УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

ТОМ XXI 1946 ВЫП. 2

ОБЗОРНЫЕ И ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФОТОСИНТЕЗЕ

А. А. КРАСНОВСКИЙ (Москва)

Фотосинтез — процесс ассимиляции углекислоты в зеленых частях растений — лежит в основе жизни на нашей планете. Изучение фотосинтеза за последние 6—7 лет привело к открытию ряда новых фактов и созданию новых теорий, более полно отражающих сущность явления, хотя и достаточно еще далеких от совершенства.

Бóльшая часть работ в области фотосинтеза за последние годы проведена в США; для этих работ характерна тесная кооперация между учеными различных специальностей — физиками, химиками, биологами, радиохимиками и пр.

Действительно, фотосинтез уже давно перестал быть областью биологии, а стал в равной мере областью насущных интересов химии и физики. Классические методы биологии и биохимии уже давно стали недостаточными для изучения интересующей нас проблемы; растущая специализация различных отраслей науки привела к невозможности сосредоточения в одних руках современных прецизионных биологических, химических и физических методов исследования.

Например, при изучении фотосинтеза успешно применяются «меченные» радиоактивными изотопами молекулы, прецизионная спектроскопия в инфракрасной, ультрафиолетовой и видимой части спектра, измерение флуоресценции, полярография, различные виды потенциометрии, электронная микроскопия, ультразвук, ряд специальных химических методов исследования.

Нужен был гений Тимирязева, сумевшего в свое время использовать последние методические достижения физики и химии для изучения фотосинтеза и установления роли хлорофилла.

Литература по фотосинтезу за последние 6—7 лет огромна. В настоящем обзоре делается попытка отражения наиболее существенных результатов, отнюдь не претендующая на библиографическую полноту; также не будут отражены работы в теории, уже описанные в отечественных обзорах Любименко (1935), Крашенинникова (1935) и Некрасова (1937).

Первая часть обзора посвящена изложению нового экспериментального материала, вторая часть — теории фотосинтеза.

I. ЭНЕРГЕТИКА ФОТОСИНТЕЗА

Реакция между углекислотой и водой, ведущая к образованию сахаров

$$CO_2 + H_2O \rightarrow {}^1/_6C_6H_{12}O_6 + O_2$$

идет с увеличением свободной энергии системы $+\Delta F = 132$ кал (Frank, Herzfeld, 1941).. Это значит, что в изолированной системе рассматриваемая реакция термодинамически невозможна. Согласно второму за-

кону термодинамики, возможность реакции определяется уменьшением свободной энергии системы. С этой точки зрения возможно течение реакции, обратной фотосинтезу,— окисление сахаров с образованием в конечном счете углекислоты и воды (дыхание).

Чтобы осуществить реакцию синтеза органического вещества из углекислоты и воды, необходимо, таким образом, прежде всего компенсировать дефицит свободной энергии системы путем подвода энергии извне. Однако точная компенсация энергетического дефицита еще недостаточна для того, чтобы обеспечить течение процесса, идущего через ряд промежуточных ступеней.

Равновесные, термодинамические условия возможности процесса ничего не говорят о скорости его течения; например, реакция между молекулярными водородом и кислородом, вообще идущая с большим уменьшением свободной энергии, в отсутствие катализаторов практически не идет. Для того, чтобы реакция прошла с измеримой скоростью, молекулы реагирующих веществ должны обладать определенной величиной избыточной энергии — энергией активации, расходуемой на ослабление междумолекулярных связей и создающей возможность перегруппировки атомов в новые, термодинамически более выгодные молекулярные конфигурации.

Величина этого потенциального барьера различна для различных реакций и приближается к нулю для реакций, идущих с участием свободных атомов или ионов.

При фотохимических реакциях энергия активации расходуется часто более расточительно, чем при реакциях термических. Например, термическое разложение иодистого водорода на иод и водород требует энергии активации 44 кал/мол, тогда как фотохимическое разложение иодистого водорода, идущее через диссоциацию молекулы на атомарные иод и водород, требует 68 кал/мол.

Таким образом, чтобы обеспечить возможность течения реакции ассимиляции углекислоты с измеримой скоростью, нужно, в общем случае, подвести энергию в количестве большем, чем 132 калорий, на молекулу углекислоты.

В живущих на нашей планете организмах источником этой энергии служит излучение солнца или, в разнообразных хемосинтезирующих бактериях и клетках, экзотермические окислительные реакции: окисление сероводорода (серные бактерии), окисление аммиака в азотистую кислоту и окисление последней в азотную (нитрифицирующие бактерии), окисление окисного железа в закисное (железобактерии) и т. д.

Роль хемосинтезирующих организмов, эволюционно более старых, в общем балансе связывания углекислоты на земле не велика по сравнению с ролью зеленых растений.

Минимальное число квантов света в области максимума поглощения хлорофилла (длина волны 7000 Å, $Nh\nu = 38$ кал), нужное для компенсации энергетического дефицита процесса ассимиляции, составляет:

$$\frac{132}{38} = 3{,}4 \ h\nu/\text{мол. } CO_2.$$

В известных работах Варбурга и Негелейна (Warburg, Negelein, 1923) квантовый выход фотосинтеза, т. е. количество молекул углекислоты, реагирующих на квант поглощенного света, определен равным около 0,25 мол. $CO_2/h\nu$, т. е. по этим измерениям на восстановление одной молекулы углекислоты расходуется 4 кванта красного света.

За последние 5—6 лет в ряде американских лабораторий был уточнен метод определения квантового выхода и произведены тщательно выполненные работы на различных типах растительного материала.

Эти работы показали, что квантовый выход фотосинтеза значительно ниже величины, определенной Варбургом и Негелейном.

Эмерсон и Льюис (Emerson, Lewis, 1939, 1941, 1943) произвели тщательную проверку манометрического метода. Был сделан ряд уточнений, основанных на более правильном учете количества кислорода, потребляемого при дыхании (обычно принимается, что интенсивность дыхания в темноте и на свету одинакова; измерение ведется при одинаковых кратковременных промежутках темноты и освещения), учете различного насыщения раствора углекислотой и кислородом и, вследствие этого, колебания отношения CO_2/O_2 в течение процесса, более точном определении количества света, рассеиваемого с суспензией водорослей Chlorella — этого классического объекта исследований — и т. д.

В ряде опытов были получены величины квантового выхода от 0,08 до 0,12.

Маннинг, Штауффер и др. (Manning, Stauffer et al., 1938) при изучении квантового выхода фотосинтеза измеряли количество потребляемой углекислоты газоабсорбционным методом и количество выделяющегося кислорода по Винклеру.

Петеринг, Даггар и Дэниэлс (Petering, Duggar, Daniels, 1939), а также Дэттон и Мэннинг (Datton, Manning, 1941) измеряли количество выделяющегося кислорода полярометрически с помощью ртутного капельного электрода.

Мэджи, Деуитт и сотр. (Magee, Dewitt et al., 1939) измеряли калориметрически количество световой энергии, деградирующей при фотосинтезе в тепло.

Во всех этих работах, произведенных с различными объектами исследования, величина квантового выхода колебалась от 0,04 до 0,11.

Измерения Эймерс и Вассинк (Eymers, Wassink, 1938), проделанные над фотосинтезирующими красными сернистыми бактериями, дали величину квантового выхода от 0,06 до 0,08.

Измерения Френч (French, 1937) для пурпурных бактерий (Spirillum rubrum) дали величину квантового выхода 0,07.

Для растений следует считать наиболее вероятной величиной квантового выхода 0,08—0,12, т. е. от 8 до 12 квантов на молекулу ассимилированной углекислоты.

Таким образом, энергетический баланс фотосинтеза можно грубо представить следующим образом: при квантовом выходе 0,1 для красного света $\lambda = 7000$ Å:

1) расходуется на покрытие дефицита свободной энергии 3,4 кванта;

2) расходуется в виде энергии активации промежуточных реакций и деградирует в тепло 6,6 кванта;

3) отдается в виде флуоресцентного излучения (по измерениям Франка и сотр., 1941) $\sim 0{,}001$ кванта.

II. ПРИРОДА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

О роли каротиноидов при фотосинтезе

Фотосинтез является типичной фотосенсибилизированной реакцией: солнечная энергия, воспринимаемая системой пигментов хлоропласта в видимой части спектра, передается реагирующим углекислоте и воде, которые не поглощают свет видимой и близкой ультрафиолетовой части спектра. То, что хлорофилл является фотосенсибилизатором ассимиляционного процесса, было установлено уже давно в классических работах К. А. Тимирязева.

Однако вопрос о роли каротиноидов, являющихся непременными компонентами пигментной системы хлоропласта, до последнего времени оставался неясным.

Уточнение методики определения квантового выхода фотосинтеза при монохроматическом облучении привело к возможности выявления фотосинтетической активности каротиноидов.

Дэттон и Маннинг (1941) исследовали квантовый выход фотосинтеза у водорослей Nitzshia closterium при различных длинах волн и при малой интенсивности света, когда минимальна роль факторов, ограничивающих фотохимическую реакцию.

Эта водоросль обладает высоким содержанием каротиноидов, почему и является благодарным объектом для исследования. Ход фотосин-

теза изучался по изменению концентрации растворенного кислорода, определяемой полярографически. Пигменты хлоропласта — β-каротин, фикоксантин, хлорофиллы — разделялись хромографически на сахаре.

Были измерены спектры поглощения ацетоновых экстрактов и суспензии хлоропластов. При этом наблюдалось смещение максимума поглощения суспензии на 200±40 Å в красную сторону по сравнению с поглощением экстрактов. Наиболее существенные результаты видны из нижеследующей таблицы:

Длина волны Å	% света, абсорбированного каротиноидами	Квантовый выход	Число пар экспериментов
4047—78	38	0,057	6
6550	0	0,052	
4358	49	0,064	7
6650	0	0,063	
4960	93	0,059	9
6650	0	0,080	
5461	48	0,065	7
6650	0	0,060	

Из таблицы видно, что величина квантового выхода в спектральных диапазонах, где доминирует поглощение каротиноидов или поглощение хлорофилла, остается практически неизменной. Отсюда сделан вывод о фотосинтетической активности каротиноидов.

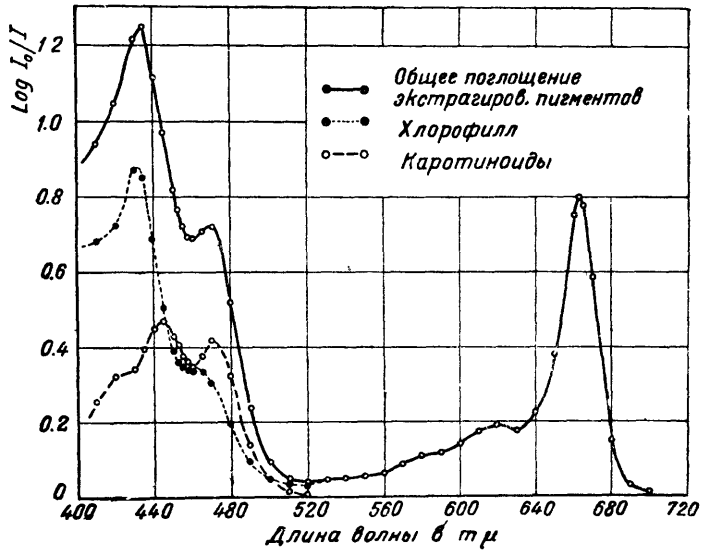


Рис. 1. Спектры поглощения растворов пигментов (в этиловом спирте), количественно экстрагированных из Chlorella

Аналогичные исследования провели Эмерсон и Льюис (Emerson, Lewis, 1942) над синезеленой водорослью Chroöcoccus, подтвердившие участие каротиноидов в фотохимической стадии фотосинтеза. В 1943 г. те же авторы произвели тщательное исследование квантового выхода фотосинтеза на классическом объекте исследования — водоросли *Chlorella pyrenoidosa.

Основные экспериментальные результаты показаны на рис. 1, 2, 3.

Колебания в величине квантового выхода в волновом диапазоне 4000—7000 Å наблюдались в пределах от 0,068 до 0,09, т. е. наимень-

шая величина квантового выхода, находящаяся в области поглощения каротиноидов, отличается от наибольшей его величины, лежащей в

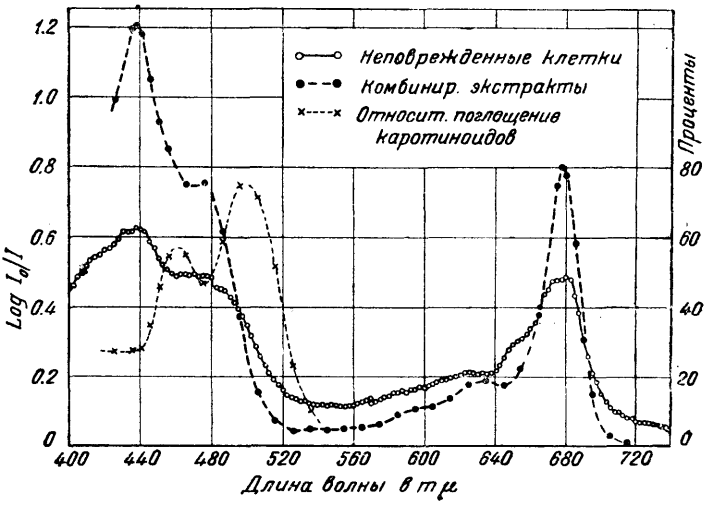


Рис. 2. Сопоставление спектров поглощения экстрагированных пигментов и неповрежденных клеток Chlorella

области максимума поглощения хлорофилла, приблизительно на 30%, тогда как в области минимума квантового выхода, между 4900 и 5100 Å, желтые пигменты абсорбируют около 70% всей радиации.

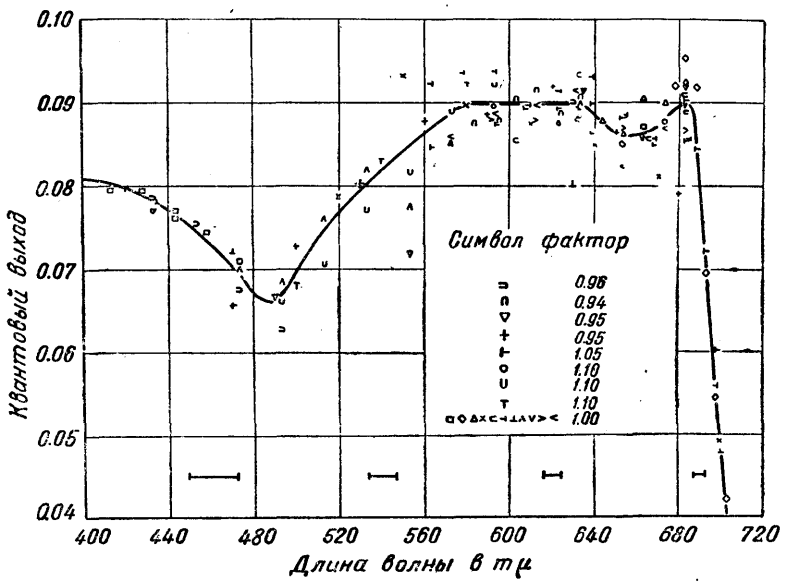


Рис. 3. Зависимость квантового выхода фотосинтеза от длины волны для Chlorella

Примечание. Экспериментальные данные каждого из девятнадцати проведенных опытов обозначены соответствующим символом. Для восьми опытов, дающих разброс, превышающий среднее значение квантового выхода, введен корректирующий фактор в пределах 0,9—1,1.

Наблюдаемые факты также свидетельствуют о том, что каротиноиды участвуют в процессе фотосинтеза как сенсибилизаторы, так как, в соответствии с законом Эйнштейна, можно было бы ожидать независимости квантового выхода от длины волны, хотя бы в фотосинтетически активной области поглощения хлорофилла.

Вероятно, в процессе эволюции растения, в ранние периоды жизни

нашей планеты, когда максимум солнечного излучения, достигающего поверхности земли, был сдвинут дальше в коротковолновую область спектра, роль каротиноидов в работе фотосинтетического аппарата была более значительна. Эволюционное приспособление растения к изменяющемуся световому режиму привело к повышению удельного значения хлорофилла, вещества более сложно построенного по сравнению с каротиноидами, служащими к тому же строительным материалом при образовании фитольной цепочки в молекуле хлорофилла.

Весьма вероятно, что родоначальники современных фотосинтетических систем обладали в своем ассимиляционном аппарате более просто построенными пигментами, имеющими максимум поглощения в более коротковолновой области.

Следует в связи с этим заметить, что сдвиг поглощения к красной области спектра происходит при увеличении числа членов конъюгированных молекулярных систем.

Это явление хорошо изучено на примерах синтеза полиметиновых красителей — фотографических сенсибилизаторов. В пигментах, являющихся компонентами хлоропласта, носителями окраски также являются конъюгированные системы.

Эти предположения получают экспериментальное подтверждение на материалах изучения пигментного состава хлоропластов высокогорной флоры. Как известно, по мере повышения над уровнем моря, максимум излучения, проходящего через атмосферу, сдвигается к фиолетовому концу спектра. Это явление объясняется значительным светопоглощением и светорассеянием молекулярно дисперсными и коллоидными (пыль, туман) компонентами земной атмосферы.

При исследовании альпийских растений Хенрици (Henrici, 1921) установил, что содержание хлорофилла в растениях уменьшается с поднятием в горы.

Н. М. Сисакян любезно указал нам на неопубликованные работы А. Ф. Самойлова, который установил повышенное содержание каротина в горных растениях Туркмении.

III. О ФОРМЕ СВЯЗИ ХЛОРОФИЛЛА В ХЛОРОПЛАСТЕ

Уже давно было установлено, что спектр поглощения живого листа отличается от спектра поглощения экстрактов хлорофилла в ацетоне, спирте, бензоле и других органических растворителях.

Максимум поглощения хлорофилла в листе сдвинут в красную сторону по сравнению со спектром поглощения раствора.

Растворы хлорофилла обладают яркой огненно-красной флуоресценцией, тогда как пластиды листа флуоресцируют весьма слабо.

При воздействиях, вызывающих денатурацию белков, хлоропласт распадается с выделением пигмента, извлекаемого растворителем.

Исходя из наблюдений, М. С. Цвет еще в 1910 г. предположил, что хлорофилл в пластиде адсорбционно связан с белком.

В. Н. Любименко в ряде работ в 1919—1921 гг. развил представление о химической связи хлорофилла со специфическим белком.

Смещение спектра поглощения хлорофилла в листе по сравнению с раствором в различных растениях находится в пределах 100—200 Å.

По данным Смита (Smith, 1941), коллоидный раствор хлорофилла, полученный разбавлением ацетонового раствора фосфатным буфером, имеет максимум поглощения в пределах 6710—6730 Å, тогда как максимум поглощения водного экстракта листа, где не нарушена связь между белком и пигментом, находится в пределах 6770—6780 Å.

В очищенных хлоропластах Смит наблюдал постоянство соотношения хлорофилла и белка в двух исследованных видах растений (16.5% хлорофилла по отношению к азоту белка).

Молекулярный вес белково-хлорофиллового комплекса, определенный с помощью ультрацентрифуги, оказался равным 265 000.

Вассинк и сотр. (Wassink et al., 1939) измерили спектр поглощения фотосинтезирующих бактерий и спиртовых экстрактов бактериохлорофилла. Экстракт обладал максимумом поглощения при 7740 Å, тогда как живые клетки обнаружили три четких максимума при 8000, 8500 и 8950 Å. Авторы полагают, что бактериохлорофилл в фотосинтезирующей клетке связан с тремя различными видами белка, что и приводит к появлению трех максимумов.

Следует также указать на работы по изучению оптических и химических свойств бактериохлорофилла, которые произвели Френч (1940), а также Катц и Вассинк (Katz, Wassink, 1939).

Более подробно литература по оптическим свойствам пластид и пигментов приведена в недавнем обзоре Стрэйна (Strain, 1944).

В настоящее время можно считать установленным, что хлорофилл, так же как и простетические группы многих ферментов, химически или адсорбционно связан со специфическим белком. Не всегда можно провести четкую грань между химическим и адсорбционным соединением.

Природа этого белка и его молекулярный вес остаются неизвестными. Экспериментальные трудности при его выделении чрезвычайно велики. Если разделение хлорофиллов из раствора (после нарушения их связи с белком) хроматографическим методом Цвета ныне не вызывает затруднений, то разделение белковых соединений ряда пигментов и ферментов, существующих в хлоропласте, доныне не достигнуто. Трудности усугубляются тем, что при механическом нарушении структуры хлоропласта возможны существенные нарушения химической связи компонентов системы из-за взаимодействия веществ гетерогенно отграниченных в живой клетке.

Для установления природы фотосинтетического процесса многое могло бы дать знание субмикроскопической структуры хлоропласта.

Цитологическое изучение (см. обзор Weier, 1938) привело к заключению, что хлоропласт состоит из бесцветной стромы основного вещества, в котором взвешены диски хлорофиллсодержащей цитоплазмы.

В некоторых случаях возможна гомогенная или гетерогенная, полосатая структура пластид; однако причины, вызывающие эти изменения, не ясны.

Робертс (Roberts, 1942) при наблюдении хлоропластов помощью электронного микроскопа показал, что они обладают сложной гетерогенной структурой.

Нейш (Neish, 1939) изучал микрораспределение металлов между хлоропластом и остальной частью клетки. Оказалось, что бóльшая часть железа и меди концентрирована в хлоропласте. Вероятно, железо хлоропласта находится в виде железо-порфириновых ферментов, наличие которых в листе показано уже давно. При этом особое внимание уделялось роли каталазы, освобождающей кислород из перекисных соединений, образующихся в процессе фотосинтеза.

Положение «о перекисном» происхождении кислорода, выделяющегося при фотосинтезе, впервые высказанное А. Н. Бахом в 1893 г., полностью сохранило свое значение поныне.

Жиро и сотр. (Gireaud et al., 1935) установили параллелизм между содержанием хлорофилла и аскорбиновой кислоты в листе. Участие этого универсального компонента биологических окислительно-восстановительных процессов при фотосинтезе обсуждено в обзорах А. М. Кузина (1940) и Б. А. Благовещенского (1940).

Содержание всей меди клетки в составе хлоропласта в известной мере подтверждает участие аскорбиновой кислоты в процессах, текущих

в хлоропласте; как известно, фермент, управляющий окислением витамина С — аскорбиноксидаза, является производным меди. Однако заключение об участии аскорбиновой кислоты в процессе фотосинтеза требует более определенных экспериментальных доказательств. В растительной клетке происходят не только фотосинтетические, но и темновые окислительно-восстановительные процессы, связанные с дыханием и иными процессами метаболизма, участие в которых аскорбиновой кислоты показано экспериментально.

IV. БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФОТОСИНТЕЗ

За последние годы чрезвычайно возрос интерес исследователей к бактериальному фотосинтезу, известному в природе в виде ряда модификаций. Его изучение дало много нового для познания весьма сходных процессов, текущих в зеленом листе. В отличие от фотосинтеза в растении, при бактериальном фотосинтезе кислород воды не выделяется в молекулярном виде, а используется для окисления ряда органических и неорганических соединений — доноров водорода.

Известные фотосинтезирующие бактерии можно грубо разделить на три группы:

1) зеленые бактерии, использующие в качестве донора водорода исключительно сероводород;

2) красные сернистые бактерии (Thiorodaceae), использующие сернистые соединения: свободную серу, сероводород, сульфиты, тиосульфат и пр.;

3) пурпурные бактерии (Athiorodaceae), использующие органические доноры водорода: жирные кислоты, пропиловый спирт и пр. Некоторые виды (Rhodovibrio) способны потреблять молекулярный водород.

Общий вид текущих при этом реакций может быть выражен уравнением:

$$nCO_2 + 2nH_2A \rightarrow (CH_2O)_n + 2nA + nH_2O,$$

где А — радикал донора водорода.

Франк и Гаффрон (Frank, Haffron, 1941) формулируют следующую краткую сводку экспериментально установленных фактов:

1) Бактериальный фотосинтез происходит в анаэробных условиях при действии излучения, поглощаемого бактериохлорофиллом, сходным по своему строению с растительным хлорофиллом. Длинноволновая граница фотосинтеза лежит в инфракрасной области спектра около 9000 Å.

2) Фотохимическое восстановление происходит лишь в присутствии определенных неорганических или органических соединений — доноров водорода. Количество восстановленной углекислоты стехиометрически соответствует количеству окисленного донора водорода

3) Образование свободного кислорода никогда не наблюдалось среди фотосинтезирующих бактерий.

Ван-Нил (van Niel, 1936) предложил следующую гипотезу о механизме бактериального фотосинтеза, широко использованную авторами последующих теорий фотосинтеза в зеленых частях растений (в основе этой гипотезы лежит представление о фотосинтезе как о сопряженном окислительно-восстановительном процессе, на что указывал А. Н. Бах еще в 1893 г.):

1) пигментная система, поглощая квант света, активируется таким образом, что может служить донором водорода при восстановлении углекислоты;

2) углекислота восстанавливается темновым путем активированной пигментной системой; последняя при этом переходит в окисленный комплекс;

3) окисленный комплекс регенерируется в первоначальное состояние донорами водорода H_2A темновым путем.

Гаффрон высказал положение, что различие между бактериальным и растительным фотосинтезом состоит лишь в способе регенерации окисленной части системы, находящейся в виде перекисного соединения.

Эта перекись может быть либо разложена каталазой с выделением свободного кислорода, что имеет место в растительной клетке, либо восстановлена каким-либо донором водорода, что происходит при бактериальном фотосинтезе. В соответствии с этим при дезактивации каталазной системы хлоропласта растения и при наличии соответствующих восстановителей можно было бы ожидать превращения растения по характеру фотосинтеза в пурпурную бактерию.

Гаффрону удалось это показать экспериментально в ряде работ 1939—1944 гг.

V. АДАПТИРОВАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Оказалось, что анаэробное развитие некоторых водорослей — Scenedesmus, Ankistrodesmus, Raphidium — в атмосфере водорода приводит к потреблению молекулярного водорода с восстановлением эквивалентного количества углекислоты.

$$CO_2 + 2H_2 \rightarrow {}^1/_6C_6H_{12}O_6 + H_2O$$

Это изменение фотосинтетического аппарата обратимо.

При достижении определенной интенсивности освещения, а также под влиянием кислорода наблюдается переход в нормальный тип фотосинтеза с выделением молекулярного кислорода.

Гаффрон в 1942 г. показал также, что адаптированные к водороду водоросли обладают способностью в темновых условиях катализировать реакцию молекулярного водорода с кислородом, при одновременном использовании энергии этой реакции для ассимиляции углекислоты.

Гаффрон и Рубин (Haffron, Rubin, 1942) нашли далее, что подобные адаптированные системы показывают эффект фотохимического выделения водорода в присутствии глюкозы или иных доноров водорода. Обращение обычного типа фотосинтеза в адаптированных системах Гаффрон объясняет образованием (или активацией уже имеющейся) гидрогеназы в процессе водородной адаптации.

Работы последнего времени, посвященные изучению природы гидрогеназы (Lippmann, 1943), приходят к заключению, что этот фермент является соединением двухвалентного железа.

Понятно поэтому дезактивирующее действие кислорода и необходимость «восстановительной» среды для активации гидрогеназы, а может быть, и ее образования из железо-порфириновых ферментов, построенных на основе трехвалентного железа.

Явление обращения фотовосстановления в обычный тип фотосинтеза в присутствии кислорода объясняется, с этой точки зрения, дезактивацией (окислением) гидрогеназы, а реверсивный эффект, наблюдающийся при повышении интенсивности освещения, обязан тому, что в этом случае скорость накопления перекисных соединений превышает скорость их восстановления аппаратом гидрогеназы. Накапливающийся в системе избыток перекисей разлагается обычным путем на каталазе.

Последняя концепция требует дополнительных экспериментальных доказательств.

Действительно, возможны два допущения:

1) Процесс освобождения молекулярного кислорода универсален для всех фотосинтетических систем — растительных и бактериальных;

в последнем случае у адаптированных систем имеет место вторичное восстановление выделяющегося молекулярного кислорода.

2) Процесс восстановления окисленной части системы (находящейся в форме перекиси) универсален для всех клеток, но в зеленом растении он сопряжен с выделением газообразного кислорода в результате разложения этой перекиси.

Более вероятен второй механизм. Дудеров (Douderoff, 1942) пытался исследовать выделение свободного кислорода при деятельности «восстановленной формы» водорослей по методу Энгельмана (свечение люминесцирующих бактерий в присутствии следов кислорода), но не получил однозначных результатов, тогда как в случае выделения молекулярного кислорода, при парциальном его давлении в клетке, соответствующем давлению в окружающей атмосфере, следовало ожидать интенсивного свечения индицирующих бактерий.

Несомненно также, что энергетически более выгоден путь непосредственного восстановления перекисей, чем восстановление выделяющегося молекулярного кислорода, вероятно потребовавший бы к тому же действия вспомогательных ферментативных систем.

VI. КИНЕТИКА ФОТОСИНТЕЗА

В предыдущем изложении неоднократно указывалось, что фотосинтез представляет собой комплекс фотохимических и темновых реакций.

Экспериментальные доказательства наличия темновых звеньев процесса были впервые получены Блекманом и Варбургом и исследованы Вильштеттером, а также рядом других ученых.

Очевидность темнового процесса была показана при изучении зависимости скорости фотосинтеза от интенсивности света. При увеличении интенсивности света скорость фотосинтеза достигает предельного значения.

Порог насыщения обычно составляет 10—20 тыс. метро-свечей.

При большой интенсивности света (более 12 000 метро-свечей) Майерс и Барр (Myers, Burr, 1940) наблюдали увеличение потребления кислорода по сравнению с дыханием в темноте, что объясняется относительным увеличением скорости фотоокислительных процессов.

При малой интенсивности света температурный коэффициент фотосинтеза очень мал ($\sim 1{,}05$). Это говорит о том, что скорость реакции лимитируется фотохимическим процессом, обладающим, обычно, весьма малой величиной температурного коэффициента, так как источником энергии активации в этом случае является не максвелл-больцмановское распределение тепловой энергии молекул, а привносимые извне кванты света, соответствующие высоким энергетическим уровням молекул, могущим быть достигнутыми лишь при температуре в несколько тысяч градусов. Наоборот, при больших интенсивностях света, когда процесс лимитируется темновой реакцией, температурный коэффициент фотосинтеза принимает величину около 2, лежащую в пределах, свойственных темновым реакциям.

Подобным же образом, Варбург нашел, что фотосинтез при достижении светового насыщения более чувствителен к таким типичным ядам железо-порфириновых катализаторов, как синильная кислота, чем при малых интенсивностях света.

Продолжительность темновой реакции и влияние различных факторов на ее течение было далее исследовано в известных работах Варбурга, Эмерсона и Арнольда с прерывистым освещением, повторенных недавно Уэллером и Франком (Weller, Frank, 1941).

Применение вращающихся дисков с прорезанными секторами различной площади и вспышки неоновой лампы при разряде конденсатора

дало возможность авторам варьировать величины темнового и светового промежутков.

Исследовался выход фотосинтеза на световую вспышку 10^{-5} сек при различной длительности темнового промежутка. Оказалось, что величина выхода гиперболически растет до максимального значения темновой паузы 0,02 сек. (при температуре 25° С).

При понижении температуры длительность темновой реакции, как и следовало бы ожидать, сильно возрастает. Яды (синильная кислота, уретан и др.) также влияют на вид зависимости выход фотосинтеза — величина темнового промежутка, а также на длительность последнего. Это интерпретировано как выключение ряда каталитических систем аппарата фотосинтеза в результате отравления.

Эмерсон и Арнольд (1932) установили тот факт, что отношение количества молекул хлорофилла, поглощающего свет (A), к количеству восстановленных молекул углекислоты (B) на световую вспышку составляет около 3000.

Для нахождения этой величины определялось калориметрически количество хлорофилла в изучаемом объекте и количество поглощенного CO_2 манометрическим методом.

В последующих работах Эмерсон, Грин и Уэбб (Emerson, Green, Webb, 1940) изучали скорость фотосинтеза в прерывистом свете в зависимости от условий роста и возраста культуры Chlorella pyrenoidosa.

Соотношение A/B на вспышку 10^{-5} сек. колебалось в зависимости от объекта от 3750 до 14 500.

Эти данные, свидетельствующие, на первый взгляд, об участии тысяч молекул хлорофилла при восстановлении молекулы CO_2, были использованы в свое время Гаффроном и Волем (Wohl, 1936) при создании теории «фотосинтетической единицы», на которой мы подробнее остановимся в дальнейшем.

Итак, экспериментально очевидным является наличие темновых реакций при фотосинтезе.

Судя по ряду косвенных доказательств (отравление темновой фазы типичными каталазными ядами), можно было предполагать, что эта реакция заключается в разложении перекисных соединений.

Однако ряд работ 1938—1942 гг. и особенно исследований, применивших метод радиоактивных изотопов, показал, что имеют место также темновые реакции иного типа, заключающиеся в химическом связывании углекислоты.

VII. ТЕМНОВАЯ ФИКСАЦИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ

В настоящее время можно считать установленным, что CO_2 не является конечным продуктом клеточного метаболизма, а сама является метаболитом (см. обзор Krebs, 1943). Темновая ассимиляция углекислоты аутотрофными хемосинтезирующими бактериями за счет энергии ряда окислительных реакций известна уже давно (см. обзоры Stephenson, 1939; Wood a. Werkman, 1942); однако наличие темнового связывания углекислоты аутотропными фотосинтезирующими растительными клетками было показано лишь в 1939 г., в известных работах Рубена с радиоактивным изотопом углерода C^{11} *.

В свете этих работ весьма вероятным является положение, высказанное Гаффроном, что темновое химическое восстановление углекислоты возможно в любой живой клетке.

---

* Радиоактивный углекислый газ $C^{11}O_2$ был также успешно применен для исследования восстановления CO_2 гетеротропными бактериями (Ruben, Kamen, 1940; Evans, Slotin, 1940).

Остановимся несколько подробнее на этих работах Рубена и сотр. (Ruben, Kamen, Hassid, de Voult, 1939).

Опыты ставились с водорослью Chlorella pyrenoidosa. Газовый обмен определялся манометрическим методом, количество связанного $C^{11}O_2$ — обычными методами измерения радиоактивности.

Оказалось, что 85—95% связанного в темноте радиоактивного углерода экстрагировалось водой; водный экстракт осаждался солями $Pb^{..}$ или $Ba^{..}$; при этом радиоактивность переходила в осадок. На основании этих наблюдений авторы заключают, что C^{11} находится в карбоксильной группе и темновая реакция фотосинтеза заключается в карбоксилировании.

$$CO_2 + RH \rightleftarrows RC\begin{matrix}O\\ \diagup\\ \diagdown\\ OH\end{matrix}$$

Определенный диффузионным методом молекулярный вес этого карбоксилированного соединения оказался равным $\sim$ 1000. Количество связанного в темноте CO_2 оказалось, приблизительно, эквимолекулярным количеству находящегося в клетке хлорофилла.

Темновое потребление CO_2 высшими растениями также обнаружил при внезапном прекращении освещения Мак-Алистер (McAlister, 1939).

Оказалось, что темновое связывание CO_2 отравляется цианидом; отсюда было сделано заключение, что эта реакция управляется ферментативной системой.

Следует отметить, что в известных реакциях карбоксилирования изменение свободной энергии $\Delta F_{298^\circ K} \cong +10$ кал. Это значит, что при обычной температуре такая реакция термодинамически невозможна.

Рубен (1943) предположил, что при темновом связывании участвуют энергетически богатые фосфорилированные компоненты, за счет чего изменяется знак ΔF.

Согласно предположению Рубена, фотохимическая реакция заключается в восстановлении карбоксильной группы в гидроксильную:

$$RCOOH + H_2O + h\nu \rightarrow RCH_2OH + O_2.$$

Хотя образование при фотосинтезе карбоксилированного соединения установлено уже 6 лет тому назад, до сих пор в литературе отсутствуют исследования, посвященные изучению его строения, хотя это соединение и может быть выделено в количествах, достаточных для современных микроаналитических методов. Значительным препятствием является, повидимому, небольшой период полураспада радиоактивного изотопа C^{11}. Виноградов и Тейс (1941) показали, что изотопный состав речной воды подобен изотопному составу воды, полученной из кислорода фотосинтетического происхождения (прецизионным методом измерения плотности воды).

Опыты Рубена и сотр. (Ruben, Randall, Kamen, Hyde, 1941) с радиоактивным кислородом O_{18} также показали, что выделяющийся при фотосинтезе кислород принадлежит воде. Этот факт имеет большое значение при построении теории фотосинтеза.

Во всех исследованиях нигде не был обнаружен формальдегид, являющийся, согласно известной теории Байера, первичным продуктом фотосинтеза.

Повидимому, более вероятным является получение сахаров ступенчатым восстановлением первичных карбоксилированных соединений.

VIII. ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ИНДУКЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ

Изучение фотосинтетического аппарата без нарушения структуры живой клетки весьма важно для познания природы процесса. Обычные химические и физические методы изучения фотосинтеза часто связаны с нарушением нормальных условий работы фотосинтетического аппа-

рата. Поэтому чрезвычайно ценен метод, позволяющий судить о течении элементарных процессов энергетического обмена пигментной системой хлоропласта без нарушения его нормальной деятельности. Одним из таких методов является изучение флуоресценции живого листа. Работы последних лет в этом направлении позволили получить ряд интересных данных.

При поглощении кванта света внешний электрон молекулы смещается на более высокий энергетический уровень:

$$AB + h\nu \rightarrow AB^*.$$

Возбужденная молекула AB^* может претерпеть следующие превращения:

1. Возвращение на более низкий энергетический уровень с испусканием флуоресцентного излучения

$$AB^* \rightarrow AB + h\nu_1.$$

2. Энергия возбуждения может быть использована для осуществления химических превращений: диссоциации молекулы AB или в качестве энергии активации при реакции с другой молекулой:

$$AB^* \rightarrow A + B,$$
$$AB^* + C \rightarrow AC + B.$$

3. Электронная энергия возбуждения может быть передана другой молекуле, возбуждающейся в результате соударения (общий случай сенсибилизации):

$$AB + C_4 \rightarrow AB + C^*.$$

4. Наконец, электронная энергия возбуждения может деградировать в виде колебательной и, в конечном счете, тепловой энергии:

$$AB^* + AB \rightarrow 2\vec{AB},$$
$$AB^* + C \rightarrow \vec{AB} + \vec{C}.$$

В наиболее «чистом» виде эти возможности реализуются в газовой фазе; в конденсированной (жидкой и твердой) фазе из-за тесного взаимодействия между молекулами исчезает определенность энергетических уровней, и эти возможности осложняются. Если в газовой фазе энергетические превращения атомов и молекул могут быть спектроскопически установлены благодаря дискретности спектров, то в конденсированной фазе это возможно лишь в очень редких случаях, когда растворенное вещество обладает дискретным видом спектрального поглощения и флуоресценции. Обычно спектры поглощения растворов представляют собой более или менее широкие полосы, не обладающие тонкой структурой из-за постоянного взаимодействия с молекулами растворителя.

Уже давно было замечено, что фотосенсибилизирующими свойствами (в том числе «фотодинамическим действием» — см. Blum, Spealman, 1941) обладают преимущественно флуоресцирующие красители.

Флуоресценция свидетельствует о том, что столкновения возбужденных молекул красителя с молекулами среды мало эффективны и возбужденное состояние обладает продолжительностью жизни вообще большей, чем продолжительность жизни возбужденного состояния нефлуоресцирующих молекул.

Молекулы, обладающие длительно живущим возбужденным состоянием, играют большую роль в фотохимии. Такие молекулы могут обладать не только флуоресценцией, но и фосфоресценцией, послесвечением после прекращения освещения. Очень многие флуоресцирующие в водных растворах красители фосфоресцируют в «жесткой» среде и

при охлаждении, когда уменьшение термической подвижности молекул благоприятствует сохранению в них энергии на больший срок.

Например, период времени между соударениями молекул красителя в растворе составляет $\sim 10^{-8}$ сек.

Весьма распространены так называемые метастабильные, длительно живущие состояния (E), когда возвращению электрона на низший уровень препятствуют спектроскопические правила отбора: гораздо более вероятно возвращение электрона «вниз» с более высокого уровня E_1; подъем электрона с уровня E до E_1 осуществляется за счет термических флуктуаций. Подобные состояния могут обладать длительностью жизни до нескольких секунд.

Акт гашения флуоресценции молекулы сенсибилизатора посторонней молекулой свидетельствует либо о восприятии этой молекулой энергии возбуждения, либо о деградации электронной энергии возбуждения иным путем (подробнее см. Шпольский и Гришкун, 1944, а также раздел «Теория фотосинтеза»).

Первая возможность наблюдается достаточно часто; это привело к распространенному заключению о том, что акт гашения флуоресценции является первичным актом сенсибилизированной реакции.

Изменение флуоресценции хлорофилла в растительной клетке под влиянием различных воздействий является «качественной» реакцией на изменение условий энергетического обмена.

Франк, Френч и Пак (Frank, French, Puck, 1941) изучали на специально сконструированной установке флуоресценцию листа в различных условиях. Мак-Алистер и Майерс (McAlister, Myers, 1940), Вассинк и Катц (Wassink, Katz, 1939) и другие исследователи измеряли одновременно флуоресценцию листа и кинетику потребления углекислоты при стационарном режиме и в течение индукционного периода. Эти работы подробно описаны в обзоре С. Я. Свешникова (1944), поэтому мы остановимся здесь лишь вкратце на результатах этих работ.

Хлорофилл в растворе (бензольном, спиртовом и пр.) обладает характерной огненнокрасной флуоресценцией, спектр которой подробно исследован (см., например, Dhéré, 1937).

Напротив того, хлорофилл в виде водного коллоидного раствора не флуоресцирует.

Интенсивность флуоресценции хлорофилла в листе значительно ниже (квантовый выход 0,001), чем у хлорофилла в растворе, что свидетельствует об эффективной трансформации энергии при связи хлорофилла со специфическим белком в аппарате листа.

При освещении листа после темнового промежутка, до установления стационарной величины газообмена, наблюдается индукционный период в течение 1—3 мин.; количество углекислоты, поглощенной за время индукционного периода, приблизительно соответствует наличному количеству молекул хлорофилла.

Одновременное измерение интенсивности флуоресценции, количества поглощаемой углекислоты и выделяемого кислорода в течение индукционного периода представляет значительные технические трудности. Был использован ряд прецизионных методов (рис. 4).

Мак-Алистер и Майерс (1940) измеряли количество поглощенного CO_2 методом инфракрасной спектроскопии; Ауфдемгартен (Aufdemgarten, 1939) пользовался для этого методом измерения теплоотдачи горячей проволоки.

Влияние различных факторов на флуоресценцию в течение индукционного и стационарного периодов различны. Экспериментальные данные позволяют сделать заключение, что факторы, вызывающие повышение интенсивности фотосинтеза, приводят к ослаблению флуоресценции и обратно

Например, «возгорание» флуоресценции наблюдается при понижении температуры и частичном отравлении фотосинтеза цианидами. Увеличение концентрации кислорода (до определенных пределов) при стационарном периоде вызывает возгорание флуоресценции, но в течение индукционного периода кислород явно гасит флуоресценцию листа.

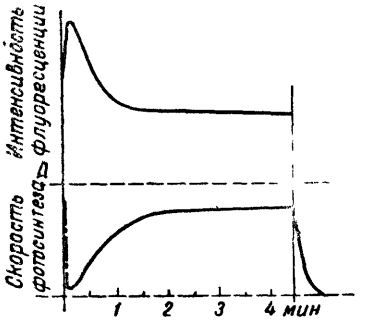


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции и скорость фотосинтеза (для побегов пшеницы) по Мак-Алистеру и Майерсу

Весьма важно установление того факта, что внезапные увеличения концентрации CO_2 над листом приводят к гашению его флуоресценции. Франк и Герцфельд усматривают в этом доказательство прямой передачи энергии возбуждения от хлорофилла к углекислоте или к связанным с ней промежуточным продуктам.

Более точные измерения газообмена в течение индукционного периода показывают наличие двух максимумов поглощения кислорода. Природа реакций, идущих во время индукционного периода, достоверно не установлена; вероятно, происходит либо накопление необходимой концентрации промежуточных продуктов, либо активация (за счет фотохимического восстановления) окисленной в темноте формы катализатора, управляющего одной из стадий фотосинтеза.

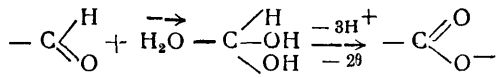
IX. ФОТОСИНТЕЗ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Биологическое восстановление углекислоты осуществляется не только в зеленых частях растений за счет подвода световой энергии. Дефицит свободной энергии в процессе ассимиляции может быть покрыт темновым путем за счет энергии экзотермических окислительных реакций не только в хемосинтезирующих бактериях, но и в адаптированных растительных клетках.

Применение метода «меченых» атомов позволило также получить многочисленные экспериментальные доказательства темновой ассимиляции углекислоты в ряде живых клеток, растительных и бактериальных; это привело к заключению, что восстановление углекислоты принципиально возможно в любой живой клетке (Гаффрон). В этом процессе могли бы быть использованы энергетически богатые фосфорилированные продукты аэробных дыхательных и анаэробных ферментативных реакций.

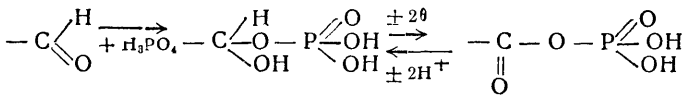
В настоящее время детально установлено значение фосфорной кислоты для сопряженных биологических окислительно-восстановительных реакций (см. Lippmann, 1941; Kalkar, 1941).

Биологическое окисление карбонильной группы в карбоксильную, являющееся важнейшим звеном в цепи реакций, обратных фотосинтезу, приводящих к «сгоранию» сахаров в организме, происходит не за счет молекулы воды:



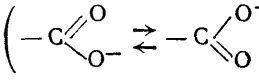
(1)

но сопровождается потреблением фосфорной кислоты:



(2)

При течении реакции по схеме (1) происходило бы значительное уменьшение свободной энергии системы за счет образования устойчивой резонирующей системы:



При осуществлении процесса в живой клетке ΔF реакции (2) весьма невелико и реакция легко обратима; в этом случае основная часть свободной энергии карбоксильной группы не выделяется, а удерживается в карбоксилфосфате.

Накапливающаяся в фосфатных связях энергия может быть реализована в виде механической работы в мышце по хорошо изученной в течение последних лет схеме:

a) карбоксилфосфат″ + аденозиндифосфат‴ → карбоксил′ + аденозинтрифосфат‴;

b) аденозинтрифосфат‴ + «сокращенный» миозин → аденозиндифосфат‴ + фосфат″ + H^+ + «расслабленный» миозин.

При реакции b) роль энзима-аденозинтрифосфатазы выполняет сам миозин, что было показано работами Энгельгардта и Любимовой (1939).

В этой важнейшей реакции, лежащей в основе получения механической работы живыми организмами за счет химической энергии превращения пищевых веществ, особое значение имеет аденозинтрифосфорная кислота, как переносчик энергии окисления карбонильных групп к сократительному веществу мышцы.

Могут ли быть использованы энергетически богатые фосфорилированные соединения не в качестве источника механической работы, а в качестве источника химической же энергии при синтетических ассимиляционных процессах?

Этот вопрос был исследован для хемосинтезирующих сернистых бактерий Thiobacillus thiooxidans, использующих для восстановления CO_2 энергию окисления серы в серную кислоту в работах Фоглера, Умбрайта и Ла-Пажа (Vogler, 1942; Vogler, Umbreit, 1942; La Page, Umbreit, 1943; Vogler, La Page, Umbreit, 1942).

Упомянутые исследователи показали, что в отсутствие углекислоты бактерии связывают неорганический фосфат в органическую форму; восстановление CO_2 сопровождается обратным выделением неорганического фосфата. Ла-Паж и Умбрайт (1943) показали также, что фосфорилированные эфиры, обнаруженные в бактериях, оказались членами цикла Мейергофа — Эмбдена.

При этом потребление неорганического фосфата сопровождается образованием аденозинтрифосфата (который, однако, оказался не аденозин-рибоза-5-трифосфатом мышц и дрожжей, а аденозин-рибоза-3-трифосфатом), разлагающимся при восстановлении углекислоты

Рубен в 1943 г. на основании соображений об энергетической невозможности темнового карбоксилирования при фотосинтезе (см. выше) предположил, что эта реакция идет с участием фосфорилированных соединений по схеме:

$$D + RH \xrightarrow[\text{энзим}]{} D + PRH, \qquad (1)$$

$$PRH + CO_2 \rightleftarrows RCOOH + \text{неорганический фосфат}, \qquad (2)$$

где PD — энергетически богатый фосфатный донор (типа аденозинтрифосфорной кислоты), PRH — фосфорилированное соединение.

Действительно, по Липпманну (1941), теплота разложения энергетически богатого фосфатного донора составляет 10—12 кал, т. е. приближенно соответствует величине энергетического дефицита реакций карбоксилирования ($\Delta F_{298}^{\circ} \sim 10$ кал).

В последней работе Эмерсона и Умбрайта (1944) даны подробные обоснования возможности фосфорилирования при фотосинтезе и проведены эксперименты, показывающие изменения в распределении органического и неорганического фосфора при разных режимах фотосинтеза (объект — Chlorella pyrenoidosa).

Авторы полагают, что фотохимическая стадия фотосинтеза заключается в образовании «энергетически богатых» фосфатных связей, а весь процесс фиксации и превращения CO_2 является цепью темновых реакций.

С этой точки зрения хлорофилл является своеобразной «фосфатазой», конвертирующей световую энергию в химическую энергию фосфорилированных соединений.

Авторы указывают на свои еще неопубликованные исследования фосфатазной активности хлорофилл-белкового комплекса.

Представление о передаче световой энергии фосфорилированным соединениям не противоречит схеме фотосинтеза Франка — Герцфельда (см. ниже); «фотопродукт» этой схемы может быть уподоблен энергетически богатому фосфорному соединению, а катализатор «В», стабилизирующий все виды фотопродуктов,— фосфатазе, переносящей энергетически богатые продукты от хлорофилла.

В экспериментальной части работы показано, что свет в отсутствие CO_2 приводит к уменьшению количества фосфора, определяемого в виде нерастворимых Ba-солей, по сравнению с темновым режимом. В присутствии CO_2, наоборот, свет приводит к увеличению этого вида связанного фосфора по сравнению с темновыми опытами.

Имеющийся экспериментальный материал пока еще не позволяет сделать однозначные выводы о роли фосфорилирования при фотосинтезе; вероятно, в ближайшее время появятся новые опытные данные, посвященные этому интересному вопросу.

Весьма заманчива мысль о том, что фотосинтез идет с участием тех же промежуточных продуктов, что и дыхание, являющееся реакцией, обратной фотосинтезу:

$$CO_2 + H_2O \underset{\text{темнота}}{\overset{\text{свет}}{\rightleftharpoons}} {}^1/_6C_6H_{12}O_6 + O_2$$

X. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОТОСИНТЕЗА

Попытки воспроизведения фотосинтеза in vitro, в системах, более простых, чем фотосинтетический аппарат растительной клетки, предпринимались с давних пор, но доныне тщетно.

Многочисленные исследователи пытались обнаружить формальдегид при фотохимическом (прямом и фотосенсибилизированном) восстановлении CO_2 и CO_3'' как в гомогенной, так и в гетерогенной системе. Однако во всех этих опытах нельзя было с достоверностью констатировать количественно наличие формальдегида или иных продуктов восстановления углекислоты.

Растворы хлорофилла (в спирте, ацетоне и прочих растворителях), обладающие флуоресценцией, показывают фотосенсибилизирующую активность, подобную активности других флуоресцирующих красителей (эозина, родамина и пр.). В аэробных условиях растворенный хлорофилл сенсибилизирует фотохимическое окисление доноров водорода, на-

пример бензидина (см. Frank, Levi, 1935), а в анаэробных приводит к окислительно-восстановительному процессу, в котором может участвовать сам в качестве донора и акцептора водорода (Rabinowitch, 1937; Weiss, Rabinowitch, 1937).

В аэробных условиях, в отсутствие донора водорода, хлорофилл окисляется с разрушением хромофорной группы (см., например, Aronoff, McKinney, 1943).

Вообще хлорофилл, как фотосенсибилизатор, в растворах не обладает высокой специфичностью, характерной для проявления его свойств в хлоропласте, и подобен по своему действию другим красителям-сенсибилизаторам.

Водные коллоидные растворы хлорофилла не обладают ни флуоресценцией, ни фотосенсибилизирующим действием.

Другой путь моделирования заключается в экспериментах с видоизмененным натуральным фотосинтетическим аппаратом растения.

Этот путь за последние годы привел к получению ряда интересных фактов. Прежде всего следует указать на опыты Хилла и Скэрисбрика (Hill, Scarisbrick, 1939, 1940) с суспензиями хлоропластов.

В этих опытах лист (обычно высших растений) был диспергирован в фосфатном буфере и полученная суспензия отфильтрована через фильтр из стеклянной ваты. Таким образом, структура клетки нарушалась, и получалась суспензия хлоропластов.

Оказалось, что хлоропласты не способны восстанавливать углекислоту, но способны фотохимически выделять молекулярный кислород (воды), используя в качестве окислителя ионы Fe^{+++} (в виде щавелекислого железа). Кислород при этом определялся спектроскопически по сдвигу равновесия системы гемоглобин-оксигемоглобин.

Чтобы избежать обратной реакции окисления образованных ионов двухвалентного железа кислородом, в систему вводилась желтая кровяная соль, окисляющая Fe^{++}. Таким образом, имела место брутто-реакция фотохимического восстановления желтой кровяной соли с выделением молекулярного кислорода.

Из этих опытов может быть сделано заключение, что в процессе фотосинтеза возможно существование двух различных циклов реакции: связанного с фотохимическим выделением кислорода без одновременного восстановления углекислоты и восстановления углекислоты без выделения кислорода (опыты Гаффрона с адаптацией водорослей к водороду).

Из опытов Хилла явствует, что первый цикл реакций осуществляется на хлоропласте; второй же цикл требует ненарушенной цитоплазмы. Возможно, что фотохимически образованные в хлоропласте активные промежуточные продукты, диффундируя в цитоплазму, участвуют в цепи реакций, восстанавливающих CO_2.

Отсюда возникает вопрос — может ли живая клетка фотохимически восстанавливать молекулы других соединений, помимо CO_2, с одновременным выделением кислорода?

Фэн, Штауффер и Умбрайт (Fan, Stauffer, Umbreit, 1943) исследовали эту возможность. Фотосинтез непозрежденных клеток Chlorella изучался манометрическим методом.

Выделяющийся кислород был индентифицирован поглощением пирогаллолом, желтым фосфором, а также полярографически, по Петерингу (см. выше).

Констатировано выделение кислорода в присутствии следующих веществ: солей окиси железа, ацетальдегида, бензальдегида, нитромочевины, углекислого натрия. (источник CO_2).

Не наблюдалось выделения кислорода в присутствии: азотнокислого калия, бихромата калия, *n*-диметил-аминобензальдегида, формальдеги-

да, бутилового альдегида, диметил-глиоксима, ализарина, метиленовой голубой, пировиноградной кислоты, глюкозы, гексозомоно- и ди-фосфата и др.

Реакция изучена более подробно с бензальдегидом; стехиометрические соотношения в соответствии с уравнением

$$2C_6H_5CHO + 2H_2O \longrightarrow 2C_6H_5CH_2OH + O_2$$

были трудно достижимы, так как бензальдегид потреблялся также при темновом процессе. Продукты восстановления идентифицированы не были.

Весьма интересно было бы исследование кинетики этого фотовосстановления — влияние интенсивности света, прерывистого освещения и пр.

В случае применения «окислителей» иных, чем CO_2, темновая реакция фотосинтеза заключается не в карбоксилировании; соответственно изменятся параметры темнового процесса; их определение дало бы много нового для познания механизма фотосинтеза.

Из описанных опытов явствует интересный вывод, что стадия восстановления при фотосинтезе не обладает высокой специфичностью, характерной для ферментативных процессов; восстанавливаются вещества различной химической природы: углекислота (анион CO_3''), катион трехвалентного железа, карбоксильная группа (ацетальдегид и бензальдегид), нитрогруппа. Эти факты подтверждают предположение о том, что при фотосинтезе первичным фотопродуктом являются энергетически богатые вещества с более высоким восстановительным потенциалом (см. ван-Нил), фотохимически генерируемые на хлоропласте, но диффундирующие в цитоплазму, где и осуществляют акт восстановления, может быть и без участия энзиматической системы.

Понятно, что в этом случае большую роль играют условия преодоления реагирующими молекулами «окислителя» диффузионного барьера на поверхности раздела клетка/среда, так как не всякая молекула или ион может диффундировать в цитоплазму растительной клетки.

Возможность диффузии должна быть учтена при экспериментах с иными «окислителями», чем CO_2.

XI. ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ РЕАКЦИИ В ПРОСТЫХ СИСТЕМАХ

Современная теория фотосинтеза должна объяснить накопленный ныне громадный (зачастую противоречивый) экспериментальный материал.

Открытие новых фактов, весьма часто не укладывающихся в рамки старых теорий, требует постоянной перестройки последних; это определяет недолговечность современных схем фотосинтеза. В настоящее время существуют две основные группы теорий (схем) фотосинтеза — теория обратимого распада промежуточных соединений и теория «фотосинтетической единицы».

Прежде чем переходить к общей теории интересующего нас процесса, следует кратко рассмотреть теоретическое представление о фотосенсибилизированных реакциях в более простых гомогенных и гетерогенных системах.

Если реагирующие молекулы не поглощают свет в данной спектральной области, то их фотохимическое превращение невозможно. Если в системе присутствует третье вещество — оптический сенсибилизатор, поглощающий свет в данной области и передающий как-то энергию возбуждения реагирующим молекулам, то реакция оказывается осуществимой. Весьма распространен случай наложения прямой фотохимической и сенсибилизированной реакции в тех случаях, когда реагирующие молекулы и сенсибилизатор поглощают в одной и той же области спектра.

Основной вопрос теории фотохимической сенсибилизации — это вопрос механизма передачи энергии возбуждения от молекул сенсибилизатора к реагирующим молекулам.

Общий случай сенсибилизации мы выражали выше схемой:

$$AB^* + C \rightarrow AB + C^*.$$

В этом случае знак * обозначает возбуждение электронных уровней; вероятность передачи электронной энергии возбуждения тем выше, чем энергетически ближе эти уровни у молекул AB и C; в случае резонанса эффективность передачи весьма высока и происходит на расстоянии нескольких молекулярных радиусов.

Этот процесс в «чистом» виде изучен в газовой фазе, где дискретный характер спектров поглощения и флуоресценции атомов и молекул, передающих и воспринимающих энергию, позволяет спектроскопически установить факт передачи энергии. В растворах весьма трудно установить факт передачи энергии в виде электронного возбуждения, так как молекулы растворенного вещества, из-за воздействия сильных энергетических полей молекул растворителя, очень редко обладают дискретным характером спектров поглощения и флуоресценции (среди таких редких соединений можно назвать, например, ионы редких земель и молекулы порфиринов). Доныне достоверно не установлено явление сенсибилизированной флуоресценции в водных растворах.

Весьма вероятно, что передача энергии возбуждения в растворах часто идет по другому механизму, нежели прямая передача электронной энергии возбуждения.

Сенсибилизирующими свойствами обычно обладают молекулы органических красителей, обладающие длительным периодом жизни возбужденного состояния.

Баур (Baur) в 1918 г. заметил, что при фотосенсибилизированных красителями реакциях в растворах имеет место явно выраженный окислительно-восстановительный процесс [1]. Эти наблюдения легли в основу предложенной им теории фотолиза, как «молекулярного электролиза». Согласно его первоначальным и весьма наивным с современной точки зрения представлениям, при поглощении кванта света молекула поляризуется, на образовавшихся аноде и катоде идет «молекулярный электролиз», т. е. соответствующий окислительно-восстановительный процесс.

Например, при фотосенсибилизированной реакции метиленовой голубой в присутствии сенсибилизатора — эозина (в отсутствие воздуха) образуется продукт окисления и восстановления (лейкосоединение) красителя. В присутствии легкоокисляющихся веществ — доноров водорода (например, глюкозы, глицерина) образуется продукт окисления этого вещества и лейкосоединение метиленовой голубой.

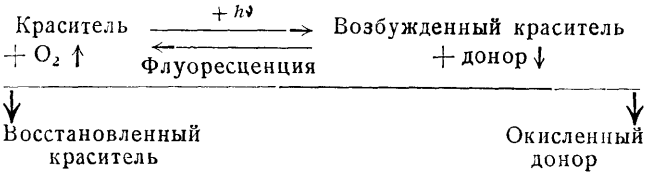
Вейсс (Weiss, 1936—1939) развил представление об окислительно-восстановительном механизме сенсибилизированных реакций в растворах.

При поглощении кванта света молекулой красителя-сенсибилизатора внешний электрон переходит на более высокий энергетический уровень, оставляя «пустой» уровень за собой. При этом растет сродство красителя к электрону. В присутствии подходящего донора электронов происходит окислительно-восстановительный процесс с образованием отрицательного иона красителя, дающего при взаимодействии с ионом водорода свободный радикал — семихинон.

При дальнейших превращениях семихинона возможна обратная регенерация красителя. Эти процессы, текущие по-разному в аэробных

[1] А. Н. Бах еще в 1893 г. указывал на окислительно-восстановительный характер фотосенсибилизированной реакции в более сложной системе — зеленом листе.

и анаэробных условиях, показаны на нижеследующей схеме Вейсса.



В эту схему укладываются лишь красители, дающие обратимо окисляющиеся лейко-соединения. Гашение флуоресценции хлорофилла кислородом Вейсс (1943) приписывает элементарному акту:

$$X + O_2 \rightarrow X^+ + O_2',$$

где X — молекула хлорофилла.

Известные опыты Каутского (Kautsky, 1936) с фотохимической активацией кислорода, адсорбированным на силикагеле трипафлавином Вейсс интерпретирует как образование радикалов HO_2 при взаимодействии кислорода с фотохимически отщепляемым водородом красителя.

Франк и Ливингстон (Frank, Livingston, 1941) предложили схему фотопроцессов, идущих с возбужденными молекулами красителями, в основе которой лежит представление о возможности превращения энергии возбуждения «внешним» и «внутренним» путем. «Внешний» путь состоит в отдаче энергии в виде кванта флуоресцентного излучения. При этом возможно, как и в схемах Вейсса, тушение флуоресценции, являющееся первичным актом сенсибилизированного процесса.

«Внутренний» путь заключается во внутренней конверсии электронной энергии возбуждения в колебательную с образованием высокоактивной модификации красителя.

Франк и Ливингстон предполагают, что при этом образуется активный таутомер красителя.

А. Н. Теренин (1943) подробно рассмотрел вопрос о природе этой «фотоактивной» модификации красителя и отверг предположения Франка и Ливингстона об образовании таутомера красителя на основании энергетических соображений.

Согласно Теренину, это метастабильное фотоактивированное состояние молекулы красителя является триплетным или бирадикальным состоянием, свойственным всем ароматическим соединениям.

Обычно запрещенный переход от возбужденного сингулетного уровня бензольного кольца к триплетному уровню может стать вероятным в случае деформации нормальной конфигурации молекулы, что возможно при некоторых столкновениях и при определенном характере среды.

«Жесткость» среды, благоприятствующая, по Льюису и сотр. (Lewis et al., 1942), образованию длительно возбужденных состояний, имеет, согласно Теренину, не столько механический, сколько «химический» смысл.

Если молекулы среды способны к образованию водородных связей, участвующих в резонирующих структурах, то возрастает вероятность перехода от сингулетного к триплетному состоянию.

В самое последнее время вопрос о длительно существующем триплетном состоянии красителей изложен в работе Льюиса и Каша (Lewis, Kasha, 1944) и ряде последующих работ Льюиса и сотрудников. Триплетное — по спектроскопической терминологии — состояние в химической терминологии соответствует бирадикалу, обладающему двумя свободными валентностями (взаимно ненасыщенными параллельными спинами) и потому химически весьма реакционноспособному.

Франк и Ливингстон дают следующую схему фотосенсибилизированного окисления

1) Возбуждение молекулы красителя-сенсибилизатора при поглощении кванта света:

$$DH + h\nu \rightarrow DH^*$$

2) Флуоресценция возбужденной молекулы и образование фотоактивной модификации красителя HD (при этом энергия возбуждения может использоваться в обоих процессах):

$$DH^* \rightarrow DH + h\nu'.$$
$$DH^* \rightarrow HD$$

3) Реакция фотоактивной молекулы с окисляющимся веществом:

$$HD + AH_2 \rightarrow DH_2 + AH,$$

где DH_2 — семихинон и AH — частично окисленная молекула.

Регенерация красителя:

$$DH_2 + O_2 \rightarrow HO_2 + DH.$$

Дальнейшее окисление:

$$AH_2 + HO_2 \longrightarrow AH + H_2O_2.$$
$$AH + O_2 \rightarrow A + HO_2 \text{ и т. д.}$$

Таким образом, в результате сенсибилизированного процесса получается, с одной стороны, продукт окисления вещества AH_2 и продукт восстановления кислорода — H_2O_2 — с другой стороны. Вообще, конечно, возможно дальнейшее окисление AH перекисью водорода.

При окислении многих веществ акт восстановления кислорода результируется в присоединении к водороду окисляемого вещества с образованием радикала HO_2 и дальнейшим его превращением в перекись водорода.

Таков, например, предполагаемый путь каталитического окисления аскорбиновой кислоты в присутствии ионов меди (Dekker, Dickinson, 1940).

Перекись водорода часто нельзя обнаружить среди конечных продуктов реакции вследствие ее взаимодействия с окисляемым веществом.

При фотосенсибилизации в гетерогенных системах первичный процесс энергетического обмена идет на границе фаз сенсибилизатор/среда. Фотосинтез следует отнести к этому типу процессов.

Среди гетерогенных процессов наиболее распространены сенсибилизация фотослоев и сенсибилизированные реакции на окислах металлов (например, окиси цинка и двуокиси титана).

В первом случае сенсибилизирующий краситель адсорбирован на поверхности кристаллов бромистого серебра; реакция заключается в восстановлении иона серебра до металла. В процессе принимает участие желатина, или, вернее, содержащиеся в ней примеси. Для нас, однако, интереснее второй случай, где сенсибилизатор — окись металла — граничит с водным раствором реагирующих веществ. Весьма активными сенсибилизаторами к ультрафиолетовой части спектра являются окись цинка и двуокись титана.

Их действие часто сходно с действием красителей-сенсибилизаторов. Например, действие окиси цинка по результату сенсибилизированного процесса подобно действию хлорофилла (Böhi, 1929).

Двухфазность системы придает процессу специфичность: гетерогенная сенсибилизация отлична от гомогенной в той же мере, как и гетерогенный катализ от гомогенного.

Длительность адсорбции молекул акцептора на активном центре кристаллической решетки вообще достаточно велика для того, чтобы воспринять энергию возбуждения; необходимым условием, однако, так же как и в случае гомогенных процессов, является достаточная длительность возбужденного состояния внутри кристалла.

Действительно, если квант света, поглощенный структурным элементом кристаллической решетки, эффективно деградирует в тепловую энергию, то чрезвычайно снижается вероятность первичного акта сенсибилизированной реакции.

Мы остановимся несколько подробнее на теории поглощения света твердыми телами, так как многие ее положения легли в основу теории фотосинтетической единицы.

Во многих случаях твердые тела, обладающие фотосинтезирующим действием, флуоресцируют при возбуждении ультрафиолетовыми лучами и обладают фотопроводимостью.

Теория поглощения света твердыми телами еще не ясна во всех деталях: согласно Френкелю (1936), при поглощении кванта света кристаллом электронное возбуждение, связанное со структурным элементом кристаллической решетки («экситон» в терминологии Френкеля), распространяется внутри кристалла; положительная «дыра» также мигрирует внутри кристалла своим путем.

В пределе экситон может быть свободным фотоэлектроном, что имеет место при возникновении фотопроводимости в кристалле, на который наложена разность потенциалов.

Экситон может претерпеть следующие возможности:

1) при столкновении с нарушенным участком кристаллической решетки разрядится в виде кванта света флуоресценции или фосфоресценции;

2) при процессе миграции внутри кристалла может деградировать в тепло;

3) диффундируя к поверхности кристалла, экситон может передать энергию возбуждения адсорбированной молекуле.

Весьма вероятна разрядка энергии экситона в форме электронного перехода при определенной величине электронного сродства адсорбированной молекулы или иона.

Этот процесс должен быть статистически уравновешен обратным проходом электрона от другого вида адсорбированных молекул или ионов к положительной «дыре», также диффундирующей к месту их сорбции.

Подобная окислительно-восстановительная схема сенсибилизированного процесса в гетерогенной среде хорошо соответствует опытным данным, полученным при изучении реакций в водных растворах, сенсибилизированных окисью цинка (Baur, Neiweiler, 1927) и двуокисью титана (Красновский, 1940).

Например, краситель метиленовый голубой на окиси цинка и двуокиси титана в анаэробных условиях при освещении ультрафиолетовым светом (линия Hg 3650 Å) дает в равной мере продукт окисления и восстановления (лейкосоединение).

В присутствии глицерина, обладающего бо́льшим восстановительным потенциалом, чем метиленовая голубая, образуется продукт восстановления красителя (лейко) и продукт окисления глицерина.

В аэробных условиях за счет обратного окисления лейкосоединения красителя кислородом воздуха необратимо образуют неокрашенные продукты деструктивного окисления красителя.

При гетерогенном процессе весьма существенна специфика сорбции; например, окись цинка сенсибилизирует образование перекиси водорода из воды в присутствии кислорода воздуха (Baur, Neiweiler, 1927), тогда как двуокись титана не обладает этой способностью (Красновский, 1940). Процесс идет за счет разрядки ионов водорода с окислением атомарного водорода кислородом воздуха. Окись цинка, обладающая основным характером, хорошо сорбирует ионы водорода (ионы водорода гасят флуоресценцию окиси цинка), тогда как гораздо более

«кислая» двуокись титана обладает весьма малым сродством к протону, чем и объясняется ее неактивность в этом процессе.

Следующим звеном в цепи усложняющихся сенсибилизированных процессов являются реакции с изолированными хлоропластами. Нам неизвестны модельные опыты, заполняющие широкий разрыв между реакциями на окислах (наиболее простой случай гетерогенной сенсибилизации) и реакциями хлоропластов.

В опытах Хилла наблюдается явно выраженный окислительно-восстановительный процесс: окисление воды до молекулярного кислорода, с одной стороны, и восстановление ионов окисного железа — с другой; результаты процесса можно выразить грубой схемой:

$$Fe^{+++} + e \rightarrow Fe^{++},$$
$$OH^- - e \rightarrow OH$$
$$2OH \rightarrow H_2O + {}^1/_2O_2.$$

Итак, вероятность первичного процесса фотохимической сенсибилизации в простых системах определяет:

1) длительность возбужденного состояния сенсибилизатора;

2) сорбция реагирующих молекул на активных центрах поверхности, участвующих в системе передачи возбуждения;

3) выполнение определенных энергетических условий молекулами, воспринимающими энергию возбуждения (например, величина сродства к электрону).

XII. ТЕОРИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Фотосинтез отличается от рассмотренных случаев сенсибилизации главным образом тем, что первичная фотохимическая стадия процесса является лишь одним звеном в цепи многочисленных ферментативных и некатализируемых реакций, ведущих в конечном счете к синтезу полисахаридов.

Поэтому теория первичного акта сенсибилизированного процесса является лишь одной из глав общей теории фотосинтеза.

Две основные группы теорий (схем) фотосинтеза пытаются объяснить резкое несоответствие между длительностью темновой реакции, определенной экспериментально опытами с прерывистым освещением (Emerson, Arnold, 1932) и рассчитанной по кривой светового насыщения фотосинтеза.

Уже указывалось, что при увеличении интенсивности освещения скорость фотосинтеза растет до определенного предела; дальнейшее увеличение интенсивности света уже не приводит к увеличению скорости процесса. Это явление объяснено наличием темновой реакции, лимитирующей скорость фотосинтеза. В точке насыщения скорости фотохимической и темновой реакции равны.

При длительности лимитирующей реакции τ сек. молекула хлорофилла в 1 сек. поглощает $\frac{1}{\tau}$ квантов. Количество молекул хлорофилла, имеющихся в наличии,— N: величина квантового выхода — a мол. CO_2 на 1 квант света.

Тогда скорость фотосинтеза, т. е. количество реагирующих молекул CO_2, в секунду будет равным:

$$v = \frac{N}{\tau} \cdot a.$$

При подстановке в это уравнение экспериментально определенной по кривой насыщения величины v, аналитически определенной величины N и значения квантового выхода, равного в среднем 0,1 (см. выше),

длительность лимитирующего процесса окажется равной ~ 30 сек. (подробнее см. Wohl, 1940).

По прямым определениям Эмерсона и Арнольда, эта величина при 25° составляет 0,02 сек.

Это противоречие может быть объяснено двояко.

Первое объяснение. Число активных центров, на которых происходит восстановление, в несколько тысяч раз меньше числа молекул хлорофилла. Квант света поглощает не единичная молекула хлорофилла, а ячейка из нескольких тысяч молекул.

Тогда N эффективное $= \frac{N}{6000}$, и значения τ, определенные обоими методами, будут соответствовать. Эта теория известна под названием теории фотосинтетической единицы (photosynthetic unit) [1].

Второе объяснение. Лимитирующая темновая реакция управляется катализатором, рабочий период которого больше продолжительности жизни первичного нестойкого фотопродукта.

Каталитическая реакция ведет к стабилизации первичного фотопродукта; нестабильный фотопродукт претерпевает обратную реакцию.

При малой интенсивности света наличное количество катализатора обеспечивает стабилизацию фотопродукта; при большой интенсивности — не обеспечивает; происходит обратная реакция разложения промежуточных фотопродуктов.

Таким образом, в расчетную формулу следует ввести коэффициент k, указывающий относительное количество «выживающих» фотопродуктов:

$$\tau = \frac{N}{v} \cdot a \cdot k$$

к точке насыщения

$$k \cong \frac{1}{6000},$$

и значения, определенные обоими способами, согласуются друг с другом. Эта теория развита Франком и Герцфельдом (1941).

Рассмотрим подробнее обе схемы.

Гаффрон и Воль (Haffron, Wohl, 1936) предположили возможность образования единого комплекса, «кристалла», состоящего из нескольких тысяч молекул хлорофилла, внутри которого возможна миграция энергии возбуждения от точки сорбции кванта к месту восприятия этой энергии (теория фотосинтетической единицы). Физическая возможность подобной модели экспериментально показана в случае неорганических фосфоров, где экситон мигрирует от точки сорбции к испускательному центру, включенному в решетку фосфора (например, Riehl, 1940).

Для органических систем нам неизвестны прямые экспериментальные доказательства миграции энергии внутри молекулярных комплексов, хотя это вообще вероятно. Гипотеза о распространении возбуждения на значительные расстояния в биологических системах оказывается весьма плодотворной для объяснения ряда фундаментальных биологических проблем (см. Szent-Györgyi, 1941).

Представление о резонансном распространении возбуждения по полипептидной цепи использовано также для интерпретации явлений нервного возбуждения (см., например, Schmidt, 1943; Denbigh, 1944).

В системах с конъюгированными двойными связями нелокализованные π-электроны ведут себя во многом подобно электрону в металле (см. Weiss, 1943), что обусловливает возможность миграции возбуждения в таких системах.

[1] Перевод английского «unit» словом «единица» здесь не точен по смыслу; все же оставляем его в таком виде, чтобы не усложнять фразу.

Для того, чтобы энергетические потери экситона при распространении внутри молекулярного агрегата были невелики, следует предположить сильное резонансное сопряжение структурных элементов комплекса.

Это должно вызывать значительное изменение спектра поглощения комплекса по сравнению со спектром поглощения отдельных молекул в растворе, что не наблюдается в случае хлорофилла (мы уже указывали, что сдвиг максимума поглощения составляет не более 100—200 Å и происходит от соединения со специфическим белком). Исходя из этих соображений, Франк и Гаффрон (1941) считают маловероятной возможность существования подобного комплекса.

В качестве доказательства теории фотосинтетической единицы приводились опыты Эмерсона и Арнольда с расчетом количества молекул хлорофилла, участвующих в восстановлении молекулы CO_2, на световую вспышку длительностью 10^{-5} сек. Эта величина для различных объектов и условий ведения опыта колеблется в пределах 3750—14 500.

Теория Франка — Герцфельда также объясняет эти результаты обратным разложением нестабилизированных фотопродуктов.

Однако здесь возможна и другая интерпретация: если длительность возбужденного состояния хлорофилла (или, что то же самое, длительность лимитирующей реакции, в которую вовлечен хлорофилл) больше 10^{-5} сек. в 3750—14 500 раз, то нет необходимости в представлении о комплексе, состоящем из тысяч молекул хлорофилла.

Орнштейн, Вассинк и сотр. (Ornstein, Wassink et al., 1938), а также Вассинк и Катц (1939) усовершенствовали первоначальную теорию фотосинтетической единицы представлением о переносе энергии возбуждения от многих молекул хлорофилла к ограниченному числу центров восстановления.

Согласно этим теориям, количество промежуточных продуктов, связанных с центрами восстановления, на несколько порядков меньше числа молекул хлорофилла. Однако экспериментальные данные последних лет показывают, что концентрация промежуточных продуктов и хлорофилла имеет величину одного порядка; здесь следует указать на эксперименты Мак-Алистера и Майерса (1940) о величине темнового потребления CO_2, а также на работы Рубена, установившего, что концентрация промежуточного карбоксилированного продукта имеет величину того же порядка, что и концентрация хлорофилла.

Указанные выше возражения против теории фотосинтетической единицы делают ее весьма маловероятной. Один из создателей этой теории — Гаффрон ныне склоняется к взглядам Франка.

В настоящее время распространена схема, предложенная Франком и Герцфельдом (1941).

Эта схема объясняет большой опытный материал, хотя и не все ее положения доказаны экспериментально. Схема использует ранее предложенные теории, в том числе известные работы Вильштеттера и ван-Нила.

Основные положения теории заключаются в следующем:

1. По последним данным (см. выше) на восстановление молекулы CO_2 расходуется 8—12 красных квантов.

Так как, в соответствии с законом Эйнштейна, на одну элементарную реакцию может расходоваться лишь один квант света, то в процессе фотосинтеза имеют место 8—12 постепенных фотохимических реакций.

Учитывая возможность неэффективной адсорбции света, предполагается 8 промежуточных реакций, что соответствует наличию семи частично восстановленных продуктов.

2. Фотохимический акт заключается в перемещении водородного атома внутри активированного комплекса от одной связи к другой. Принимается, что четыре кванта расходуются на восстановление углекислоты — на перенос четырех атомов водорода от молекул доноров R′H к CO_2; другие четыре кванта расходуются на регенерацию радикалов R′ до R′H за счет окисления молекул воды. Картина упрощается, если R′H уподобить хлорофиллу, вообще способному отдавать свой водород.

3. Концентрация промежуточных продуктов, в соответствии с экспериментом, имеет величину того же порядка, что и хлорофилл.

4. Резкое влияние изменения концентрации CO_2 на флуоресценцию хлорофилла в листе свидетельствует о прямом энергетическом обмене между молекулами CO_2 (или соответствующего промежуточного продукта) и возбужденными молекулами хлорофилла.

5. В процессе фотосинтеза участвуют три рода катализаторов:

A, контролирующий образование комплекса акцептор — CO_2; существование подобного фермента экспериментально доказывается фактом отравления цианидом реакции карбоксилирования (Рубен);
B, стабилизирующий нестойкие первичные фотопродукты;
C, катализирующий выделение кислорода из перекиси.

Исходя из этих положений, построили нижеследующую схему процесса:

Обозначения

НХ — нормальный хлорофилл,
Х — дегидрохлорофилл,
$ХП_{in}$ *n*-ный нестойкий промежуточный продукт,
$ХП_{sn}$ *n*-ный стабилизированный промежуточный продукт,
R и R_1 — радикалы вспомогательных субстратов,
A, *B*, *C* — соответствующие катализаторы.

I. Предварительная темновая реакция. Обратимое образование карбоксилированного соединения

$$RH + CO_2 \rightleftarrows RH\cdot CO_2,$$
$$RH\cdot CO_2 + A \rightleftarrows R\,COOH + A.$$

II. Фотохимические и каталитические реакции. Образование первого промежуточного продукта

$$НХ\cdot R\,COOH + h\nu \rightarrow ХП_{i1}.$$

Его стабилизация на катализаторе *B*:

$$ХП_{i1} + B \rightarrow ХП_{s1} + B.$$

Обратная реакция нестабилизованного продукта:

$$ХП_{i1} \rightarrow НХ + CO_2 + RH.$$

Освобождение первого стабилизованного полупродукта и его связывание с хлорофиллом для осуществления второй ступени реакции:

$$ХП_{s1} \rightarrow Х + П_{s1},$$
$$П_{s1} + НХ \rightarrow НХП_{s_1}.$$

соответственно реакции II, III IV с образованием промежуточных продуктов остальных ступеней:

$$НХП_{sn} + h\nu \rightarrow ХП_{i\,(n+1)}$$

и

$$ХП_{i\,(n+1)} + B \rightarrow ХП_{s\,(n+1)} + B$$

или обратная реакция:

$$ХП_{i\,(n+1)} \rightarrow НХ + П_{sn}$$

и далее четыре элементарных процесса регенерации четырех молекул дегидрохлорофилла в хлорофилл.

Образование нестойкого полупродукта:

$$X + R'OH + h\nu \rightarrow (HXR'O)_i.$$

Его превращение с образованием хлорофилла и окисленной молекулы субстрата:

$$(HXR'O)_i + B \rightarrow HX + R'O + B.$$

Образование гидроперекиси:

$$2R'O + H_2O \rightarrow ROOH + R'OH.$$

Разложение перекиси с освобождением молекулярного кислорода:

$$R'OOH + C \rightarrow R'OH + \frac{1}{2} O_2 + C.$$

Изложенный механизм дал возможность Франку и Герцфельду математически обработать ряд кинетических экспериментальных данных фотосинтеза. При этом было получено удовлетворительное соответствие теории с опытом.

XIII. ОБСУЖДЕНИЕ

Схема Франка удовлетворительно объясняет формальный механизм фотосинтеза.

Однако на некоторых разделах следует остановиться особо. Уже указывалось на примерах более простых процессов, что сенсибилизатор обычно должен обладать длительностью возбужденного состояния. Природа этого состояния у красителей служит в настоящее время предметом дискуссии; наиболее вероятным следует считать нахождение длительно возбужденной молекулы в триплетном состоянии (Теренин, 1943).

Для комплекса хлорофилл — белок вопрос о природе длительно возбужденного состояния чрезвычайно трудно разрешить спектроскопическим путем.

Хлорофилл, правда, обладает узкими полосами поглощения, но дискретность его спектра, конечно, не может быть сравнима с дискретностью спектра, например, газообразного бензола. Франк и Ливингстон в своих схемах фотохимических процессов, идущих с участием хлорофилла in vitro, приписывают фотоактивному его состоянию вид таутомера. В этом случае, однако, отсутствуют какие-либо экспериментальные доказательства, позволяющие предпочесть форму таутомера форме бирадикала.

Хлорофилл, обладающий высоким выходом флуоресценции в растворах, в живой клетке обладает чрезвычайно слабой флуоресценцией.

Следует полагать, что природа фотоактивного состояния хлорофилла в растворах и в живой клетке при соединении с белком различна.

В отсутствие подходящего акцептора энергия возбуждения хлорофилла эффективно разменивается в тепло, о чем свидетельствует низкий выход флуоресценции в живой клетке.

С другой стороны, в присутствии молекул, способных воспринять энергию, идет эффективный процесс ее передачи, о чем свидетельствует сравнительно высокая величина квантового выхода.

Таким образом, в процессе фотосинтеза используется главным образом та часть энергии возбуждения, которая не проявляется в форме света флуоресценции. Поэтому нельзя считать достаточно обоснованным вывод Франка о том, что энергия возбуждения воспринимается непосредственно CO_2 или связанным с ним промежуточным продуктом, так как наблюдения Франка о влиянии на интенсивность флоуресценции листа изменения концентрации углекислоты относятся к той доле излучения, которая не использовалась для химических превращений.

Вопрос о природе фотоактивного состояния хлорофилла in vivo тесно связан с вопросом о природе акцептора, воспринимающего энергию возбуждения.

По схеме Франка, лучистая энергия, поглощаемая хлорофиллом, расходуется на передачу атома водорода промежуточному продукту; энергия, поглощаемая дегидрохлорофиллом, расходуется, в конечном счете, на дегидрирование воды.

Непосредственная, прямая передача энергии возбуждения углекислоте и воде не имеет места, что становится понятным, если учесть многоступенчатость процесса.

Весьма заманчива гипотеза Эмерсона о том, что энергия хлорофилла передается некоторому универсальному акцептору — фосфорилированному соединению, коим она используется для дальнейших этапов реакции темновым путем.

Однако эта гипотеза в настоящее время не имеет прямых экспериментальных доказательств.

Некоторым экспериментальным критерием, позволяющим установить, какому виду молекул передается энергия от хлорофилла в живой клетке, является измерение флуоресценции листа, на чем мы уже останавливались выше.

Здесь есть ограничивающие обстоятельства. Уже неоднократно указывалось, что квантовый выход флуоресценции составляет около 1/1000. Поэтому гашение этой флуоресценции является лишь «качественной реакцией» на действительный процесс энергетического обмена, в котором участвует основная часть энергии, поглощенной фотосинтетическим аппаратом. Не исключена возможность того, что флуоресценция листа своим возникновением обязана не хлорофиллу, связанному со специфическим белком, а хлорофиллу, растворенному в липоидной фазе хлоропласта и не участвующему в процессе фотосинтеза. В связи с этим следует указать, что у коллоидных препаратов хлорофилла флуоресценция отсутствует (Smith, 1941).

Обычно предполагается, что вещество, гасящее флуоресценцию листа, воспринимает энергию возбуждения хлорофилла. Акт гашения флуоресценции, однако, не всегда является первичным актом сенсибилизированной реакции (см. Шпольский и Гришкун, 1944).

Кроме того, в таких сложных гетерогенных многокомпонентных системах, как фотосинтетический аппарат листа, изменение флуоресценции при воздействии определенного вида молекул не может однозначно свидетельствовать о восприятии им энергии возбуждения. Всегда существует возможность воздействия этих молекул на другие части системы, со вторичным воздействием на хлорофилл.

В связи с этим следует вспомнить работы Каутского, построившего в свое время теорию фотосинтеза, согласно которой первичным акцептором энергии от хлорофилла является кислород. Эта гипотеза обосновывалась фактом гашения флуоресценции хлорофилла в листе при увеличении парциального давления кислорода в течение индукционного периода. В дальнейшем, однако, оказалось, что при установившемся режиме фотосинтеза влияние кислорода на флуоресценцию листа обратно по знаку.

В соответствии со схемой Франка, фотохимический акт заключается в перемещении водородного атома внутри активного комплекса хлорофилл — промежуточный продукт от одной связи к другой.

При этом предполагается фотохимический процесс регенерации дегидрохлорофилла, что предполагает его поглощение в видимой части спектра.

Однако при дегидрировании с нарушением системы конъюгированных связей получается неокрашенный дегидрохлорофилл. Франк предполагает, что возможна отдача водорода без нарушения хромофорной системы пигмента, что нуждается в дополнительных экспериментальных доказательствах.

Согласно схеме Франка, темновыми процессами фотосинтеза управляют три катализатора.

Наличие катализатора *C* — каталазы, разлагающей перекись в фотосинтетическом аппарате, ныне сомнений не вызывает.

Катализаторы *A* и *B*, существование которых вероятно по кинетическим и косвенным данным, из системы хлоропласта доныне не выделены, и их индивидуальные свойства (хотя бы оптические) не установлены.

Таким образом, мы видим, что схема Франка нуждается в более строгом экспериментальном обосновании.

Современное состояние теории фотосинтеза немного напоминает положение с цепной теорией химических реакций, имевшее место 10—15 лет тому назад: начало удовлетворительной математической интерпретации кинетических данных при неясности химической стороны вопроса — природы промежуточных продуктов и пр.

Доныне неясны основные положения теории фотосинтеза: какова природа фотоактивного состояния комплекса хлорофилл — белок, каков механизм передачи энергии возбуждения от поглощающего свет комплекса и какому виду молекул передается эта энергия, какова природа катализаторов, управляющих темновыми процессами, каков химизм ассимиляции и химическая природа промежуточных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

Бах А. Н. 1893. Moniteur scientifique № 1. Рус. перевод см. сборник избр. трудов А. Н. Баха, Химтеорет., 1937.

Благовещенский Б. А. 1940. Тр. Моск. дома ученых и Ин-та биохимии АН СССР, вып. 4, стр. 67.

Виноградов А. П. и Тейс Р. В. 1941. ДАН СССР, **33**, № 9, 497.

Красновский А. А. 1940. Диссертация. Моск. ордена Ленина Хим.-техн. ин-т им. Менделеева.

Крашенников Ф. Н. 1935. Успехи химии, **4**, 138.

Кузин А. М. 1940. Тр. Моск. Дома ученых и Ин-та биохимии АН СССР, вып. 4, стр. 87.

Любименко В. Н. 1935. Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире. Сельхозгиз, Л.

Некрасов Н. И. 1937. Успехи химии, **6**, 334.

Самойлов А. Ф. 1944. Тезисы III Всесоюзн. витаминной конфер. Изд. АН СССР, стр. 119.

Свешников Б. Я. 1944. Природа, **33**, № 4, стр. 29.

Теренин А. Н. 1943. Acta physicochimica URSS, **18**, 210.

Тимирязев К. А. 1923. Солнце, жизнь и хлорофилл. М.— Л.

Френкель Я. И. 1936. Phys. Z. Sow. Union, **9**, 158.

Цвет М. С. 1910. Хромофиллы в растительном и животном мире. Варшава.

Шпольский Э. В. и Гришкун. 1944. Журн. физич. химии, **19**, 101.

Энгельгардт В. А. и Любимова М. Н. 1939. Биохимия, **4**, 716.

Aronoff A., Mackinney. 1943. Jnl. Amer. Chem. Soc., **65**, 956.

Aufdemgarten H. 1939. Planta, **30**, 342.

Baur E. 1918. Helv. Chim. Acta, **1**, 186.

Baur E., Neiweiler C. 1927. Ibid., **10**, 901.

Blum H., Spealman C. 1942. Photodynamic action and diseases caused by light. N. Y.

Böhi J. 1929. Helv. chim. acta, **12**, 121.

Dekker, Dickinson. 1940. Jnl. Amer. Chem. Soc., **62**, 2165.—1943. Ibid., **65**, 137.

Denbigh K. 1944. Nature, **154**, 642, No. 3916.

Dhéré Ch. 1937. La fluorescence en biochemie. Paris.

Douderoff. 1941. Jnl. Gen. Physiol., **24**, 565.

Dutton H., Manning W. 1941. Amer. Jnl. Botany, **28**, 516.

Emerson R., Arnold W. 1932. Jnl. Gen. Physiol., **15**, 391; **16**, 191.

Emerson R., Green L., Webb J. 1940. Plant Physiol., **15**, 314.

Emerson R., Lewis C. 1939. Amer. Jnl. Botany, **26**, 808.—1941. Ibid., **28**, 789.—1942. Jnl. Gen. Physiol., **25**, 579.—1943. Amer. Jnl. Boanty, **30**, 165.

Emerson R., Stauffer J., Umbreit W. 1944. Ibid., **31**, 107.

Evans E., Slotin L. 1940. Jnl. Biol. Chem., **136**, 805.

Eymers J., Wassink E. 1938. Enzymologia, **2**, 258.

Fan A., Stauffer J., Umbreit W. 1943. Jnl. Gen. Physiol., **27**, 15.

Frank J. Haffron H. 1941. Adv. Enzymol., **1**, 199.

Frank J., Herzfeld K. 1941. Jnl. Phys. Chem., **45**, 978.

Frank J., French C., Puck T. 1941. Ibid., **45**, 1268.

Frank J., Levi H. 1935. Ztschr. phys. Chem., B. **27**, 409.

Frank J., Livingston R. 1941. Jnl. Chem. Phys., **9**, 184.

French C. 1937. Jnl. Gen. Physiol., **21**, 71.—1940. Ibid., **23**, 469.

Gireaud et al. 1935. Bull. chim. biol., **17**, 232.

Haffron H. 1940. Amer. Jnl. Botany, **27**, 204, 273; Science, **91**, 529.—1944. Biol. Rev., **19**, 1 (полный обзор работ по адаптированным системам).

Haffron H., Rubin A. 1942. Jnl. Gen. Physiol., **26**, 219.

Haffron H., Wohl K. 1936. Naturwiss., **24**, 87, 103.

Henrici M. 1921. Verhandl. Nat.-Forsch. Ges. Basel, **30**, 43 (по Любименко).

Hill, Scarisbrick. 1939. Proc. Roy. Soc. (L.), B., **127**, 192.—1940. Ibid., B, **129**, 238; Nature, **146**, 61.

Jablonsky. 1935. Ztschr. Phys., **94**, 38.

Kalkar H. 1941. Chem. Rev., **28**, 71.

Katz E., Wassink E. 1939. Enzymologia, **7**, 97.

Kautsky H. et al. 1933. Ber., **66**, 1588.

Krebs H. 1943. Ann. Rev. Biochem., **12**, 529.

La Page, Umbreit W. 1943. Jnl. Biol. Chem., **147**, 263.

Lewis G., Kasha. 1944. Jnl. Amer. Chem. Soc., **66**, 2100.

Lewis G., Lipkin, Magel. 1941. Ibid., **63**, 3005.

Lippmann. 1941. Adv. Enzymol., **1**, 1.—1943. Ann. Rev. Biochem., **12**, 1.

Magee T., Dewitt T. et al. 1939. Jnl. Amer. Chem. Soc., **61**, 3529.

Manning W., Stauffer S. 1938. Ibid., **60**, 266.

McAlister E. 1939. Jnl. Gen. Physiol., **22**, 613.

McAlister E., Myers J. 1940. Science, **92**, 241.

Neish A. 1939. Biochem. Journ., **33**, 293.

Ornstein L., Wassink E. et al. 1938. Enzymologia, **5**, 110.

Petering H., Duggar B., Daniels F. 1939. Jnl. Amer. Chem. Soc., **61**, 3525.

Rabinowitch E. 1937. Trans. Farad. Soc., **33**, 1225.
Riehl N. 1940. Naturwiss., **28**, 601.
Roberts. 1942. Amer. Jnl. Botany, **29**, 165.
Ruben S., Kamen M., Hassid W., De Voult A. 1939. Science, **90**, 570.
Ruben S., Kamen M. 1940. Jnl. Amer. Chem. Soc., **62**, 3451.
Ruben S., Randall M., Kamen M., Hyde J. 1941. Ibid., **63**, 877.
Ruben S. 1943. Ibid., **65**, 273.
Scent-Györgyi A. 1941. Nature, **148**, 157.
Schmidt O. 1943. Phys. Zeit., **44**, 139.
Smith E. 1941. Jnl. Gen. Physiol., **24**, 565.
Stephenson M. 1939. Bacterial metabolism. (L.) Longman Green Co.
Strain H. 1944. Ann. Rev. Biochem., **13**, 591.
Warburg O., Negelein E. 1923. Zeit. phys. Chem., B. **106**, 191.
Warburg O. 1928. Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin.
Wassink E., Katz E., Oorrenstein R. 1939. Enzymologia, **7**, 113; **6**, 145.
Weier E. 1938. Botanical Rev., **4**, 497.
Weiss J., Rabinowitch E. 1937. Proc. Roy. Soc. (L.) A, **162**, 251.
Weiss J. 1939. Trans. Farad. Soc., **35**, 135.—1943. Nature, **152**, 175.
Weller C., Frank J. 1941. Jnl. Phys. Chem., **45**, 1359.
Wood H., Werkman G. 1942. Adv. Enzymol., **2**, 139.
van-Niel C. 1936. Arch. Microbiol., **7**, 323.—1941. Adv. Enzymol., **1**, 263.
Vogler K. 1942. Jnl. Gen. Physiol., **26**, 103.
Vogler K., Umbreit W. 1942. Ibid., **26**, 257.
Vogler K. La Page, Umbreit W. 1943. Ibid., **26**, 89.

Наиболее полные обзоры по фотосинтезу за последние годы:

Frank J., Haffron H. 1941. Adv. Enzymol., **1**, 199.
Johnson E., Myers J. 1943. Ann. Rev. Biochem., **12**, 473.
Rabinowitch E. 1945. Photosynthesis, N. Y. vol. I, II.

После сдачи статьи в печать мы имели возможность ознакомиться с первым томом книги Е. Рабиновича. Эта книга представляет собой наиболее полный и современный обзор проблемы фотосинтеза из имеющихся в литературе.

Доклады Академии Наук СССР
1946. Том LIII, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

КАТАЛИТИЧЕСКОЕ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ОКИСЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФТАЛОЦИАНИНАХ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 IV 1946)

Многие биохимические процессы сенсибилизируются и катализируются системами, содержащими в качестве активных групп производные порфирина с координационно-связанным атомом металла.

Близкие по своей структуре к порфиринам фталоцианины представляют собой модель подобного рода активных групп. В ряде случаев они обладают каталитической активностью ([1], [2]).

Нами сделана попытка исследования каталитического и фотосенсибилизирующего действия тетрафенилтетразопорфина (фталоцианина) и его медного и магниевого комплекса на окисление аскорбиновой кислоты (витамин С) — универсального участника биологических окислительно-восстановительных систем.

Применение аскорбиновой кислоты при исследовании процессов, сенсибилизированных к видимой части спектра, удобно также и потому, что длинноволновая граница поглощения водных растворов аскорбиновой кислоты лежит при 3 000 Å ([3]).

Действие фталоцианинов нами было сопоставлено с действием окиси меди (ион меди в кристаллической решетке, гетерогенный процесс) и ионов меди в растворе.

Опыты велись с водным раствором аскорбиновой кислоты. Буферные растворы не применялись, чтобы посторонние ионы не усложняли течения процесса.

Реакция, таким образом, проводилась в кислой среде при pH $\sim$ 2,6; в этих условиях окисление происходит количественно до дегидроаскорбиновой кислоты без образования побочных продуктов окисления ([4]).

Для наблюдения кинетики окисления был применен микроманометрический метод Варбурга—Баркрофта.

Применение манометрического метода в нашем случае может, вообще, вызвать сомнение. Действительно, окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха сопровождается образованием перекиси водорода, способной каталитически разлагаться на примененных катализаторах. Таким образом, убыль парциального давления кислорода в данный момент будет функцией скорости окисления аскорбиновой кислоты и разложения перекиси водорода. Однако на начальной стадии реакции, идущей по нулевому порядку, когда процесс идет при подавляющем избытке аскорбиновой кислоты и концентрация образующейся перекиси водорода ничтожна, скорость ее разложения несоизмеримо мала по сравнению со скоростью окисления аскорбиновой кислоты, что было проверено специальными опытами.

Фотохимически активной, в соответствии с поглощением фталоцианинов, является красная область спектра. Источником света слу-

жила лампа накаливания мощностью 200 W, помещенная в проточный термостат манометрического прибора на расстоянии 5 см от дна плоского реакционного сосуда специальной формы.

Условия ведения опытов: температура 20, 30, 40° ± 0,05°, число качаний реакционных сосудов 90—110 в мин. при амплитуде 7 см. В боковое плечо сосуда вводилось 0,75 мл однопроцентного раствора аскорбиновой кислоты, в среднюю часть 3 мл воды и 30 мг порошка катализатора. Применялась вода, трижды перегнанная на пирексовой установке. Тщательная очистка воды была необходима из-за чрезвычайной чувствительности реакции к загрязнениям.

В опытах с Cu^{++} концентрация сернокислой меди составляла 10^{-5} мол/л.

Реактивы: аскорбиновая кислота синтетическая, химически чистая; процентное содержание, определенное титрованием раствором дихлорфенолиндофенола 99%. Окись меди и сернокислая медь химически чистые Гослаборснабжения. Фталоцианины меди, магния и без металла синтезировались и очищались по Линстеду и сотр. (5)*.

Катализатор	Температура, °С	$k_T \cdot 10$	$k_c \cdot 10$	Кажущаяся энергия активации в кал.	
				темновой процесс	световой процесс
Раствор аскорбиновой кислоты в воде (без катализатора)	30	0,067	0,1	22600	11200
	40	0,22	0,28		
$Cu^{++} 10^{-5}$ мол/л	20	8,6	8,6		
	30	14,6	14,6	8500	8500
	40	22,0	22,0		
Окись меди	20	8,2	12,5		
	30	18,5	26,7	14600	11200
	40	37,0	52,0		
Фталоцианин без металла	20	0,33	0,62		
	30	0,55	0,94	10760	6260
	40	1,00	1,53		
Фталоцианин магния	20	0,63	2,10		
	30	1,03	3,14	9900	6700
	40	1,85	5,00		
Фталоцианин меди	20	0,39	2,3		
	30	0,65	2,4	9200*	—
	40	0,75	3,5		

* Для температурного предела 20—30°.

Экспериментальные результаты показаны в таблице. Во всех случаях, за исключением Cu^{++}, бо́льшая часть процесса проходит по нулевому порядку; константа скорости реакции выражена пропорциональным отношением числа поглощенных мм³ кислорода в минуту на прямолинейном участке; $k_т$ для темновой реакции, $k_с$ — для реакции при освещении.

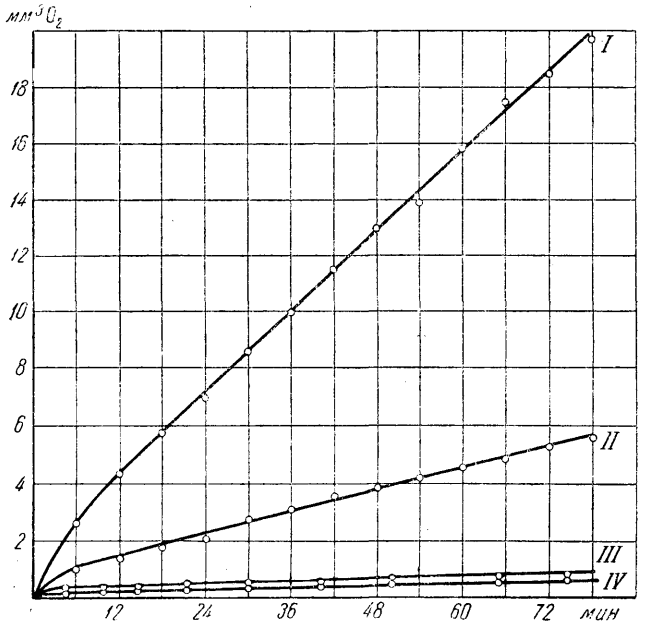
Размер сообщения не позволяет привести кривые всех опытов; на рисунке показан типичный ход окисления аскорбиновой кислоты на фталоцианине меди при 30° С.

Из полученного материала могут быть сделаны следующие основные заключения:

* Синтез осуществлен в Научно-исследовательском институте полупродуктов и красителей им. Ворошилова Е. Н. Юрыгиной и А. Жориной.

1. Исследованные темновые реакции удовлетворительно подчиняются уравнению Аррениуса в пределах 20—40°, кроме реакции, катализированной фталоцианином меди.

2. Для фталоцианина меди в интервале 20—30° температурный коэффициент составляет 1,67, а в интервале 30—40° 1,11, что свидетельствует о диффузионной кинетике в последнем интервале тем-



Ход окисления аскорбиновой кислоты на фталоцианине меди при 30° С: *I* — световой процесс; *II* — темновой процесс; *III* — контрольный опыт — раствор аскорбиновой кислоты в воде при освещении; *IV* — контрольный опыт в темноте

ператур. Действительно, фталоцианин меди чрезвычайно гидрофобен, и при повышении температуры, когда растет скорость химического процесса, скорость диффузии реагентов к плохо смачиваемым участкам поверхности катализатора определяет общую скорость процесса.

3. Сопоставление активности изученных катализаторов возможно при знании величины их удельной поверхности, в нашей работе не определенной. Следует все же отметить, что наименьшая величина кажущейся энергии активации наблюдается для меди, комплексно связанной в решетке фталоцианина, и иона меди в водном растворе, повидимому комплексно связанного с аскорбиновой кислотой ([8]).

4. Растворы аскорбиновой кислоты в воде (тридистиллат) довольно устойчивы; явно, однако, ускоряющее действие света, хотя реагенты и не поглощают в видимой части спектра. Вероятно так же, как и в случае перекиси водорода ([6]), реакция сенсибилизируется пылевыми загрязнениями. Действительно, величина энергии активации фотопроцесса имеет значение того же порядка, что и для реакции на окиси меди.

5. Во всех исследованных случаях освещение чрезвычайно ускоряет процесс (кроме Cu^{++}). Это значит, что испытанные катализаторы обладают фотосенсибилизирующими свойствами. При освещении каталитический и сенсибилизирующий эффекты накладываются друг на друга. Наиболее фотохимически активны фталоцианины меди и магния.

6. Световая реакция обладает довольно значительной величиной температурного коэффициента (1,35—1,90) и также удовлетворительно подчиняется уравнению Аррениуса (кроме фталоцианина меди). Вероятно, быстрый фотопроцесс лимитируется вторичной химической реакцией; значение энергии активации при этом ниже значений для темновой реакции. Кажущееся значение энергии активации фотопроцесса подсчитано по значениям константы скорости $k_c - k_т$.

Механизм окисления аскорбиновой кислоты молекулярным кислородом в присутствии $Cu^{\cdot\cdot}$ (мы подразумеваем в нашем случае ион меди, находящийся в активном центре кристаллической решетки катализатора), в свете работ последнего времени ([7]), может быть представлен в виде следующей схемы (где AH_2 — молекула аскорбиновой кислоты):

1. $$Cu^{\cdot\cdot} + AH_2 \rightarrow Cu^{\cdot} + RH_2^{\cdot}.$$

Образование $Cu^{\cdot}$ при катализе аскорбиновой кислоты констатировано магнетометрическими измерениями ([8]).

2. Регенерация двухвалентной меди кислородом с вероятным образованием иона O_2' ([9]):

$$Cu^{\cdot} + O_2 \rightarrow Cu^{\cdot\cdot} + O_2'.$$

3. $$RH_2^{\cdot} + O_2' \rightarrow R + H_2O_2$$

или через промежуточный этап с образованием радикала HO_2

$$RH_2^{\cdot} + O_2' \rightarrow RH + HO_2,$$

вероятно, идущий с промежуточным отделением протона:

$$RH_2^{\cdot} \rightarrow RH + H^{\cdot}, \qquad H^{\cdot} + O_2' \rightarrow HO_2 \text{ и т. д.}$$

При гетерогенном процессе реакции 1 и 2 должны проходить на активных центрах поверхности катализатора, остальные стадии возможны в объеме.

Действие кванта света может сказываться в снижении потенциального барьера наиболее медленного этапа процесса. Если, однако, квант света, поглощенный элементом кристаллической решетки катализатора, эффективно деградирует в тепло, то маловероятно его использование для химических целей. В этом случае существенна известная длительность возбужденного состояния внутри кристалла, связанная со спецификой структуры данного полупроводника.

Вопрос о теории фотосенсибилизирующего действия твердой фазы, однако, выходит за рамки настоящего сообщения.

В заключение приносим глубокую благодарность руководителю лаборатории фотобиохимии академику А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
24 IV 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] A. Cook, J. Chem. Soc. (L), **1938**, 176. [2] B. Tamamusi, S. Tohmatu, Bull. Chem. Soc. Japan, **15**, 223 (1940). [3] R. Morton, The Application of Absorbtion Spektra to Study of Vitamins, Hormones and Coenzymes, L., 1942. [4] R. Peterson, J. Walton, J. Am. Chem. Soc., **65**, 1210 (1943). [5] R. Linstead et al., J. Chem. Soc. (L), **1934**, 1017. [6] F. Rice, J. Am. Chem. Soc., **48**, 2099 (1926). [7] F. Dekker, R. Dickinson, J. Am. Chem. Soc., **62**, 2165 (1940); E. Silverblatt, A. Robinson, C. King, ib., **65**, 137 (1943); A. Weissberger, J. Luvalle, ib., **56**, 700 (1944). [8] G. Tyson, J. Wiley, J. Am. Chem. Soc., **63**, 1936 (1944). [9] I. Weiss, Trans. Farad. Soc., **35**, 135. (1939). A. N. Terenin, Acta Physicochim. URSS, **18**, 210 (1943).

Comptes Rendus (Doklady) de l'Académie des Sciences de l'URSS
1946. Volume LIII, № 5

BIOCHEMISTRY

CATALYTIC AND PHOTOSENSITIZED OXIDATION OF ASCORBIC ACID ON PHTHALOCYANINES

By A. A. KRASNOVSKY and G. P. BRIN

(Communicated by A. N. Terenin, Member of the Academy, 24. IV. 1946)

Many biochemical processes are sensitized and catalysed by systems containing as active groups derivatives of porphyrin with a coordinately bound metallic atom.

Phthalocyanines which closely resemble porphyrins in their structure represent a pattern of active groups of this kind. In numerous cases they are endowed with catalytic activity ([1,2]).

We attempted to investigate the catalytic and photosensitizing action of tetraphenyltetrazoporphin (phthalocyanine) and of its copper and magnesium complex upon the oxidation of ascorbic acid (vitamin C)—the universal participant of biological oxidation-reduction systems.

The use of ascorbic acid in studies of processes which are sensitized to the visible part of the spectrum is convenient also because the long-wave boundary of absorption of water solutions of ascorbic acid is 3000 Å([3]).

We compared the action of phthalocyanines with that of copper oxide (an ion of copper in the crystal lattice, heterogeneous process) and of copper ions in solution. The experiments were made with water solutions of ascorbic acid (buffer solutions were not used, so as not to complicate the course of the process by the introduction of foreign ions).

The reaction, consequently, took place in an acid medium (pH$\sim$2.6). Under these conditions the oxidation proceeds quantitatively up to dehydroascorbic acid without the formation of any side-products of oxidation ([4]).

The observations on the kinetics of oxidation were performed by the micromanometric technique of Warburg-Barkroft. The use of the manometric technique in our case is, speaking generally, open to doubt. Indeed, oxidation of ascorbic acid by atmospheric oxygen is accompanied by the formation of hydrogen peroxide which is liable to decompose catalytically on the catalysts employed in this case. Consequently, the loss of the partial pressure of oxygen at a given moment will be a function of the rate of oxidation of ascorbic acid and of the decomposition of hydrogen peroxide. However, at the initial stage of the reaction, proceeding along the zero range when the process goes on with an overwhelming excess of ascorbic acid and the concentration of the forming hydrogen peroxide is insignificant, the rate of decomposition of the latter is incommensurably small in comparison with the rate of oxidation of ascorbic acid, which was checked by means of special tests.

In accordance with the absorption by phthalocyanines, the red region of the spectrum is the one photochemically active in this case. As the source of light we used a 200 W incandescent lamp, placed into the vessel of the manometric apparatus at a distance of 5 cm from the bottom of the flat container of a special design used for the reaction.

The conditions of the experiments were: temperature, 20, 30, 40°C$\pm$0.05;

number of oscillations of the test-containers, 90—110 per minute; amplitude of oscillations, 7 cm. Into the side-tube of the container we introduced 0.75 ml of a 1 per cent solution of ascorbic acid; into its middle part, 3 ml of water and 30 mg of the catalyst in powder form. The water used was thrice distilled in a pyrex apparatus. This thorough purification of the water was necessitated by the extreme susceptibility of the reaction to contamination.

In the tests with Cu^{++} the concentration of copper sulphate was 10^{-5} mol/l.

The reagents used were: synthetic, chemically pure ascorbic acid, with a content determined by titration with dichlorphenolindophenol of 99 per cent; chemically pure copper oxide and copper sulphate (State Laboratory Supplies C°); the phthalocyanines of copper, magnesium and without metal were synthetized and purified according to the methods described by Linstead *et al.* (5)*.

Catalyst	t°C	$k_d \cdot 10$	$k_l \cdot 10$	Effective energy of activation, cal.	
				in the dark	in the light
Water solution of ascorbic acid (without catalyst) . .	30	0.067	0.1	22600	11200
	40	0.22	0.28		
Cu^{++} 10^{-5} mol/l	20	8.6	8.6	8500	8500
	30	14.6	14.6		
	40	22.0	22.0		
Copper oxide	20	8.2	12.5	14600	11200
	30	18.5	26.7		
	40	37.0	52.0		
Phthalocyanine without metal.	20	0.33	0.62	10760	6260
	30	0.55	0.94		
	40	1.00	1.53		
Phthalocyanine of magnesium.	20	0.63	2.10	9900	6700
	30	1.03	3.14		
	40	1 85	5.00		
Phthalocyanine of copper .	20	0.39	2.3	9200*	—
	30	0.65	2.4		
	40	0.75	3.5		

* For the temperature interval 20—30° C.

The results of the experiments are presented in the adjoined table. In every case, except that of Cu^{++}, the greater part of the process is achieved within the zero range; the constant of the rate of the reaction is expressed as a proportional ratio of the number of mm^3 of oxygen absorbed per 1 minute on a rectilinear plot; k_d, for the reaction in the dark; k_l, for the reaction in the light. The volume of our report does not allow us to include into it the curves of all the tests. The figure attached shows the typical course of the oxidation of ascorbic acid on the phthalocyanine of copper at 30° C.

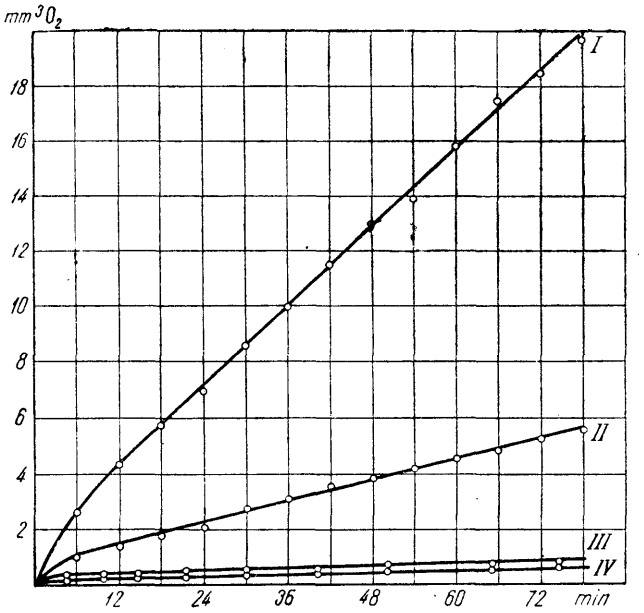
The following main conclusions may be drawn from the material obtained in this study.

* They were synthetized by E. N. Yuryghina and A. Zhorina at the K. E. Voroshilov Scientific Research Institute of Semi-products and Dyestuffs.

1. The reactions in the dark, studied by us, conform in a satisfactory way to the equation of Arrhenius within the limits of 20—40°, with the exception of the reaction catalysed by the phthalocyanine of copper.

2. For the reaction with phthalocyanine of copper as catalyst within the interval 20—30° the temperature coefficient equals 1.67, and within the interval 30—40°, 1.11; this speaks of diffusion kinetics in the last temperature interval. And indeed, the phthalocyanine of copper is very hydrophobic, and when the temperature is raised and the rate of the chemical process is increasing, the general rate of the process is determined by the rate of diffusion of the reagents to the less wetted areas of the surface of the catalyst.

3. The comparison of the activity of the catalysts studied by us were possible if the value of their specific surface were known, but we did not determine it in this study. The effective value of the energy of activation in the general case cannot be used as a criterion of activity. It should



Course of oxidation of ascorbic acid on phthalocyanine of copper at 30° C. *I*, in the light, *II*, in the dark; *III*, control test—water solution of ascorbic acid in the light; *IV*, control test—idem in the dark.

be noted, however, that the least values of effective energy of activation were observed for copper complexly bound in the lattice of phthalocyanine and for the copper ion in water solution which seems to be complexly bound with ascorbic acid ([8]).

4. The solutions of ascorbic acid in water (tridistillate) are relatively stable; however, the accelerating effect of light is evident, though the reagents do not absorb within the visible part of the spectrum. Like in the case of hydrogen peroxide ([6]), the reaction is probably sensitized by dust contaminations; indeed, the value of the energy of activation of the photoprocess is of the same order as the one for the reaction on copper oxide.

5. In every case studied illumination went greatly to accelerate the process (except with Cu^{++}). This means that the catalysts tested possess photosensitizing properties. In the case of illumination the catalytic and sensitizing effects are superimposed on one another. The phthalocyanines of copper and magnesium are the most photochemically active of the catalysts tested.

6. The reaction in the light shows a considerable value of the temperature coefficient (1.35—1.90) and also obeys in a satisfactory way the equation

of Arrhenius (except the phthalocyanine of copper). Probably the speedy photoprocess is limited by the secondary chemical reaction. The value of the energy of activation is in this case lower than its values in the reactions conducted in the dark. The effective value of the energy of activation of the photoprocess has been calculated from the values of the constant of the rate $k_l - k_d$.

The mechanism of the oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen in the presence of $Cu^{\cdot\cdot}$ (we mean in our case the copper ion situated in the active centre of the crystal lattice of the catalyst) may be represented in the light of recent publications (7) by the following scheme (in which AH_2 stands for the molecule of ascorbic acid):

1. $$Cu^{\cdot\cdot} + AH_2 \rightarrow Cu^{\cdot} + RH_2^{\cdot}$$

The production of $Cu^{\cdot}$ in the course of the catalysis of ascorbic acid has been demonstrated by magnetometric measurements (8).

2. Regeneration of bivalent copper by oxygen with the probable production of the O_2' (9):

$$Cu^{\cdot} + O_2 \rightarrow Cu^{\cdot\cdot} + O_2'$$

3. $$RH_2^{\cdot} + O_2' \rightarrow R + H_2O_2$$

or *via* an intermediate stage with the production of the radical HO_2

$$RH_2^{\cdot} + O_2' \rightarrow RN + HO_2$$

proceeding probably with an intermediate separation of a proton:

$$RH_2^{\cdot} \rightarrow RH + H^{\cdot}, \quad H^{\cdot} + O_2' \rightarrow HO_2, \text{ etc.}$$

In the course of the heterogeneous process the reactions 1 and 2 should take place on the active centres of the catalyst's surface, the remaining stages are possible in the volume.

The action of the light quantum may be in the form of a lowering of the potential barrier of the slowest stage of the process. If, however, the quantum of light absorbed by the element of the crystal lattice of the catalyst degrades effectively into heat, its utilization for chemical purposes becomes scarcely probable. In this case the continuance of the state of excitation within the crystal connected with the structural specifity of the semi-conductor in question acquires an essential significance.

However, the theoretical problem of the photosensitizing action of the solid phase is out of the scope of the present communication.

In conclusion we wish to express our deepest gratitude to the chief of this laboratory, A. N. Terenin, Member of the Academy, for most valuable suggestions and aid in this study.

The A. N. Bach Institute of Biochemistry.
Academy of Sciences of the USSR.

Received
24. IV. 1946.

REFERENCES

[1] A. Cook, J. Chem. Soc., (L), 176, 1938. [2] R. Tamamusi, S. Tohmatu, Bull. Chem. Soc. Japan, 15, 223 (1940). [3] R. Morton, The Application of Absorption Spectra to Study of Vitamins, Hormones and Coenzymes, L., 1942. [4] R. Peterson, J. Walton, J. Am. Chem. Soc., 65, 1210 (1943). [5] R. Linstead et al., J. Chem. Soc. (L), 1017, 1934. [6] F. Rice, J. Am. Chem. Soc., 48, 2099 (1926). [7] A. Dekker, R. Dickinson, ibid., 62, 2165 (1940); E. Silverblatt, A. Robinson, C. King, ibid., 65, 137 (1943); A. Weissberger, J. Luvalle, ibid., 66, 700 (1944). [8] G. Tyson, J. Wiley, ibid., 66, 1936 (1944). [9] A. N. Terenin, Acta Phys.-Chim. URSS, 18, 210 (1943); J. Weiss, Trans. Farad. Soc., 35, 135 (1939).

Доклады Академии Наук СССР
1947. Том LVIII, № 3

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 10 IV 1947)

Близкие по своей структуре к порфиринам фталоцианины и в особенности комплексное соединение с магнием представляют интерес как более простые модели ряда порфириновых производных, сенсибилизирующих и катализирующих многие биохимические процессы.

Спектры поглощения магниевого комплекса, в числе других металлических производных, измеряли Линстед и сотр. ([1,2]), давшие положение максимумов полос поглощения и величины логарифмов коэффициентов погашения в α-хлорнафталиновом растворе.

Однако приведенные ими данные не могут считаться достоверными, так как из результатов наших исследований очевидно, что эти авторы работали с веществом, имевшим заметную примесь фталоцианина без металла, исказившую действительный вид спектра.

Мы имели в своем распоряжении магниевое соединение фталоцианина, синтезированного по Линстеду и Лове ([3]) действием металлического магния на фталонитрил, перекристаллизованное из пиридина. В этом случае кристаллизуется дигидрат $(C_8H_4N_2)_4Mg\cdot 2H_2O$ с мол. весом 572,5. Кристаллический продукт содержал все же некоторое количество фталоцианина без металла, от которого нельзя было освободиться даже возгонкой в вакууме.

Магниевый комплекс, свободный от примесей, можно было получить при использовании свойства фталоцианина без металла не растворяться на холоду в таких растворителях, как ацетон, спирт и эфир.

Небольшое количество кристаллического порошка взбалтывалось на холоду с одним из указанных растворителей (обычно ацетоном) до появления интенсивной окраски. Нерастворившийся остаток отфильтровывался. Содержащийся в фильтрате фталоцианин магния получался при выпаривании ацетона на водяной бане.

Без тщательного удаления примеси свободного фталоцианина получалась ошибочная картина отношения исследуемого соединения к растворителям. Так как фталоцианин без металла лучше, чем магниевый комплекс, растворяется в гидрофобных растворителях (бензол, α-бромнафталин и т. п.) и несравненно хуже в растворителях типа ацетона, спирта, эфира и т. д., то при обработке первыми в раствор переходил в основном фталоцианин без металла, имеющий две сильных полосы поглощения в красной части спектра, а при обработке гидрофильными растворителями только магниевый комплекс, имеющий одну сильную полосу поглощения в указанной области спектра.

В случае применения веществ, растворяющих оба соединения (например скипидар), или использования порошка, имеющего малое содержание примеси чистого фталоцианина, при обработке гидрофобны-

ми растворителями, получается спектр, обладающий тремя полосами в участке 700—650 mμ, что, очевидно, и имело место в указанной работе Линстеда и сотр.

Малая растворимость исследуемого соединения, не превышающая порядка 10^{-5} М/л почти во всех растворителях, явилась затруднением при приготовлении растворов известной концентрации или определения последней для уже приготовленного раствора.

Отвешивание малой навески на микровесах не приводило к желаемым результатам, так как растворение шло медленно, требовало длительного нагревания, с трудом доходило до конца, что вызывало сомнение в неизменяемости веществ в процессе растворения.

Для определения концентрации растворов в низкокипящих растворителях нами было использовано свойство фталоцианина магния легко растворяться в концентрированной H_2SO_4 и давать резкую полосу поглощения с максимумом 838 mμ и молекулярным коэффициентом

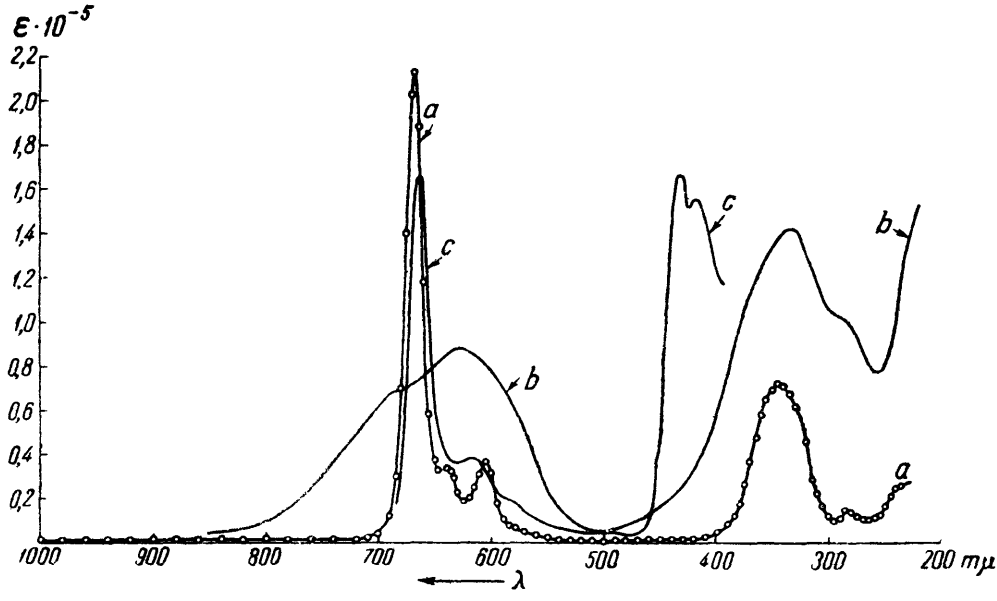


Рис. 1

погашения $\varepsilon = 1{,}1 \cdot 10^5$*. Магниевый комплекс при этом разрушается, превращаясь во фталоцианин без металла.

Точно отмеренное количество исследуемого раствора выпаривалось до полного удаления растворителя. К остатку добавлялось измеренное количество H_2SO_4 и после растворения измерялся коэффициент погашения $\varepsilon^{1\text{ см}}_{838\ m\mu} = \lg \frac{I_0}{I}$.

Концентрация C в мг фталоцианина Mg на 1 л определялась из выражения $C = 5{,}0 \frac{b}{a} \varepsilon^{1\text{ см}}_{838\ m\mu}$ (полученного из экспериментальных данных),

где a — мл исследуемого раствора, b — мл H_2SO_4.

В случае растворителей, кипящих при более высокой температуре (например пиридин), выпаривание не производилось во избежание возможного разрушения соединения, а приготавливался раствор путем растворения остатка от выпаренного измеренного объема ацетонового раствора известной концентрации.

---

* Измерено нами в 95% H_2SO_4.

Спектральные измерения были проведены с помощью кварцевого спектрофотометра Бекмана, модель DU, позволяющего снимать кривые поглощения в интервале от 1000 до 220 mμ. Исследуемые растворы помещались в кварцевые кюветы с толщиной слоя в 1000 см.

На рис. 1 приводятся: *a* — абсорбционная кривая раствора фталоцианина магния в этаноле, *b* — кривая поглощения твердой пленки этого соединения, нанесенной на кварцевую пластинку путем возгонки при пониженном давлении, *c* — кривая поглощения хлорофилла *a* в метаноле (по данным Гарриса, Цшейле [4] и Маккиннея [5]),

Для кривых *a* и *c* поглощения выражено в величинах молекулярного коэффициента погашения, а для *b* в относительных величинах, так как толщина пленки не определялась.

Вид абсорбционных кривых фталоцианина Mg в других растворителях почти не отличается от кривой *a*.

Смещение положения основных максимумов поглощения в зависимости от растворителя можно видеть в табл. 1.

Таблица 1

Растворитель	Положение максимумов, mμ				
Ацетон	665	638	601	344	—
Этанол	668	640	605	344	283
Эфир серн.	666	638	601	344	—
Пиридин	673	647	608	349	—
Диоксан	666	638	602	344	—
Бензол	672	646	608	346	—
Толуол	672	646	609	346	—
Тетралин	672	646	609	347	—
α-бромнафталин	678	649	613	355	—
Твердая пленка	—	630	—	335	290

Кроме указанных, наблюдаются еще две очень слабые полосы, лежащие около 578—582 и 556—560 mμ.

В табл. 2 приведены измеренные нами молекулярные коэффициенты погашения ε, умноженные на 10^{-5} для фталоцианина магния, и для основных максимумов хлорофилла *a* в эфире по Маккиннею [5].

Таблица 2

Растворитель	λ	ε	λ	ε	λ	ε	λ	ε
Ацетон	665	1,89	638	0,31	601	0,37	344	0,71
Этанол	668	2,13	640	0,33	605	0,36	344	0,71
Эфир	666	2,36	638	0,28	601	0,35	344	0,61
Пиридин	673	1,93	647	0,32	608	0,37	349	0,65
Хлорофилл *a* в эфире	660	1,85	—	—	—	—	430	2,24

Из кривых и результатов измерений видно, что спектры поглощения фталоцианина магния и хлорофилла, обусловленные наличием в обоих случаях подобной системы конъюгированных связей в красной части спектра, весьма близки друг к другу как по положению главной полосы поглощения, так и по величине коэффициента погашения.

Этот факт и то, что фталоцианин магния обладает такой же огненно-красной флуоресценцией и хемолюминесценцией [6], как и хлоро-

филл, подтверждают возможность рассмотрения его как более просто построенного аналога хлорофилла. Красновский и Брин установили также, что фталоцианин магния обладает подобным хлорофиллу фотосенсибилизирующим действием в твердой фазе ([8]) и растворе.

Следует также отметить смещение в коротковолновую сторону спектра поглощения твердой пленки по сравнению со спектром фталоцианина Mg в растворенном состоянии; подобное явление для кристаллического фиолетового наблюдалось Вартаняном ([7]).

Интерпретация полученных данных будет дана в другом месте.

Приносим глубокую благодарность руководителю лаборатории фотобиохимии академику А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

Лаборатория фотобиохимии
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
8 IV 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] J. S. Anderson, E. F. Bradbrook, A. H. Cook and R. P. Linstead, J. Chem. Soc. London, 1151 (1938). [2] P. A. Barret, R. P. Linstead, F. G. Rundall and G. A. Tuey, ibd., 1083 (1940). [3] R. P. Linstead and A. R. Lowe, ibid., 1022 (1934). [4] D. G. Harris and E. P. Zscheile, Bot. Gaz., **104**, 515 (1943). [5] G. Mackinney, J. Biol. Chem , **132**, 91 (1940). [6] J. H. Helberger, Naturwissensch., **26**, 316 (1938). [7] А. Г. Вартанян, ЖФХ, **20**, 1065 (1946). [8] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946).

Доклады Академии Наук СССР
1947. Том LVIII, № 7

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ФТАЛОЦИАНИНОВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 15 VII 1947)

Спектры поглощения фталоцианинов, близких по строению к порфиринам, представляют значительный интерес, так как эти соединения можно рассматривать как более простые модели многих биологически важных систем.

Ранее нами были измерены спектры поглощения магниевого фталоцианина, являющегося аналогом хлорофилла (1). В настоящей работе исследуются спектры поглощения фталоцианина без металла и его медного комплекса.

Поглощение этих веществ в видимой части спектра описано английскими исследователями (2). Однако приведенные авторами величины коэффициентов погашения в α-хлорнафталине мы склонны считать заниженными, так как способ приготовления растворов известной концентрации (растворение малой навески в органическом растворителе) не может привести к правильному результату из-за трудной растворимости фталоцианина и возможности образования коллоидов в процессе растворения. Поглощение в ультрафиолете и близкой инфракрасной части спектра не измерялось этими исследователями вообще.

Фталоцианин без металла, исследованный нами, был получен из магниевого соединения путем растворения последнего в концентрированной H_2SO_4 с последующим разбавлением водой и тщательным промыванием полученного осадка. Фталоцианин меди был синтезирован по Денту и Линстеду (3) из фталонитрила и металлической меди в хинолиновой среде и после промывки перекристаллизован из хинолина.

Воднорастворимый сульфированный фталоцианин меди был получен из технического образца многократным переосаждением соляной кислотой.

Трудно растворимые почти во всех органических растворителях фталоцианины легко растворяются на холоду в крепкой серной кислоте. Это позволяет воспользоваться серной кислотой для определения концентрации растворов фталоцианинов в органических растворителях с не слишком высокой температурой кипения (1).

Исследованные фталоцианины неодинаково устойчивы по отношению к серной кислоте. Медное соединение является весьма устойчивым, и его растворы в крепкой H_2SO_4 могут сохраняться продолжительное время без изменения. Фталоцианин без металла разрушается довольно быстро и тем скорее, чем больше воды содержит серная кислота. В наших опытах в 95—96% H_2SO_4 в течение часа разрушалось 3—4% находящегося в растворе фталоцианина.

Растворы фталоцианинов для измерений в H_2SO_4 приготовлялись путем растворения навески вещества 0,2—0,3 мг, взятой на микро-

весах с точностью до 0,01—0,02 мг, в определенном объеме H_2SO_4 (95—96%) и тотчас же фотометрировались на спектрофотометре Бекмана (модель DU).

Растворы в органических растворителях приготовлялись путем взбалтывания некоторого количества фталоцианина с растворителем на холоду с последующим фильтрованием. Концентрация их определялась через серную кислоту.

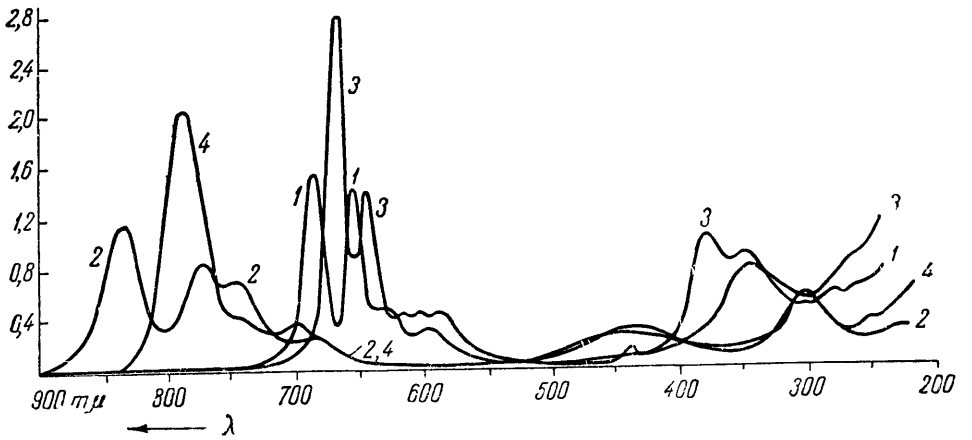


Рис. 1. Фталоцианин без металла: *1* — в диоксане, *2* — в H_2SO_4. Фталоцианин меди: *3* — в диоксане, *4* — в H_2SO_4

Водный раствор сульфированного фталоцианина был получен путем прямого растворения навески вещества в мерной колбе.

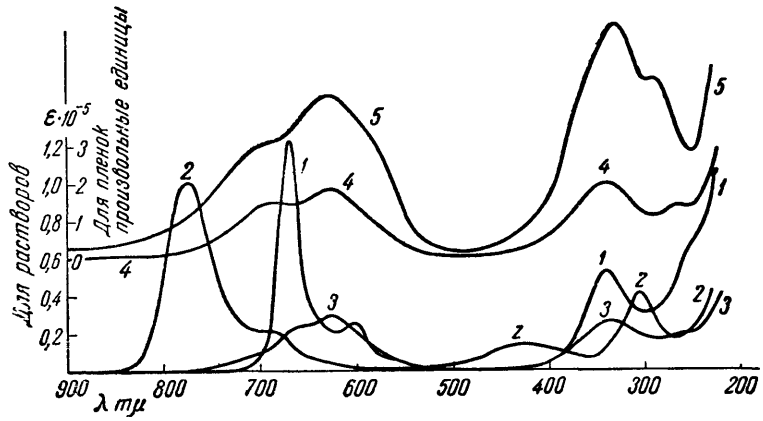


Рис. 2. Сульфированный фталоцианин меди: *1* — в метаноле, *2* — в H_2SO_4, *3* — в воде, *4* — фталоцианин меди, пленка на кварце, *5* — фталоцианин без металла, пленка на кварце

На рис. 1 приведены кривые поглощения фталоцианина без металла и медного комплекса в диоксане и H_2SO_4, на рис. 2 — сульфированного фталоцианина Cu в метиловом спирте, воде и H_2SO_4, и твердых пленок фталоцианинов на кварце, нанесенных возгонкой в вакууме.

В табл. 1 даны молекулярные коэффициенты погашения ε (умноженные на 10^{-5}) в основных максимумах кривых.

Сравнивая спектры каждого соединения в органическом растворителе и серной кислоте, можно видеть, что, несмотря на значительное уменьшение абсолютной величины коэффициента погашения и расширение полос в H_2SO_4, система полос поглощения в обоих случаях

Таблица 1

Фталоцианин без металла				Фталоцианин меди				Сульфированный фталоцианин меди					
в диоксане		в H_2SO_4		в диоксане		в H_2SO		в метаноле		в H_2SO_4		в воде	
λ mμ	ε	λ	ε	λ	ε	λ	ε	λ	ε	λ	ε	λ	ε
688	1,5	838	1,14	670	2,8	791	2,02	670	1,22	775	1,03	628	0,30
655	1,4	773	0,83	648	1,4	748	0,41	603	0,27	688	0,22	335	0,26
636	0,46	745	0,65	615	0,4	698	0,35	343	0,53	425	0,14	265	0,20
629	0,44	690	0,23	605	0,43	440	0,27	—	—	305	0,43	—	—
595	0,29	440	0,23	436	0,14	305	0,57	—	—	—	—	—	—
344	0,78	305	0,55	375	1,0	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	347	0,86	—	—	—	—	—	—	—	—

подобна, что говорит о неизменяемости основного хромофора — системы конъюгированных связей фталоцианина.

Однако все полосы в H_2SO_4 сильно сдвинуты в длинноволновую часть спектра. Внешне это выражается в исчезновении обычно синего цвета фталоцианина и появлении желто-зеленой окраски. Основные полосы поглощения, лежащие при органическом растворителе в красной части спектра, уходят почти целиком в невидимую инфракрасную

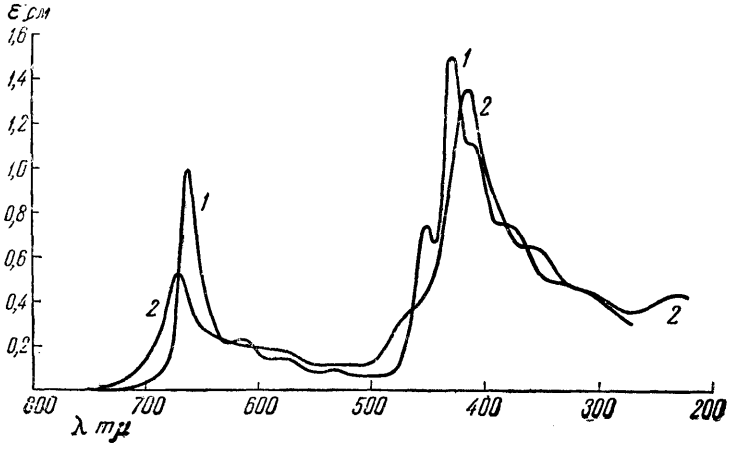


Рис. 3. Хлорофилл a + b: *1* — в этиловом эфире, *2* — в H_2SO_4

область, а в сине-фиолетовой области появляется заметная полоса обусловливающая желтый оттенок. Подобное явление наблюдалось рядом исследователей ([4]) для других красителей, содержащих в хромофорной системе конъюгированных связей азот (=N—). Было найдено, что батохромный эффект является следствием присоединения протона или другой кислоты (в смысле Льюиса) к азоту хромофорной системы этих красителей, тогда как присоединение кислоты к азоту боковых аминогрупп вызывало гипсохромию.

Следует думать, что в случае фталоцианинов протон присоединяется к атомам азота, включенным в 18-членную систему конъюгированных связей, а не к атомам азота пиррольных ядер.

Об этом говорят также данные, полученные Барретом и др. ([2]) по окраске сернокислотных растворов тетрабензпорфирина и тетрабензазапорфиринов.

Порфирины, имеющие вместо азотных метиновые мостики, связывающие пиррольные кольца, не меняют свою зеленую окраску при растворении в H_2SO_4.

Только три- и ди-азапорфирины, т. е. соединения, в которых две или три метиновых группы замещены на азот, дают растворы с окрас-

кой, которую авторы называют бурой. К сожалению, эти авторы не измеряли поглощения, но по аналогии с фталоцианинами можно предполагать, что изменение окраски имеет одинаковую причину в обоих случаях.

На рис. 3 приводятся кривые поглощения хлорофилла (a + b) в эфире и в концентрированной H_2SO_4.

Наблюдаемое изменение в расположении полос поглощения не носит характера, который позволил бы заключить о явном батохромном эффекте.

Молекула хлорофилла достаточно лабильна, и растворение в крепкой серной кислоте может вызвать изменение в ее строении. Однако отсутствие и здесь сильного батохромного эффекта свидетельствует о том, что этот эффект не связан с присоединением протона к атомам азота пиррольных колец.

Вид кривой поглощения водного раствора сульфированного фталоцианина резко отличается от вида подобной кривой в спирте как по положению, так по величине полос поглощения и весьма похож на кривые поглощения твердых пленок фталоцианина, приведенных на том же рисунке.

Причиной размазывания и понижения полос, вероятно, является взаимодействие молекул красителя с полярными молекулами растворителя в случае водных растворов и молекул фталоцианина между собой в случае твердых пленок.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
15 VII 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 3 (1947). [2] J. Anderson et al., J. Chem. Soc. L., 1151 (1938); P. A. Barret, R. P. Linstead et al., ibid., 1083 (1940). [3] C. E. Dent and R. P. Linstead, ibid., 1027 (1934). [4] G. N. Lewis and J. Biegeleisen, J. Am. Chem. Soc., **65**, 1144 (1943); G. Schwarzenbach and L. Michaelis, ibid., **60**, 1667 (1938); L. Michaelis and S. Granick, ibid., **63**, 1636 (1941).

Доклады Академии Наук СССР
1947. Том LVIII, № 4

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

О ФОТОХИМИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ И ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 10 IV 1947)

Представление об обратимых окислительно-восстановительных превращениях хлорофилла, впервые высказанное К. А. Тимирязевым, широко используется в современных теориях фотосинтеза. В ряде предложенных схем (например, школы Дж. Франка) большое значение придается наличию в молекуле хлорофилла лабильных атомов водорода, определяющих возможность обратимого образования дегидрохлорофилла.

Франк и Ливингстон [1] полагают также, что длительно живущее возбужденное состояние красителя является активной таутомерной формой. Теренин [2] и позже Льюис и Каша [3] развили представление о бирадикальной природе этого „фотоактивированного" состояния.

Нами сделана попытка получения экспериментальных данных: 1) о роли лабильных атомов водорода при фотохимическом окислении пигментов; 2) о возможности обратимого восстановления продуктов фотохимического окисления некоторыми веществами, сопутствующими хлорофиллу в зеленой клетке. Произведено сравнительное исследование фотохимического окисления хлорофилла, способного к кето-энольной таутомерии, и его аналога — фталоцианина магния [4], обладающего симметричной молекулой, все атомы водорода которой принадлежат бензольным ядрам. Применялись растворы пигментов в 95% этиловом спирте с концентрацией порядка 10^{-5} мол. на литр. Чтобы установить фотохимически активно электронное или возбужденное состояние, определяющее флуоресценцию, или длительно живущее метастабильное возбужденное состояние, проведены опыты тушения флуоресценции спиртовых растворов пигментов кислородом воздуха. Оба пигмента в растворе обладают яркокрасной флуоресценцией: хлорофилл — с главным максимумом, лежащим в области 664—670 mμ, фталоцианин магния — 670—675 mμ.

Растворенный кислород удалялся при кипении растворов под вакуумом. Флуоресценция измерялась при 0° С сначала у раствора в эвакуированном сосуде и затем после сообщения сосуда с атмосферой. Измерения велись на фотоэлектрическом флуорометре Колемана (модель 12). Флуоресценция возбуждалась линией Hg 366 mμ, измерялась через фильтр с видимым пропусканием 520—700 mμ. В пределах точности измерения (±2%) не было обнаружено тушения флуоресценции.

Окисление растворов производилось в плоской кювете диаметром 45 мм при толщине слоя до 10 мм. Освещение через красный светофильтр RG-2 (Шотт) и слой воды 60 мм киноламповой 250 W. Расстояние от нити лампы до поверхности раствора — 100 мм. Спектральные

измерения растворов до и после освещения производились на спектрофотометре Бекмана (модель DU).

При фотоокислении фталоцианина магния образуются неокрашенные продукты.

Таблица 1

Скорость фотохимического окисления хлорофилла a+b и фталоцианина магния в спиртовом растворе

Длительность освещения, мин.	Коэффициент погашения при 665 mμ, толщина слоя 10 мм	
	хлорофилл a + b	фталоцианин магния
До опыта	0,960	0,960
6	0,460	0,198
12	0,305	0,078
18	0,195	0,040

При нагревании окисленного раствора до кипения идет обратное разложение части продуктов окисления с образованием исходного пигмента. При введении в окисленный раствор кристаллической аскор-

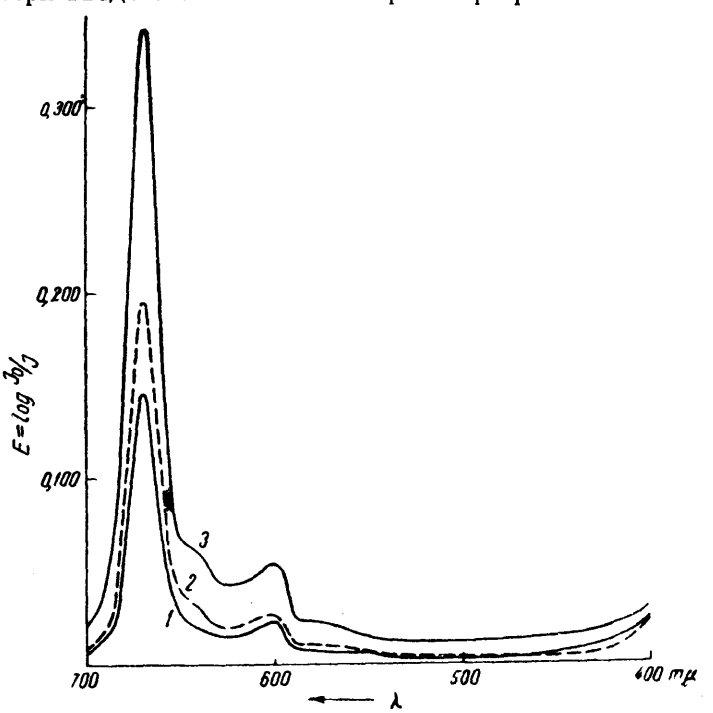


Рис. 1. Обратимость фотохимического окисления раствора фталоцианина магния в этиловом спирте. *1* — раствор после 9 мин. облучения, *2* — раствор *1* после нагревания до кипения, *3* — в раствор *1* введена аскорбиновая кислота; нагрет до кипения. Измерения при 18° С

биновой кислоты (20 мг на 4 мл раствора) на холоду идет восстановление продуктов окисления; нагревание ускоряет этот процесс. Нагревание приводит к регенерации 6—8% окисленного пигмента; в присутствии аскорбиновой кислоты — 24—30%.

Введение избытка кристаллического хлористого калия также приводит к медленному восстановлению. Окисленный раствор, нагретый до кипения, уже не восстанавливается дальше аскорбиновой кислотой. Длительное освещение раствора также приводит к необратимости окисления.

Фотоокислению подвергались растворы хлорофилла a, хлорофилла (a+b)*, спиртовые экстракты сухих листьев крапивы (7-месячной давности) и свежеприготовленные спиртовые экстракты листьев *Tradescantia*.

Во всех случаях образуются продукты окисления с типичной областью поглощения 500—600 mμ, приводящей к появлению желтой окраски раствора. Аскорбиновая кислота восстанавливает эти продукты с возвращением зеленой окраски как на холоду, так и после кратковременного нагревания окисленного раствора**. Введение хлористого калия не приводит к восстановлению этих продуктов.

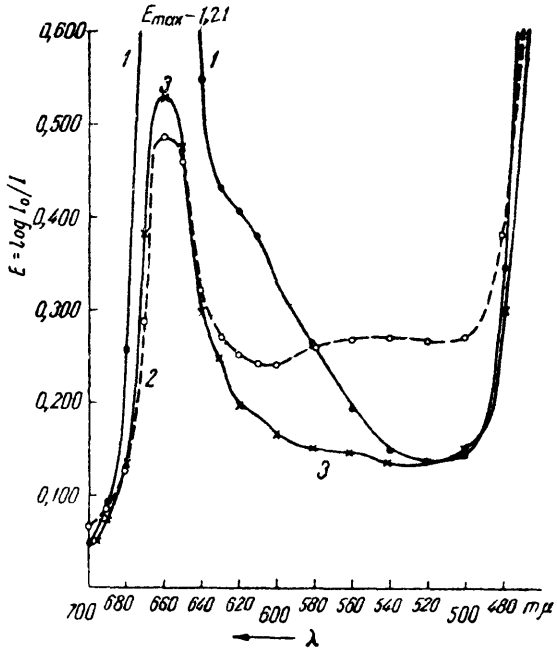


Рис. 2. Обратимость фотохимического окисления раствора хлорофилла (a+b) в этиловом спирте. *1* — исходный раствор, *2* — раствор *1* после 20 мин. облучения, *3* — раствор *2* после нагревания с аскорбиновой кислотой. Измерения при 18° С

Превращение этих соединений, повидимому, не приводит к образованию хлорофилла; в ряде случаев восстановление, ведущее к значительному уменьшению поглощения света при 500—600 mμ, не приводит к увеличению поглощения при 665 mμ. Однако наряду с этим образуются лабильные продукты окисления хлорофилла, обратимо восстанавливающиеся аскорбиновой кислотой (рис. 2). Обратное восстановление сопровождается соответствующим усилением флуоресценции.

В проведенных опытах наблюдалось восстановление не более 10% окисленного хлорофилла, т. е. гораздо меньше, чем при темновом окислении перекисью бензоила, где эта величина достигала 40% [5].

* Любезно предоставлен нам Т. Н. Годневым и О. П. Осиповой.

** К. А. Тимирязев еще в своей магистерской диссертации (1871) указал на восстановление зеленой окраски при действии цинка на окисленные растворы хлорофилла; эти наблюдения, однако, не получили дальнейшего развития.

При более медленном фотоокислении вообще не удается наблюдать обратимости восстановления — вероятно, из-за успевающих пройти вторичных реакций образующихся неустойчивых соединений. Окисленные растворы пигментов дают реакцию на перекиси (по окраске Fe^{+++} с CNS' в метаноле). Пока неясно, перекиси ли это пигментов или продуктов сенсибилизированного окисления растворителя.

Из приведенных данных можно сделать следующие заключения:

1. Фотохимическое окисление происходит за счет взаимодействия длительно живущего возбужденного состояния с растворенным кислородом. Это состояние, повидимому, не является таутомерной формой, на что указывает подобное хлорофиллу поведение фталоцианина магния. Более вероятно образование бирадикального (триплетного) состояния с появлением в качестве первичного продукта присоединения кислорода перекиси по механизму, предложенному Терениным [2] в соответствии с теорией Баха — Энглера.

2. Первично образующийся лабильный продукт окисления при нагревании образует более устойчивые соединения с необратимым нарушением системы конъюгированных связей, либо восстанавливается растворителем или содержащимися в нем примесями. Степень обратного восстановления зависит от соотношения скоростей этих процессов.

Следует полагать, что хлористый калий оказывает каталитическое действие на вторую из этих реакций. Восстановление лабильного продукта окисления аскорбиновой кислотой идет быстрее, поэтому количество регенерированного пигмента в этом случае больше. Вопрос о роли этого лабильного промежуточного продукта при сенсибилизированном фотоокислении будет рассмотрен в нашем последующем сообщении.

3. Свойства обнаруженных лабильных продуктов окисления отличны у обоих пигментов. У фталоцианина магния эти продукты более активны; их обратное восстановление достигается не только аскорбиновой кислотой, но и (более медленно) идет в присутствии олеиновой кислоты; в случае хлорофилла последняя неактивна.

Приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

Лаборатория фотобиохимии
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
10 IV 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] J. Frank and R. Livingston, J. Chem. Phys., **9**, 184 (1941). [2] A. N. Terenin, Acta Physicochim., **18**, 210 (1943); А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [3] G. N. Lewis and M. Kasha, J. Am. Chem. Soc., **66**, 2100 (1944). [4] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 3 (1947). [5] А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 5 (1947).

Доклады Академии Наук СССР
1947. Том LVIII, № 5

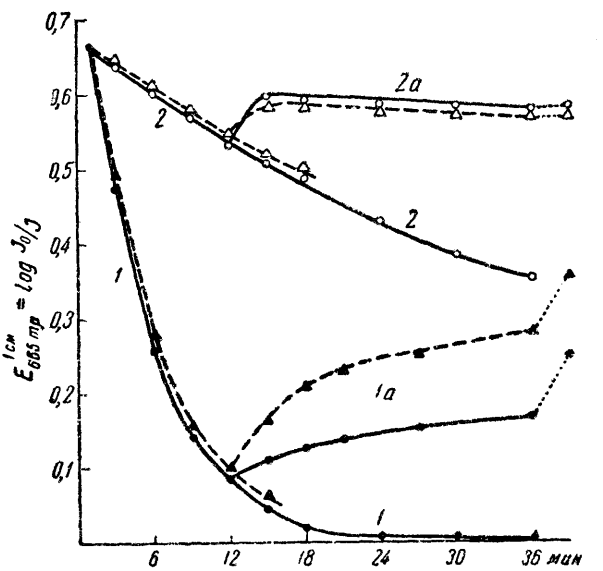
БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБ ОБРАТИМОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ ПЕРЕКИСЬЮ БЕНЗОИЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 10IV 1947)

Экспериментальные данные о возможности обратимого окисления хлорофилла весьма скудны. Рабинович и Вейсс (1) нашли, что хлорофилл окисляется в абсолютном метаноле ионами Fe^{+++} с обратным восстановлением ионами Fe^{++}, а также, более медленно, под влиянием избытка неорганических солей, например NaCl. Последнее



Окисление фталоцианина магния и хлорофилла (a + b) перекисью бензоила в спиртовом растворе. 3 мл раствора пигмента ($E^{1\,см}_{665\,m\mu} = 1{,}2$) + + 1 мл раствора перекиси бензоила.
1 — фталоцианин магния; *1a* — после введения аскорбиновой кислоты; *2* — хлорофилл (a + b); *2a* — после введения аскорбиновой кислоты. — опыты без хлористого калия, — — опыты с хлористым калием, ··· нагревание до кипения. Измерения при 18° С

наблюдение оставляло возможность интерпретации полученных данных к к обратимого смещения кетоэнольного равновесия (2).

Нами исследовано окисление различных препаратов хлорофилла и его аналога фталоцианина магния (не способного к кетоэнольной

таутомерии) перекисью бензоила в спиртовом растворе и восстановление продуктов окисления преимущественно аскорбиновой кислотой.

Оказалось, что перекись водорода (от Мерка, pro anal., без стабилизаторов) при той же концентрации в спиртовом растворе, что и перекись бензоила (считая на активный кислород), не приводит к окислению исследованных пигментов.

Для работы применялись растворы пигментов в 95% этиловом спирте с концентрацией 10^{-5} M/л и свежеприготовленные растворы перекиси бензоила в спирте с концентрацией $7{,}7 \cdot 10^{-3}$ M/л.

Растворы сливались в кювету (толщина слоя 1 см) спектрофотометра Бекмана (модель DU); значения коэффициента погашения в максимуме поглощения, являющиеся мерой концентрации пигмента, измерялись во времени (рис. 1). Было найдено, что окисленные растворы частично восстанавливаются при введении кристаллической аскорбиновой кислоты (20 мг на 4 мл раствора). Щавелевая, янтарная, пировиноградная, олеиновая кислоты, а также $CaCl_2$, KCl и NaCl оказались неактивными; фенилгидразин ведет себя подобно аскорбиновой кислоте.

Степень обратного восстановления в значительной мере зависит от степени, соответственно, длительности окисления (табл. 1). Длительно реагирующие или нагретые растворы теряют способность к регенерации.

Различные препараты хлорофилла: a, a + b, спиртовый экстракт из сухих листьев крапивы (7-мес. давности), свежеприготовленный экстракт из листьев *Tradescantia* — в общем подобны по характеру поведения; некоторые различия наблюдались в скорости окисления и степени обратного восстановления.

Ослабленная в результате окисления флуоресценция соответственно восстанавливалась при регенерации.

Таблица 1

Спиртовый экстракт из сухих листьев крапивы (с коэффициентом погашения $E\,\frac{1\text{ см}}{665\text{ m}\mu} = 1{,}65$) 1,5 мл + 1,5 мл раствора перекиси бензоила

Время в мин.	E	E после введения аскорбиновой кислоты	% обратимо-восстановленного хлорофилла
0	0,82	—	—
3	0 70	0,740	33
18	0 360	0,490	27
48	0,170	0,300	20
96	0,105	0,210	14

Отсутствие эффекта солей могло быть вызвано наличием в процессе реакции избытка окислителя. Были приготовлены растворы фталоцианина магния и хлорофилла в спирте, насыщенном хлористым калием (от Кальбаума, pro anal.) при 18° С, и в чистом спирте, с одинаковой концентрацией пигмента.

Измерена скорость окисления и обратного восстановления окисленного продукта при введении аскорбиновой кислоты (рис. 1). Из полученных данных видно, что хлористый калий ускоряет восстановление окисленного фталоцианина магния аскорбиновой кислотой. В случае хлорофилла наблюдается столь быстрое восстановление промежуточного соединения, что действие хлористого калия не удается заметить.

Действие неорганических солей, наблюдавшееся в опытах Рабиновича и Вейсса ([1]), вероятно, заключается в катализе восстановления окисленного продукта растворителем или содержащимися в нем примесями.

Спектральные свойства продуктов темнового и фотохимического ([3]) окисления пигментов в общем подобны. Фталоцианин магния образует неокрашенные соединения, из хлорофилла образуются окрашенные вещества с поглощением в области 500—600 mμ.

При окислении перекисью бензоила стационарная концентрация лабильных продуктов (по сравнению со стабильными, характеризующимися поглощением в области 500—600 mμ) значительно выше, чем при фотохимическом окислении. Это видно из следующих данных: в первом случае введение аскорбиновой кислоты в окисленный раствор приводит к увеличению E при 665 mμ от 0,220 до 0,330 и уменьшению E при 520 mμ от 0,112 до 0,080; в подобном опыте фотохимического окисления соответствующие цифры составляют: E при 665 mμ 0,220 — 0,245 и E при 520 mμ 0,140—0,060.

Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Исследованные пигменты при окислении перекисью бензоила дают лабильные и стабильные продукты окисления. Первые способны восстанавливаться аскорбиновой кислотой и некоторыми другими соединениями; эта реакция катализируется неорганическими солями.

2. Окисление связано с исчезновением красного максимума поглощения, откуда следует, что при этом нарушается система конъюгированных связей пигмента, что может произойти, например, при образовании лабильной перекиси. Наибольший наблюдавшийся процент обратного восстановления фталоцианина магния составлял 60%, хлорофилла 40% (от количества окисленного пигмента).

3. Эффект обратимости наблюдается в равной степени у обоих типов пигментов. Это свидетельствует о том, что смещение кето-энольного равновесия и наличие лабильных атомов водорода не связано с возможностью обратного восстановления.

4. Хромофорная система хлорофилла устойчивее к окислению, чем фталоцианин магния, что вероятно зависит от наличия в молекуле хлорофилла заместителей (винильная группа и пр.), окисляющихся легче, чем система конъюгированных связей, тогда как у фталоцианина магния эта система внутримолекулярно от воздействия не защищена.

5. Нужно полагать, что защита пигментов от окислительных воздействий аскорбиновой кислотой связана с ее биологической ролью в зеленой клетке — восстановлением окисленной части пигментной системы (об окислительно-восстановительных реакциях при фотосинтезе см. подробнее ([4], [5])).

Недавно Окунцов ([7]) установил, что введение ионов Cu^{++} в растение приводит к повышению устойчивости хлорофилла к выцветанию; быть может, этот эффект связан с активацией восстановления окисленной формы хлорофилла аскорбиновой кислотой; как известно, аскорбиноксидаза является медным соединением.

Возможно также восстановление продуктов побочного фотоокисления хлорофилла, идущего в зеленой клетке с измеримой скоростью при достаточно большой интенсивности освещения ([6]).

Приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за ценные указания и помощь в работе.

Лаборатория фотобиохимии
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
10 IV 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] E. Rabinowitch and J. Weiss, Proc. Roy. Soc. (L), **162**, 251 (1937). [2] E. Rabinowitch, Photosynthesis and Related Processes, N. Y., 1945. [3] А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 3 (1947). [4] А. А. Красновский, Усп. совр. биол., **21**, № 2, 153 (1946). [5] А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер биол., № 3 (1947). [6] F. Bukatsch, Planta, **30**, 118 (1939); **31**, 209 (1940). [7] М. Окунцов, ДАН, **57**, № 4, 407 (1947).

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК СОЮЗА ССР
BULLETIN DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE L'URSS
Серия биологическая № 3, 1947 Série biologique

А. А. КРАСНОВСКИЙ

О ФОТОХИМИИ ФОТОСИНТЕЗА

(*Представлено академиком* Н. А. Максимовым)

Введение

Дыхание и фотосинтез — основные процессы жизни на земле — обратны друг другу. При дыхании происходит термодинамически самопроизвольное окисление сахаров кислородом воздуха с образованием в качестве конечных продуктов углекислоты и воды. Обратный процесс — синтез сахаров из углекислоты и воды в изолированной системе термодинамически невозможен, так как он идет с увеличением свободной энергии $\Delta F \cong +120$ кал. Для осуществления этой реакции нужно подвести к системе энергию извне.

Фотосинтезирующие органы растений поглощают излучение солнца, используя энергию видимой части спектра. Фотосинтезирующие бактерии используют в качестве «восстановителя» вместо воды ряд иных соединений; брутто-процесс бактериального фотосинтеза иногда термодинамически возможен, и роль света сводится к преодолению активационных барьеров.

Хемосинтизирующие клетки используют для синтеза энергию окисления ряда неорганических и органических соединений. Сопряжение двух систем, синтезирующей (реагирующей изолированно с приращением свободной энергии) и выделяющей энергию, осуществляется через богатые энергией неустойчивые промежуточные продукты, обладающие, однако, достаточно длительным периодом существования.

Фотосинтезирующие клетки, в отличие от хемосинтезирующих, имеют аппарат для поглощения лучистой энергии извне и трансформации ее в энергию химическую.

Работы последнего времени говорят о большом сходстве синтезирующих аппаратов клеток обоих типов. Gaffron (1944), например, показал, что выращенная в атмосфере водорода одноклеточная водоросль *Scenedesmus* обладает способностью не только фотосинтезировать органические вещества из углекислоты и молекулярного водорода (по типу фотосинтезирующих бактерий), но и в условиях темноты использует для синтеза энергию окисления водорода кислородом. Вероятно, в обоих случаях образуются промежуточные активные продукты одного типа, реагирующие в цитоплазме по одному пути.

Предметом нашего обсуждения является, однако, преимущественно фотохимическая стадия фотосинтеза, являющаяся наиболее специфичной частью всего процесса. Мы попытаемся рассмотреть в свете современных работ следующие вопросы:

1. Природа оптического аппарата, поглощающего световую энергию солнца.

2. Природа длительно живущего «фотоактивированного» (следуя терминологии Теренина) состояния пигментной системы и возможности фотосенсибилизированного процесса.

3. Природа элементарных фотохимических реакций.

Однако трудно ограничиться рассмотрением фотохимии процесса изолированно от общей суммы темновых и световых реакций, идущих при фотосинтезе.

Прежде чем переходить к рассмотрению перечисленных разделов, мы кратко изложим современные представления о природе фотосинтеза вообще, отсылая для более детального ознакомления к нашему обзору (1946) и к книге Rabinowitch (1945), в которой дан наиболее полный и современный обзор проблемы фотосинтеза.

1. Фотосинтез есть окислительно-восстановительная реакция между углекислотой и водой, фотосенсибилизированная к видимой части спектра. При этом углекислота является «окислителем», т. е. акцептором водорода, а вода — «восстановителем», окисляющимся в результате реакции до молекулярного кислорода. То, что выделяющийся кислород принадлежит воде, показано в работах Виноградова и Тейс (1941), а также Ruben с сотрудниками (Ruben, Randall, Kamen и Hyde, 1941).

2. Фотосенсибилизатором, улавливающим излучение солнца и трансформирующим его в химическую энергию, является сложный белково-липоидный комплекс хлорофилла и каротиноидов, обладающих в свете работ последнего времени фотосинтетической активностью (Dutton и Manning, 1941; Emerson и Lewis, 1942, 1943).

3. Наиболее вероятно, что предварительной темновой реакцией связывания углекислоты является карбоксилирование органического субстрата; дальнейшее восстановление карбоксильной группы идет фотохимически. Это было показано работами с «мечеными» радиоактивным углеродом молекулами углекислоты (Ruben, Kamen, Hassid и de Voult, 1939); о темновой фиксации CO_2 см. обзор Wood (1946).

4. Химическая природа промежуточных продуктов между крайними точками — карбоновая кислота — моносахарид — достоверно не установлена. Гипотезы последнего времени (например Emerson, Stauffer и Umbreit, 1944) о подобии промежуточных продуктов дыхания и фотосинтеза заманчивы, но пока лишены веских экспериментальных доказательств.

5. Химическая природа вспомогательных фотокаталитических систем, переносящих электрон и протон от воды к углекислоте, неизвестна.

6. Квантовый выход фотосинтеза — количество реагирующих молекул CO_2 на квант красного света, по современным данным, составляет 0.08—0.12, т. е., чтобы восстановить 1 молекулу CO_2, нужно 8—12 квантов. Так как одна фотореакция может использовать, в соответствии с законом Эйнштейна, лишь 1 квант света, то следует ожидать 8—12 последовательных фотохимических стадий с образованием промежуточных продуктов различной степени окисления-восстановления.

Известно, что в живой клетке вообще не наблюдаются процессы, идущие с большим энергетическим перепадом за один акт; и при фотосинтезе можно было бы ожидать, что на одну элементарную реакцию падает изменение ΔF от $120 : 8 = 15$ кал. до $120 : 12 = 10$ кал.

7. Элементарные реакции фотосинтеза идут «против» термодинамически равновесных условий; это значит, что обратные реакции образованных продуктов текут самопроизвольно; при быстром ходе их течения возможно полное рассеяние электронной энергии возбуждения в тепло.

Для того чтобы осуществить фотосинтез, необходимо предохранить фотопродукты от обратного процесса; в схеме Frank-Herzfeld (1941) для этого служит специальный катализатор; более вероятно, однако, топохимическое разделение неустойчивых продуктов на разных фазовых границах (см. ниже). Понятны поэтому неудачи попыток воспроизведения фотосинтеза in vitro в простых системах.

8. Следует отметить, что in vitro распространены фотохимические реакции, в которых электронная энергия возбуждения используется в качестве энергии активации, когда фотохимический процесс вообще термодинамически возможен (например многочисленные случаи фотоокисления). Более редки и трудно осуществимы реакции, идущие с приращением свободной энергии системы; изучение подобных систем особенно интересно при моделировании фотосинтеза.

Примером подобного процесса является реакция Hill (Hill и Scarisbrick, 1939, 1940) восстановления Fe^{+++} до Fe^{++} на изолированных хлоропластах, являющаяся по существу обращением распространенной реакции окисления F^{++} молекулярным кислородом:

$$4Fe^{++} + O_2 + 4H^+ \underset{\text{с ет}}{\overset{\text{темнота}}{\rightleftarrows}} 4Fe^{+++} + 2H_2O.$$

9. Фотосинтетический аппарат не обладает высокой специфичностью, характерной для изолированных энзиматических систем.

Помимо нормального фотосинтеза с окислителем (CO_2) и восстановителем (водой), могут быть использованы иные окислители и восстановители; правда, во всех этих случаях имеет место процесс с более отрицательными значениями ΔF, чем при фотосинтезе.

Так, в качестве окислителя могут быть использованы ионы NO'з, ионы F^{+++}, ацетальдегид, бензальдегид, нитромочевина (Fan, Stauffer и Umbreit, 1943) и, наконец, молекулярный кислород при фотоокислении in vivo; в опытах с изолированными хлоропластами наблюдалось восстановление Fe^{+++} (Hill), хинонов (Warburg и Lüttgens, 1946; Aronoff, 1946), ионов NO'з (Михлин и Броновицкая, 1946), *о*-динитробензола (Гуревич, 1945).

С другой стороны, при сохранени в качестве «окислителя» CO_2, вместо воды используются в адаптированных системах (Gaffron) молекулярный водород, глюкоза, при бактериальном фотосинтезе — ряд органических и неорганических доноров водорода (сероводород, жирные кислоты и пр.). Изолированные хлоропласты в отсутствии окислителя способны выделять молекулярный водород в растворах моносахаридов (Бойченко, 1946), ионы водорода при одновременном выделении молекулярного кислорода (French, Holt и Powell, 1946; Holt и French, 1946).

Из всех этих данных явствует чрезвычайно важный вывод, что восстановление CO_2 требует ненарушенной цитоплазмы; процесс выделения кислорода локализован в хлоропластах. Вероятно, что при фотопроцессе генерируются активные промежуточные продукты с высоким восстановительным потенциалом, могущие неспецифично реагировать со многими соединениями различной химической природы (Van Niel, 1936, 1941).

Восстановительный процесс может, таким образом, итти на границе хлоропласт/плазма или в объеме самой цитоплазмы.

10. Предложенные в настоящее время схемы фотосинтеза являются по существу рабочими гипотезами, экспериментально не доказанными во многих своих частях. Эти гипотезы обобщают наше современное знание природы процесса, а потому являются неизбежными этапами исследования. Понятны поэтому их недолговечность и зачастую умозрительный характер построений.

Природа оптического аппарата растительной клетки

Фотохимические реакции протекают в зеленых органах растительной клетки — хлоропластах, содержащих пигменты, белки, липоиды и ряд энзиматических систем; для восстановления углекислоты необходима ненарушенная цитоплазма.

Воспринимающими лучистую энергию компонентами хлоропласта являются пигменты — хлорофилл (*a* и *b*) и каротиноиды. Цитологическое изучение с помощью обычной флуоресцентной и электронной микроскопии (например Roberts, 1942) привело лишь к заключению, что хлоропласты являются гетерогенным образованием с участками различной плотности, обладающими различной флуоресценцией в разных частях; физиологические функции отдельных частей хлоропласта неясны.

Наиболее интересен вопрос о форме связи пигментов в пластидах. Для решения этого исследователи пользовались преимущественно оптическими методами — измерением спектров поглощения и флуоресценции.

Уже давно было известно, что поглощение и флуоресценция хлорофилла в живой клетке сдвинуты по сравнению с экстрактами пигментов к красной границе спектра на 10—20 mμ.

Так, например, если максимум поглощения живого листа лежит при 680 mμ, то максимум для раствора хлорофилла *a* расположен для раствора в пентане (неполярный растворитель) при 662 mμ и для пиридинового раствора (высокополярный растворитель) при 671 mμ (Seybold и Egle, 1940).

Соответственно сдвинут максимум флуоресценции; у живого листа — 684.7 mμ, для раствора в пентане — 663 mμ и в пиридине — 674 mμ (Dhéré, 1939).

Для водного коллоидного раствора хлорофилла максимум поглощения лежит при 675—690 mμ, в зависимости от степени коагуляции; флуоресценцией коллоидный раствор не обладает.

Имеются три направления в трактовке формы связи хлорофилла в пластиде:

1. Хлорофилл находится в коллоидном состоянии (Ивановский, 1913; Willstätter и Stoll, 1918). Действительно, поглощение коллоидного хлорофилла близко к поглощению живой клетки. Но водный коллоид не флуоресцирует.

2. Хлорофилл молекулярно растворен в липоидной фазе (Stern, 1921). По данным Stern, максимум поглощения и флуоресценции лецитиновых растворов близок к аналогичным свойствам листа (поглощение 677 mμ, [1] флуоресценция 684.5 mμ).

3. Хлорофилл адсорбционно (Цвет, 1910) или химически (Любименко, 1921) связан с белками хлоропласта.

Если простетический порфириновый комплекс связан в гемоглобине и цитохроме с белком в стехиометрических соотношениях, то до сих пор не удалось установить подобные соотношения для пигментов хлоропласта. В ряде исследованных образцов это соотношение колебалось в пределах 1—5 молей (Granick, 1838; Bot, 1942) хлорофилла на «эквивалент» белка (мол. вес 17 000).

«Хлоропластиновые» растворы (Stoll и Wiedemann, 1938), получающиеся при диспергировании листьев при низкой температуре, содержат 80% белка, 10—20% липоидов и около 5% пигментов. Эти растворы имеют определенную изоэлектрическую точку и подобны по своему поглощению живому листу; по нашим наблюдениям, подобные растворы обладают флуоресценцией.

Попытки получения искусственного хлорофилл-белкового соединения, обладающего хотя бы оптическими свойствами хлорофилла в листе — сдвигом спектра поглощения и наличием флуоресценции, — до сих пор не удавались.

---

[1] Эти данные, вероятно, ошибочны; по нашим измерениям, максимум поглощения в лецитине расположен при 670 mμ.

Noack (1927) адсорбировал хлорофилл на альбумине, казеине, легумине, горденине, клупеин-сульфате и на пептонах; некоторые образцы слабо флуоресцировали. Однако Seyboldt и Egle (1940), повторившие эксперименты Noack, нашли, что флуоресценция наблюдалась лишь в присутствии липоидных примесей.

Осипова (1946) исследовала сорбцию хлорофилла на ряде белков и нашла, что при связывании хлорофилла с глиадином происходит смещение максимума поглощения на 14.4 mμ. Полученные адсорбаты не флуоресцировали.

Любопытно наблюдение Seyboldt и Egle, что нефлуоресцирующие адсорбаты начинали флуоресцировать при смачивании растворителем; при этом хлорофилл не переходил в раствор. Следует в связи с этим вспомнить о модели хлоропластов Hubert (1936), согласно которой происходит ориентация адсорбированных белком молекул хлорофилла фитольным хвостом в сторону липоидной фазы.

Нами была исследована адсорбция хлорофилла и фталоцианина магния на ряде неорганических и органических веществ. Флуоресценция адсорбатов возбуждалась линией ртути 366 mμ и наблюдалась через красный светофильтр. На окислах металлов — SiO_2, Al_2O_3, TiO_2, ZnO — адсорбированные пигменты не флуоресцировали; лишь в случае MgO наблюдалось красное свечение; при сорбции на белках — фиброине шелка, яичном альбумине, зеине, глиадине — и при флуоресценции оно не наблюдалось даже при температуре жидкого воздуха. Образование флуоресцирующих адсорбатов наблюдалось лишь в случае неполярных адсорбентов — парафина, пальмитиновой кислоты (ориентированной жирной цепочкой наружу), дифенила и пр. Эти наблюдения приводят к заключению, что флуоресценция сохраняется при ориентации молекулы пигмента неполярной частью (фитольной цепочкой у хлорофилла) к адсорбенту; при сцеплении полярной частью — порфириновым циклом — флуоресценция тушится; то же происходит при агрегации молекул в коллоидные частицы. Можно думать поэтому, что хлорофилл связан в пластиде не с полярными группами, а скорее с липоидной частью липопротеинового комплекса.

Чему же обязана флуоресценция живого листа: связанному или молекулярно растворенному хлорофиллу?

Noack (1927), а впоследствии Seyboldt и Egle (1940) развили взгляд, что хлорофилл находится в двух формах — коллоидной, не флуоресцирующей, и молекулярно-дисперсной, флуоресцирующей.

Однако в настоящее время нет убедительных экспериментальных доказательств, позволяющих однозначно решить вопрос о том, находится ли в хлоропласте весь или не весь хлорофилл в связанном виде. Можно думать, что для решения этого вопроса многое могло бы дать исследование поляризации флуоресценции хлорофилла в листе и модельных системах (см. Вавилов, 1945; Феофилов, 1945).

Представление о том, что флуоресценция живого листа обязана хлорофиллу, растворенному в липоидной фазе хлоропласта, в известной мере ограничило бы пределы метода изучения флуоресценции хлорофилла in vivo. Действительно, тушение флуоресценции в этом случае будет не только реакцией фотосенсибилизирующего аппарата на внешние воздействия, но также и следствием вторичных химических процессов, приводящих к накоплению или расходованию промежуточных соединений, влияющих на флуоресценцию растворенного хлорофилла.

Возможно, что тушители являются перекисными соединениями, которые, согласно нашим предварительным экспериментам, влияют на флуоресценцию хлорофилла и фталоцианина магния.

Следуя измерениям флуоресценции листа, трудно сделать заключение о природе первичных акцепторов энергии, так как акт тушения вообще не является первичным актом сенсибилизированного процесса (см. ниже). Существенно также и то, что при фотосинтезе используется та часть энергии возбуждения, которая не проявляется в виде света флуоресценции (квантовый выход флуоресценции листа около 0.001).

До недавнего времени полагали, что каротиноиды фотохимически неактивны и сенсибилизатором является лишь хлорофилл. Однако исследования последних лет (см. выше) свидетельствуют о фотосинтетической активности каротиноидов. Согласно этим работам, квантовый выход фотосинтеза, измеренный в пределах 400—700 mμ, мало изменялся в спектральных диапазонах, где доминировало поглощение хлорофилла либо каротиноидов.

Вообще неизвестны случаи сенсибилизирующего действия каротиноидов in vitro, кроме наблюдений Karrer и Strauss (1938) над тем, что коллоидный каротин сенсибилизирует окисление бензидина; вероятно, реакция индуцируется перекисными соединениями, легко образующимися при фотоокислении каротина кислородом воздуха.

Недавние работы Dutton, Manning и Duggar (1943) свидетельствуют о том, что пигментная система в живом листе энергетически сопряжена в большей степени, чем это представлялось ранее. Ими измерялся выход флуоресценции у водоросли *Nitzschia closterium* при возбуждении светом следующих длин волн: 600, 578, 470 и 435.8 mμ, т. е. в пределах, где доминирует поглощение либо хлорофилла, либо каротиноидов. Оказалось, что в пределах ошибки эксперимента, квантовый выход флуоресценции был одинаков во всем диапазоне. Подобные измерения были сделаны с ацетоновыми экстрактами пигментов; в этом случае величина выхода соответствовала относительному количеству хлорофилла; поглощение каротиноидов оказалось неэффективным. Из этих опытов сделано заключение о сенсибилизированной флуоресценции хлорофилла под влиянием света, поглощенного каротиноидами.

Явление сенсибилизированной флуоресценции, часто наблюдающееся в газовой фазе, в конденсированной фазе встречается чрезвычайно редко.

Однако, когда степень взаимодействия между молекулами или структурными единицами столь велика, что приводит к появлению общих уровней [например кристаллическое состояние, полимеры (Scheibe, 1937; Jelly, 1937)], сенсибилизированная флуоресценция становится вероятной; известны подобные эффекты, наблюдаемые у кристаллических фосфоров (Riehl, 1946).

Теренин (1945) установил факт передачи энергии от карбазола, антрацена и ряда других ароматических соединений в замороженном состоянии, в средах, молекулы которых способны к образованию водородных связей с молекулами растворенного вещества.

Существует возможность модельного рассмотрения пигментно-белкового комплекса в виде единой молекулярной системы, обладающего общими энергетическими уровнями по типу принятой картины полупроводника. В связи с этим следует вспомнить представление об общих энергетических уровнях в биологических системах, высказанное Szent-Györgyi (1941).[1] Последнее делает возможным предположение о том, что оба типа пигментов хлоропласта связаны с одним типом специфического белка. Аналогичные взгляды высказывались Любименко.

[1] Вопросы миграции энергии в молекулярных системах и критика взглядов Szent-Györgyi освещены в докладе А. Н. Теренина (см. стр. 369—376 настоящего выпуска).

Подобная картина оптического аппарата походит на гипотезу фотосинтетического комплекса, предложенную Gaffron и Wohl в 1936 г. Эта гипотеза возникла из необходимости объяснить противоречие в подсчете длительности темновой реакции фотосинтеза, исходя из кривой светового насыщения и из экспериментов с прерывистым освещением. Было предположено образование единого комплекса, «кристалла», состоящего из нескольких тысяч молекул хлорофилла, внутри которого возможна миграция энергии возбуждения от места поглощения кванта света к месту восприятия этой энергии.

Для объяснения этой кинетической неувязки впоследствии была выдвинута теория стабилизации промежуточных продуктов, развитая в схеме Frank и Herzfeld (1941) и изложенная в обзоре Frank и Gaffron (1941); см. подробнее у Красновского (1946).

В связи с вышеупомянутым следует указать, что некоторые полупроводники, обладающие электронным механизмом фотопроводимости, например окись цинка (Baur, Neiweiler, 1927), двуокись титана (Goodeve, 1937; Красновский, 1940), являются фотосенсибилизаторами ряда окислительно-восстановительных реакций.

Кристаллические фталоцианины, в том числе аналог хлорофилла — фталоцианин магния, обладают в видимой части спектра как фотосенсибилизирующим действием, так и фотопроводимостью (Красновский и Брин, 1946; Вартаньян, неопубл.). В первой из указанных работ исследовалось каталитическое и фотосенсибилизированное фталоцианинами окисление аскорбиновой кислоты; интересно отметить, что при фотопроцессе энергия активации снижается на 3—4 кг-кал. при энергии возбуждающего кванта ~ 40 кг-кал.; таким образом для «химических» нужд используется лишь около 10% лучистой энергии.

Нам кажется наиболее вероятным, что бóльшая часть хлорофилла в пластиде находится в коллоидном, нефлуоресцирующем (запасном), фотохимически неактивном состоянии, а меньшая часть — фотосинтетически активная, флуоресцирующая — в белково-липоидном комплексе. С этой точки зрения разрешается кинетическая неувязка, объясняемая гипотезами «фотосинтетической единицы» и стабилизации промежуточных продуктов; при расчете длительности темновой реакции должно учитываться не все количество хлорофилла, а лишь количество, находящееся в фотохимически активном состоянии.

Природа фотоактивированного состояния

Квант света, поглощенный сенсибилизатором, может:

1) быть излучен в виде кванта света флуоресценции;

2) быть использован реагирующими молекулами в той или иной форме с возвратом сенсибилизатора в исходное состояние;

3) быть использован для необратимого химического превращения молекулы сенсибилизатора, например ее окисления.

4) деградировать в тепло.

В тех случаях, когда квантовый выход первого и третьего процессов невелик, что бывает достаточно часто, основным является соотношение скоростей деградации энергии возбуждения в тепло и ее восприятия реагирующей системой.

Как справедливо указывает Rabinowitch (1945), эффективность фотохимического процесса есть скорее проблема кинетики, чем термодинамики, так как во многих случаях энергия поглощаемого кванта, вообще достаточная для химического превращения, быстро деградирует в тепло.

Существенна такая структура сенсибилизатора, при которой электронная энергия возбуждения переходит в форму, трудно превращаю-

щуюся в тепло и легко воспринимаемую реагирующими молекулами.

Флуоресценция свидетельствует о какой-то степени сохранения электронной энергии от рассеяния при столкновениях. Часто поэтому связывают сенсибилизирующие и «фотодинамические» свойства красителей (Blum и Spealman, 1941) с их способностью к флуоресценции, а первичный акт сенсибилизированного процесса отождествляют с актом гашения флуоресценции (Weiss, 1939).

Среди красителей в растворе, действительно, чаще всего сенсибилизирующими свойствами обладают флуоресцирующие красители, хотя и нефлуоресцирующие иногда обладают некоторой активностью (Livingston и Hurd, 1941).

При гетерогенном процессе флуоресценция сенсибилизатора совершенно не обязательна: например, слабо флуоресцирующая двуокись титана и не флуоресцирующие даже при температуре жидкого воздуха фталоцианины обладают сенсибилизирующим действием (Красновский и Брин, 1946).

Действительно, у кристаллов флуоресценция и фосфоресценция связаны с наличием нарушений кристаллической решетки (испускательные центры); в идеальном кристалле электронное возбуждение может деградировать в тепло без испускания световых квантов.

Акт тушения флуоресценции не всегда соответствует первичному акту сенсибилизированного процесса. В ряде случаев течение сенсибилизированной реакции не сопровождается тушением флуоресценции сенсибилизатора реагирующими молекулами (Шпольский, Гришкун, 1945). Это явление объясняется тем, что электронная энергия возбуждения молекулы может быть либо отдана в виде света флуоресценции, либо может конвертировать внутри молекулы в колебательную энергию возбуждения, образуя высокоактивную длительно живущую модификацию. Frank и Livingston (1941) предполагают, что при этом образуется активный таутомер красителя.

Теренин (1943) подробно рассмотрел вопрос о природе этой «фотоактивной» модификации красителя и отверг предположение об образовании таутомера красителя на основании энергетических соображений. Согласно Теренину, это метастабильное фотоактивированное состояние молекулы красителя является бирадикальным состоянием. Триплетное (по спектроскопической терминологии) состояние в химической терминологии соответствует бирадикалу, обладающему двумя свободными валентностями (антипараллельными спинами валентных электронов) и потому весьма реакционноспособному.

Обычно запрещенный переход от возбужденного синглетного уровня к триплетному уровню может стать вероятным при деформации нормальной конфигурации молекулы, что возможно при некоторых столкновениях и при определенном характере среды. «Жесткость» среды, благоприятствующая, по Lewis (1942), образованию длительно возбужденных состояний, имеет, согласно Теренину, не столько механический, сколько «химический» смысл.

Если молекулы среды способны к образованию водородных связей, участвующих в резонирующих структурах, то возрастает вероятность перехода в бирадикальное состояние. В последнее время гипотеза бирадикального состояния изложена также в ряде работ Lewis и его сотр. (Lewis и Kasha, 1944) и получила экспериментальное подтверждение в магнетометрических измерениях Lewis и Calvin (1945).

При сравнительном исследовании фотохимического поведения фталоцианина магния и хлорофилла нами также были получены некоторые данные, указывающие на вероятность бирадикального длительно возбужденного состояния (1947).

Если рассматривать в качестве сенсибилизатора сорбированную молекулу хлорофилла, то переход в триплетное состояние может стать более вероятным вследствие иной энергетической картины деформированной при адсорбции молекулы.

Вообще, вряд ли возможно перенесение представлений о природе фотоактивированного состояния красителей в растворе на фотосинтетический аппарат хлоропласта, в котором пигменты связаны с белком и тесно энергетически сопряжены.

В настоящее время нет достаточных экспериментальных данных, позволяющих решить вопрос о природе длительно живущего возбужденного состояния сенсибилизирующего комплекса зеленой клетки. Этот вопрос тесно связан с также пока неясным вопросом о природе связи хлорофилла в пластиде.

Природа элементарных процессов фотосинтеза

Рассмотрим случай, когда сенсибилизатор — молекула в растворе. При поглощении кванта света окислительно-восстановительный потенциал молекулы изменяется в пределе на $\pm Nh\nu$.

Действительно, с одной стороны увеличивается сродство молекулы к электрону, т. е. окислительная способность, за счет перехода возбужденного светом электрона на более высокий уровень, оставляющего «пустой» уровень за собой (Weiss, 1939). С другой стороны, возбужденный электрон слабее связан с ядром и его способность к переходу, т. е. восстановительная способность молекулы, также увеличивается.

Направление первичного фотопроцесса определится величиной электронного сродства или, иначе говоря, окислительно-восстановительного потенциала партнера.

Существенным является обратимость процесса по типу обратимости превращения распространенных биологических окислительно-восстановительных катализаторов; в противном случае, вместо сенсибилизированного процесса, при котором происходит многократное ред-окс-превращение сенсибилизатора, произойдет необратимый однократный процесс, выводящий сенсибилизатор из участия в процессе.

Уже при поглощении красного кванта потенциал молекулы мог бы измениться на ± 1.6 вольта; однако эффективная величина ΔE значительно ниже из-за быстрого размена энергии возбуждения в тепло.

В процессе деградации, однако, возможна внутренняя конверсия электронной энергии в колебательную с образованием высокоактивной модификации молекулы, наиболее вероятно в бирадикальной форме.

Обратимое взаимодействие бирадикала с реагирующими молекулами в этом случае будет элементарным процессом сенсибилизированной реакции. Таким образом возможны два механизма элементарного процесса:

1) прямой электронный обмен возбужденной молекулы (в этом случае элементарный процесс соответствует акту тушения флуоресценции);

2) первичный переход молекулы в фотоактивное состояние с последующим обратимым окислительно-восстановительным процессом (элементарный процесс не связан с тушением флуоресценции). Оба механизма имеют место в действительности (Шпольский, Гришкун, 1945).

Baur еще в 1918 г. заметил, что при сенсибилизированных реакциях в конденсированной фазе имеет место явно выраженный окислительно-восстановительный процесс; эти наблюдения легли в основу

предложенной им теории фотолиза как «молекулярного электролиза», наивной с современной точки зрения, но хорошо объясняющей большой опытный материал.

При гетерогенной реакции, когда сенсибилизатор является кристаллом или комплексом, обладающим общими уровнями, первичный процесс будет заключаться в статистически компенсированном электронном обмене на фазовой границе между электроном и «дырой», находящимися в зоне проводимости, и реагирующими молекулами. Конечно, и здесь возможно необратимое химическое изменение поверхности сенсибилизатора. Подобный механизм для реакций, сенсибилизированных окисью цинка, двуокисью титана, фталоцианинами, хорошо соответствует опытным данным.

Обычно под окислением — восстановлением подразумевают переход электрона или атома водорода; последний процесс, однако, правильнее рассматривать идущим в два акта — переход электрона и переход протона (Теренин, 1947, также Michaelis, 1936; Kalkar, 1941).

Первичным актом гетерогенной сенсибилизации является электронный переход. Поэтому при фотовосстановлении, заключающемся в переносе водорода, должен иметь место вторичный перенос протона.

Для познания элементарных процессов фотосинтеза особенно интересны описанные в докладе Теренина опыты фотохимического переноса протона против термодинамического потенциала. Ведь фотосинтез в конечном счете и заключается в переносе атомов водорода (протона и электрона) от воды к углекислоте с участием вспомогательных редокс-систем.

Выше уже указывалось, что, согласно имеющемуся экспериментальному материалу, процесс выделения кислорода локализован в хлоропласте, а восстановление углекислоты со всеми последующими превращениями промежуточных продуктов до полисахаридов — в цитоплазме.

Суспензии хлоропластов способны восстанавливать ряд соединений самой различной химической структуры; адаптированные растительные клетки способны не только к разным видам фотосинтеза, но и к хемосинтезу. Подобная универсальность аппарата удивительна по сравнению с высокой специфичностью «темновых» энзиматических систем.

Напрашивается вывод, что фотохимический процесс заключается в образовании активного восстановителя (диффундирующего в цитоплазму) и окислителя (локализованного в хлоропласте), вторичным процессом реагирующих с различными молекулами. Подобная точка зрения принимается в большинстве современных теорий фотосинтеза (Van Niel, Gaffron, Frank, Rabinowitch).

Таким образом фотопроцесс можно представить в виде схемы:

1) первичный электронный переход

$$HZ + X + h\nu \rightarrow HZ^+ + X^-,$$

2) вторичный переход протона

$$HZ^+ + X^- \rightarrow Z + HX,$$

где обогащенные энергией фотопродукты HX и Z являются соответственно активными восстановителем и окислителем. В системе клетки они, вероятно, топохимически разделены, чтобы воспрепятствовать обращению реакции.

Тогда нормальный фотосинтез выразится схемой, в которой один из нижеследующих процессов, как мы увидим из дальнейшего, также может быть фотохимическим [1]

$$HX + (CO_2) \rightarrow (HCO_2) + X,$$
$$Z + H_2O \rightarrow HZ + (OH)$$

с дальнейшими превращениями, вероятно типа дисмутации, первичных продуктов восстановления CO_2 и окисления воды.

Подобно этому могут быть даны схемы иных процессов.

1. Фотовосстановление адаптированной системой

$$HX + (CO_2) \rightarrow (HCO_2) + X,$$
$$Z + \frac{1}{2} H_2 \rightarrow HZ.$$

Вторая реакция требует активной гидрогеназы (Gaffron).

2. Фотоокисление вещества HA

$$HX + O_2 \rightarrow HO_2 + X,$$
$$Z + HA \rightarrow HZ + A.$$

Подобным же образом может рассматриваться хемосинтез. Активные промежуточные продукты, повидимому типа свободных радикалов (об их природе ниже), образуются в первой стадии окисления доноров водорода, например по схеме

$$AH_2 + O_2 \rightarrow AH + HO_2,$$

с образованием радикала HO_2 (Weiss, 1935), дисмутирующего в конечном счете до воды и кислорода

$$2HO_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$$

и активного продукта (вероятно, также типа свободного радикала) AH, темновым путем восстанавливающего углекислоту непосредственно или с помощью вспомогательных систем.

При использовании энергии реакции $H_2 + O_2$ в клетках, обладающих активной гидрогеназой (в адаптированных системах Gaffron) следует предположить предварительную реакцию

$$H_2 + A \rightarrow AH_2$$

с последующим окислением AH_2, как указано выше.

Действительно, потребляющие молекулярный водород клетки способны также к восприятию органических доноров водорода.

Использование первичных продуктов окисления молекулярного водорода по типу реакций, идущих в газовой фазе с образованием атомарного водорода или свободного гидроксила, крайне маловероятно, так как трудно приписать атомарному водороду или свободному гидроксилу роль промежуточного восстановителя в конденсированной фазе, из-за чрезвычайно большой скорости его рекомбинации и связывания в химически ненасыщенной атмосфере клетки.

[1] Скобки означают, что эти молекулы являются частью какого-то комплекса или молекулярного образования большого размера. Обозначение — подобно принятому в книге Rabinowitch (1945).

Радикал HO_2, которому приписывается столь большое значение в современных схемах окисления, но который экспериментально пока не обнаружен в конденсированной фазе, вероятно, должен обладать окислительным действием.

О природе активных промежуточных продуктов

Свободные радикалы. Для темнового восстановления углекислоты нужно соединение с потенциалом, во всяком случае, не ниже гидрогеназы, т. е. водородного электрода, потенциал которого при pH 7 составляет +0.42 вольта. Обычные биологические редокс-системы обладают более низкими значениями потенциала.

При действии кванта света могут образовываться свободные радикалы, обладающие энергией, например при воздействии красного света, порядка 1.5 вольт. Окислительно-восстановительный потенциал свободных радикалов может варьировать в гораздо более широких пределах, чем у насыщенных валентных систем.

Свободные радикалы, образованные, например, при разрыве связи C—C, C—H, O—H и т. д., вследствие своей чрезвычайной активности, сравнимой с активностью атомарного водорода, обладают очень малой длительностью существования. Образование свободных радикалов требует незначительной энергии активации, и трудность окисления органической молекулы до радикала происходит не из-за большой величины энергии активации, а из-за большой величины свободной энергии процесса.

Некоторые типы свободных радикалов, стабилизованные в результате квантовомеханического резонанса, обладают гораздо большей продолжительностью жизни.

Образование подобных радикалов с одним непарным электроном при обратимых окислительно-восстановительных превращениях красителей было исследовано в известных работах Michaelis и его сотрудников (1931—1940).

Равновесие между свободным радикалом (семихиноном) и его продуктами окисления и восстановления (дисмутации) устанавливается так же быстро, как ионное равновесие в растворе:

$$2\,RH\ (\text{семихинон}) = R + RH_2.$$

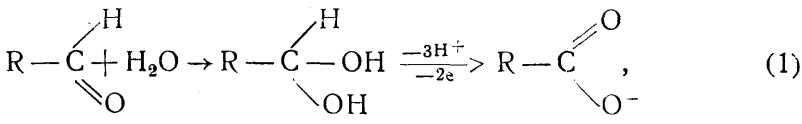
Резонансная стабилизация семихинонов делает их столь устойчивыми (снижает их энергию), что наличие их в системе можно определить обычными аналитическими методами (колориметрически, потенциометрически, магнетометрически); ведь константа равновесия, определяющая концентрацию свободного радикала, зависит от значения свободной энергии дисмутации.

Семихиноны образуются и при биологическом окислительно-восстановительном катализе, например при реакциях флавинов и пр.

За последние годы выяснилось большое значение иного типа свободных радикалов, обладающих двумя неспаренными электронами, так называемых бирадикалов, играющих весьма значительную роль при фотохимических реакциях (Теренин, 1947).

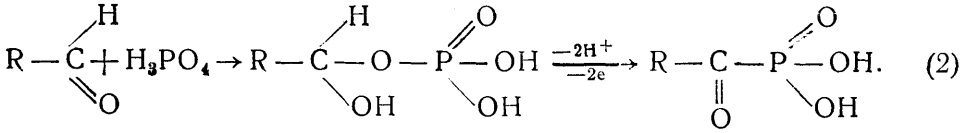
Фосфорные эфиры. Энергетически богатые фосфорные соединения типа аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) играют чрезвычайную роль при трансформации химической энергии окисления сахаров в механическую энергию сокращения мышцы и, возможно, при хемосинтетических процессах (см. ниже).

Биологическое окисление карбонильной группы сахаров в карбоксильную происходит не через стадию присоединения воды, как полагали ранее



(1)

а сопровождается потреблением фосфорной кислоты



(2)

При течении реакции по схеме (1) происходило бы значительное уменьшение свободной энергии системы, связанное с образованием устойчивой карбоксильной группы, стабилизованной за счет квантово-механического резонанса.

При течении реакции по схеме (2) ΔF реакции весьма невелико и основная часть свободной энергии карбонильной группы не выделяется, а удерживается в карбоксилфосфате.

Накапливающаяся в фосфатных связях энергия передается через обратимо реагирующую аденозиндифосфорную кислоту воспринимающей энергию системе по схеме (Lippmann, 1941; Kalkar, 1941)

карбоксилфосфат+аденозиндифосфат → аденозинтрифосфат+карбоксил.

АТФ, отщепляя концевую фосфатную группу с обратным образованием аденозиндифосфата и фосфорной кислоты, передает выделяющуюся при этом энергию (10—12 кал./моль) сокращающейся мышце. Эта энергия является существенной частью окисления карбонильной группы в карбоксильную.

Ruben (1943) предположил, что энергетически богатые фосфорилированные соединения участвуют в темновой стадии (карбоксилирование) фотосинтеза. Участие подобных соединений при хемосинтезе исследовалось в работах, рассматриваемых ниже.

Таким образом накопление химической энергии окислительных реакций в активных фосфорных эфирах является экспериментально установленным фактом, но участие этих соединений в фотосинтетических окислительно-восстановительных процессах требует дальнейших доказательств.

Механизм восьмиквантового процесса

На ассимиляцию одной молекулы CO_2 расходуется минимум 8 красных квантов. Для восстановления CO_2 до уровня углевода требуется 4 атома водорода; таким образом на перенос одного атома водорода от воды к CO_2 расходуется 2 красных кванта.

Можно представить следующие интерпретации этого заключения.

1. Переход одного атома водорода за счет двух фотохимических актов (например схема Frank-Herzfeld).

2. Переход энергии, фотохимически накопленной в 8 атомах водорода, к четырем (схема дисмутации энергии Rabinowitch).

3. Накопление электронной энергии возбуждения в активных продуктах типа фосфорных эфиров (Ruben, 1943; Emerson, Stauffer, Umbreit, 1944).

Рассмотрим эти возможности.

1. Два фотоакта на атом водорода

Наиболее проста схема с участием промежуточной системы HX—X:
1) фотовосстановление CO_2 донором водорода HX

$$HX + (CO_2) + h\nu \rightarrow (HCO_2) + X;$$

2) фотохимическая регенерация HX за счет окисления воды

$$X + HOH + h\nu \rightarrow HX + (OH).$$

Однако уже указывалась большая вероятность темнового восстановления CO_2 за счет генерируемых на хлоропласте активных восстановителей и предварительного редокс-процесса со вспомогательной системой HZ — Z; тогда возможны следующие сочетания реакций:

I.
$$HX + Z + h\nu \rightarrow HZ + X$$
$$X + HOH + h\nu \rightarrow HX + (OH)$$
$$HX + (CO_2) \rightarrow (HCO_2) + X$$

или

II.
$$HX + (CO_2) + h\nu \rightarrow (HCO_2) + X$$
$$X + HZ + h\nu \rightarrow HX + Z$$
$$HOH + Z \rightarrow HZ + (OH)$$

Схема Frank-Herzfeld (1941) построена по второму типу (подробнее см.: Красновский, 1946). Согласно этой схеме, HX восстанавливает фотохимически все три промежуточных продукта. Предположено, что катализатор HZ есть органическое соединение типа ROH, дающее при отнятии водорода радикал RO, окисляющий воду темновым путем с образованием перекиси

$$2RO + H_2O \rightarrow ROH + RO_2H.$$

Промежуточные продукты предохраняются от обратной реакции специальным катализатором «B». HX может быть уподоблен хлорофиллу.

Frank и Herzfeld аргументируют возможность фотовосстановления CO_2 тем, что флуоресценция листа зависит от парциального давления CO_2 над ним, что свидетельствует о передаче энергии от хлорофилла к углекислоте. Уже указывалось на то, что акт тушения вообще не связан с первичным актом сенсибилизированного процесса; кроме того, при фотосинтезе используется та часть энергии возбуждения, которая вообще не проявляется в виде флуоресценции (квантовый выход последней около 0.001). Поэтому кажется более вероятной схема первого типа, согласно которой восстановление CO_2 происходит темновым путем.

Гипотеза фотохимического разложения воды (второй фотоакт схемы I) является одной из наиболее распространенных гипотез. Однако разложение молекулы воды на H и OH требует 110 кал., т. е. для этого процесса недостаточно даже двух красных квантов; чтобы

реакция стала энергетически возможной, необходимо связывание продуктов разложения с выделением энергии (если процесс идет за счет одного кванта) до 70 кал.

Можно представить процесс идущим по схеме

$$H_2O + X + h\nu \longrightarrow HX + (OH)$$

с дисмутацией: $2\,(OH) \rightarrow H_2O + {}^1/_2O_2$; тогда энергия присоединения H к X должна составить ~70 кал. (конечно, без учета энергии дисмутации $2OH \rightarrow H_2O_2 + 22$ кал.).

Образующееся с такой убылью энергии соединение HX вряд ли может обладать достаточной активностью для темнового восстановления углекислоты;[1] поэтому естественной является вторая фотореакция, ведущая к образованию активного продукта HZ

$$HX + Z + h\nu \rightarrow HZ + X.$$

2. Схема с дисмутацией энергии

Rabinowitch (1945) предлагает схему, согласно которой энергия, накопленная в восьми фотоактах, приводит к переносу 4 атомов водорода; вводится промежуточная система Y—HY и представление о дисмутации образующихся семихинонов.

1. Фотохимическое образование свободных радикалов — семихинонов HY

$$8HZ + 8Y \xrightarrow{+8h\nu} 8Z + 8HY.$$

2. Дисмутация семихинона с образованием окисленной (Y) и восстановленной (H_2Y) форм промежуточного катализатора

$$8HY \rightarrow 4H_2Y + 4Y.$$

3. Темновое получение восстановленной (лейко) формы катализатора X

$$4H_2Y + 4X \rightarrow 4H_2X + 4Y.$$

4. Темновое образование свободных радикалов (семихинонов) HX с регенерацией исходного компонента HZ каталитической системы

$$4H_2X + 4Z \rightarrow 4HX + 4HZ.$$

5. Восстановление CO_2 семихиноном HX и дисмутация первичных продуктов восстановления

$$\begin{array}{l} 4HX + 4(CO_2) \rightarrow 4(HCO_2) + 4X \\ 4(HCO_2) \rightarrow (CH_2O) + 3(CO_2) + H_2O \\ 4Z + 4H_2O \rightarrow 4HZ + O_2 + 2H_2O \\ \hline 4H_2O + 4(CO_2) \rightarrow (CH_2O) + O_2 + 3(CO_2) + 3H_2O \end{array}$$

[1] Например, энергия присоединения одного атома водорода H к связи $>C=C<$ или $>C=O$ составляет соответственно 67 кал. и 60 кал.

Используя подобные представления для хемосинтеза, можно предположить, что в клетках, содержащих гидрогеназу, происходит восстановление промежуточного катализатора (X) молекулярным водородом и окисление полученного продукта H_2X молекулярным кислородом с образованием семихинона HX

$$4H_2X + 4X \rightarrow 4H_2X$$
$$4H_2X + 4O_2 \rightarrow 4HO_2 + 4HX$$
$$4HX + 4CO_2 \rightarrow (CH_2O) + 3CO_2 + H_2O + 4X$$
$$4HO_2 \rightarrow 2H_2O + 3O_2$$
$$\overline{4H_2 + O_2 + (CO_2) \rightarrow (CH_2O) + 3H_2O}$$

3. Накопление энергии в фосфатных связях

При энзиматическом расщеплении аденозинтрифосфорной кислоты выделяется 10—12 кал./моль (Lippmann, 1941).

Может ли быть использована энергия соединений типа АТФ для синтетических процессов?

В работах Volger, Umbreit и Le Page (1942, 1943) была исследована эта возможность для хемосинтезирующих сернистых бактерий *Thiobacillus thiooxidans*, использующих для восстановления CO_2 энергию окисления серы в серную кислоту. Оказалось, что в отсутствии CO_2 бактерии связывают неорганический фосфат в органическую форму.

При этом образуется АТФ, который, однако, оказался не аденозин-рибоза-5-трифосфатом мышц и дрожжей, а аденозин-рибоза-3-трифосфатом; восстановление CO_2 сопровождается обратным выделением неорганического фосфата.

Эти опыты, однако, говорят лишь об участии фосфорных эфиров в процессе хемосинтеза, но является ли это участие переносом энергии от системы $-\Delta F$ к системе $+\Delta F$, нуждается в особых доказательствах.

Emerson, Stauffer и Umbreit (1944) подробно рассматривают возможность фосфорилирования при фотосинтезе и проводят эксперименты, показывающие изменение в распределении органического и неорганического фосфора при разных режимах фотосинтеза водоросли *Chlorella pyrenoidosa*.

Предполагается, что фотохимическая стадия фотосинтеза заключается в образовании энергетически богатых фосфатных связей, а весь процесс превращений CO_2 является цепью темновых реакций, использующих энергию фосфорных эфиров типа АТФ. Однако имеющийся экспериментальный материал пока не позволяет сделать определенных выводов.

Следует также заметить, что если бы за счет одного фотоакта происходило образование одной фосфатной связи, то всей энергии ($8 \times 12 = 96$ кал.) все равно нехватило бы для осуществления процесса.

Нет убедительных экспериментальных данных, позволяющих предпочесть ту или иную гипотезу первичного процесса. Наиболее вероятны все же схемы с двумя фотоактами на один атом переносимого водорода (окисление — восстановление промежуточной системы с участием и без участия воды), а также схема дисмутации энергии (к со-

жалению, чисто умозрительная), значительным преимуществом которой является допущение одного типа фотопроцессов.

О химическом участии хлорофилла в фотопроцессе

Тимирязев еще в 1885 г. выдвинул предположение, что хлорофилл функционирует подобно гемоглобину, испытывая обратимое окислительно-восстановительное превращение. Эта концепция была использована авторами многих схем фотосинтеза от Willstätter и Stoll (1918) до Rabinowitch (1945). Однако до настоящего времени нет прямых экспериментальных доказательств подобного процесса in vivo. Попытки получить лейкохлорофилл и из него обратным окислением исходный продукт не удаются, вероятно вследствие необратимого окисления ненасыщенных боковых цепей [некоторые данные о возможности подобных превращений в растворах хлорофилла есть у Rabinowitch и Weiss (1937)].

Интересны опыты Narris, Ruben, Allen (1942) по изучению фотосинтеза *Chlorella* в воде, содержащей радиоактивный изотоп водорода H^3. Они не обнаружили связывания этого водорода с хлорофиллом, что могло бы рассматриваться как аргумент против теории химического участия хлорофилла в фотосинтезе.

Rabinowitch (1945) указывает на ряд иных возможных интерпретаций этих опытов и, в частности, на то, что радиоактивный водород улавливается в вспомогательной окислительно-восстановительной системе между хлорофиллом и водой.

При обратимом превращении имеются три возможности: фотохимическое восстановление или окисление хлорофилла, или то и другое.

Frank и Herzfeld в своей схеме уподобляют промежуточную систему HX—X хлорофиллу; при этом фотохимическими являются прямой и обратный процессы. Подобное допущение требует одинаковых оптических свойств окисленной и восстановленной форм, что экспериментально не подтверждено.

Заключение

Хотя изучение фотосинтеза за последние годы привело к открытию ряда новых фактов, но еще очень многое остается в области предположений.

Чрезвычайно велики методические трудности исследования работающей фотосинтетической системы без ее нарушения, однако попрежнему можно многое ожидать от оптических методов исследования, применения радиоактивных индикаторов и моделирования процесса на простых системах.

Проблема фотосинтеза уже давно вышла за рамки физиологии растений и стала фундаментальной проблемой физики и химии.

По сути — это вопрос конверсии лучистой энергии в химическую, осуществления химических процессов без темновых термодинамических ограничений, превращения распространенных в природе стабильных молекул в соединения высокого химического потенциала, лежащие в основе жизненных процессов.

Если освобождение ядерной энергии разрешает энергетическую проблему нашей планеты, то познание и осуществление фотосинтеза дали бы в наши руки первичные источники воссоздания жизни.

Космическая роль растения и заключается в использовании лучистой энергии ядерных превращений солнца в химическую энергию лабильных органических образований.

В заключение считаем своим приятным долгом принести глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за критический просмотр настоящей статьи и ряд ценных указаний.

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

Поступило
7 I 1947

ЛИТЕРАТУРА

Бойченко Е. А. 1946. ДАН СССР, *52*, 6 : 525.
Вавилов С. И. 1945. Изв. АН СССР, физ., *9*, 4—5 : 283.
Виноградов А. П и Р. В. Тейс. 1941. ДАН СССР, *33*, 9 : 497.
Ивановский Д. 1913. О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях. Варшава.
Красновский А. А. 1946. Усп. совр. биол., *21*, 2 : 153.
Красновский А. А. 1947. ДАН СССР (в печати).
Красновский А. А. и Г. П. Брин. 1946. ДАН СССР, *53*, 5 : 447.
Любименко В. Н. 1935. Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире. Сельхозгиз, Л.
Теренин А. Н. 1943. Acta Physicochimica URSS, 18 : 210.
Теренин А. Н. 1945. Изв. АН СССР, физ., *9*, 4—5 : 312.
Теренин А. Н. 1947. Фотохимия красителей. Изд. АН СССР.
Тимирязев К. А. 1923. Сб. „Солнце, жизнь и хлорофилл".
Феофилов П. П. 1945. Изв. АН СССР, физ., *9*, 4—5 : 317.
Цвет М. С. 1910. Хромофиллы в растительном и животном мире. Варшава.
Шпольский Э. В. и Е. В. Гришкун. 1945. Журн. физ. хим., *19* : 101.
Aronoff S. 1946. Science, *104*, 504
Baur E. 1918. Helv. Chim. Acta, *1* : 186.
Baur E. and C. Neiweiler. 1927. Helv. Chim. Acta, *10* : 901.
Blum H. and C. Spealman. 1941. Photodynamic Action and Diseases Caused by Light. New York.
Bot G. 1942. Chronica Bot., *7* : 66 (по Rabinowitch).
Dhéré Ch. 1937. La fluorescence en biochimie. Paris.
Dutton H. and W. Manning. 1941. Amer. Journ. Bot., *28* : 516.
Dutton H., W. Manning and B. Duggar. 1943. Journ. Phys. Chem., *47* : 308.
Emerson R. and C. Lewis. 1942. Journ. Gen. Physiol., *25* : 579.
Emerson R. and C. Lewis. 1943. Amer. Journ. Bot., *30* : 165.
Emerson R., I. Stauffer and W. Umbreit. 1944. Amer. Journ. Bot., *31* : 107.
Fan A., I. Stauffer and W. Umbreit. 1943. Journ. Gen. Physiol., *27* : 15.
Frank J. and H. Gaffron. Adv. Enzymol., *1* : 199.
Frank J. and K. Herzfeld. 1941. Journ. Phys. Chem., *45* : 978.
Frank J. and R. Livingston. 1941. Journ. Chem. Phys., *9* : 184.
French C., A. Holt and Powell. 1946. Science, 505, No. 2673.
Gaffron H. 1944. Biol. Rev., *19*:1.
Gaffron H. und K. Wohl. 1936. Naturwiss., *24*, 87 : 103.
Goodeve C. 1937. Trans. Farad. Soc., *33* : 340.
Granick S. 1938. Amer. Journ. Bot., *25* : 561.
Hill and Scarisbrick. 1939. Proc. Roy. Soc. London, B, *127* : 192.
Hill and Scarisbrick. 1939a. Proc. Roy. Soc. London, B, *129* : 238.
Holt A. and C. French. 1946. Arch. Biochem., *75*, 1.
Hubert B. 1936. Rec. trav. botan. néerland., *32* : 323.
Kalkar H. 1941. Chem. Rev., *23* : 71.
Karrer P. und W. Strauss. 1938. Helv. Chim. Acta, *21* : 1624.
Lewis G. and M. Calvin. 1945. Journ. Amer. Chem. Soc., *67* : 1232.
Lewis G. and Kasha. 1944. Journ. Amer. Chem. Soc., *66* : 2100.
Lewis G., Lipkin and Magel. 1942. Journ. Amer. Chem. Soc., *64* : 1744.
Lippmann. 1941. Adv. Enzymol., *1*, 1.
Lippmann. 1943. Ann. Rev. Biochem., *12*, 1.
Livingston R. and Hurd. 1941. Journ. Phys. Chem., *44* : 865.
Michaelis L. 1936. Окислительно-восстановительные потенциалы. ОНТИ.
Michaelis L. 1939. Cold Springs Harbour Symposia. *II* : 33.

Narris, Ruben and Allen. 1942. Journ. Amer. Chem. Soc., *64*: 3037.
Niel van. 1936. Arch. Microbiol., *7*: 323.
Niel van. 1936a. Adv. Enzymol., *1*: 263.
Noack K. 1927. Biochem. Ztschr., *183*: 135.
Rabinowitch E. 1945. Photosynthesis, *1*. New York.
Rabinowitch E. and I. Weiss. 1917. Proc. Roy. Soc. London, A, *162*: 251.
Riehl. 1940. Naturwiss., *28*: 601.
Riehl. 1946. Люминесценция. ГХТИ
Roberts. 1942. Amer. Journ. Bot., *29*: 165.
Ruben. 1943. Journ. Amer. Chem. Soc., *65*: 273.
Ruben, Kamen, Hassid and de Voult. 1939. Science, *90*: 570.
Ruben, Randall, Kamen and Hyde. 1941. Journ. Amer. Chem. Soc., *63*: 877.
Scheibe C. 1937. Naturwiss., *25*: 795.
Seyboldt A. und K. Egle. 1940. Botan. Arch. *41*: 578.
Stern K. 1921. Ztschr. Botan., *13*: 193.
Stoll A. and E. Wiedemann. 1938. Fortschritte der Chem. Org. Naturverb., 1: 159 (no Rabinowitch).
Szent-Györgyi A. 1941. Nature, *148*: 157.
Vogler K. 1942. Journ. Gen. Physiol., *25*: 103.
Vogler K. and W. Umbreit. 1942. Journ. Gen. Physiol., *25*: 257.
Vogler K., Le Page and W. Umbreit. 1943. Journ. Gen. Physiol., *26*: 89.
Warburg O. and Lüttgens. 1946. Биохимия, *11*, 4: 303.
Weissl. 1935. Naturwiss., *23*, 609
Weiss J. 1939. Trans. Farad. Soc., *35*: 135.
Willstätter R. und A. Stoll. 1913. Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin.
Willstätter R. und A. Stoll. 1918. Untersuchungen über die Assimilation des Kohlensäure. Berlin.
Wood H. 1946. Physiol. Rev., *26*, 2: 198.
Wurmser R. 1930. Oxidations et réductions. Paris. Русский перевод 1933 г.

A. A. KRASSNOWSKY. PHOTOCHEMISTRY OF PHOTOSYNTHESIS

SUMMARY

The connection between photosynthesis and chemosynthesis. Formation of active intermediate products of the free radical type as a result of photochemical reaction or exergonic dark process.

Modern concepts of the mechanism of the process are considered, as well as photochemical stages of photosynthesis, i. e. the transformation of radiant energy into chemical energy of labile organic substances.

1. The nature of the optical apparatus of the green cell. The type of pigment bond in the chloroplast. Energetic coupling of pigments in chloroplasts. Suggestions as to the common levels in photosynthetic systems. Model experiments with phthalocyanines.

2. The nature of long-lived excited state of pigments. Fluorescence and sensitisation in heterogenous systems. «Photo-activated» biradical (triplet) state. Possibilities of simplifying the system after the semiconductor type.

3. The nature of primary photosynthesis reactions. Photochemical transition of hydrogen atoms from water to carbon dioxide as an electron and proton transfer.

Photochemical formation of active oxidation-reduction pair and dark reduction of carbonic acid.

4. The nature of active intermediate product. Free radicals stabilised by resonance and phosphorilated ethers adenosinetriphosphate type.

5. Quantum yield of photosynthesis according to modern measurment, Eight quanta schemes. Hypothesis about one hydrogen atom transfer by two photoreactions, energy dismutation and energy accumulation in phosphate bonds.

The chemical participation of chlorophyll in processes is also considered.

Доклады Академии Наук СССР
1947. Том LVIII, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ И ХЛОРОФИЛЛА В РАСТВОРЕ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 10 IV 1947)

С целью получения экспериментальных данных о природе длительно-возбужденного состояния сенсибилизатора и элементарного механизма процесса сделана попытка сравнительного исследования фотосенсибилизирующего действия хлорофилла и фталоцианина магния в спиртовом растворе. Изучались два типа сенсибилизированных реакций: 1) окисление олеиновой кислоты, идущее через присоединение кислорода с образованием перекиси по Баху — Энглеру, 2) окисление аскорбиновой кислоты, заключающееся в дегидрировании с образованием перекиси водорода и дегидроаскорбиновой кислоты.

Реакция исследовалась микроманометрическим методом Варбурга — Баркрофта по убыли парциального давления кислорода над реагирующей системой ([1]). Освещение сосудов производилось 150-ваттной лампой накаливания через красный светофильтр RG-2 (Шотт). Расстояние от нити лампы до дна сосуда 70 мм. Растворы пигментов в 95% этиловом спирте были приготовлены с одинаковой величиной коэффициента погашения $(E)^{1\text{см}}_{665m\mu} = 1{,}2$. Это соответствует концентрации фталоцианина магния $0{,}64 \cdot 10^{-5}$ мол/л ([2]) и хлорофилла a+b $0{,}72 \cdot 10^{-5}$ мол/л (принимая молярный коэффициент погашения для хлорофилла a по Маккинней ([3]) $1{,}65 \cdot 10^{-5}$).

Применялся 0,5% раствор аскорбиновой кислоты в спирте (свежеприготовленный) и 5% раствор олеиновой кислоты (перед опытом перегонялась в вакууме).

В сосуд помещали 3 мл раствора пигмента, в боковое плечо 1 мл раствора субстрата. Опыты проводились при температуре от 10 до 40° С. До и после реакции производилось измерение спектра поглощения растворов в области пропускания фильтра (600—700 mμ) на спектрофотометре Бекмана (модель DU). Относительные значения квантового выхода окисления субстрата подсчитаны в виде отношения количества граммолекул поглощенного за час кислорода к средней величине интеграла поглощения в кв. см площади, ограниченной спектральной кривой. Соответственно, количество граммолекул разрушенного красителя, определенное спектрофотометрически, отнесено к средней величине интеграла поглощения. В табл. 1 эти величины увеличены в 10^6 раз.

Применялся свежеприготовленный раствор хлорофилла, дающий положительную фазовую пробу. После фотоокисления фазовая проба становится менее отчетливой.

Следует отметить, что алломеризованный раствор обладает сенсибилизирующим действием, подобным раствору с положительной фазовой пробой. Предварительное освещение раствора пигмента перед опытом не приводило к поглощению кислорода в темноте.

В случае выключения освещения в течение фотохимической реакции дальнейшего поглощения кислорода в темноте также не наблюдалось.

Таблица 1

Система	Относительная величина квантового выхода в произвольных единицах		Примечание
	Разрушение пигмента	Окисление субстрата	
Фталоцианин магния			Приведены данные для температуры 20±0,05°С При температурах 10, 30, 40° колебание значений в пределах±10% от значений при 20°С
Без субстрата	$0{,}58 \cdot 10^{-3}$	—	
С аскорбиновой кислотой	$0{,}13 \cdot 10^{-3}$	0,09	
С олеиновой кислотой	$0{,}74 \cdot 10^{-3}$	0,10	
Хлорофилл (a + b)			
Без субстрата	$0{,}47 \cdot 10^{-3}$	—	
С аскорбиновой кислотой	$0{,}40 \cdot 10^{-3}$	0,12	
С олеиновой кислотой	$0{,}46 \cdot 10^{-3}$	0,10	

Чтобы выяснить, активно ли при сенсибилизации электронное возбужденное состояние, определяющее флуоресценцию, или длительно-возбужденное состояние, ставились опыты тушения флуоресценции растворов пигментов аскорбиновой кислотой. С олеиновой кислотой подобные опыты не проводились вследствие ее поглощения в близком ультрафиолете. Измерялась флуоресценция спиртовых растворов пигментов той же концентрации, с которой велись манометрические опыты. Введением кристаллической аскорбиновой кислоты ее концентрация в растворе доводилась до 0,5%. В пределах точности измерения (±2%) тушения флуоресценции не наблюдалось. Измерение производилось на фотоэлектрическом флуорометре Колемана (модель 12). На отсутствие измеримого тушения флуоресценции пигментов кислородом воздуха было указано в предыдущем сообщении одного из нас ([4]).

Из рассмотрения экспериментальных данных можно сделать следующие заключения:

1. Отсутствие явно выраженной температурной зависимости указывает на то, что скорость реакции определяется фотохимической стадией, вероятно, идущей через промежуточное образование свободных радикалов.

2. Эффективность сенсибилизации имеет величину одного порядка у хлорофилла, способного к кетоэнольной таутомерии, и у фталоцианина магния, не обладающего лабильными атомами водорода, что свидетельствует о малой вероятности гипотезы „активного таутомера" ([5]). Более вероятна бирадикальная природа фотоактивированного состояния сенсибилизатора ([6]).

3. Из данных табл. 1 видно, что в присутствии аскорбиновой кислоты уменьшается фотоокисление пигмента-сенсибилизатора; это связано с восстановлением окисленной формы пигмента, что было показано опытами одного из нас ([4]).

При сенсибилизированном окислении олеиновой кислоты в присутствии фталоцианина магния наблюдается большее разрушение пигмента, чем в опыте без олеиновой кислоты. Это объясняется вторичным темновым разрушением пигмента образующимися перекисными соединениями; хлорофилл при этом более устойчив ([7]). При кратковременном освещении растворов пигментов с олеиновой кислотой удается наблюдать ее защитное действие, наиболее явно в опытах

с фталоцианином магния. Кроме того, можно было также констатировать возможность восстановления продуктов фотоокисления фталоцианина магния олеиновой кислотой ([4]); у хлорофилла подобный эффект наблюдать не удалось. Вероятно, это связано с различной устойчивостью промежуточных продуктов окисления обоих пигментов.

4. Исследованные пигменты сенсибилизируют оба изученных типа окисления. Механизм сенсибилизации, предложенный Вейссом ([8]) и

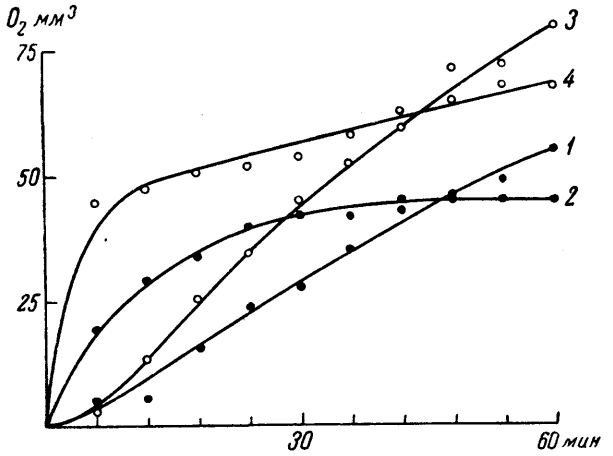


Рис. 1. Ход сенсибилизированного окисления; *1* — фталоцианин магния с аскорбиновой кислотой; *2* — фталоцианин магния с олеиновой кислотой; *3* — хлорофилл a + b с аскорбиновой кислотой; *4* — хлорофилл a + b с олеиновой кислотой

Франком и Ливингстоном ([5]), не охватывает оба типа исследованных реакций, так как:

а) рассматривает фотосенсибилизированное окисление как дегидрирование, тогда как возможно окисление по Баху — Энглеру через образование перекиси;

б) оперирует с представлением о промежуточном образовании семихинона красителя, что для порфиринов требует экспериментальных подтверждений.

Установленное образование лабильных продуктов окисления исследованных пигментов ([4,7]) позволяет предположить механизм, в основе которого лежит реакция восстановления субстратом обратимо-образующейся активной перекиси пигмента по схеме (применяя символику Теренина ([6]) для обозначения спинов электронов, где A — молекула пигмента, B — олеиновой кислоты, HB — аскорбиновой кислоты):

$$h\nu + A[\uparrow\downarrow] \rightarrow A[\uparrow][\downarrow] \rightarrow A[\uparrow][\uparrow].$$

$$A[\uparrow][\uparrow] + O_2[\downarrow][\downarrow] \rightarrow A[\uparrow][\uparrow][\downarrow]O_2 \begin{cases} \xrightarrow{+B} A + BO_2 \\ \xrightarrow{+HB} A + HO_2 + B \text{ и т. д.} \end{cases}$$

Дальнейшее окисление олеиновой кислоты, вероятно, идет по цепному механизму, на что указывает вид кинетической кривой.

Следует считать также возможным стимулирование перехода молекулы субстрата из основного в бирадикальное состояние под влиянием магнитного момента фотохимически образованного бирадикала ([9]).

Такой „вторично“ образованный радикал будет способен к самопроизвольному окислению либо за счет присоединения кислорода, либо за счет отделения электрона и протона. Вопрос о механизме процесса будет подробнее рассмотрен в другом месте.

Приносим глубокую благодарность академику А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

Лаборатория фотобиохимии
Института биохимии им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
10 IV 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946). [2] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 3 (1947). [3] G. Mackinney, J. Biol. Chem., **132**, 91 (1940). [4] А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 4 (1947). [5] J. Frank, R. Livingston, J. Chem. Phys., **9**, 184 (1941). [6] A. N. Terenin, Acta Physicochimica. URSS, **18**, 210 (1943); Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [7] А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 5 (1947). [8] J. Weiss, Trans. Farad. Soc., **35**, 48 (1939). [9] А. Н. Теренин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3 (1947).

Доклады Академии Наук СССР
1948. Том LX, № 4

БИОХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ И ХЛОРОФИЛЛА ПОСТОРОННИМИ МОЛЕКУЛАМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 19 II 1948)

Известны наблюдения над тушением флуоресценции хлорофилла в растворе кислородом ([1–3]), бензидином, анилином и иодистым натрием([2]). Эти работы представляют интерес в связи с выяснением механизма передачи энергии от возбужденной светом молекулы хлорофилла, хотя исследования последних лет показали в ряде случаев независимость процессов тушения флуоресценции и фотосенсибилизации друг от друга ([4], [5]) и большую роль длительно живущего «фотоактивированного», по терминологии А. Н. Теренина, возбужденного состояния, возникающего при внутримолекулярной конверсии электронной энергии возбуждения ([6]).

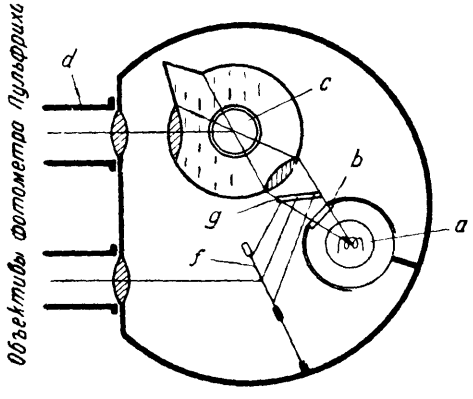


Рис. 1

В наших предыдущих сообщениях ([5], [7], [8]) было показано, что фталоцианин магния по своим оптическим и фотохимическим свойствам близок к хлорофиллу. Спектр флуоресценции спиртового раствора фталоцианина магния при наблюдении в малый спектрометр Цейсса представляется в виде узкой красной полосы, лежащей в области 670—675 mμ, т. е. приблизительно на 5 mμ дальше в длинноволновую часть спектра по сравнению с главной полосой флуоресценции хлорофилла.

В настоящей работе измерялось тушение флуоресценции фталоцианина магния и хлорофилла (a + b) в спиртовом растворе кислородом, хиноном, гидрохиноном, аскорбиновой кислотой, иодистым калием и иодистым натрием. Эти вещества были выбраны как представители соединений, имеющих различное сродство к электрону, и в большинстве являются участниками биологических окислительно-восстановительных систем. Во избежание сильного фотохимического воздействия при возбуждении ультрафиолетом флуоресценция возбуждалась в красном максимуме поглощения; во всех случаях одновременно с тушением флуоресценции измерялось изменение величины коэффициента погашения в максимуме, характеризующее возможное химическое взаимодействие между молекулами пигмента и тушителя.

В качестве прибора для измерения интенсивности флуоресценции нами был использован фотометр Пульфриха с приставкой для измерения мутности (рис. 1).

Свет от лампы накаливания *a* проходит через красный светофильтр RG-2 *b* и фокусируется на пробирке *c* с флуоресцирующим раствором.

Свет флуоресценции через объектив *d* попадает в левую диафрагму фотометра Пульфриха. Его интенсивность сравнивается с интенсивностью свечения матового стекла *f*, на которое падает луч света от лампы *a*, прошедший через светофильтр *b* и частично отраженный посредством стеклянной пластинки *g*.

Интенсивность флуоресценции выражалась в делениях процентной шкалы правого барабана фотометра Пульфриха, отсчитанных при установке левого барабана на 100% и при достижении равенства освещения обоих полей зрения. Перед окуляром фотометра находился светофильтр RG-2. Пропуская водопроводную воду через рубашку прибора, можно было в течение опыта поддерживать температуру постоянной в пределах $\pm 0{,}5^\circ$ С.

Контрольными измерениями прозрачных нефлуоресцирующих жидкостей было показано, что отсчет для интенсивности отраженного и рассеянного света не превышает 2—3 делений при использовании для сравнения матового стекла № 4. Контрольное измерение проводилось перед каждым опытом, и полученная величина вычиталась из измеренной интенсивности флуоресценции.

Ход кривой зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации при данной методике измерения подобен для обоих соединений. Максимальную интенсивность флуоресценции показывают в обоих случаях растворы с коэффициентом погашения 0,5 в красном максимуме поглощения (668 mμ для фталоцианина магния и 664 mμ для хлорофилла), что соответствует концентрации $0{,}25—0{,}3 \cdot 10^{-5}$ М/л.

Интенсивность флуоресценции пигментов зависит от примененного растворителя, что видно из табл. 1.

Тушение флуоресценции кислородом измерялось в вакуумной трубке Тунберга специальной формы, допускающей ее установку в кювето-

Таблица 1

Растворитель	Фталоцианин магния		Хлорофилл (a + b)	
	Коэффициент погашения раствора в красном максимуме кривой поглощения	Интенсивность флуоресценции в услови. единицах	Коэффициент погашения в красном максимуме кривой поглощения	Интенсивность флуоресценции в услови. единицах
Этанол 95%	0,415	61,5	0,418	40,5
Ацетон	0,413	70,5	0,417	50,5
Пиридин	0,412	35,5	0,416	32,0

Примечание. Измерения при $7 \pm 0{,}5^\circ$ С.

Таблица 2

	Коэффициент погашения E	Интенсивность флуоресценции		Коэффициент погашения E	Интенсивность флуоресценции	
		в услови. единицах	в %		в услови. единицах	в %
Спиртовый раствор фталоцианина магния, температура $7 \pm 0{,}5^\circ$С $E^{1\ см}$ при 668 mμ						
После удаления воздуха .	1,07	75	100	0,490	86	100
После насыщения O_2 . . .	1,07	63	84	0,486	69	80,5
После удаления O_2	1,08	75	100	0,489	86	100
Спиртовый раствор хлорофилла (a+b) $E^{1\ см}$ при 664 mμ						
После удаления воздуха .	0,541	51	100	0,207	36,5	100
После насыщения O_2 . . .	0,545	41	80,5	0,207	30,5	83
После удаления O_2	0,542	51	100	0,208	37,0	101,5

держатель спектрофотометра Бекмана.

В начале опыта воздух удалялся из раствора при кипении под вакуумом в течение нескольких минут, затем измерялось погашение E раствора в красном максимуме поглощения и интенсивность флуоресценции непосредственно в трубке. Те же измерения производились после впуска кислорода под атмосферным давлением и насыщения раствора при взбалтывании и, наконец, после повторного удаления кислорода под вакуумом.

Степень тушения флуоресценции обоих соединений зависит от процентного содержания воды в спирте. Чем больше воды содержит спирт, тем меньше тушится флуоресценция, что связано, очевидно, с меньшей растворимостью кислорода в воде. При 25% воды в спирте тушение флуоресценции хлорофилла кислородом уже нельзя заметить. С фталоцианином подобный опыт не мог быть произведен, так как при разбавлении спирта водой пигмент выпадает из раствора.

Один из нас ([7]) указывал на то, что не удалось наблюдать тушения флуоресценции растворов этих пигментов воздухом при возбуждении ртутной линией 365 mμ; повидимому, величина эффекта была близка к пределу возможной ошибки измерения на примененном тогда фотоэлектрическом флуорометре Колемана, обладающем фотоэлементом, сравнительно малочувствительным в крайней красной области спектра. Примененный в настоящей работе метод измерения дает возможность обнаружить тушение флуоресценции воздухом, хотя и в этом случае величина наблюдаемого эффекта близка к субъективной ошибке измерения. Тушение флуоресценции остальными веществами определялось в пробирке, в которую наливалось 10 мл раствора. В табл. 3 приводятся данные опытов с хиноном (свежевозогнанным) и гидрохиноном.

Таблица 3

Спиртовый раствор фталоцианина магния, температура 16 ± 0,5° С							
Концентрация хинона в М/л . . .	0	0,0019	0,0065	0,016	0,034	0,066	0,122
Коэффициент погашения $E^{1\text{ см}}$ при 668 mμ . . .	0,530	0,528	0,520	0,525	0,520	0,509	0,500
Интенсивность флуоресценции в услови. единицах	63	57	44	34	21	16	13
То же в % . . .	100	90,5	70	54	33,5	25,5	20,5
Спиртовый раствор хлорофилла (a + b), температура 12 ± 0,5° С							
Концентрация хинона в М/л . . .	0	0,0019	0,0055	0,016	0,031	0,065	0,147
Коэффициент погашения $E^{1\text{ см}}$ при 664 mμ . . .	0,282	0,280	0,276	0,275	0,272	0,264	0,252
Интенсивность флуоресценции в услови. единицах	37	35	31	24	18	11	8
То же в % . . .	100	95	84	65	49	30	22
Спиртовый раствор фталоцианина магния, температура 12 ± 0,5°С							
Концентрация гидрохинона в М/л .	0	0,039	0,129	0,268	0,542	—	—
Коэффициент погашения $E^{1\text{ см}}$ при 668 mμ . . .	0,509	—	0,502	0,499	0,495	—	—
Интенсивность флуоресценции в услови. единицах	67	66	60	52	40	—	—
То же в % . . .	100	98	90	77,5	59,5	—	—

Спиртовый раствор хлорофилла (a + b), температура 21 ± 0,5° C

Концентрация гидрохинона в М/л .	0	0,061	0,165	0,328	0,566	1,10	—
Коэффициент погашения $E^{1\text{ см}}$ при 664 mμ . . .	0,264	—	—	0,260	—	0,258	—
Интенсивность флуоресценции в услови. единицах	37	37	35,5	35	34	32	—
То же в % . . .	100	100	96	94,5	92	86,5	—

При растворении гидрохинона (х. ч. от Мерка) образовывалась некоторая муть, которую необходимо было удалять во избежание ошибок при измерениях. Как показали контрольные опыты, муть полностью удаляется фильтрованием через плотный бумажный фильтр. Адсорбции красителя на бумаге не наблюдалось.

Мы не приводим цифр для опытов с KJ, NaJ и аскорбиновой кислотой. Эти соединения практически не тушат флуоресценции фталоцианина магния и хлорофилла при концентрациях, соответствующих их насыщению в 95% этаноле. Заметное тушащее действие можно было наблюдать только при значительных концентрациях KJ и NaJ для растворов хлорофилла, содержащих 20—25% воды.

Следует отметить, что хотя изменение поглощения в красном максимуме после прибавления тушения очень невелико, оно все же превышает возможную ошибку эксперимента. Это побудило нас исследовать полный спектр поглощения спиртовых растворов хлорофилла и фталоцианина магния после прибавления хинона. В качестве контрольного раствора при спектрофотометрировании служил раствор хинона соответствующей концентрации. Было обнаружено, что прибавка хинона не вызывает заметного изменения положения и величины максимумов поглощения в сине-фиолетовой части спектра для хлорофилла и в ультрафиолете для фталоцианина магния.

Из полученных данных можно сделать следующие заключения.

1. Тушение флуоресценции фталоцианина магния посторонними молекулами подобно тушению флуоресценции хлорофилла; таким образом, этот эффект не связан с наличием в молекуле хлорофилла лабильных атомов водорода и свидетельствует о подобии свойств тетразапорфиновой и порфиновой системы конъюгированных двойных связей.

2. Молекулы-окислители, обладающие сродством к электрону (хинон, кислород), сильно тушат флуоресценцию исследованных пигментов, тогда как восстановители (гидрохинон, аскорбиновая кислота, NaJ и KJ) гораздо менее активны.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
12 II 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] H. Kautsky u. A. Hirsch, Ber. Deutsch. chem. Ges., **64**, 2677 (1931). [2] T. Franck u. H. Levi, Z. phys. Chem., B, **27**, 409 (1934). [3] Э. В. Шпольский и Г. Шереметьев, ЖФХ, **8**, 640 (1936). [4] Э. В. Шпольский и Е. В. Гришкун, там же, **19**, 107 (1945). [5] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947). [6] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947; Acta Physicochim. URSS, **18**, 210 (1943). [7] А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947). [8] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, 417 (1947).

Доклады Академии Наук СССР
1948. Том LX, № 3

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 19 II 1948)

Установление возможности обратимого окислительно-восстановительного превращения хлорофилла при фотосинтезе существенно для познания природы элементарного механизма этого явления. К. А. Тимирязев [1] впервые предположил, что хлорофилл при фотосинтезе испытывает обратимое химическое превращение. Ему удалось экспериментально показать возможность восстановления хлорофилла в растворе цинком с уксусной кислотой и обратного окисления на воздухе слабо окрашенных продуктов восстановления. Т. Годнев и С. Калишевич [2] при восстановлении подобным методом протохлорофилла установили образование лейкосоединения, окисляющегося кислородом воздуха. Имеются указания на то, что спектр флуоресценции и поглощения регенерированного пигмента несколько отличен от исходного, что приписывалось необратимому восстановлению винильной группы хлорофилла [3].

Мы исследовали возможность фотохимического восстановления хлорофилла и фталоцианина магния распространенными в зеленой клетке соединениями: кислотами аскорбиновой, пировиноградной, щавелевой, яблочной, лимонной, а также этиловым спиртом, фенилгидразином и гидрохиноном.

Реакции проводились в спиртовом и пиридиновом * растворах при концентрации восстановителя до $5 \cdot 10^{-2}$ М/л и концентрации пигмента $5 \cdot 10^{-6}$ М/л. Опыты проводились в вакуумных трубках специальной формы, помещаемых в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана. 5 мл раствора в трубке эвакуировалось масляным насосом; кислород воздуха удалялся при кипении растворителя. Освещение производилось киноламповой 500 W через конденсор, водяной фильтр и красный фильтр RG-2 (Шотт). В спиртовом растворе не удалось констатировать течения фотохимического процесса, обратимого в темноте. Однако в пиридине хлорофилл быстро реагирует с аскорбиновой кислотой; раствор теряет флуоресценцию уже после 1—2 мин. освещения; в темноте реакция идет обратно с возвратом флуоресценции и зеленой окраски раствора. Реакция идет также с фенилгидразином; остальные соединения были неактивны. Добавка пиридина или аммиака в спиртовый раствор хлорофилла с аскорбиновой кислотой также приводила к образованию некоторого количества обратимо-реагирующего фотопродукта.

До освещения измерялся спектр поглощения эвакуированного раствора, после выключения света производились отсчеты коэффициента

* Применялся пиридин, обезвоженный путем разгонки с бензолом на ректификационной колонке высотой 120 мм с насадкой Фенске.

погашения в максимуме поглощения хлорофилла, характеризующие скорость обратной реакции. По окончании темновой реакции (2—3 часа) снова измерялось поглощение по всему спектру. Спектральная харак-

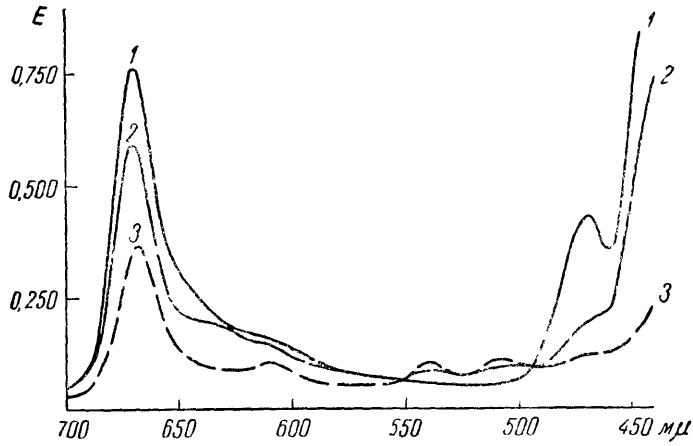


Рис. 1. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла a + b аскорбиновой кислотой в пиридине: *1* — спектр поглощения исходных пигментов в безводном пиридине; *2* — —спектр поглощения пигментов после обратной реакции в безводном пиридине; *3* — спектр поглощения пигментов после обратной реакции в водном пиридине (16% воды)

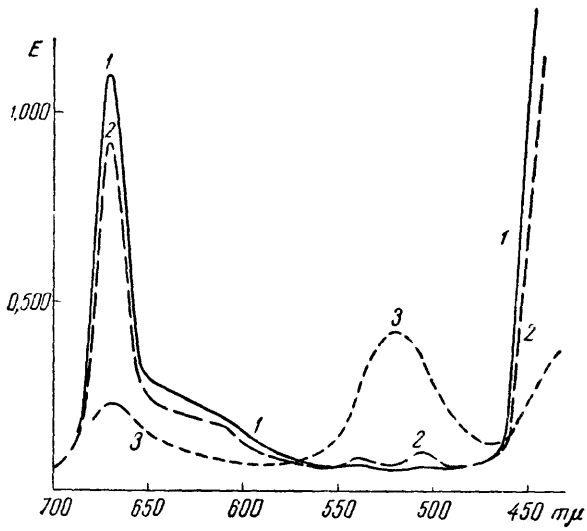


Рис. 2. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла a аскорбиновой кислотой в пиридине: *1* — спектр поглощения исходного хлорофилла в безводном пиридине; *2* — спектр поглощения хлорофилла после обратной реакции; *3* — приближенный спектр поглощения неустойчивого фотопродукта через 6 мин. после выключения света (точность значений *E* в пределах ± 10%)

теристика быстро реагирующих восстановленных продуктов измерялась в ряде опытов с учетом скорости процесса; так удалось получить приближенную спектральную кривую неустойчивого фотопродукта (рис. 2).

Из рассмотрения полученных опытных данных следуют заключения:

1. Хлорофилл фотохимически восстанавливается аскорбиновой кислотой против темновых равновесных условий; образующиеся активные фотопродукты в темноте реагируют обратно. Фталоцианин магния восстанавливается значительно труднее хлорофилла и в условиях опыта образует больше продуктов необратимого восстановления.

2. Реакция может быть обнаружена лишь в среде, обладающей сродством к протону; в этих условиях осуществляется стабилизация лабильных фотопродуктов. В среде, обладающей большей концентрацией водородных ионов, происходит образование устойчивых продуктов деструктивного восстановления; уже небольшое содержание воды в пиридине приводит к относительно большому увеличению количества этих соединений.

3. Спектр поглощения регенерированного пигмента после восстановления хлорофилла (a + b) несколько отличен от спектра исходного соединения. Характерный для хлорофилла b максимум при 470 mμ сглаживается после регенерации; соответственно наблюдается относительно большее падение поглощения в области красного максимума хлорофилла b; отношение $E_{670\ m\mu}/E_{650\ m\mu}$ у исходного хлорофилла (a + b) равно 2,55, у регенерированного 3 2. Общий вид спектра поглощения после регенерации приближается к виду спектра хлорофилла a, что свидетельствует о необратимом фотохимическом восстановлении карбонильной группы хлорофилла b аскорбиновой кислотой. В присутствии воды явно идет реакция образования феофитина, характеризующаяся появлением максимума при 540 mμ и ходом коротковолновой ветви спектральной кривой. Обратная реакция в присутствии кислорода идет гораздо быстрее и ведет к получению того же продукта, что и при течении обратной реакции в анаэробных условиях.

4. Спектр поглощения обратно образованного пигмента при восстановлении хлорофилла a подобен спектру исходного соединения; некоторые отличия наблюдаются лишь в величине максимумов при 505 и 540 mμ, характерных для феофитина; вероятно, имеет место побочное образование этого соединения. В случае хлорофилла a, у которого альдегидная группа восстановлена до метильной, не наблюдается необратимого фотохимического изменения, происходящего у хлорофилла b.

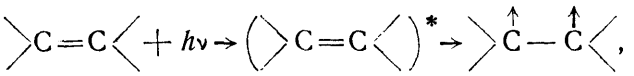
5. Наиболее вероятно, что первичный фотопродукт получается за счет размыкания конъюгированной по кругу системы двойных связей порфирина в одном месте. В пользу этого предположения свидетельствует следующее:

а) При размыкании конъюгированной по кругу системы 9 двойных связей порфирина следует ожидать значительного сдвига максимума поглощения в коротковолновую часть спектра; например, у соединений из ряда каротиноидов с 9 двойными связями (виолоксантин, фукоксантин) максимумы расположены в области 450—500 mμ [4]. Максимум поглощения лабильного фотопродукта лежит при 530 mμ.

б) Молярный коэффициент погашения у системы, конъюгированной по кругу, выше, чем у разомкнутой системы; например, у хлорофилла a и фталоцианина магния этот коэффициент равен $1{,}7—2\cdot10^5$ [5], у каротиноидов — около $1\cdot10^5$. Отношение молярных коэффициентов погашения хлорофилла и фотопродукта $\Delta E_{670\ m\mu}/\Delta E_{530\ m\mu}=1{,}8$, что соответствует вышеприведенным значениям.

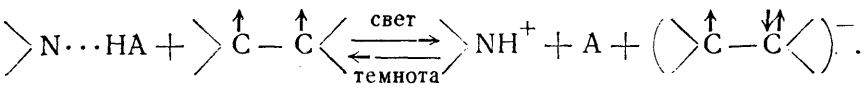
в) Согласно гипотезе А. Н. Теренина [6, 7], наиболее вероятна бирадикальная природа возбужденного состояния пигмента-сенсибилизатора; в этом случае первичный фотоакт связан с размыканием одной из двойных связей системы.

6. Исходя из бирадикальной гипотезы возбужденного состояния, схему фотовосстановления можно представить следующим образом



где * — символ электронного возбужденного состояния, ↑ — символ электрона с неспаренным спином. Образуется бирадикал, обладающий повышенной тенденцией к отдаче или приему электрона.

Аскорбиновая кислота (восстановитель), ассоциированная с растворителем — пиридином посредством водородной связи, способна легко отдать свой электрон с образованием радикалов — ионной формы семихинона пигмента и монодегидроаскорбиновой кислоты; предположим, что этот процесс имеет следующий механизм:



Образованная ионная форма семихинона хлорофилла могла бы захватить протон с последующей дисмутацией до лейкосоединения, согласно работам Михаэлиса ([8]). Однако возможность захвата протона уменьшается в среде, обладающей большой величиной сродства к протону (пиридин); нужно полагать также, что весьма велики стерические препятствия бимолекулярной дисмутации в случае большой и несимметричной молекулы хлорофилла. Поэтому неясно, чем является обнаруженный фотопродукт с максимумом поглощения при 530 mμ,— лейкосоединением хлорофилла, нейтральной или ионной формой семихинона; последнее нам кажется более вероятным. Решение вопроса о природе этого соединения, повидимому, возможно лишь путем магнетометрических измерений.

В спиртовой среде не удается наблюдать образования обратимореагирующего фотопродукта. Следует полагать, что это объясняется быстро текущей обратной реакцией семихинона в неионной форме, менее устойчивого, чем семихинон в ионной форме, обладающий дополнительными возможностями резонанса структур. Можно думать, что фотохимическая реакция между хлорофиллом и его непременным спутником в зеленой клетке — аскорбиновой кислотой связана с элементарными процессами фотосинтеза. Нам удалось также показать, что активные фотопродукты, образуемые при фотовосстановлении хлорофилла, играют важную роль при сенсибилизированных реакциях в простых системах и, вероятно, при фотосинтезе.

Приношу глубокую благодарность А. Н. Терешину за существенные указания и помощь в работе и Т. Н. Годневу за ценную дискуссию.

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

Поступило
12 II 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] К. А. Тимирязев, Nature, **32**, 342 (1885); **34**, 52 (1886); Сб. Солнце, жизнь и хлорофилл, 1923. [2] Т. Н. Годнев и С. Калищевич, Тр. Ин-та физиол. растений АН СССР, **4**, в. 2, 160 (1945). [3] V. Albers, H. Knorr and P. Rothemund, Phys. Rev., **47**, 198 (1935); P. Rothemund, Cold Springs Harbour Symp. Quant. Biol., **3**, 171 (1935). [4] R. Morton, The Appl. of Absorption Spectra to the Study of Vitamins, etc., L, 1942. [5] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, № 3 (1947). [6] А. Н. Терешин, Acta physicochim. URSS, **18**, 210 (1943); Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947; Изв. АН СССР, сер. биол., № **3**, 369 (1947). [7] А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 377 (1947); ДАН, **58**, № 4, 5 (1947); Усп. совр. биол., **21**, 153 (1946); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, № 6 (1947). [8] L. Michaelis, Cold Springs Harbour Symp. Quant. Biol., **7**, 33 (1939).

Доклады Академии Наук СССР
1948. Том LXI, № 1

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ И ФТАЛОЦИАНИНОМ МАГНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ, ИДУЩИЕ С УВЕЛИЧЕНИЕМ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ СИСТЕМЫ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 27 IV 1948)

Хлорофилл в зеленой клетке сенсибилизирует реакции, ведущие к восстановлению углекислоты за счет водорода воды. Эти реакции идут „против" темновых термодинамически равновесных условий и сопровождаются увеличением свободной энергии реагирующей системы.

Хлорофилл, извлеченный из зеленой клетки, теряет свою фотосинтетическую активность; доныне осуществленные процессы, сенсибилизированные хлорофиллом в растворе, вообще возможны и в темноте, и энергия света используется в этих случаях для преодоления активационных барьеров; сюда относятся многочисленные случаи окисления кислородом ([1,2]) и немногие известные случаи иных окислительно-восстановительных реакций ([3–5]).

Недавно нам удалось показать возможность обратимого фотохимического восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой, приводящего к образованию неустойчивого фотопродукта, повидимому, типа семихинона ([6]). Это указало путь осуществления сенсибилизированных хлорофиллом реакций, идущих с увеличением свободной энергии системы, моделирующих первичный процесс фотосинтеза.

В результате ряда опытов мы обнаружили возможность обратимого фотохимического восстановления аскорбиновой и пировиноградной кислотой ряда красителей, из которых для нас были наиболее интересны рибофлавин и сафранин Т, по причинам, которые будут ясны из нижеизложенного. Аскорбиновая кислота, обладающая $E_0 = +0{,}05$V при pH = 7, не может восстановить в темноте рибофлавин ($E_0 = -0{,}22$V) и сафранин Т ($E_0 = -0{,}29$ V), а способна лишь к самопроизвольному восстановлению красителей, обладающих более положительной величиной редокс-потенциала; хорошо известно ускорение светом реакций восстановления тионина и метиленового голубого аскорбиновой кислотой, вообще идущее и в темноте, наиболее явно в спиртовом растворе.

Возможность обратимого окисления пировиноградной кислоты и соответствующая этому величина E_0 нам неизвестна.

Реакции осуществлялись в спиртовом и пиридиновом растворах, в вакуумных трубках специальной формы, допускающей их установку в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана. Концентрация красителя 10^{-5} мол/л, восстановителя $6 \cdot 10^{-2}$ мол/л. После кипения под вакуумом для удаления кислорода растворы освещались в течение

1—3 мин. в фокусе конденсора киноламповой 500 W через водяной фильтр. За ходом прямой фотохимической и обратной темновой реакций следили по величине коэффициента погашения E в максимуме поглощения красителя. При впуске воздуха обратное окисление образованных лейкосоединений происходило гораздо быстрее и полнее. Реакции могут быть изображены схемой:

$$2К + 2АН_2 \underset{\text{темнота}}{\overset{\text{свет}}{\rightleftarrows}} 2КН + 2АН \leftrightarrows (КН_2 + К) + (АН_2 + А),$$

где К, $КН_2$ и КН, соответственно, исходная молекула красителя, ее лейкосоединение и семихинон; А, $АН_2$ и АН, соответственно, дегидроаскорбиновая, аскорбиновая и гипотетическая монодегидроаскорбиновая („семихинон") кислота.

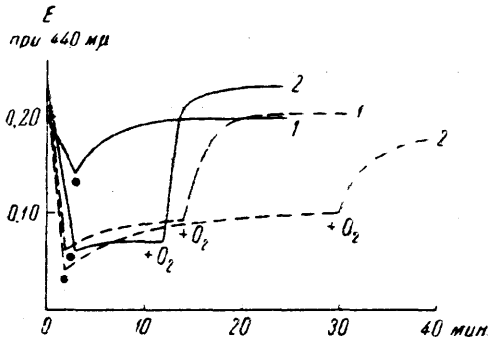


Рис. 1. Обратимое фотохимическое восстановление рибофлавина, температура 20° С. *1* — опыты с аскорбиновой кислотой, *2* — опыты с пировиноградной кислотой; сплошные линии — опыты в пиридине, пунктирные линии — опыты в этаноле, точки — выключение света; $+O_2$ — впуск воздуха

Более полная обратимость реакции в пиридине связана, повидимому, с большей устойчивостью анионной формы семихинонов вследствие сродства пиридина к протону. Некоторая обратимость реакции с пировиноградной кислотой свидетельствует о возможности ее обратимого окисления (рис. 1 и 2).

Мы показали возможность сенсибилизации этих реакций хлорофиллом и фталоцианином магния к красной области спектра; концентрация пигмента-сенсибилизатора в этих опытах, подобных вышеописанным, составляла 10^{-5} мол/л. Освещение раствора в вакуумной трубке производилось через красный фильтр RG-2 в течение 5 мин. Рибофлавин и сафранин не поглощают света в области пропускания этого фильтра; все же были поставлены соответствующие контрольные опыты без сенсибилизатора.

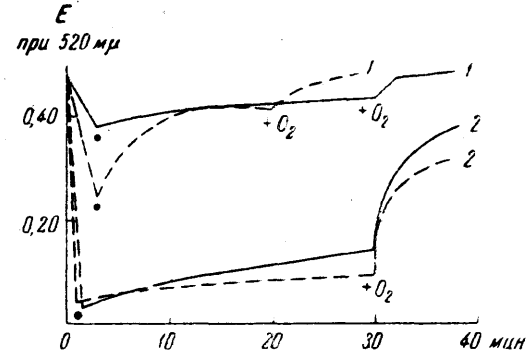


Рис. 2. Обратимое фотохимическое восстановление сафранина Т, температура 20° С. *1* — опыты с аскорбиновой кислотой, *2* — опыты с пировиноградной кислотой; сплошные линии — опыты в спирте, пунктирные линии — опыты в пиридине, точки — выключение света; $+O_2$ — впуск воздуха

В табл. 1 течение реакции охарактеризовано величиной ΔE — разностью коэффициентов погашения красителей до и после освещения. В контрольных опытах с аскорбиновой и пировиноградной кислотой без пигмента величина ΔE лежала в пределах 0,005—0,010.

В качестве первичного фотопроцесса возможна реакция хлорофилла в длительно живущем возбужденном состоянии с молекулами растворителя, красителя или донора водорода. Нам не удалось наблюдать образования лабильных продуктов взаимодействия хлорофилла с первыми двумя видами молекул, тогда как обратимое взаимодействие хлорофилла с аскорбиновой (но не пировиноградной!) кислотой было нами установлено ([6]).

Таким образом, сенсибилизированная реакция заключается в переносе водорода (протона и электрона) от аскорбиновой кислоты к

Таблица 1

Анаэробное фотовосстановление красителей, сенсибилизированное хлорофиллом a+b и фталоцианином магния

(температура 20° С)

Сенсибилизатор и восстановитель	Спирт этиловый		Пиридин	
	рибофлавин	сафранин	рибофлавин	сафранин
	ΔE при 480 mμ	ΔE при 520 mμ	ΔE при 480 mμ	ΔE при 520 mμ
Хлорофилл—аскорбиновая кислота	0,100	0,060	0,120	0,110
Хлорофилл—пировиноградная кислота	Образуется феофитин		0,030	0,025
Фталоцианин магния—аскорбиновая кислота	0,065	0,070	0,260	0,250
Фталоцианин магния—пировиноградная кислота	Образуется фталоцианин без металла		0,020	0,015

молекуле красителя с помощью обратимо восстанавливающейся молекулы хлорофилла, по типу действия дегидраз:

$$X + AH_2 \underset{\text{темнота}}{\overset{\text{свет}}{\rightleftarrows}} (X^- + H^+ \rightleftarrows XH) + AH, \qquad (1)$$

$$(X^- + H^+ \rightleftarrows XH) + K \rightleftarrows (K^- + H^+ \rightleftarrows KH) + X, \qquad (2)$$

$$2KH \rightleftarrows K + KH_2. \qquad (3)$$

Течение подобной реакции между хлорофиллом и его непременным спутником, аскорбиновой кислотой, вероятно и в зеленой клетке в качестве первичного процесса фотосинтеза. Тогда XH мог бы передавать водород окисленной форме системы, осуществляющей сопряжение фотохимической стадии процесса с цепью темновых реакций, приводящих к восстановлению углекислоты (можно представить возможность реакции AH с водой с выделением в результате процесса молекулярного кислорода). Это сопряжение могло бы осуществляться посредством флавиновых и фосфопиридин-нуклеотидных дегидраз (E_0 последних лежит при 0,3 V, что соответствует величине E_0 для сафранина Т), о возможности фотовосстановления которых с помощью хлорофилла свидетельствуют вышеприведенные опыты.

При сенсибилизированном восстановлении сафранина аскорбиновой кислотой за счет кванта красного света, поглощенного хлорофиллом (42 ккал), увеличение ΔF системы составляет приблизительно 16 ккал. (подсчитано по величине ΔE_0 *), т. е. в пределе возможно использование для химических нужд около 40% энергии красного кванта (эта величина, конечно, не говорит о действительной величине квантового выхода). При фотосинтезе ΔF процесса составляет 120 ккал. при квантовом выходе около 0,1, т. е. превращается в химическую энергию около $120/42 \cdot 10 \cong 30\%$ энергии света.

* При подсчете использованы равновесные значения E_0 для водного раствора вследствие отсутствия иных данных, тогда как условия осуществления реакции вообще отличны от равновесных и значение ΔE_0 в органических растворителях может отличаться от значения для водного раствора.

Вопросы об участии аскорбиновой кислоты в процессе фотосинтеза и природе ферментативных систем, связывающих фотохимический аппарат пластиды с реакциями восстановления углекислоты, будут подробнее рассмотрены в другом месте.

Приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Терепину за помощь в работе и ценные указания.

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

Поступило
22 IV 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] E. Rabinowitch, Photosynthesis, N. Y., 1945. [2] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947). [3] J. Böhi, Helv. chim. acta, **12**, 121 (1929). [4] T. Ghosh and S. Sen-Gupta, J. Indian Chem. Soc., **11**, 65 (1934). [5] А. А. Гуревич, ДАН, **59**, 937 (1948). [6] А. А. Красновский, ДАН, **60**, № 3 (1948).

Доклады Академии Наук СССР
1948. Том LXIII, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

ОПТИЧЕСКИЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА В РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ СВЯЗИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 7 IX 1948)

В соответствии с представлениями, впервые развитыми М. С. Цветом ([1]) и В. Н. Любименко ([2]), обычно принимают, что хлорофилл в пластиде связан с белком ([3], [4]). Однако доныне с полной определенностью не установлено, что этим исчерпываются возможные состояния хлорофилла в растении ([5], [6]).

Для получения опытных данных по этому вопросу нами произведено систематическое исследование оптических и фотохимических свойств хлорофилла (a + b) в различных формах и в естественном состоянии.

Спектры поглощения объектов измерялись с помощью спектрофотометра Бекмана (модель DU). Флуоресценция наблюдалась через красный фильтр RG-2 при возбуждении группой ртутных линий при 366 мμ. Фотохимическая активность в большинстве случаев исследовалась методом измерения сенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты кислородом, описанным нами ранее ([7]); реакция проводилась при pH = 7,5 в фосфатном буфере. В табл. 1 активность выражена отношением количества куб. миллиметров кислорода, поглощенного за 30 мин. в условиях опыта, к средней величине коэффициента погашения раствора до и после реакции в красном максимуме поглощения хлорофилла. В табл. 1 дается краткая сводка полученного опытного материала.

Рассмотрение табл. 1 показывает, что ни одна из отдельно взятых модельных систем не воспроизводит полностью оптических свойств хлорофилла в листе — сдвига красного максимума поглощения при сохранении флуоресценции. С другой стороны, спектральные свойства живых фотосинтезирующих систем свидетельствуют о том, что хлорофилл в них находится не в одной форме. Нам удалось наблюдать у живых листьев ряда растений наличие двух максимумов: при 677—678 мμ и при 665—670 мμ. Состояние хлорофилла, соответствующее главному максимуму, нарушается при ряде воздействий на живой лист и переходит в состояние, характеризующееся поглощением при 670 мμ.

Наиболее явно это явление выражено у фотосинтезирующих бактерий, где удалось наблюдать три отчетливых максимума поглощения бактерио-хлорофилла в инфракрасной области спектра, переходящих в один максимум (наиболее коротковолновый) при нагревании бактериальной суспензии ([12]) — явление, подобное перемещению максимума поглощения листа при его нагревании; при этом хлорофилл, повидимому, переходит в наиболее устойчивое растворенное состояние; денатурация листа глубоким охлаждением не приводит к подобному изменению.

Какова природа различных форм хлорофилла в растении? Маловероятно, чтобы это были химически отличные формы; исследование

Таблица 1

Состояние	Положение красного максимума, в мμ	Флуоресценция	Фотохимическая активность в относительн. ед.
Растворы в органических растворителях	660—670	+++	Активны ([7], [8])
Растворы в жирных кислотах, растительных маслах, лецитине, водные эмульсии растворов в липоидах	668—670	+++	Активны
Коллоидные растворы, полученные разбавлением спиртовых растворов водой	670	—	Неактивны
Коллоидные растворы, коагулированные электролитами по Д. И. Ивановскому ([5]); положение максимума зависит от степени коагуляции	670—690	—	Неактивны
Коллоидные растворы, полученные разбавлением спиртовых растворов (водными растворами детергентов катионоидного, анионоидного и нейтрального)*	668—670	+++	2400—3500
Хлорофилл, адсорбированный на парафине, пальмитиновой кислоте и окиси магния	668—670 (п)	++	—
Хлорофилл, адсорбированный на окислах алюминия, титана, цинка, кремния и др.	668—670 (п)	—	—
Хлорофилл, адсорбированный на спирторастворимых белках — зеине и глиадине (см. также ([9], [10])). Коллоидные растворы адсорбатов получались разбавлением водой спиртовых растворов хлорофилла с белком	668—670	—	Неактивны
Хлорофилл, адсорбированный на других белках. эдестине, фиброине шелка, кератине шерсти, яичном альбумине и пр.	670 (п)	—	—
Коллоидные водные хлорофилл-белковые растворы, полученные с помощью трех типов детергентов и перечисленных выше типов белка	668—670	+++	2600—3500
Твердые пленки хлорофилла, полученные испарением спиртовых растворов на стекле и фильтровальной бумаге	670 (п)	—	—
Живые листья, суспензии хлоропластов и гранул (главный максимум) (см. также ([11]))	677—678	+	При реакциях сенсибилизированного окисления малоактивны
Лист фасоли, убитый кипячением в воде	670	+	
Лист фасоли, убитый замораживанием жидким воздухом	678	+	
Хлоропласты и гранулы в водных растворах трех типов детергентов	668—670	+++	1000—2000

* Образцы детергентов: гериаль ВФ, сульфанол и гепаль В были нам любезно предоставлены А. Г. Пасынским.

Примечания: Знак + приближенно характеризует интенсивность флуоресценции по трехбальной шкале, — отсутствие наблюдаемой флуоресценции, — в графе «фотохимическая активность» указывает на отсутствие измерений. Знак (п) указывает на приближенность измерения вследствие размытости максимума (при измерении порошка).

обратимых реакций хлорофилла и его поведения в активных средах не позволило получить данных о наличии химически измененных форм, обладающих максимумом поглощения, смещенным на 10—12 мμ в красную сторону спектра ([6]).

В то же время коллоидные нефлуоресцирующие формы хлорофилла обладают максимумом, лежащим в области от 670 до 690 мμ. Вообще,

следует считать возможным подобное смещение максимума поглощения хлорофилла и при адсорбции, хотя полученные доныне искусственные хлорофилл-белковые соединения обладают максимумом, лежащим в области 670 мμ.

Из модельных опытов, приведенных выше, следует, что флуоресценцией и фотохимической активностью хлорофилл обладает лишь в молекулярно-дисперсной форме — в растворенном или адсорбированном на мицелле детергента состоянии. Эти формы обладают максимумом поглощения в области 660—670 мμ. Найденные доводы в пользу механизма сенсибилизирующего действия хлорофилла путем обратимого окисления — восстановления, подобного действию дегидраз ([6], [13]), предопределяют его существование в двух формах: связанной со специфическим липопротеином и в виде свободного «кофермента». Представление о подвижном равновесии между свободной и связанной формами хлорофилла соответствует впервые высказанному М. С. Цветом ([1]) представлению об адсорбционном связывании хлорофилла, отличном от устойчивого химического соединения пигмента с белком по типу гемоглобина. Физиологически оправдано существование хлорофилла в третьей — буферной, запасной форме между синтезирующей его системой и фотосинтетическим аппаратом. Этот запас может существовать в виде коллоидного или адсорбированного состояния с поглощением, лежащим в области главного максимума поглощения листа. Следует полагать, что равновесие между тремя возможными формами хлорофилла определяется условиями работы пластиды.

Е. Рабинович в своей книге ([8]) возражает против представления о возможности существования хлорофилла в двух формах — нефлуоресцирующей, определяющей положение максимума поглощения, и флуоресцирующей; он считает, что в этом случае нельзя понять наблюдающийся одинаковый сдвиг в красную сторону максимумов поглощения и флуоресценции, наблюдаемый у живого листа. Мы полагаем, однако, что подобие сдвига можно объяснить, учитывая внутренний фильтрующий эффект нефлуоресцирующей фазы; наблюдаема лишь часть спектра флуоресценции, расположенная в более длинноволновой области, чем максимум поглощения нефлуоресцирующей фазы. Считаем нужным отметить в заключение, что представление о трех формах хлорофилла наиболее правдоподобно объясняет лишь известные экспериментальные факты; получение модельного хлорофилл-белкового соединения, обладающего хотя бы оптическими свойствами хлорофилла в листе, внесло бы существенные коррективы в эти представления.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
11 VI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] М. С. Цвет, Диссертация, Физико-химическое строение хлорофильного зерна, Казань, 1901; Избр. работы под ред. А. А. Рихтера и Т. А. Красносельской, изд. АН СССР, 1946. [2] В. Н. Любименко, Дневник Всеросс. съезда ботаников, Петроград, 1921, стр. 45; Хемосинтез и фотосинтез в растительном мире, Сельхозгиз, 1935, там же литература. [3] Е. Р. Гюббенет, Природа, **35**, № 11, 68 (1947). [4] Т. Н. Годнев и О. Н. Осипова, ДАН, **57**, 161 (1947). [5] Д. И. Ивановский, О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. [6] А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 377 (1947); Докторск. диссертация, Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948. [7] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946); **58**, 1087 (1947). [8] E. Rabinowitsch, Photosynthesis and Related Processes, **1**, N. Y., 1945. [9] О. П. Осипова, ДАН, **57**, 371 (1947). [10] М. П. Знаменская и О. П. Осипова, ДАН, **57**, 705 (1947). [11] А. А. Ильина, ЖФХ, **21**, 145 (1947); Э. В. Шпольский, Усп. физ. наук, **29**, 221 (1946). [12] E. Katz u. E. Wassink, Enzymol., **7**, 97 (1939). [13] А. А. Красновский, ДАН, **60**, № 3 (1948); **61**, № 1 (1948).

Доклады Академии Наук СССР
1949. Том LXVI, № 6

БИОХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, В. А. ГАВРИЛОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ РАСТВОРОВ ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 5 IV 1949)

В работах разных авторов (литературу см. ([1],[2])) было установлено тушение флуоресценции хлорофилла кислородом. При исследовании этого явления в различных растворителях мы обнаружили, что в растворах хлорофилла в некоторых неполярных средах под действием кислорода воздуха происходит не тушение, а наоборот, усиление флуоресценции; например, при введении воздуха в эвакуированный раствор хлорофилла в толуоле концентрацией около 10^{-5} М/л интенсивность флуоресценции, возбужденной красным светом в длинноволновом максимуме хлорофилла, сильно возрастает *. Это явление было исследовано нами более детально.

В качестве объектов исследования были взяты: хлорофилл a + b, выделенный в сухом виде, и хлорофиллы a и b, полученные в нашей лаборатории Г. П. Брин хроматографическим методом разделения.

Растворы хлорофилла a + b приготовлялись путем прямого растворения сухого порошка в свежеперегнанном над металлическим натрием толуоле. Хлорофилл a и хлорофилл b, хранившиеся обычно в холодильнике в виде адсорбатов на сахарозе, снимались сначала с адсорбента серным эфиром. Последний испаряли досуха при комнатной температуре и сухой остаток растворяли в толуоле. Концентрация исследуемых растворов была $0{,}3—0{,}6 \cdot 10^{-5}$ М/л.

Около 10 мл исследуемого раствора наливалось в вакуумный сосуд Тунберга диаметром около 15 мм, специальной формы, приспособленный для непосредственных измерений на спектрофотометре Бекмана (DU) и измерения интенсивности флуоресценции в приборе, описанном ранее ([2]). Перед началом опыта и после каждой эвакуации сосуд с раствором взвешивался, что давало возможность вносить поправку на испарение растворителя при выкачивании воздуха.

Опыт проводился следующим образом. Вакуумный сосуд с раствором термостатировался в водяном термостате при 20°. Затем производилось измерение поглощения E на спектрофотометре Бекмана и измерение интенсивности флуоресценции. Вслед за этим воздух эвакуировался из раствора при взбалтывании в течение 3 мин. с помощью масляного форвакуумного насоса. После 5-минутного термостатирования при 20° опять проводились измерения поглощения и флуоресценции. Эти же измерения повторялись после впуска воздуха и сильного встряхивания раствора.

Так как в качестве контроля при абсорбционных измерениях нам служила кювета ($l = 1$ см), наполненная водой, то при снятии полных спектров поглощения вводилась поправка, полученная для каждой длины волны путем сравнения поглощения контрольной кюветы с поглощением используемой вакуумной трубки, наполненной чистым растворителем. Измеренные величины поглощения умножались на

* Обратимое повышение флуоресценции при впуске кислорода было установлено в вакуумных условиях для фталоцианина магния, адсорбированного на MgO, в нашей лаборатории В. Ф. Гачковским.

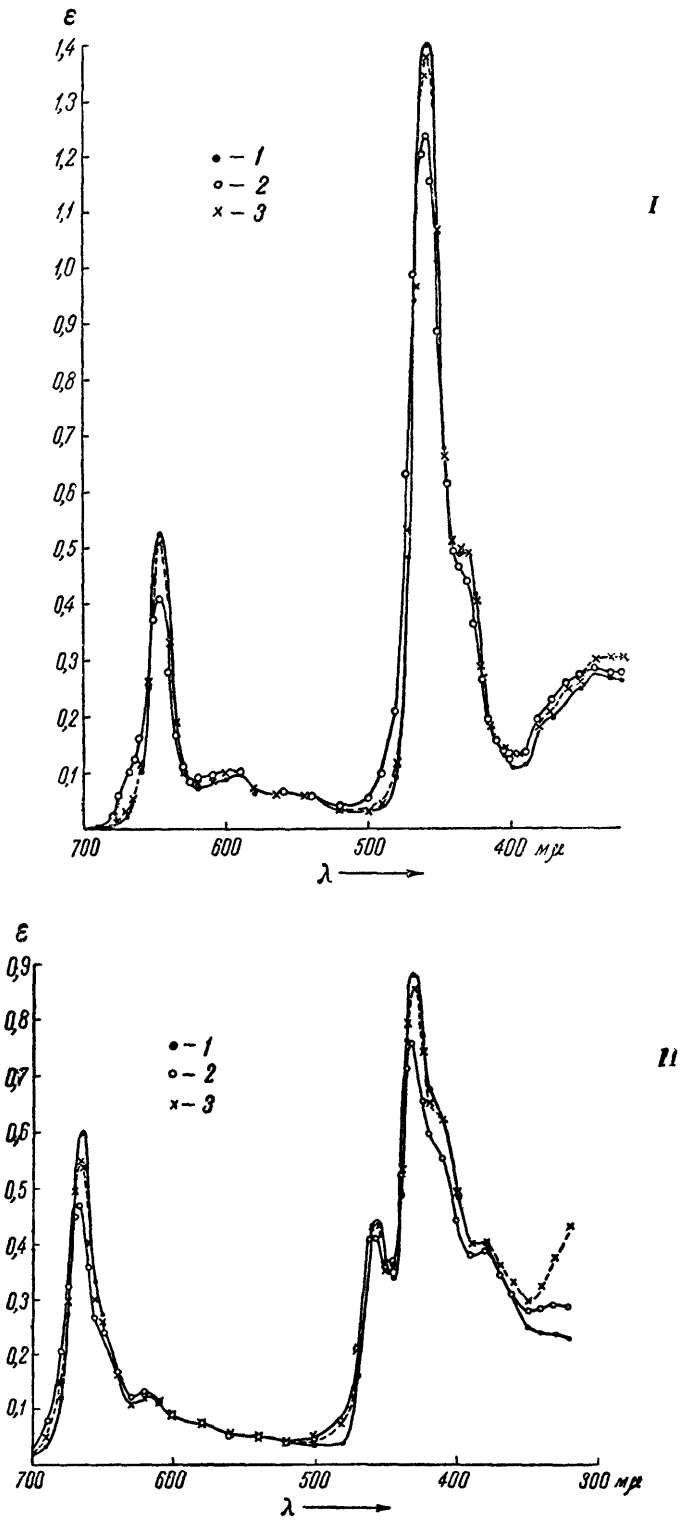


Рис. 1. Изменение спектров поглощения растворов хлорофилла *I*— b и *II*— a + b в толуоле при выкачивании воздуха. *1*— в начале опыта, *2*— после выкачивания воздуха, *3*— после впуска воздуха

отношение веса раствора после эвакуации к первоначальному весу его и таким образом приводились к первоначальному объему раствора. Было установлено, что поглощение растворов хлорофилла применяемых концентраций полностью подчиняется закону Ламберта — Бера.

На рис. 1 приведены кривые поглощения толуоловых растворов хлорофилла a + b и b до эвакуации, после эвакуации и после повторного впуска воздуха. Спектры хлорофилла a не приводятся из-за недостатка места. Изменения спектров поглощения при выкачивании воздуха во всех случаях состоят в уменьшении величины поглощения в обоих главных максимумах и небольшого передвижения (на 2—3 мμ) красной полосы поглощения в сторону длинноволновой части спектра. В случае хлорофилла b, имеющего максимум около 645 мμ, наблюдается значительное увеличение поглощения при 665—670 мμ, похожее на появление новой полосы. При впуске воздуха величина поглощения опять увеличивается с перемещением максимума на прежнее место, хотя и не достигает первоначальной величины. В ультрафиолете в области 300—320 мμ после каждой операции кривая необратимо изменяет свое положение.

В табл. 1 дано несколько примеров изменения коэффициентов погашения и интенсивности флуоресценции (последняя в относительных единицах) при выкачивании и впуске воздуха для растворов хлорофилла в толуоле.

Таблица 1

Хлорофилл	Коэффициент погашения в максимуме			Интенсивность флуоресценции		
	до эвакуации воздуха	после эвакуации воздуха	после впуска воздуха	до эвакуации воздуха	после эвакуации воздуха	после впуска воздуха
a + b	0,570	0,418	0,479	54	29	49
a + b	0,570	0,394	0,439	55	26	43
a + b	0,570	0,438	0,492	54	28	44
a	0,475	0,423	0,452	45	32	45
a + b	0,712	0,613	0,684	—	—	—
a + b	0,590	0,467	0,537	—	—	—

В ряде опытов эвакуация и впуск воздуха повторялись последовательно несколько раз с одним и тем же раствором с измерением величины поглощения только в красном максимуме. По данным рис. 2 можно видеть, что амплитуда колебаний E довольно быстро затухает.

После того как E перестает изменяться при впуске воздуха, воздух приводит уже не к усилению, а к тушению флуоресценции хлорофилла. Прекращение изменения E происходило особенно быстро, если вместо воздуха в эвакуированную трубку вводился кислород. После второй или третьей эвакуации E переставало изменяться, и наблюдалось сильное тушение флуоресценции при впуске кислорода*.

Подобные опыты были проведены с растворами хлорофилла в пиридине, этиловом спирте, этилацетате, ацетоне, CCl_4, бензоле и гептане. Лишь в CCl_4 и гептане поведение хлорофилла оказалось таким же, как и в толуоле, хотя изменения E происходили в более слабой степени. При других растворителях поглощение раствора увеличивалось после эвакуации воздуха пропорционально уменьшению объема и при впуске воздуха не изменялось. Флуоресценция при впуске воздуха и, в особенности, чистого кислорода заметно уменьшалась, как это наблюдалось ранее ([2]).

Прибавление к 10 мл толуолового раствора хлорофилла 1 капли (0,015 мл) спирта, пиридина или ацетона полностью прекращало

* Последующие эксперименты показали, что чем чище был используемый кислород, тем дольше происходило изменение E.

реакцию E на выкачивание и впуск воздуха. Прибавление 1 капли бензола почти не сказывалось на исследуемых свойствах толуолового раствора, но увеличение количества прибавляемого бензола вызывало постепенное уменьшение способности E реагировать на эвакуацию воздуха, и в случае добавки 1,5—2,0 мл изменения E не происходило. Из этого можно сделать заключение, что не сам бензол является причиной такого влияния, а присутствующие в нем в малых количествах примеси (нами был использован бензол, свободный от тиофена, перегнанный перед опытом над металлическим Na).



Рис. 2. Изменение коэффициента погашения раствора хлорофилла a + b в толуоле при повторном выкачивании и впуске воздуха (*I*) и кислорода (*II*). Величина поглощения выражена в процентах от первоначального. Нечетные цифры по горизонтальной оси — в сосуде воздух или кислород; четные — после эвакуации

Для объяснения вышеописанных явлений могут быть предложены, по нашему мнению, две точки зрения.

1. Взаимодействие кислорода с хлорофиллом приводит к сокращению длительности возбужденного состояния молекулы хлорофилла; соответственно этому увеличивается коэффициент погашения и интенсивность флуоресценции раствора.

2. Растворенный кислород влияет на равновесие молекул хлорофилла, находящихся в растворе в димерном и мономерном состоянии, способствуя дезагрегации димеров. Обычно мономер красителя обладает флуоресценцией, тогда как димер не флуоресцирует.

Имеющийся экспериментальный материал не позволяет дать определенного решения вопроса. Можно предположить, что эффекты усиления и ослабления флуоресценции связаны с взаимодействием O_2 с разными местами молекулы хлорофилла.

Центральный атом магния молекулы хлорофилла имеет два свободных координационных места; в случае полярных растворителей (спиртов, оснований и т. п.) или полярных добавок к толуоловому раствору эти места блокируются. В отсутствие полярных соединений (в толуоле, CCl_4, гептане) следует предположить возможность присоединения молекулярного кислорода; подобные ассоциаты обладают меньшей длительностью жизни возбужденного состояния.

Когда координационные места Mg заполнены, взаимодействие O_2 с другой группой молекулы хлорофилла, например с циклопентаноновым кольцом, приводит к тушению флуоресценции. Этим объясняется явление тушения флуоресценции хлорофилла в полярных растворителях. Затухание обратимости при повторном введении O_2 следует объяснить необратимым окислением хлорофилла, вероятно, за счет образования перекисного соединения при реакции типа алломе ризации, не ведущей к изменению вида спектра поглощения хлорофилла (см. также [3,4]).

Авторы выражают глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
22 III 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947, гл. 7. [2] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, 60, 623 (1948). [3] А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947). [4] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 58, 1087 (1947).

Доклады Академии Наук СССР
1949. Том LXVII, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

ПЕРЕНОС ВОДОРОДА ОТ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ К КОДЕГИДРАЗЕ I ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА, ПОГЛОЩЕННОГО ХЛОРОФИЛЛОМ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 17 V 1949)

Ранее одним из нас ([1]) была показана способность хлорофилла к обратимому фотохимическому восстановлению (посредством аскорбиновой кислоты, сульфогидрильных и некоторых других соединений), идущему с увеличением свободной энергии системы. Эту реакцию удается наблюдать в явной форме лишь в среде пиридина или в присутствии других органических оснований. Способность хлорофилла к окислительно-восстановительным превращениям в такого рода средах напоминает подобную активность гемохромогенов, у которых центральный атом железа координационно связан с пиридином либо с другими основаниями; как известно, эти наблюдения послужили в пользу предположения, что гемин в цитохроме и гемоглобине связан с белком посредством имидазолового кольца гистидина; подобная связь возможна и в случае хлорофилла. Далее, было показано, что хлорофилл фотохимически сенсибилизирует перенос водорода от аскорбиновой кислоты к рибофлавину и сафранину Т, „против" термодинамически равновесных условий ([2]); было высказано также предположение, что хлорофилл способен переносить водород к окисленной форме пиридин-нуклеотидных дегидраз и что эта реакция смыкает фотохимическую стадию фотосинтеза, идущую с участием хлорофилла с цепью ферментативных реакций, ведущих к связыванию и восстановлению углекислоты.

Ниже показано, что хлорофилл осуществляет перенос водорода от аскорбиновой кислоты к дифосфопиридин-нуклеотиду—кодегидразе I (ниже обозначаемой Ко), и показан механизм этого процесса, заключающийся в реакции Ко с активной восстановленной формой хлорофилла (ниже обозначаемой $ХН_2$), образующейся при фотохимической реакции *.

О восстановлении Ко до $КоН_2$ мы судили по появлению характерного для $КоН_2$ максимума поглощения, лежащего в водном растворе при 340 мμ с молекулярным коэффициентом погашения $5{,}6 \cdot 10^3$. Для определения максимума поглощения $КоН_2$ в водно-пиридиновой среде, в которой осуществлялась сенсибилизированная реакция, был использован раствор, получающийся при анализе Ко.

Навеску 2—3 мг Ко (взятую на микровесах) вводили в 1 мл водного раствора, содержащего 0,2% гидросульфита и 1% бикарбоната натрия, нагревали на кипящей водяной бане 1 мин., опускали в лед и добавляли 4 мл буфера с pH = 9,7 (1 г $NaHCO_3$ + 1 г Na_2CO_3 в 100 мл воды). Через раствор продували воздух для окисления из-

* Препарат кодегидразы I, содержащий около 60% дифосфопиридин-нуклеотида, нам любезно предоставил С. Н. Гинсбург, которому мы выражаем глубокую благодарность.

бытка гидросульфита до постоянного значения E при 340 мμ. Контрольный опыт ставили без Ко с той же процедурой; снятие спектра (на спектрофотометре Бекмана) производили против контрольного опыта. По величине E при 340 мμ определялось содержание Ко в препарате ([3]). 1 мл восстановленного раствора смешивали с 5 мл пиридина, центрифугировали для удаления осадка выпавших солей и спектрофотометрировали против контрольного опыта, прошедшего ту же процедуру. Максимум поглощения в этом случае лежал в области 340—345 мμ. Введение 10 мг аскорбиновой кислоты не изменяло положения максимума.

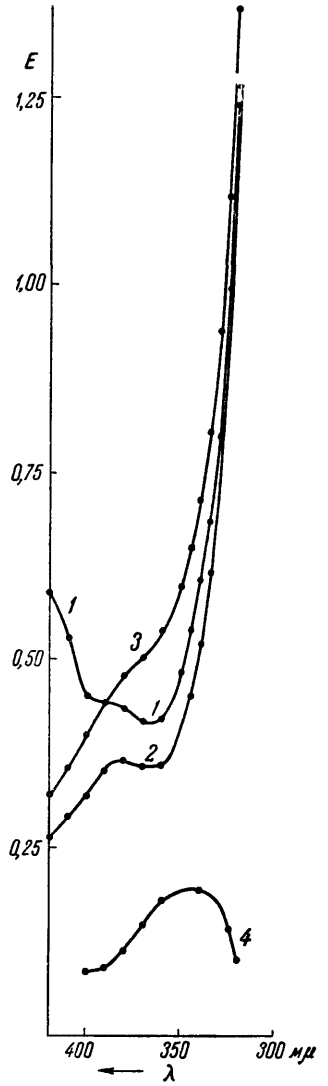


Рис. 1. Восстановление кодегидразы под действием света, поглощенного хлорофиллом. *1*— 5 мл раствора хлорофилла (a+ b) в пиридине +10 мг аскорбиновой кислоты + 1 мг кодегидразы в вакуумной трубке до освещения; без кодегидразы тот же спектр; *2*—после 3 мин. освещения через красный фильтр RG-2 опыт без кодегидразы; *3*— после 3 мин. освещения, опыт с кодегидразой; *4*—разность спектров 3—2; соответствует спектру восстановленной формы кодегидразы (максимум 340—345 мμ). Спектры 1, 2, 3 сняты против воды

Для осуществления сенсибилизированной реакции была применена методика, описанная ранее одним из нас ([2]). Реакция проводилась в вакуумной трубке Тунберга специальной формы, помещаемой в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана либо в специальное термостатическое устройство для облучения. В качестве источника света применялась киноламна 500 вт с конденсором и красным светофильтром RG-2; освещение производилось, таким образом, в области красного максимума поглощения хлорофилла (620—700 мμ).

В трубку вводили 5 мл раствора хлорофилла $a+b$ в пиридине с концентрацией $0{,}7\cdot10^{-5}$ мол/л, 1 мл водного раствора Ко с концентрацией $5\cdot10^{-4}$ мол/л и 10 мг кристаллической аскорбиновой кислоты. После эвакуации масляным насосом при кипении растворителя (3 мин.) снимали спектр поглощения, затем освещали раствор в течение 3 мин. при 8° и с возможной быстротой проводили съемку спектра поглощения, начиная от 310 мμ. Измерения производили также в течение 1 часа стояния в темноте. Контрольные опыты ставились с 5 мл раствора хлорофилла в пиридине + 1 мл воды + 10 мг аскорбиновой кислоты с тем же графиком (во времени) съемки спектра.

В другом варианте опыты с Ко и контрольный (без Ко) производились одновременно в двух вакуумных трубках, освещаемых в специальном вращающемся устройстве, чтобы обеспечить одинаковый средний режим освещения в обоих опытах: после 3-минутного освещения трубки вставляли в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана и во времени измеряли дифференциальный спектр поглощения, в котором трубка без Ко стояла на месте растворителя. В контрольной паре опытов освещали две трубки без Ко, с той же последующей процедурой.

В контрольном опыте без Ко фотохимическое взаимодействие хлорофилла с аскорбиновой кислотой приводит к образованию продукта восстановления с максимумом поглощения при 525 мμ, в темноте реагирующего обратимо с образованием хлорофилла ([1]). В опытах с Ко, являющемся акцептором водорода, иногда не удается наблюдать явного максимума XH_2 при 525 мμ, что связано с взаимодействием активного продукта восстановления хлорофилла с кодегидразой.

Из рассмотрения опытных данных (рис. 1) явствует восстановление Ко под влиянием света, поглощенного хлорофиллом, с появлением максимума поглощения (KoH_2) при 340 мμ, спадающего при стоянии в темноте из-за течения обратной реакции.

Следовало показать теперь прямым опытом, что механизм процесса заключается в темновой реакции кодегидразы с фотохимически восстановленной формой хлорофилла XH_2. С этой целью были поставлены следующие опыты в вакуумной трубке Тунберга, обладающей боковым отводом. В боковой отвод вакуумной трубки вводили 1 мл водного раствора Ко или другого окислителя с концентрацией $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ мол/л. В трубку вводили раствор хлорофилла в пиридине с E при 670 мμ 0,7 + 5 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировали, освещали 3 мин. через красный светофильтр и в восстановленный раствор розового цвета вводили в темноте раствор Ко из бокового отвода. В контрольном опыте в боковой отвод вакуумной трубки вводилась вода.

О ходе реакции между XH_2 и Ко можно судить по изменению любой из взаимно связанных величин: увеличению E при 670 мμ (образование хлорофилла), либо при 340 мμ (KoH_2), либо по уменьшению E при 525 мμ (XH_2).

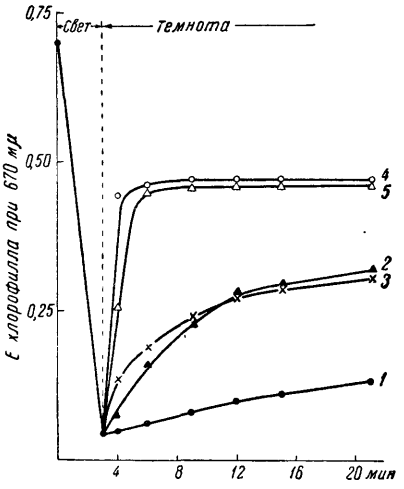


Рис. 2. Темновая реакция фото-восстановленной формы хлорофилла с различными „окислителями". 5 мл раствора хлорофилла (a + b) в пиридине + 5 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировано, освещено 3 мин. через красный фильтр; к восстановленному раствору прилиты из бокового отвода вакуумной трубки; *1* — 1 мл воды, *2* — 1 мл воды, пущен воздух; *3* — 1 мл раствора Ко в воде с концентрацией 0,015 мол/л; *4* — 1 мл раствора сафранина Т в воде, 0,015 мол/л; *5* — 1 мл раствора рибофлавина в смеси воды и пиридина (30%), 0,015 мол/л

Измерение E при 525 мμ неудобно, так как некоторые из исследованных „окислителей" обладают поглощением света в этой области; измерение при 340 мμ неудобно по тем же причинам; кроме того, величина молекулярного коэффициента погашения KoH_2 составляет $5{,}6 \cdot 10^3$, т.е. в $0{,}9 \cdot 10^5 / 5{,}6 \cdot 10^3 \cong 16$ раз меньше соответствующей величины для хлорофилла; при изменении E хлорофилла в процессе опыта на 0,6—0,7 соответственное изменение E KoH_2 составит около 0,04, т. е. величину, не намного превышающую ошибку опыта в наших условиях его осуществления. В то же время в области красного максимума хлорофилла не поглощает ни одна из исследованных систем; измерение при 670 мμ поэтому наиболее удобно.

Для сравнения, кроме Ко, в качестве окислителей исследовались рибофлавин, сафранин Т (обладающий значением окислительно-восстановительного потенциала, близким к тому же значению для Ко) и кислород.

Из рис. 2 отчетливо видна быстрая реакция продукта восстановления хлорофилла со всеми исследованными соединениями. Несколько

меньшую скорость реакции взаимодействия XH_2 с Ко можно объяснить менее благоприятным значением стерического фактора вследствие значительного отличия конфигурации молекулы Ко от других примененных окислителей. Полученные данные с рибофлавином и сафранином Т являются дополнительным подтверждением предложенного нами ранее ([2]) механизма сенсибилизированной реакции.

Механизм исследованной реакции можно представить следующей схемой:

1. Световая реакция:

$$X^{\nu} + AH_2 \rightleftarrows XH_2 + A,$$

где X^{ν} — молекула хлорофилла в длительно живущем бирадикальном состоянии, возникающем в результате поглощения кванта света ([4], [5]); AH_2 — аскорбиновая кислота; А—дегидроаскорбиновая кислота; XH_2 — восстановленная форма хлорофилла. Здесь остается открытым вопрос о том, является ли это соединение свободным радикалом типа семихинона или валентно-насыщенным лейкосоединением, так же как и возможность первичного образования монодегидроаскорбиновой кислоты ([1], [2]).

2. Восстановление Ко в течение светового периода:

$$XH_2 + Ко \rightarrow XH_2 \cdot Ко \rightarrow КоH_2 + X.$$

3. Обратная реакция (темновая);

$$КоH_2 + A \rightarrow Ко + AH_2, \quad XH_2 + A \rightarrow X + AH_2.$$

Полученные данные дают основание полагать, что в процессе фотосинтеза хлорофилл может играть роль переносчика водорода от донора водорода (в конечном счете воды) к окисленной форме кодегидразы, участвующей в ступенчатых реакциях темнового восстановления углекислоты. Возможность участия дегидраз в процессе фотосинтеза находит подтверждение в работе Н. М. Сисакяна и К. Г. Чамовой ([6]), обнаруживших дегидразы в изолированных хлоропластах.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
23 III 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **50**, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, ДАН, **51**, 91 (1948). [3] S. Gutcho and E. Stewart, Anal. Chem., **20**, 1185 (1948). [4] А. Н. Теренин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 361 (1947). [5] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [6] Н. М. Сисакян и К. Г. Чамова, ДАН, **67**, № 2 (1949).

Доклады Академии Наук СССР
1949. Том LXIX, № 3

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

УСЛОВИЯ ОБРАТИМЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ХЛОРОФИЛЛА, ИДУЩИХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 IX 1949)

В предыдущих сообщениях была описана найденная одним из нас реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе (1) и изложены результаты работ, показавших участие активной фото-восстановленной формы хлорофилла в сенсибилизированных окислительно-восстановительных реакциях (2, 3) *.

В этом сообщении излагаются результаты исследования условий обратимого фото-восстановления хлорофилла a и b разными соединениями и в различных средах. Методика осуществления реакции была подобна описанной ранее: опыты производились в вакуумной трубке специальной формы, вставляемой попеременно в кюветодержатель спектрофотометра и в термостатируемую установку для освещения киноламповой 500 вт через конденсор и красный светофильтр RG-2. О ходе реакции судили по изменению вида спектра и величины коэффициента погашения E в максимуме поглощения.

В трубку вводили 6 мл раствора хлорофилла с концентрацией около 10^{-5} мол/л и от 1 до 20 мг испытуемого соединения (восстановителя), эвакуировали трубку при взбалтывании в течение 3 мин. масляным вакуум-насосом и освещали от 1 до 3 мин. в термостатируемой установке при 10°. Измерение спектра поглощения в видимой области производилось с помощью кварцевого спектрофотометра Бекмана после эвакуации, через 30 сек. после выключения облучения и после 2 час. стояния в темноте (температура 20°), где проходила обратная реакция.

В табл. 1 результаты опытов охарактеризованы значениями $K_п = \frac{E_1 - E_2}{E_1} 100$, выражающим глубину прямой фотохимической реакции, и $K_о = \frac{E_3 - E_2}{E_1 - E_2} 100$, выражающим обратимость реакции в темноте. Значения коэффициентов погашения измерены при 670 мμ, E_1 — после эвакуирования до освещения, E_2 — после освещения. E_3 — после 2-часового стояния в темноте.

Хлорофилл a + b был выделен обычным способом из листьев крапивы, хроматографическое разделение компонентов a и b на сахарозе осуществлялось в условиях, близких к описанным (4).

---

* Подобным хлорофиллу оказалось поведение протохлорофилла (11), фталоцианина магния и феофитина; в случае фталоцианина меди и гемина фотореакция не идет.

Таблица 1

Среда	$E_1 \cdot 1000$	$E_2 \cdot 1000$	$E_3 \cdot 1000$	K_n	K_o
Пиридин	311	20	248	93	78
»	810	49	641	94	80
»	1100	59	840	95	75
Смесь пиридин — вода в отношении:					
5 : 1	629	26	372	96	57
2 : 1	432	56	250	87	52
1 : 1	266	41	172	85	58
1 : 2	117	42	100	64	77
1 : 5	92	74	81	20	39
Анилин	366	285	331	22	57
Спирт этиловый 96%	430	344	356	20	14
Спирт этиловый, содержащий:					
14% пиридина	385	54	233	86	54
3% пиридина	595	123	350	79	48
16% воды и 0,3% пиридина	498	134	305	73	47
16% воды и 0,3% имидазола	405	53	236	87	52
16% воды и 0,3% гистидина	440	85	252	81	47
Ацетон	530	376	405	29	19
Ацетон, содержащий:					
14% пиридина	401	15	208	96	50
3% пиридина	470	83	231	83	38
0,3% пиридина	525	325	377	38	26

Примечание. Этиловый спирт, ацетон и пиридин разогнаны на лабораторной ректификационной колонке с насадкой Фенске высотой 150 мм.

1. Фото-восстановление хлорофилла a и b в различных средах.

Из сравнения значений K_o табл. 1 видно, что наблюдение обратимой реакции в явной форме возможно лишь в среде органических оснований, либо при добавке оснований к другим растворителям. Существенно, что действие добавок гистидина, имидазола и пиридина подобно. Способность хлорофилла к обратимым превращениям в таких средах указывает на аналогию с гемохромогенами, легкость окислительно-восстановительных превращений которых определяется связью центрального атома железа с молекулой органического основания; такая связь возможна и в случае хлорофилла, атом магния которого обладает двумя „вакантными" координационными местами *.

С целью получения данных о взаимодействии хлорофилла с пиридином мы произвели детальное измерение спектров поглощения хлорофилла a и b в пиридиновом и эфирном растворах; последний обладает системой полос, подобной наблюдаемой в других растворителях ([5]).

Адсорбированный на сахаре хлорофилл a извлекали эфиром и измеряли спектр поглощения на спектрофотометре, затем под вакуумом испаряли эфир, к сухому остатку добавляли тот же объем пиридина и снова производили измерение спектра поглощения (рис. 1). Максимумы полос (± 1 мμ) в эфире; 662, 615, 577, 531, 428, 410 мμ; в пиридине: 669, 643, 622, 543, 442, 420 мμ.

* Судя по тому, что аналог хлорофилла, фталоцианин магния дает кристаллический гидрат с двумя молекулами воды.

Значительная деформация вида спектра свидетельствует о взаимодействии хлорофилла с пиридином, наиболее вероятно координационно связанного с центральным атомом Mg, или посредством водородной связи с другими частями молекулы хлорофилла. Ни в одном из ранее исследованных растворителей столь значительного изменения в положении II и III полос поглощения хлорофилла a не наблюдалось ([5]).

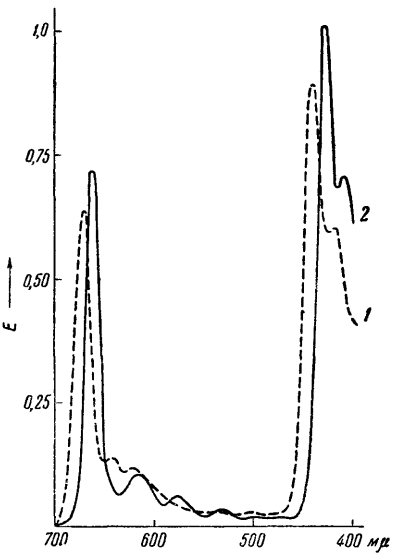


Рис. 1. Раствор хлорофилла a: *1* — в пиридине, *2* — в эфире

2. Фото-восстановление хлорофилла a + b различными соединениями. Были исследованы кислоты: аскорбиновая, диоксималеиновая, янтарная, яблочная, молочная, фумаровая, лимонная, пировиноградная, щавелевая, уксусная, глиоксалевая, глютаминовая, гликоль, глюкоза, глицерин, глицеральдегид, пирокатехин, резорцин, гидрохинон, цистеин, аспарагин, гипоксантин, ацетуксусный эфир, фенилгидразин, сероводород, иод *. Фото-восстановление хлорофилла удалось наблюдать лишь с аскорбиновой и диоксималеиновой кислотой, цистеином, фенилгидразином и сероводородом. При этом образуется восстановленная форма хлорофилла с максимумом поглощения при 525 мμ, в темноте обратимо окисляющаяся до хлорофилла (быстрее в присутствии кислорода воздуха).

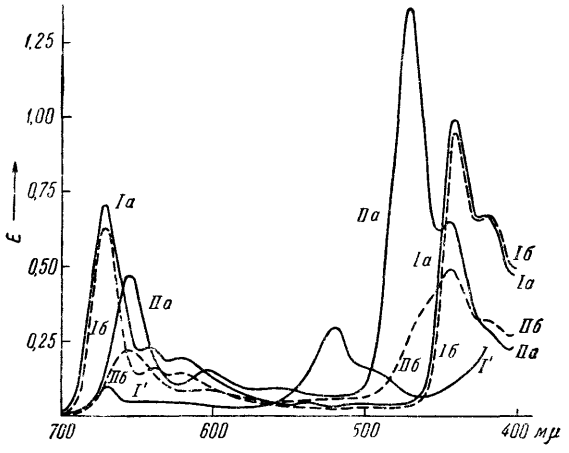


Рис. 2. *I а* — 6 мл раствора хлорофилла a в пиридине + 1 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировано, до освещения; *I'* — после 1,5 мин. освещения (из другого опыта; снято в течение 5 мин., от 420 мμ); *I б* — после 2 час. стояния в темноте. *II а* — 6 мл раствора хлорофилла b в пиридине + 1 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировано, до освещения; *II б* — после 2 час. стояния в темноте

3. Раздельное фото-восстановление хлорофилла a и b. При фото-восстановлении в пиридиновом растворе хлорофилла a + b после окончания обратной темновой реакции исчезает коротко-волновый максимум (470 мμ) хлорофилла b ([1]), что привело к предположению о необратимом восстановлении альдегидной группы хлорофила b до метильной группы. Для решения этого вопроса мы исследовали фото-восстановление хроматографически изолированных компонентов a и b. Результаты опытов видны из рис. 2.

В случае хлорофилла a обратимость реакции высока; спектр регенери-

* Опыт с иодом был поставлен, исходя из недавних наблюдений ([7]) над тем, что иод сильно повышает обратимость выцветания растворов хлорофилла в метаноле. В наших опытах иод оказался неактивным. Повидимому, в спирте происходит преимущественное фотоокисление хлорофилла ([8], [9]), а в основных средах — восстановление.

рованного хлорофилла подобен спектру исходного. Введение избытка аскорбиновой кислоты, длительное освещение и увеличение содержания воды в пиридине приводят к фотохимическому образованию феофитина a и увеличению количеств необратимых фотопродуктов.

В случае хлорофилла b обратимость вообще невелика ($K_n = 60—70$, $K_o = 5—10$), и в результате фотохимической реакции образуется соединение с иным видом спектра поглощения, обладающее характерным максимумом при 445 мμ (в пиридине). С целью исследования природы образующегося соединения, пигмент из пиридинового раствора после облучения переведен и петролейный эфир, пиридин отмыт водой. Эфирный раствор пропущен через колонку с сахаром, при этом получена одна слабоокрашенная в зеленый цвет зона; различные части этой зоны извлечены серным эфиром и сняты спектры поглощения, оказавшиеся подобными. Главные максимумы поглощения продукта реакции в эфире 643 и 432 мμ, тогда как соответственные величины для хлорофилла b 642 и 453 мμ, хлорофилла a 662 и 428 мμ, феофитина a 665 и 408 мμ и феофитина b 653 и 443 мμ.

Таким образом, продукт фотореакции не является ни одним из перечисленных соединений. Можно предположить, что происходит необратимое восстановление альдегидной группы хлорофилла b до спиртовой.

В результате исследования установлено, что: 1) обратимое фото-восстановление хлорофилла удается наблюдать лишь в присутствии органических оснований; 2) обратимость фото-восстановления хлорофилла a весьма высока, тогда как хлорофилла b в тех же условиях дает преимущественно продукты необратимого фото-восстановления; 3) образование обратимых окислительно-восстановительных систем с хлорофиллом (под действием света) установлено для аскорбиновой и диоксималеиновой кислот, цистеина, фенилгидразина и сероводорода.

Следует полагать, что сенсибилизированное хлорофиллом фото-окисление этих соединений в пиридиновом растворе определяется реакцией кислорода (или иного окислителя) с фото-восстановленной формой хлорофилла ([2], [3], [6], [8]), тогда как в спиртовом растворе более вероятна реакция восстановителя с активной фотоокисленной формой хлорофилла ([8—10]).

Фото-восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой может быть связано с ее ролью в процессе фотосинтеза (см. подробнее ([6])), а фото-восстановление сероводородом указывает на возможный путь участия бактериохлорофилла в процессе бактериального фотосинтеза посредством обратимого восстановления.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
5 IX 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948). [3] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949). [4] F. Zscheile, C. Comar, Botan. Gaz., 102, 463 (1941). [5] D. Harris, F. Zscheile, Botan. Gaz., 104, 515 (1943). [6] А. А. Красновский, Докторская диссертация, Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948. [7] J. McBrady and R. Livingston, Journ. Phys. Coll. Chem., 52, 662 (1948). [8] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [9] А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947). [10] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 58, 1087 (1947). [11] А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, 66, 663 (1949).

Доклады Академии Наук СССР
1949. Том LXVI, № 4

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТОХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 5 IV 1949)

Протохлорофилл, обнаруженный Н. А. Монтеверде и В. Н. Любименко ([1,5]) во внутренних оболочках семян тыквенных, образуется в этиолированных проростках высших растений, зеленеющих при освещении вследствие накопления в них хлорофилла.

Существует два основных предположения о физиологической роли протохлорофилла: этот пигмент является 1) непосредственным предшественником хлорофилла; или 2) побочным продуктом синтеза хлорофилла ([2]). Измерение количества образованного хлорофилла в этиолированных проростках при освещении светом различной длины волны показало, что „спектр действия" реакции зеленения весьма близок к спектру поглощения протохлорофилла ([3]), что свидетельствует о большей вероятности первого предположения.

В нашей работе исследованы свойства выделенного из клетки протохлорофилла с целью получения данных о возможных его превращениях при действии света.

Спектр поглощения протохлорофилла в растворе. Пигменты внутренних оболочек семян тыквы извлекали (при растирании) 80% ацетоном. К экстракту добавляли петролейный эфир (т. кип. 60—80°) и ацетон отмывали водой. Раствор пигментов в петролейном эфире сушили над прокаленным сульфатом натрия и подвергали хроматографическому разделению на сахаре в колонке Цвета. Адсорбированные пигменты проявлялись петролейным эфиром, содержащим серный эфир в отношении 1 : 10. В другом варианте разделение пигментов велось из смеси петролейного и серного эфира в отношении 5 : 1. Полученная зеленая зона разделялась на три части, пигмент извлекали серным эфиром. Спектры поглощения пигмента различных участков зеленой зоны, измеренные с помощью спектрофотометра Бекмана (модель DU), не отличались друг от друга. Таким образом, у нас не подтвердились результаты Зейбольда и Эгле ([4]), нашедших в протохлорофилле два компонента *a* и *b*. Как видно из рис. 1, поглощение пиридиновой вытяжки из внутренних оболочек семян тыквы в коротковолновой области мало отличается от поглощения чистого пигмента, что свидетельствует о незначительном количестве извлекаемых каротиноидов.

Положение главных максимумов поглощения протохлорофилла (в мμ): в эфире 623, 571, 533, 433; в пиридине 633, 588, 550, 453. Красный максимум поглощения внутренних оболочек семян тыквы по нашим измерениям (зимой) лежит при 645—650 мμ, т. е. сдвинут в красную сторону по сравнению с раствором, что, как и в случае хлорофилла, является доводом в пользу предположения о связи протохлорофилла с белком в ткани растения ([5]).

Фотохимическое восстановление протохлорофилла. Т. Н. Годнев и С. В. Калишевич ([6]) показали возможность восстанов-

ления протохлорофилла цинком (по методу К. А. Тимирязева) и обратного окисления образованного лейкосоединения на воздухе. Один из нас обнаружил и исследовал реакцию обратимого фотохимического восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой и некоторыми другими соединениями, идущую „против" термодинамически равновесных условий (7). Было также найдено, что образующаяся при реакции активная восстановленная форма хлорофилла способна передавать водород ряду окислительно-восстановительных систем, в том числе окисленным формам простетических групп дегидраз (8).

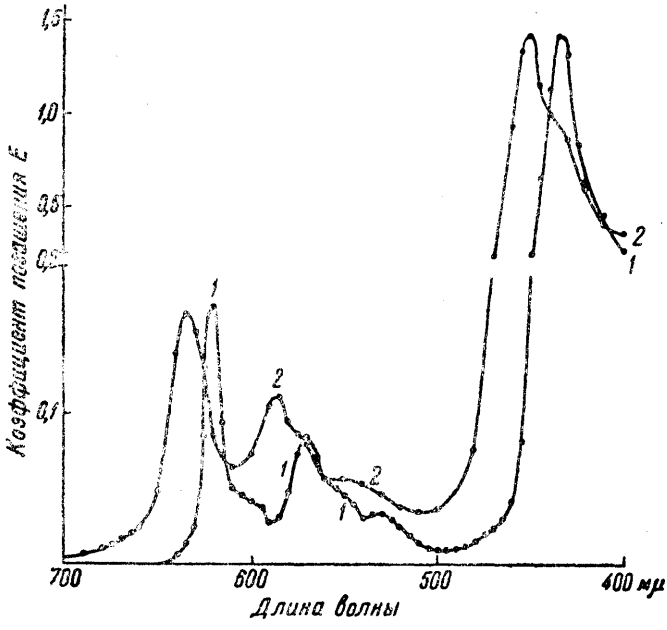


Рис. 1. Спектр поглощения раствора протохлорофилла из внутренних оболочек семян тыквы. *1* — в эфире, *2* — в пиридине.

Мы исследовали возможность обратимого фотовосстановления протохлорофилла, подобного восстановлению хлорофилла. Реакция проводилась с чистым (изолированным хроматографически) протохлорофиллом и с пиридиновыми экстрактами оболочек семян; в обоих случаях реакция шла подобно. В вакуумную трубку Тунберга специальной формы (допускающей ее установку в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана) вводили 20 мг кристаллической аскорбиновой кислоты, 6 мл пиридинового раствора пигмента с величиной коэффициента погашения E при 635 мμ 0,2—0,6, эвакуировали масляным насосом в течение 3 мин. и освещали кинолампой 500 вт через конденсор и систему светофильтров, выделяющих участок 640—550 мμ — область двух первых максимумов поглощения протохлорофилла. Освещение производилось при 8° в специальном термостатирующем устройстве в течение 3 мин. Фотореакция происходила весьма быстро, зеленый раствор при освещении приобретал коричневую окраску; при стоянии в темноте (быстрее в присутствии воздуха) восстанавливалась зеленая окраска раствора (рис. 2). Таким образом, протохлорофилл реагирует подобно хлорофиллу, образуя промежуточный продукт с максимумом поглощения, лежащим при 470 мμ (в случае хлорофилла *a* максимум поглощения продукта восстановления лежит при 525 мμ).

Исчезновение поглощения в красной области свидетельствует о том, что восстановление сопровождается нарушением системы

конъюгированных по кругу двойных связей. Пока неясно, так же как и в случае хлорофилла, является ли промежуточный продукт валентно-насыщенным лейкосоединением или устойчивым свободным радикалом типа семихинона.

При достаточно длительном освещении, без светофильтра (30 мин.), после обратной регенерации продуктов восстановления удается заметить появление в растворе максимума поглощения при 675 мμ, характерного для системы полос хлорина (максимум поглощения хлорофилла

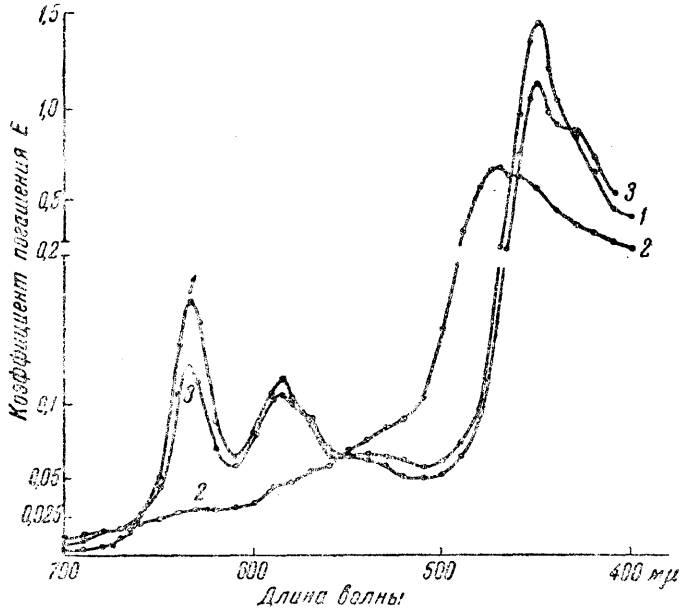


Рис. 2. Обратимое фотохимическое восстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе. *1* — спектр поглощения раствора до реакции; *2* — раствор после 3 мин. освещения; измерение производилось 6 мин., начиная от 400 мμ; *3* — раствор после стояния 16 час. при доступе воздуха (в темноте)

а в пиридине лежит при 668—669 мμ). Это свидетельствует о возможности фотовосстановления одной из двух изолированных двойных связей протохлорофилла.

Нужно отметить, что при осуществлении подобной реакции с хлорофиллом нам не удалось наблюдать восстановления второй изолированной двойной связи с образованием бактериохлорофилла, обладающего максимумом поглощения в инфракрасной области при 780 мμ.

Сенсибилизированный протохлорофиллом перенос водорода. В описанных ниже опытах показано, что протохлорофилл, подобно хлорофиллу, способен фотосенсибилизировать окислительно-восстановительные процессы; нами была осуществлена реакция переноса водорода от аскорбиновой кислоты ($E_0 = +0{,}05$ в) к сафранину Т ($E_0 = -0{,}29$ в), т. е. „против" равновесных условий; методика постановки опытов была подобна описанной нами для хлорофилла ([8]).

В вакуумную трубку помещали 6 мл раствора протохлорофилла с коэффициентом погашения E при 635 мμ 0,3, сафранина Т (E при 540 мμ 0,50) и 20 мг аскорбиновой кислоты и освещали киноламной 500 вт через конденсор и светофильтр RG-1 в области первого красного максимума поглощения протохлорофилла; сафранин не поглощает света в красной области спектра. За ходом сенсибилизированной реакции следили по изменению величины коэффициента погашения сафранина Т в его максимуме (при 540 мμ).

Таблица 1

Фотосенсибилизированное протохлорофиллом восстановление сафранина Т (растворы в пиридине, освещение в течение 6 мин., ΔE — изменение коэффициента погашения после освещения)

	ΔE при 635 мμ, протохлорофилл	ΔE при 540 мμ, сафранин Т
Контрольный опыт без протохлорофилла (сафранин Т + аскорбиновая к-та)	—	0,006
Протохлорофилл + сафранин Т + аскорбин. к-та	0,035	0,076
Течение обратной реакции после выключения освещения: через 2 мин.	0,025	0,046
» 5 »	0,018	0,021
Пущен воздух: через 45 мин.	0,002	0,000

Опыт показывает восстановление сафранина под влиянием света, поглощенного протохлорофиллом, и обратное окисление лейкоформы сафранина в темноте и под действием кислорода воздуха.

Результаты исследования показывают подобие фотохимического поведения протохлорофилла и хлорофилла; полученные данные позволяют предположить следующие возможные пути образования хлорофилла при зеленении проростков:

1. Прямое фотохимическое восстановление протохлорофилла до хлорофилла посредством присутствующих в проростках восстановителей: аскорбиновой кислоты (AH_2), сульфогидрильных соединений и т. п. Восстановление в растворе первично приводит к образованию лейкосоединения. Восстановление изолированной двойной связи (если оно имеет место) идет с трудом. При осуществлении подобной реакции в растительной клетке следует предположить реакцию протохлорофилла в сочетании со специфическим белком, направляющим путь восстановления до хлорофилла, а не до обратимо реагирующего лейкосоединения.

2. Темновое (ферментативное) восстановление протохолорфилла (П) за счет активной „лейкоформы" пигмента ($ПH_2$), образующейся при фотохимическом процессе. Ферментативная темновая реакция, возможно, идущая с участием дегидразных систем, направляет восстановление по пути образования хлорофилла (Х), также участвующего в фотохимической реакции. Вероятность подобного процесса обосновывается способностью протохлорофилла к переносу водорода:

$$П + AH_2 \xrightarrow{+h\nu} ПH_2 + A \quad \text{(фотохимическая реакция)},$$

$$ПH_2 + П \longrightarrow П + X \quad \text{(ферментативная реакция)}.$$

Следует считать также возможным образование хлорофилла посредством фотосенсибилизированного протохлорофиллом восстановления отличных от протохлорофилла промежуточных продуктов.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
22 III 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Н. А. Монтеверде и В. Н. Любименко, Изв. СПб Ботан. сада, **9** (1909). [2] Т. Н. Годнев, VII Тимирязевское чтение. Строение хлорофилла и возможные пути его образования в растении, изд. АН СССР, 1947. [3] S. Frank, J. Gen. Physiol., **29**, 157 (1946). [4] K. Seyboldt and K. Egle, Planta, **26** (718) (1937); **28** (718) (1938). [5] В. Н. Любименко, Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. [6] Т. Н. Годнев и С. В. Калишевич, Тр. Ин-та физиол. растений им. Тимирязева АН СССР, в. 2, 160 (1945). [7] А. А. Красновский, ДАН, **50**, 421 (1948). [8] А. А. Красновский, ДАН, **51**, 91 (1948).

КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ

Том XI 1949 № 3

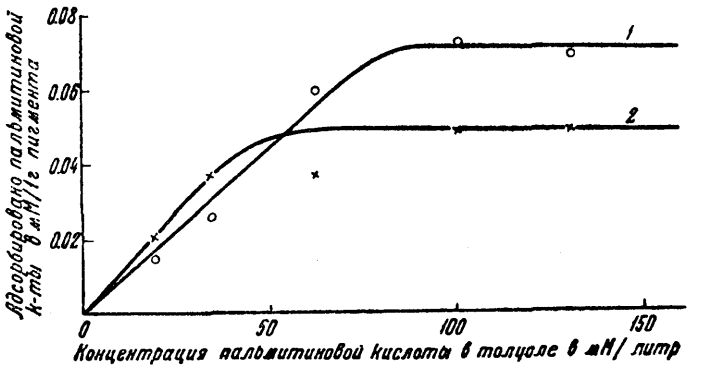
О ДЕСОРБЦИИ ГАЗА ПРИ СМАЧИВАНИИ ПОРОШКОВ

А. А. Красновский, Т. Н. Гуревич

При исследовании каталитического и фотосенсибилизирующего действия пигментов микроманометрическим методом мы обратили внимание на значительное газовыделение при смачивании порошков пигментов различными растворами, происходящее вследствие десорбции газа с поверхности частиц пигмента.

Это явление было исследовано нами более подробно, причем сделана попытка выяснить следующие вопросы: 1) какова поверхность, занимаемая десорбируемой молекулой газа (воздуха) в условиях равновесия порошка с окружающей атмосферой до смачивания; 2) какова зависимость десорбции газа от природы смачивающих веществ; 3) как влияет состояние поверхности порошка на десорбцию газа.

Наиболее подробно были обследованы образцы двуокиси титана (анатаз) и окислов железа, являющиеся дисперсными порошками, не обладающими внутренней поверхностью, образованной порами.



Изотерма адсорбции пальмитиновой кислоты на двуокиси титана (*1*) и окиси железа (*2*) при $t=20°$

Удельная поверхность. Измерение поверхности непористых порошков методом адсорбции из раствора дает значения, близкие к получаемым по наиболее надежному способу определения по сорбции азота вблизи его температуры кипения [1].

Удельная поверхность порошков определена нами по изотерме адсорбции пальмитиновой кислоты из раствора в сухом толуоле.

Применялись окись и закись железа химически чистые (полученные прокаливанием соответствующих оксалатов), окись железа природная (железный сурик), двуокись титана (анатаз), содержащая не ниже 96% TiO_2. Толуол дважды перегонялся над металлическим натрием. Растворы химически чистой пальмитиновой кислоты в толуоле приготовлялись с концентрацией от 20 до 130 м-мол/л.

В 4 мл раствора вводили 1 г пигмента и энергично взбалтывали в течение 1 час. (специальными опытами установлена достаточность этого времени для установления адсорбционного равновесия). Суспензию центрифугировали до полного осаждения пигмента при 3000 об/мин. Проба

прозрачного раствора титровалась 0,01 *N* раствором спиртовой щелочи из микробюретки; одновременно титровался исходный раствор. По разности рассчитывалось количество адсорбированной пальмитиновой кислоты.

По величине насыщения рассчитана удельная поверхность порошка, принимая, что ориентированная молекула пальмитиновой кислоты занимает поверхность 20,5 Å² [2]. Результаты измерения приведены на рисунке и в табл. 1.

Таблица 1

Средняя поверхность, занимаемая молекулой адсорбированного газа

Пигмент	Удельная поверхность по адсорбции пальмитиновой кислоты в м²/г	Поверхность, занимаемая одной молекулой десорбированного газа Å²
Двуокись титана	8,9	27,5
Окись железа (х. ч.) . . .	7,35	32,6
Закись железа (х. ч.) . .	6	25,2
Окись железа (природная)	6,75	24,1

В табл. 1 даны средние величины результатов анализа 4—6 однотипных опытов. Для смачивания применялся раствор пальмитиновой кислоты, соответствующий насыщению поверхности по изотерме адсорбции (~120 м-мол/л).

Величина поверхности, занимаемая молекулой десорбированного газа, получена делением удельной поверхности на число молекул в объеме десорбированного с 1 г пигмента газа.

Десорбция газа. Объем десорбируемого газа определялся при помощи микроманометрического прибора Варбурга, распространенного в практике биохимических исследований. В среднюю часть манометрического сосуда вводили 0,3 г пигмента, в боковой отвод 0,75 мл раствора пальмитиновой кислоты в толуоле. После термостатирования наклонением прибора пигмент смачивался раствором. Выделение газа заканчивалось в течение 3 мин. Объем десорбированного газа рассчитывался по разности давлений в обоих плечах водяного манометра, корректированных показаниями термобарометра.

Для проверки возможности того, что десорбированный газ не является углекислотой, поставлены опыты десорбции в присутствии поглотителя (раствор едкого натра), введенного в адсорбционный стаканчик прибора. Количество десорбированного газа не изменилось от введения щелочи. Количество азота и кислорода в газе не определялось.

Средняя поверхность, занимаемая адсорбированной молекулой азота, составляет 15 Å². В нашем случае на молекулу газа приходится приблизительно вдвое большая площадь. Таким образом, исследованные образцы воздушно-сухих пигментов, вероятно, не обладают насыщенным мономолекулярным слоем адсорбированного газа.

Влияние природы смачивающего раствора и характера поверхности на десорбцию газа было изучено для образцов двуокиси титана, обладающих различным характером поверхности [3].

Исходный образец дисперсной двуокиси титана (анатаз) был обработан следующими способами:

1. Разбалтывание с водой (pH=6,0) в течение 1 час., фильтрация, сушка при 110° в течение 2 час. или прокаливание при 600° в течение 10 мин.; известно, что при сушке сорбированная вода удаляется в малой степени.

2. Обработка раствором едкого натра, фильтрация, промывка водой, сушка и прокаливание в тех же условиях; известно, что в щелочной среде за счет преимущественной

сорбции OH^--ионов образуется отрицательно заряженная взвесь частиц двуокиси титана.

3. Обработка 0,1 *N* раствором серной кислоты с целью полного удаления ионов OH^- с поверхности частиц; фильтрация, промывка, сушка и прокаливание.

4. В щелочной среде получены стабильные суспензии двуокиси титана; особыми опытами установлена концентрация щелочи, соответствующая оптимуму стабилизации (0,7 г NaOH на 1 л); стабильные суспензии коагулировались ионами Co^{2+} (ацетат кобальта) и Cr^{3+} (сернокислый хром); при этом получались образцы двуокиси титана, адсорбировавшие ионы OH^- и соответствующего катиона. Промывка, сушка и прокаливание велись по типу предыдущих опытов.

Полученные вышеописанным способом образцы двуокиси титана, обладающие различным характером поверхности, смачивались в манометрическом приборе водой с pH=6,0, раствором серной кислоты (0,1 *N*), едкого натра (0,1 *N*) и 3%-ным раствором пальмитиновой кислоты в толуоле (концентрация, лежащая в области насыщения поверхности частиц пигмента пальмитиновой кислотой). Количество десорбированного при этом газа показано в табл. 2.

Таблица 2

Десорбция газа при смачивании двуокиси титана
(в $мм^3$ на 1 г порошка)

Способ обработки \ Смачивающие агенты	H_2O	0,1 *N* H_2SO_4	0,1 *N* NaOH	3%-ный раствор пальмитиновой кислоты в толуоле
Сушка при 110°	350	49	255	890
Прокаливание при 600°	700	630	760	1580
Обработка едким натром, сушка при 110°	750	925	755	2600
Обработка едким натром, прокаливание при 600°	900	780	630	2500
Обработка серной кислотой, сушка при 110°	120	12	40	440
Обработка серной кислотой, прокаливание при 600°	760	550	580	1420
Коагуляция ионами Co^{2+}, сушка при 110°	13	18	67	520
Коагуляция ионами Co^{2+}, прокаливание при 600°	760	600	700	2400
Коагуляция ионами Cr^{3+}, сушка при 110°	240	49	150	730
Коагуляция ионами Cr^{3+}, прокаливание при 600°	940	1120	945	1800

Данные табл. 2 позволяют сделать следующие заключения. Во всех случаях кроме двуокиси титана, обработанной щелочью, высушенные образцы обладают гораздо меньшим количеством десорбирующегося газа по сравнению с прокаленными образцами. Это объясняется тем, что поверхность частиц двуокиси титана закрыта слоем молекул сорбированной воды, лишь в малой степени удаляемой в условиях сушки при 110°.

В случае прокаливания вода удаляется более полно, что приводит к возможности большего насыщения поверхности молекулами газа.

В случае двуокиси титана, обработанной щелочью, практически нет разницы в десорбции газа с высушенного и прокаленного образца. Это может быть объяснено нижеследующим образом: хотя двуокись титана и не обладает явно выраженной ионной решеткой, активные центры ее поверхности обладают положительным зарядом, о чем свидетельствует предпочтительная сорбция ионов OH^- из раствора. Диполи воды при сорбции, вероятно, ориентируются отрицательным концом к положительно заряженным активным центрам. В том случае, когда эти центры блокированы ионами OH^-, сорбция воды затрудняется, чем объясняется одинаковое действие сушки и прокаливания. Подобный эффект наблюдался одним из

нас при сорбции ионов OH^- на окиси алюминия, теряющей вследствие этого способность к образованию комплексов с ализарином [4].

Адсорбция газов не может быть интерпретирована, исходя из простых электростатических представлений, как в случае сорбции диполей и ионов. В данном случае адсорбция газов, повидимому, не связана с активными центрами, несущими положительный заряд. Это явствует из того, что двуокись титана, обработанная щелочью, обладает наибольшим количеством десорбированного газа. Вероятно, изменение энергетической характеристики поверхности в связи с сорбцией OH^--ионов на положительных центрах приводит к увеличенной сорбции газа на поверхности. Действительно, образцы, обработанные кислотой, удаляющей OH^-, показывают наименьшие объемы десорбированного газа.

В заключение следует заметить, что простота измерения при помощи микроманометрического метода количества десорбируемого газа при смачивании позволяет применить этот метод для приближенной характеристики поверхностных свойств порошков и твердых адсорбентов в многообразных случаях аналитической практики, а именно: а) для приближенного определения величины удельной поверхности порошка данного типа; б) в качестве критерия степени смачивания порошка; в) для определения количества газа, адсорбированного порошком.

Выводы

1. Методом адсорбции из раствора измерена удельная поверхность двуокиси титана и ряда окислов железа.
2. При помощи микроманометрического метода измерено количество десорбируемого газа при смачивании порошков, обладающих различным характером поверхности.
3. Подсчитана поверхность, занимаемая молекулой газа, десорбирующей с поверхности воздушно-сухих порошков при смачивании.

Государственный научно-исследовательский
и проектный институт № 4
Министерства химической промышленности

Поступила в редакцию
20 марта 1948 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Emmett P. H., Ind. Eng. Chem. **37**, 639, 1945.
2. Адам Н. К., Физика и химия поверхностей, Гостехиздат, 1947.
3. Каргин В. А. и Толстая М. Л., Ж. физ. хим. **13**, 211, 1939.
4. Красновский А. А., Ж. пр. орг. хим. **5**, 597, 1938.

1949 г. Январь *Т. XXXVII, вып. 1*

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

К ВОПРОСУ О МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ ПРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

А. Н. Теренин и А. А. Красновский

Физик Н. Риль, известный своими работами по люминесценции кристаллов, развивает в статье, недавно вышедшей в настоящем журнале [1], представления о миграции энергии в биологических системах, основанное на уподоблении этих систем неорганическим полупроводникам — фосфорам, в которых, при возбуждении квантом света, электрон может перейти в зону проводимости. Аналогичная концепция была также выдвинута известным венгерским биологом А. Сент-Дьёрди [2]. В более расплывчатой формулировке представление об электронной проводимости привлекалось и ранее некоторыми биохимиками к объяснению действия ферментов [3]. Н. Риль в своей статье приводит ряд экспериментальных обоснований такой точки зрения и даёт развёрнутую физическую картину, охватывающую широкий круг биокаталитических процессов. Однако представленные упомянутыми авторами опытные доказательства трудно считать убедительными, и предложенная в статье Н. Риля теоретическая трактовка белка как полупроводника, по нашему мнению, встречает серьёзные возражения.

Один из нас (А. Н. Теренин) в своей речи на всесоюзном совещании по фотосинтезу [4] уже указывал на то, что перенесение на белок представлений из теории полупроводников пока лишено достаточных оснований, и он же наметил вкратце те выводы для биохимии, которые вытекают из подвижности электрона и протона в органических соединениях *).

Перейдём к более детальному рассмотрению вопроса.

ОБ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

В качестве experimentum crucis, доказывающего факт передачи энергии в белковой молекуле на значительные расстояния, Риль приводит опыты Бюхера по фотохимическому разложению комплекса CO + миоглобин, не приводя литературной ссылки; повидимому,

*) Более подробное изложение этой точки зрения будет дано в статье, намеченной к опубликованию в настоящем журнале.

речь идёт об опубликованной в прошлом году работе Бюхера и Касперса [5]. В этой работе был измерен квантовый выход реакции фотохимического разложения соединения CO + миоглобин под действием длин волн 280, 313, 334, 366 и 546 mμ. Величина квантового выхода оказалась равной 1 ± 0,1 во всех участках спектра. Была измерена в той же спектральной области и величина молярного коэффициента погашения как CO + миоглобина, так и отдельно геминового компонента этого соединения, непосредственно связывающего CO. Спектры поглощения оказались полностью совпадающими, от видимой части до длины волны 320 mμ. Это указывало на то, что в этой части спектра поглощает свет исключительно геминовый компонент. Различие спектров заметно только в более коротком участке спектра: CO + миоглобин имеет максимум при 280 mμ, CO + гемин — при 265 mμ *). Поглощение геминового компонента при 280 mμ на 40% ниже по сравнению со спектром поглощения миоглобинового комплекса.

Из того факта, что значения квантового выхода практически одинаковы и равны единице во всех участках спектра, авторы делают вывод, что кванты света с длиной волны 280 mμ, поглощаемые не только геминовым, но и белковым компонентом, а именно ароматическими кольцами тирозина и триптофана, распределёнными по всей массе белка миоглобина, — используются для отщепления CO от геминовой части системы.

В статье Риля этот факт интерпретируется в решающем смысле для его концепции миграции электронной энергии; он пишет: «Квантовая энергия перемещается без всяких потерь через всю большую белковую молекулу к геминовой группе».

Между тем неясен основной вопрос: каким образом происходит отщепление CO от гемина при поглощении света последним? То обстоятельство, что отрыв CO от миоглобина идёт с измеримой скоростью также и без освещения даже при 0° C, указывает на слабую связь CO с гемином, для разрыва которой оказывается достаточным подвести несколько *ккал/моль* термической энергии.

При поглощении кванта уже в первом максимуме, расположенном в видимой области (около 570 mμ), молекуле гемина подводится энергия в 50 *ккал/моль*, которая полностью преобразуется во внутримолекулярные вибрации, как об этом свидетельствует отсутствие у гемина флуоресценции. Достаточно небольшой части этой энергии, чтобы вызвать отщепление CO [6]. Вибрационная энергия будет подводиться к связи гемин-CO с избытком при поглощении квантов ещё большей величины в максимумах ультрафиолетового спектра гемина.

*) Следует подчеркнуть, что авторами измерялся спектр поглощения геминового компонента, отделённого от белкового носителя, между тем не исключена возможность, что в связанном состоянии максимум спектра геминового компонента будет ещё более близок к максимуму спектра комплекса CO + миоглобин.

Этим объясняется необычное для фотохимических реакций распада постоянство квантового выхода, сохраняющего значение, равное единице на широком протяжении спектра поглощения гемина, начиная от видимой области. Усиление выделения CO под действием света, поглощаемого гемином, следует с этой точки зрения трактовать, как своего рода внутренний разогрев молекулы, доставляющий на вибрацию связи гемин-CO требующуюся сравнительно небольшую энергию диссоциации. Как известно, расщепление валентной связи даже в сложных молекулах происходит не непосредственно при подведении электронной энергии возбуждения, а только в последующем процессе преобразования энергии возбуждения в движение ядер.

При освещении миоглобина, содержащего гемин, в максимуме 280 mμ происходит, наряду с описанным выше процессом, поглощение тирозиновыми и триптофановыми структурными звеньями белка квантов с энергией в 100 *ккал*. При обычно происходящей деградации поглощённой энергии в вибрационную энергию вполне мыслимо распространение значительных порций энергии вибрации по жёстко связанной цепи главных валентностей белка до подвижных атомов водорода, точнее — протонов, образующих мостики «водородной» связи между структурными звеньями белка. В результате такой активации может произойти перенос протона от одного звена к другому с соответствующей валентной перегруппировкой весьма протяжённой системы, наподобие известной реакции таутомерии органических соединений [4]. Перенос протона под действием света между сопряжёнными молекулами был установлен у нас прямым опытом [7]. Энергия, освобождающаяся при такой обратимой реакции «макротаутомерии», переносится по участвующим в ней валентным связям на большие расстояния в виде потенциальной энергии, растрачиваясь затем на вибрации большой амплитуды. Повидимому, таким именно путём гемину доставляется требующаяся для отщепления CO небольшая порция вибрационной энергии *). В белке мигрирует не электронная энергия возбуждённого уровня (экситон) и отнюдь не свободный электрон в зоне проводимости, а потенциальная энергия вибраций, создаваемая внезапной таутомерной перегруппировкой структурного скелета миоглобина, как единого целого. Можно говорить лишь о перегруппировке валентных электронов, затрагивающей одновременно большое число атомов. Миграция кванта электронной энергии, как такового, в белке невероятна из-за отсутствия сопряжённых двойных связей и правильного чередования однотипных молекул. Но как раз это обстоятельство, наоборот, способствует беспрепятственному распространению вибраций по цепи ординарных валентностей, имею-

*) Этой передаче благоприятствует то обстоятельство, что атом Fe гемина координационно связан с белком — глобином — посредством имидазоловой группы гистидина [8].

щих примерно одинаковые упругие константы и приведённые массы вибрирующих частиц.

Перенос кванта электронной энергии возбуждения без всяких потерь был бы доказан, если бы удалось показать сенсибилизованную флуоресценцию фиксированной на белке и способной флуоресцировать молекулы под действием света, поглощённого только белком.

Оставляя в стороне вопрос о методической трудности измерения поглощения света и квантового выхода в микрогетерогенных коллоидных структурах, интерпретация подобного опыта встретит то затруднение, что в спектральной области поглощения белка обычно поглощает свет и адсорбированный компонент.

В условиях живого листа была показана сенсибилизованная флуоресценция хлорофилла под действием света, поглощаемого каротиноидами [9]. Однако последние, в отличие от белка, представляют собой длинные цепи сопряжённых связей, с глубокой окраской; кроме того, неизвестно, были ли компоненты фиксированы, и притом на одном и том же белке.

В исследовании передачи энергии в биохимических системах, проводимом в нашей лаборатории, была в своё время сделана также попытка получить данные о возможности переноса электронной энергии в системе белок-краситель методом исследования сенсибилизованной флуоресценции.

На белке (фиброин шелка) адсорбировались два вида красителей, максимумы поглощения которых были значительно сдвинуты один относительно другого. Предполагалось, что при освещении системы в области поглощения красителя с максимумом, расположенным в коротковолновой области спектра, можно будет наблюдать флуоресценцию другого красителя, обладающего более длинноволновым максимумом, т. е. высвечивание должно было бы произойти по наиболее низкому энергетическому уровню системы. Опыты проводились в высоковакуумных условиях при температуре жидкого воздуха с тем, чтобы воспрепятствовать быстрой деградации энергии возбуждения в тепло. Явления сенсибилизованной флуоресценции в этих условиях нам наблюдать не удалось.

В свете приведённых соображений трудно считать приведённый выше материал прямым доказательством существования миграции электронной энергии в белковой молекуле.

Сент-Дьёрди в своей книге [2] описывает опыты по фосфоресценции и фотопроводимости белков, окрашенных красителями, типа желатиновых фосфóров. В белке без красителей фотопроводимости установлено не было. Автор полагает, что проводимость системы белок-краситель свидетельствует о наличии общих электронных уровней по типу неорганических фосфóров.

Однако исследования последних лет прежде всего показали, что природа фосфоресценции органических соединений в корне отлична

от фосфоресценции неорганических кристаллов и объясняется переходом органической молекулы в длительно живущее метастабильное бирадикальное состояние (Теренин[6], Льюис). Что же касается фотопроводимости «сухих» систем белок-краситель, то работами советских исследователей было впервые показано, что не только микрокристаллы красителей[10], но и красители в коллодионных плёнках и бензольном растворе, т. е. не белковых средах, обладают сами по себе значительной фотопроводимостью[11].

Из последних опытов[12] следует, что молекулы красителей, адсорбированные на полупроводниках, могут вызвать при поглощении видимого света появление электронов в зоне проводимости, но подобный эффект совершенно отсутствует на кристаллических аминокислотах.

На основании этих экспериментальных фактов следует признать, что гипотеза о миграции электронов в белке, подобно полупроводнику, лишена основания.

Рассмотрим теперь теоретические представления о биокаталитических процессах, изложенные в статье Н. Риля.

1. Модель действия окисляющих и восстанавливающих энзимов

Предложенная Н. Рилем модель действия различных окислительно-восстановительных систем основана на передаче (на расстояние) через белковую молекулу электрона с компенсирующей отдачей или приёмом протона из водной фазы. Ныне принятая схема действия дегидраз основана на известных фактах диссоциации фермента на простетическую группу и специфический белок и обратимого окислительно-восстановительного превращения простетической группы, происходящего на разных типах специфического белка.

Таким образом, передача электрона от одной системы к другой происходит путём диффузии диссоциирующей простетической группы фермента дегидразы. Механизм реакции передачи водорода от АН к В может быть выражен следующей упрощённой схемой, где П обозначает простетическую группу, а НП—гидрированную простетическую группу, (см., например,[14]):

$$\text{АН} + \text{П} \longrightarrow \text{АН}^{+} + \text{П}^{-} \longrightarrow \text{А} + \text{НП} \quad \text{(на I типе белка)}$$

$$\text{НП} + \text{В} \longrightarrow \text{ВН} + \text{П} \quad \text{(на II типе белка)}$$

Мы не будем здесь останавливаться на детальном разборе схем окислительно-восстановительных реакций, приведённых в статье Н. Риля, укажем лишь, что элементарный процесс

$$2\,\text{Fe}^{++} + \frac{1}{2}\,\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}^{--} + 2\,\text{Fe}^{+++},$$

сопровождающийся появлением иона O^{--}, чрезвычайно маловероятен, а присоединение второго электрона к молекуле кислорода представляет собой сильно эндотермический процесс [13].

2. Модель действия гидролаз

Автор рассматривает гидролазы, в том числе ферменты, гидролизующие пептидную связь, как двухкомпонентные, содержащие простетическую группу и белковый носитель. При этом указывается на необходимость существования простетической группы в двух различных энергетических состояниях. Присоединение воды к пептидной связи рассматривается с электронной точки зрения как «разрядка» H^+ с присоединением H к NH-группе пептидной связи и как компенсирующая разрядка OH^- с присоединением OH к CO-группе.

Против этой схемы следует выдвинуть два основных возражения.

а) Гидролизующие пептидную связь ферменты являются однокомпонентными — это белки, не связанные с простетической группой, существующей в различных энергетических состояниях, как это имеет место у окислительно-восстановительных ферментов [14].

б) Трудно представить себе с энергетической точки зрения возможность механизма гидратации, идущей через промежуточное образование свободных радикалов H и OH.

Диссоциация воды на радикалы требует 110 *ккал*, предварительная диссоциация на ионы уменьшает эту величину до, приблизительно, 95 *ккал*. За счёт каких энергетических рессурсов возможны подобные элементарные процессы на молекуле белка?

3. О миграции энергии в процессе ассимиляции углекислоты

В опытах исследования фотосинтеза в прерывистом свете было найдено, что отношение количества молекул хлорофилла, поглощающего свет, к количеству восстановленных молекул углекислоты составляет, при длительности световой вспышки 10^{-5} *сек*, величину от 2 000 до 14 000.

Исходя из этих данных, а также для объяснения ряда неувязок, возникающих при расчёте длительности темновой реакции фотосинтеза, Гаффрон и Воль предложили гипотезу, согласно которой число центров восстановления в несколько тысяч раз меньше числа наличных молекул хлорофилла; при этом были предложены две возможные модели:

1) «оптическая модель» фотосинтетической единицы, согласно которой большое число молекул хлорофилла связано в едином комплексе — «кристалле» (это представление развивает Н. Риль в своей статье);

2) «кинетическая модель», согласно которой энергия от большого числа отдельных молекул хлорофилла передаётся малому числу центров восстановления; эти представления также были развиты в ряде работ (лит. см. [15]).

Впоследствии были предложены другие схемы: наиболее математически была разработана схема Франка-Герцфельда *), исходящая из того предположения, что лимитирующая темновая реакция управляется катализатором, рабочий период которого больше продолжительности жизни нестойкого фотопродукта. Возможно также объяснение, исходящее из представления о том, что период обратимых реакций, в которые вовлечён хлорофилл, в несколько тысяч раз больше длительности светового промежутка в опытах с прерывистым освещением. Таким образом, мы видим, что полученные опытные данные могут быть интерпретированы с помощью ряда отличающихся друг от друга схем **).

Своей концепцией Н. Риль воскрешает взгляды Рейнке, рассматривавшего хлорофилл как «физический» сенсибилизатор, передающий только энергию реагирующим молекулам, не подкрепляя этого взгляда новыми опытными доказательствами.

В противоположность этому К. А. Тимирязев в своих классических работах рассматривал хлорофилл как сенсибилизатор «оптический» и «химический», подвергающийся в процессе фотосинтеза обратимому химическому превращению.

Выдвинутое К. А. Тимирязевым направление имеет наибольшее количество экспериментальных доказательств и лучше всего объясняет фактический материал фотосинтеза (см.[15, 17, 18]).

Недавно удалось также показать возможность обратимого фотохимического восстановления хлорофилла, идущего с увеличением свободной энергии системы, и отметить значение этого процесса при сенсибилизованных реакциях [17].

---

*) Общая схема фотосинтеза Франка и Герцфельда, предложенная в 1941 г., в настоящее время неприемлема, так как не соответствует современным опытным результатам. Кроме ранее данной критики этой схемы [15], здесь следует привести следующие возражения:

1) Предположение о фотохимическом акте восстановления углекислоты не соответствует действительности; исследования, в которых применялись изотопы углерода C^{11} и C^{14}, показали, что фиксация и восстановление углекислоты происходят в результате темновой реакции.

2) Представление о существовании окисленной и восстановленной формы хлорофилла, сохраняющих подобные спектры поглощения, не получило опытного подтверждения; недавно удалось показать, что обратимое восстановление и окисление хлорофилла сопровождается размыканием системы конъюгированных связей, исчезновением красного максимума поглощения и появлением нового максимума в области 500—550 mμ [16,17].

**) Мы здесь оставляем в стороне обсуждение правильности использования имеющихся опытных данных (исследования фотосинтеза в прерывистом свете и пр.) в расчётах, произведённых различными авторами; в частности, вопрос о том, поглощали ли в условиях опытов все молекулы хлорофилла, заключённого в хлоропластах исследуемого растения.

В нашу задачу здесь не входит обсуждение вопроса о форме связи хлорофилла в пластиде. Хотелось бы лишь отметить, что приведённая в статье Н. Риля схема Губерта является в значительной мере умозрительной, так как отсутствуют прямые доказательства существования всего хлорофилла в пластиде в форме монослоя с порфириновым циклом, прилегающим к молекуле белка.

Более вероятно, что хлорофилл в пластиде находится не в одном состоянии, и фотохимически активной является часть молекул хлорофилла, связанная с липоидной частью липопротеинового комплекса.

В заключение мы позволим себе высказать мнение, что, несмотря на принципиальный интерес, физическое представление о миграции электрона в применении к биологическим системам нуждается в более убедительных экспериментальных доказательствах. Широкое использование этой гипотезы для толкования известных фактов биокатализа не имеет преимуществ по сравнению с ныне принятыми представлениями. Соображения Н. Риля более уместны в применении к каталитическим реакциям, протекающим на поверхности кристаллических твёрдых тел, т. е. настоящих полупроводников, для которых электронные представления уже давно развивались в нашей стране Л. В. Писаржевским[19] и которые вновь приобретают в настоящее время актуальность[20]. Нет необходимости искусственно ограничивать энергетику биохимических процессов тесными рамками детальной физической картины, взятой из области весьма интересных явлений, не имеющих, однако, прямого отношения к органическим системам. Несомненно, что в последних также наблюдается перемещение электрона с сопутствующей передачей энергии (см. примеры в[6]), но механизм этой миграции имеет иную природу, чем в неорганических кристаллах-полупроводниках. К подробному обоснованию такой точки зрения мы вернёмся на страницах настоящего журнала.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Риль, Успехи Физ. Наук **35**, 186 (1948), № 2.
2. A. Szent-Györgyi, Nature **9**, 157 (1941); «Chemistry of Muscular Contraction», N. Y. 1947.
3. H. Borsook, Ergebn, Enzymforsch. **4**, 19 (1935).
4. А. Н. Теренин, Изв. Акад. Наук, сер. биол. № 3, 369 (1947).
5. T. Bücher, J. Kaspers, Biochimica et biophysica acta **1**, 21 (1947).
6. А. Н. Теренин, «Фотохимия красителей», Изд. АН СССР (1947).
7. А. Н. Теренин и А. В. Карякин, ДАН, 88, 425 (1947).
8. H. Theorell. Ann. Rev. Biochem. **7**, 265 (1947).
9. H. Dutton, W. Manning, B. Duggar, J. Phys. Chem. **47**, 308 (1943). E. Wassink, I. Kersten, Enzymologia **12**, 3 (1946).
10. А. Т. Вартанян, Ж. физ. хим. **20**, 1065 (1946); **22**, 769 (1948). Е. К. Пуцейко, Докл. Акад. Наук СССР, **59**, 471 (1948); Ж. физ. хим. **22**, 1172 (1948).

11. Щодро, Изв. Рос. Акад. Наук **6**, 727 (1919); Изв. физ. ин-та **1**, 571, 132, J. chimie physique **26**, 59, 117, 178 (1929).
12. А. Теренин и Е. К. Пуцейко, Ж. физ. хим. (1949).
13. И. А. Казарновский, Ж. физ. хим. **14**, 320 (1940).
14. „Ферменты", Изд. АН (1940) (сборник).
15. А. А. Красновский, Усп. совр. биолог. **21**, 153 (1946); Изв. Акад. Наук, сер. биол, № **3**, 377 (1947).
16. А. А. Красновский, Докл. Акад. Наук СССР **58**, 617 (1947); **58**, 835 (1947).
17. А. А. Красновский, Докл. Акад. Наук СССР, **60**, 421 (1948); **61**, № 1 (1948).
18. E. Rabinowitch, «Photosynthesis» № 4 (1945).
19. Л. В. Писаржевский и М. Розенберг, «Неорганическая химия» (1928) ДВНТУ.
20. Ф. Ф. Волькенштейн, Ж. физ, хим. **22**, 311 (1948).

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXX, № 2

БИОХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, В. А. ГАВРИЛОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ ПОСТОРОННИХ МОЛЕКУЛ НА СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ И ХЛОРОФИЛЛА В РАСТВОРЕ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 3 XI 1949)

В предыдущем сообщении (1) нами были описаны опыты, показавшие влияние выкачивания и впуска воздуха на спектр поглощения и флуоресценцию растворов хлорофилла в толуоле. При выкачивании воздуха из трубки Тунберга, содержавшей раствор хлорофилла, интенсивность флуоресценции последнего уменьшалась и снова возрастала при впуске воздуха; одновременно обратимо изменялся спектр поглощения. Дальнейшие опыты показали, что ослабление интенсивности флуоресценции при эвакуации воздуха тем больше, чем чище был использованный для приготовления раствора толуол. В случае применения толуола, очищенного взбалтыванием с H_2SO_4 и последующей перегонкой над металлическим натрием, интенсивность флуоресценции уменьшалась в 3,5—4 раза (с 40—45 до 10—11 относительных единиц).

Это действие было объяснено нами влиянием кислорода воздуха. Однако последующее изучение этого явления показало, что наблюдаемый эффект не может быть отнесен лишь за счет кислорода*, а главным действующим началом являются пары воды, присутствующие в воздухе. Это было установлено в результате следующих опытов: содержащийся в трубке Тунберга раствор хлорофилла (a + b) в толуоле эвакуировали в течение 3 мин. при сильном взбалтывании. После измерения интенсивности флуоресценции и снятия спектра поглощения в трубку впускали кислород (полученный из перекиси водорода реакцией с $K_2Cr_2O_7$), тщательно высушенный пропусканием через крепкую H_2SO_4, две колонки с обезвоженным силикагелем, трубку с твердым KOH и ловушку, охлажденную до —130—140°. Перед впуском кислорода воздух из всех соединительных трубок выкачивался вакуумным насосом. Оказалось, что сухой кислород (при давлении 1 атм.) в пределах ошибки измерения не оказывает действия на флуоресценцию и вид спектра поглощения раствора хлорофилла в сухом толуоле. Впуск кислорода, высушенного вышеописанным образом, а затем увлажненного приводил к усилению интенсивности флуоресценции, как это было ранее описано (1).

Для выяснения роли влаги независимо от кислорода в боковой отвод пробки трубки Тунберга вводили 2—3 капли дестиллированной воды и содержащийся в трубке толуоловый раствор хлорофилла эвакуировали обычным образом. Флуоресценция сразу после откачивания оказывалась

* Тем не менее сухой кислород, по данным В. Ф. Гачковского, полученным в нашей лаборатории, способен повышать флуоресценцию адсорбатов хлорофилла и фталоцианина в вакуумных условиях.

значительно меньшей, чем начальная, но достаточно было взболтать раствор, чтобы пары воды могли продиффундировать в него, и флуоресценция сразу повышалась в 4—4,5 раза. Такое же явление наблюдалось, если пары воды вводились в эвакуированную трубку Тунберга путем нагревания нескольких кристаллов $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, помещенных заранее в боковой отвод.

Интенсивность флуоресценции в присутствии паров воды без кислорода оказывалась на 15—20% выше, чем в присутствии последнего. Если, например, при впуске влажного кислорода интенсивность флуоресценции данного раствора повышалась с 11 до 39—40 относительных единиц, то в присутствии только воды интенсивность флуоресценции доходила до 49—50.

Отсюда следует, что молекулярный кислород тушит флуоресценцию хлорофилла в присутствии влаги также и в толуоловом растворе, как это известно для растворов хлорофилла в полярных растворителях ([2]).

Это было подтверждено опытом с последующим впуском кислорода в эвакуированную трубку Тунберга, содержащую капли воды в отводе. Флуоресценция после взбалтывания раствора для насыщения кислородом падала с 49—50 единиц до обычных 39—40. Действие воды не является специфичным. Такое же действие оказывают сухие пары спирта и прибавка ряда полярных веществ: пиридина, ацетона, анилина и др., на что уже указывалось в предыдущем сообщении. Чтобы объяснить отсутствие тушения флуоресценции эвакуированного толуолового раствора хлорофилла сухим кислородом, можно выдвинуть предположение, что наблюдаемый результат является следствием наложения противоположных эффектов, активирующего флуоресценцию и тушащего действия кислорода. Следует поэтому допустить, что кислород обладает все же способностью воздействовать на молекулу хлорофилла подобно воде, хотя и в значительно более слабой степени.

По вопросу о механизме действия веществ, увеличивающих флуоресценцию хлорофилла, могут быть выдвинуты различные точки зрения.

Ливингстон и сотр., недавно опубликовавшие работу ([3]) по влиянию влажности на флуоресценцию хлорофилла в ряде растворителей (главным образом, в бензоле), выдвинули как наиболее вероятное предположение, что в инертных растворителях молекула хлорофилла вообще не флуоресцирует и только присоединение „активаторов" по месту циклопентанонового кольца молекулы хлорофилла посредством водородной связи дает флуоресцирующую форму.

В предыдущем сообщении мы высказали предположение о координационной связи активирующей добавки с центральным атомом магния молекулы хлорофилла. Это предположение нашло подтверждение в наших опытах с феофитином, фталоцианином и его Mg-комплексом.

Растворы феофитина (отличающиеся от хлорофилла только отсутствием Mg) в толуоле, как показывают цифры табл. 1, не меняют ни интенсивности флуоресценции, ни спектра поглощения при выкачивании и впуске воздуха, несмотря на то, что в молекуле феофитина имеется циклопентаноновое кольцо. Для получения феофитина в водно-спиртовые растворы хлорофилла вводили уксусную кислоту при слабом нагревании. Феофитин экстрагировали эфиром. Эфирный экстракт промывали водой, сушили над безводным Na_2SO_4 и испаряли досуха. Остаток растворяли в толуоле и феофитин идентифицировали по его спектру поглощения.

Фталоцианин магния не имеет циклопентанонового кольца и, однако, раствор его в толуоле показывает поведение, подобное хлорофиллу. Получение толуолового раствора фталоцианина магния достаточной

для опыта концентрации было связано с известными затруднениями так как это соединение практически нерастворимо в неполярных растворителях, что, повидимому, связано с наличием в его составе двух молекул прочно связанной воды ([4]). Поэтому для приготовления раствора мы использовали следующий прием. Сначала фталоцианин Mg растворяли в эфире, в котором легко получить требующуюся для опыта концентрацию, и эфирный раствор смешивали с толуолом. Эфир испаряли из смеси при нагревании на водяной бане и затем под вакуумом. Этим способом удавалось получить стойкие растворы фталоцианина Mg в толуоле с поглощением в красном максимуме $E_{672мμ} = 1{,}3$ и выше.

В табл. 1 приведены цифры, показывающие изменение флуоресценции и величины поглощения для фталоцианина магния.

Флуоресценция и спектр поглощения толуолового раствора фталоцианина без металла, отличающегося от магниевого комплекса только отсутствием магния, не изменяются при выкачивании и впуске воздуха (см. соответствующие цифры в табл. 1).

На рис. 1 приведены результаты одного из опытов, в котором применялся толуоловый раствор смеси фталоцианина без металла и фталоцианина магния. Эти соединения обладают спектрами поглощения, резко отличающимися друг от друга ([5,6]), что позволило по кривым поглощения независимо судить об их изменениях.

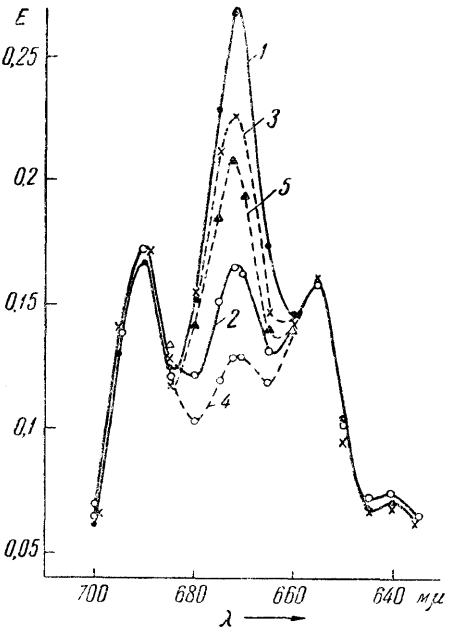


Рис. 1. Изменение спектра поглощения раствора смеси фталоцианина без металла и фталоцианина магния в толуоле при выкачивании и впуске воздуха: *1* — начальный раствор, *2* — после 1-го выкачивания, *3* — после впуска воздуха, *4* — после повторного выкачивания, *5* — после повторного впуска воздуха

Таблица 1

Изменение интенсивности флуоресценции и величины поглощения при выкачивании и впуске воздуха

Соединение, растворенное в толуоле	Интенсивность флуоресц. в относит. единицах			Величина коэфф. погашения в максимуме			
	начальная	после выкачив. воздуха	после впуска воздуха	начальная	после выкачив. воздуха	после впуска воздуха	положение максим. поглощения мμ
Фталоцианин Mg	49	27	45	0,700	0,314	0,557	672
То же	30	23	30	0,268	0,165	0,226	672
» »	27	19	36	0,186	0,095	0,200	672
Фталоцианин без металла	21	22	22	0,327	0,300	0,290	690
Феофитин (a+b)	30	31	32	0,900	0,895	0,892	670
То же	24	27	28	0,345	0,346	0,341	670

По кривым рис. 1 легко видеть, что максимумы при 690 и 655 мμ, принадлежащие фталоцианину без металла, почти не меняются, тогда как поглощение в максимуме кривой фталоцианина магния 672 мμ резко уменьшается при выкачивании и опять увеличивается при впуске воздуха.

Полное подобие условий для обоих соединений в этих опытах позволяет отнести разницу в поведении только за счет центрального атома Mg.

На основании этих опытов следует предположить, что вещества, усиливающие флуоресценцию хлорофилла, координационно связываются с центральным атомом магния его молекулы. Вероятно, это приводит или к дезагрегации нефлуоресцирующих димерных молекул пигмента на флуоресцирующие мономеры или к образованию хлорофилла, связанного с полярной молекулой, обладающего в таком виде иным спектром поглощения и флуоресценцией.

Здесь уместно указать также на то, что координационная связь молекулы пиридина с центральным атомом магния молекулы хлорофилла, вероятно, определяет своеобразие его спектральных и фотохимических свойств в пиридиновых растворах ([7],[8]).

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за ценные указания и помощь в работе.

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

Поступило
24 X 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова и А. А. Красновский, ДАН, **66**, 1133 (1949). [2] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **69**, 623 (1948). [3] R. Livingston, W. Watson and J. McArdle, Journ. Am. Chem. Soc., **71**, 1542 (1949). [4] R. P. Linstead and A. R. Lowe, Journ. Chem. Soc. (London), **1934**, 1022. [5] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, 417 (1947). [6] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **58**, 1399 (1947). [7] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [8] А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, № 3 (1949).

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXXIV, № 2

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, В. А. ГАВРИЛОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

О ТУШЕНИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ФТАЛОЦИАНИНА МАГНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИХ С ТУШАЩИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 4 VII 1950)

Исследование тушения флуоресценции красителей посторонними молекулами и взаимодействия тушителей с флуоресцирующим веществом необходимо для выяснения природы фотохимического действия красителей и, в частности, хлорофилла.

В нашем сообщении ([1]) были приведены данные о тушении флуоресценции фталоцианина магния в спиртовом растворе, из которых следует, что более сильным тушащим действием обладают молекулы-окислители.

Ливингстон и Чун-Лин-хе ([2]) пришли к тем же выводам для растворов хлорофилла в метаноле в опытах с большим количеством различных соединений.

В данном сообщении излагаются результаты исследований о влиянии ряда веществ на интенсивность флуоресценции растворов хлорофилла (a + b) и фталоцианина Mg в разных средах: в толуоле*, этаноле и пиридине, и о взаимодействии тушителя с молекулами пигмента.

Флуоресценцию возбуждали в области максимума поглощения указанных соединений в красной области спектра и интенсивность ее измеряли методом, описанным ранее ([1]). Растворы помещались в вакуумных пробирках особой формы, приспособленных для непосредственных измерений поглощения на спектрофотометре. Растворенный кислород удаляли откачкой масляным насосом при кипении растворителя.

В табл. 1 приведены данные, показывающие изменение интенсивности флуоресценции и величины поглощения в красном максимуме раствора вышеуказанных пигментов под действием соединений различной химической природы. Концентрация последних во всех случаях, за исключением особо отмеченных, составляла 0,1 *M* на 1 л.

Величины поглощения *E*, показанные в табл. 1, измерены на фотоэлектрическом спектрофотометре, прямо в пробирках.

Данные табл. 1 подтверждают ранее сделанный только для спиртовых растворов вывод, что более сильное тушащее действие на флуоресценцию хлорофилла и фталоцианина магния оказывают окислители.

Восстановители обычно или совсем не уменьшают интенсивность флуоресценции или же их действие значительно слабее.

О взаимодействии молекул тушителя с пигментом можно судить прежде всего по изменению положения и относительной величины максимумов спектральной кривой поглощения.

---

* Раствор фталоцианина Mg в толуоле приготовлен через эфир, как описано ранее ([6]).

Сильно тушащие флуоресценцию окислители, хинон и кислород, практически не изменяют вида спектра поглощения пигментов в обычных растворителях, тогда как в случае иода и динитробензола величина поглощения в красном максимуме заметно уменьшается, что говорит о возможности в этом случае химического взаимодействия. Таким образом, следует думать, что в различных случаях тушения окислителями имеет место различный механизм процесса тушения.

Для исследования вопроса о связи между тушением флуоресценции и способностью к фототохимическому взаимодействию между молекулами хлорофилла и тушителя в том случае, когда они, очевидно, не реагируют друг с другом в темновых условиях, о чем можно судить по неизменности спектра поглощения, нами были поставлены следующие опыты.

Растворы хлорофилла, содержащие хинон, гидрохинон или аскорбиновую кислоту, освобожденные от кислорода откачкой на масляном

Таблица 1

Изменение интенсивности флуоресценции и величины поглощения в красном максимуме растворов хлорофилла (a + b) и фталоцианина в результате прибавления посторонних веществ

Прибавленное вещество	Растворитель	Хлорофилл (a + b)					Фталоцианин магния				
		I_1	I_2	% туш.	E_1*	E_2	I_1	I_2	% туш.	E_1*	E_2
Нитробензол	Этанол	42,5	13,6	68	0,484	0,479	66,5	20	70	0,495	0,486
м-динитробензол	То же	42,5	5,5	87	0,458	0,393	65,5	9,0	86	0,492	0,469
J_2 (0,005 *M*)	„	42,7	19,9	53	0,650	0,550	71,4	29,8	58	—	—
Аскорбиновая кислота	„	46,1	46,1	0	0,409	0,409	53,0	54,0	0	0,390	0,392
Бензойная кислота	„	45,0	45,0	0	0,486	0,483	69,0	69,0	0	0,494	0,509
Анилин	„	44,5	45,0	0	0,480	0,473	65,1	50,0	23	0,498	0,491
Диметиланилин	„	35,4	25,5	28	0,780	0,750	62,5	18,4	71	0,477	0,462
Фенол	„	45,0	45,0	0	—	—	68,0	68,0	0	0,498	0,491
Бензальдегид	„	42,0	42,0	0	0,480	0,455	67,0	67,0	0	0,495	0,481
Пирокатехин	„	46,0	47,0	0	0,470	0,470	66,5	66,5	0	0,499	0,481
Пирогаллол	„	46,0	46,0	0	0,480	0,478	68,5	66,5	3	0,489	0,485
Фенилгидразин солянокислый (0,05 *M*)	„	47,0	43,0	8	0,462	0,456	66,0	66,0	0	0,528	0,510
п-хинон	Пиридин	49,2	2,7	94,5	0,660	0,660	44,6	1,7	96	0,648	0,643
Гидрохинон	То же	49,1	50,2	0	0,650	0,648	44,1	41,6	6	0,655	0,646
Нитробензол	„	48,0	30,2	37	0,640	0,614	43,8	30,2	31	0,675	0,661
м-динитробензол	„	47,4	10,4	78	0,620	0,594	45,3	6,5	86	0,671	0,645
Анилин	„	45,0	44,9	0	0,620	0,605	44,0	42,1	4	0,656	0,646
Диметиланилин	„	45,2	44,4	2	0,612	0,593	43,3	27,3	37	0,661	0,627
Аскорбиновая кислота	„	44,0	44,0	0	0,480	0,480	—	—	—	—	—
п-хинон	Толуол	49,1	3,3	93	0,680	0,683	48,0	2,0	96	0,570	0,560
Нитробензол	То же	47,1	33,5	29	0,675	0,663	48,0	24,0	50	0,590	0,581
м-динитробензол	„	49,2	11,7	75	0,655	0,611	48,0	10,0	81	0,592	0,562
Анилин	„	47,5	48,0	0	0,648	0,641	48,0	49,0	0	0,583	0,576
Диметиланилин	„	46,1	47,5	0	0,647	0,630	47	39	17	0,586	0,568

Примечание. I_1 — интенсивность флуоресценции в условных единицах; E_1 — поглощение в максимуме для чистого раствора; I_2 и E_2 — то же для раствора, содержащего постороннее вещество.

* Положение красного максимума для растворов в этаноле: хлорофилла 665 мμ, фталоцианина магния 668 мμ; в пиридине соответственно: 670 и 673 мμ; в толуоле 665 и 672 мμ.

насосе при кипении, подвергались в течение 9 мин. действию излучения 500-вт кинолампы на расстоянии 45 см, концентрированного конденсором и прошедшего через красный светофильтр RG-2 толщиной 10 мм.

Результаты опытов, наряду с данными по фотохимическому окислению кислородом воздуха в тех же условиях, приведены в виде кривых на рис. 1. По оси ординат отложена величина поглощения в красном максимуме в процентах от поглощения неосвещенного

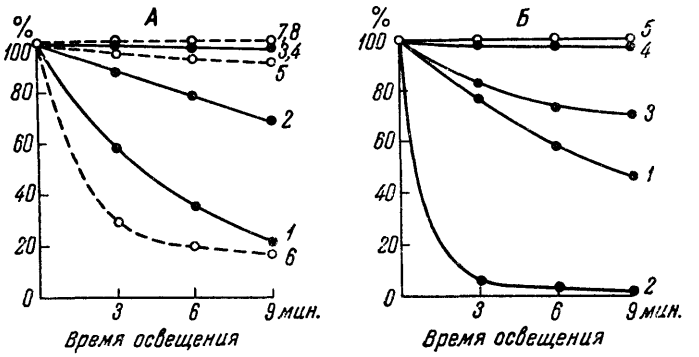


Рис. 1. Фотохимические реакции хлорофилла. *А*. В этаноле: *1* — O_2, *2* — аскорбиновая кислота, *3* — хинон, *4* — гидрохинон, *7* — чистый раствор. В толуоле: *5* — хинон, *6* — O_2, *8* — чистый раствор. Б. В пиридине: *1* — O_2, *2*—аскорбиновая кислота, *3* — хинон, *4* — гидрохинон, *5* — чистый раствор

раствора. Эти данные свидетельствуют о том, что не существует прямой связи между тушением флуоресценции и способностью к фотохимическому взаимодействию хлорофилла с тушителем. Например хинон, сильно тущащий флуоресценцию, почти не реагирует фотохимически с хлорофиллом в спиртовом и толуоловом растворах. Аскорбиновая кислота, не влияющая на интенсивность флуоресценции хлорофилла, реагирует значительно быстрее, чем хинон, в спирте и очень быстро в пиридине.

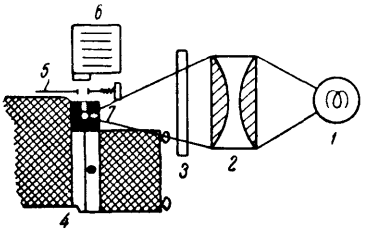


Рис. 2. Расположение приборов при опытах с боковым освещением. *1* — кинолампа 500 вт, *2* — конденсор, *3* — светофильтр RG-2, *4* — спектрофотометр, *5* — оптическая щель, *6* — осветитель спектрофотометра, *7* — стойка для пробирки с раствором

Хотя фотореакция хлорофилла с аскорбиновой кислотой в пиридине является обратимым фотовосстановлением ([4]), относительная медленность обратной реакции в анаэробных условиях дает возможность судить о ходе фотореакции по измерению *E* после выключения света.

Для проверки того, не происходит ли между сильным тушителем, не изменяющим вида спектра поглощения хлорофилла и красителя, очень быстро протекающая обратимая химическая реакция, которая и является причиной тушения, нами был поставлен опыт с наблюдением за изменением поглощения растворов хлорофилла (a + b) (в концентрации около 10^{-5} *М*/л) в спирте, пиридине и толуоле, содержащих хинон в концентрации 0,1 *М*/л, при освещении их сильным светом, направленным перпендикулярно лучу света монохроматора спектрофотометра. Расположение приборов показано на рис. 2.

Для того чтобы избежать ошибок из-за рассеянного света и флуоресценции, боковое освещение раствора велось через красный светофильтр (RG-2), пропускающий длины волн больше 620 мμ, а наблюдение за изменением поглощения в области второго максимума хлорофилла при 430—440 мμ. Опыт показал, что во всех случаях при включении бокового освещения величина поглощения в синем максимуме хлорофилла не менялась, что говорит об отсутствии реакции.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы.

1. Молекулы-окислители оказывают более сильное тушащее действие на флуоресценцию хлорофилла в спиртовом, пиридиновом и толуоловом растворе.

2. Тушащее действие посторонних молекул не имеет прямой связи со способностью их фотохимически реагировать с хлорофиллом, что указывает на реакционную способность не электронно возбужденного состояния, обладающего длительностью 10^{-7} — 10^{-8} сек., а, повидимому, длительно живущего бирадикального (триплетного) состояния ([5]).

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь в работе.

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

Поступило
26 VI 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. Б. Евстигнеев и А. А. Красновский, ДАН, **60**, 623 (1948). [2] R. Livingston and Chun-Lin Ke, Journ. Am. Chem. Soc., **72**, 909 (1950). [3] R. Livigston, Photosynthesis in Plants, 1949, p. 184. [4] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [5] А. Н. Теренин, Acta physicochim. URSS, **18**, 210 (1943); ЖФХ, **81**, 1 (1944); Фотохимия красителей, М., 1947. [6] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова и А. А. Красновский, ДАН, **70**, 261, (1950).

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXXIV, № 1

БИОХИМИЯ

Л. М. КОСОБУЦКАЯ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И АНАЛОГОВ ПО РЕАКЦИИ ТИМИРЯЗЕВА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 VI 1950)

К. А. Тимирязев ([1–3]) в 1885 г. открыл реакцию обратимого восстановления хлорофилла цинковой пылью в присутствии уксусной кислоты. При этом наблюдалось образование продуктов восстановления желто-коричневого цвета; при стоянии на воздухе возвращалась зеленая окраска раствора. До настоящего времени, однако, с полной определенностью не установлена природа образующихся при этой реакции продуктов. Изучение реакции Тимирязева представляет значительный интерес в связи с проблемой химического участия хлорофилла в процессе фотосинтеза.

Кун и Винтерштейн ([4]) нашли, что продукты окисления восстановленных форм хлорофилла a и b по реакции Тимирязева тождественны с исходным веществом, в случае феофитина и феофорбида было установлено образование их цинковых производных. Однако Альберс, Кнорр и Ротемунд ([5]) обнаружили различия в спектрах флуоресценции и поглощения исходного хлорофилла и регенерированных продуктов после реакции. Подобное различие в спектрах поглощения наблюдал Т. Н. Годнев ([6]) при восстановлении протохлорофилла.

С целью установления природы образующихся при реакции Тимирязева продуктов мы произвели сравнительное исследование восстановления хлорофилла (a + b), a и b, феофитина, его цинкового и медного комплекса, а также аналога хлорофилла-фталоцианина магния.

Хлорофилл a и b получали хроматографическим разделением на сахаре в условиях, близких к описанным ([7]). Феофитин получали непосредственно из порошка сухих листьев крапивы по Фишеру ([8]). Цинковый и медный комплекс были получены при взаимодействии ацетонового раствора феофитина с нагретым раствором ацетата меди или цинка в метаноле. Реакция проводилась в вакуумных трубках с отводом особой формы, позволяющей устанавливать их в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана. В отвод вводилось 0,3 г цинковой пыли, 3 мл пиридинового раствора исследуемого пигмента с концентрацией 10^{-4} М/л, 0,06 мл ледяной уксусной кислоты, 0,04 мл воды. В трубку отвода вводился ватный фильтр. В нижний конец трубки наливалось 3 мл пиридина.

Трубку эвакуировали при взбалтывании в течение 3 мин. масляным вакуумным насосом. В течение нескольких секунд происходил переход зеленой окраски раствора в желто-бурую. Затем при наклоне трубки раствор фильтровали через ватный фильтр в нижнюю часть вакуумной трубки. Таким образом, фильтрование продуктов реакции от цинка происходило в вакуумных условиях.

Измеряли спектр поглощения продуктов после реакции и после пуска воздуха на фотоэлектрическом спектрофотометре через каждые

5 мμ, были проведены контрольные опыты с заменой раствора хлорофилла пиридином. Спектры контрольных опытов учитывали при построении кривых поглощения.

Таблица 1

Положение главных максимумов поглощения (красного и фиолетового) в пиридине

Пигмент	Исходный продукт		После обратной реакции	
Хлорофилл (a+b) . . .	670	442	661	431
Феофитин (a + b) . . .	677,5	415	661	431
Хлорофилл a	670	442	661	430
Хлорофилл b	656	470	644	459
Zn-феофитин (a + b) . .	661	431	661	431
Cu-феофитин (a + b) . .	655	422,5	660	428
Zn-феофитин a	661	430	—	—
Zn-феофитин b	644	459	—	—
Фталоцианин магния . .	672,5	607,5	672,5	607,5

Хлорофилл b восстанавливается полнее, чем хлорофилл a, некоторое количество которого в большинстве опытов оставалось непрореагировавшим.

Продукт восстановления фталоцианина магния окрашен и не поглощает в видимой области спектра. Пуск воздуха приводит к окислению продуктов восстановления, раствор при этом зеленеет. Существенно, что у всех производных хлорофилла образуются продукты, обладающие подобным спектром поглощения с главными максимумами при 661 и 431 мμ (± 1 мμ).

Вид спектра поглощения конечных продуктов реакции соответствует поглощению Zn-феофитина (см. рис. 1 и 2) *.

С целью дополнительной идентификации было произведено хроматографическое разделение.

Продукты окисления хлорофилла a и b переводились в серный эфир. Раствор в смеси 30% серного и 70% петролейного эфира хроматографировали на сахарной колонке по Цвету. В случае хлорофилла b наблюдались две зоны — верхняя, серая, содержащая неизвестные продукты распада, и нижняя, зеленая, со спектром, соответствующим Zn-феофитину b. В случае хлорофилла a можно было заметить образование трех зон — верхней, серой (продукты разложения) и двух сине-зеленых, разделенных полоской бесцветного сахара. В верхней слабой зоне адсорбировался непрореагировавший хлорофилл a, в нижней — более широкой — цинковое производное хлорофилла a.

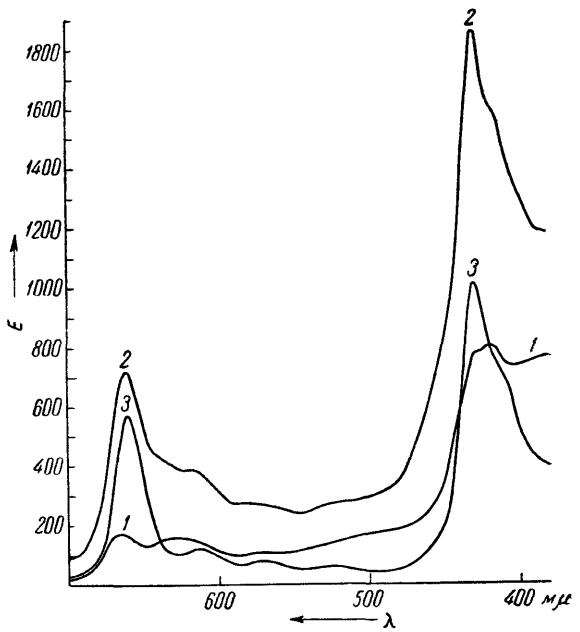


Рис. 1. Восстановление феофитина (a'+ b) по реакции Тимирязева: *1* — восстановленный продукт, *2* — продукт обратного окисления кислородом воздуха, *3* — цинковый комплекс феофитина (a+b)

* На рис. 1, 2 и 3 спектр поглощения Zn-феофитина дан в произвольной концентрации лишь для сопоставления вида спектров.

В случае Cu-феофитина спектр регенерированных окисленных продуктов реакции был сдвинут в сторону более коротких длин волн, по сравнению с Zn-феофитином. У феофитина спектр продуктов реакции был подобен цинковому комплексу (см. рис. 3). У фталоцианина магния наблюдалось полное соответствие спектров поглощения до и после реакции.

На основании проведенных опытов можно притти к следующим заключениям.

1. При действии цинковой пыли на пиридиновые растворы хлорофилла, феофитина, цинкового и медного производных хлорофилла и фталоцианина магния происходит восстановление пигментов с падением поглощения в области главных максимумов этих соединений в видимой области спектра, что свидетельствует о нарушении хромофорной системы конъюгированных связей молекулы пигмента. Применение весьма концентрированных растворов хлорофилла дает возможность обнаружить полосу поглощения в области 510—530 мμ. Химическая природа образующихся восстановленных соединений остается неясной.

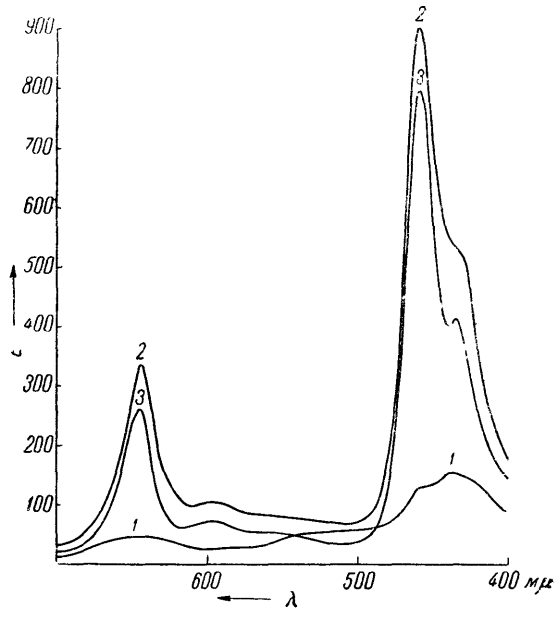


Рис. 2. Восстановление хлорофилла а по реакции Тимирязева: *1* — восстановленный продукт, *2* — продукт обратного окисления кислородом воздуха, *3* — цинковый комплекс феофитина а

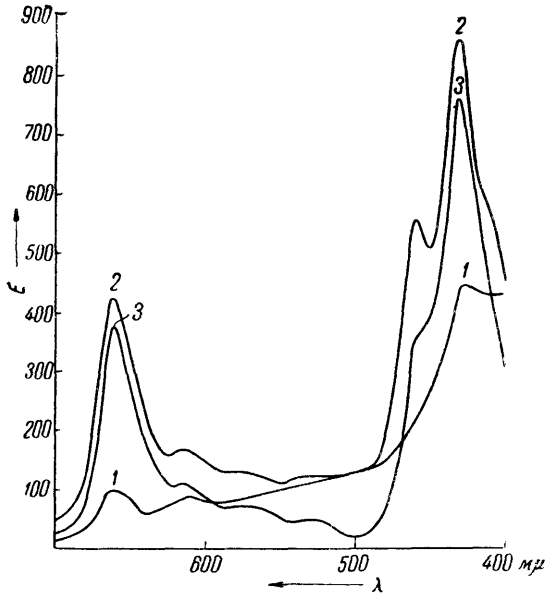


Рис 3. Восстановление хлорофилла b по реакции Тимирязева: *1* — восстановленный продукт, *2* — продукт обратного окисления кислородом воздуха, *3* — цинковый комплекс феофитина b

2. После пуска воздуха происходит обратное образование зеленого пигмента. Спектральные и хроматографические исследования показали, что в случае хлорофилла и феофитина происходит образование цинкового комплекса. В случае хлорофилла а часть первоначального продукта не участвует в реакции. Можно думать, что эта часть незначительна, так как спектр продукта после окисления не дает отклонений от спектра Zn-феофитина а. При реакции с цинковым комплексом происходит его обратная регенерация. В случае медного комплекса продукт после реакции обладает флуоресценцией, тогда как исходное медное соединение ее не имеет; однако спектр пол-

ностью не соответствует цинковому комплексу. Наиболее вероятно, что при этом получается смесь способного к флуоресценции цинкового и исходного медного комплексов. В случае фталоцианина магния остается неясным вопрос о присутствии магния в регенерированном продукте, так как мы не имели в своем распоряжении фталоцианина цинка.

3. В наших опытах не подтвердились данные Куна и Винтерштейна ([4]) о полной регенерации хлорофилла и предположения Рабиновича ([9]) об образовании мезосоединений, т. е. о восстановлении винильной группы молекулы хлорофилла. Реакцию Тимирязева нельзя также объяснить только образованием феофитина, так как феофитин восстанавливается при этой реакции.

4. Наряду с обратимым восстановлением происходит в значительной степени необратимое разрушение пигмента. В случае фталоцианина магния разрушается около 80% пигмента, у хлорофилла и его производных — до 50%.

5. Скорость восстановления при комнатной температуре уменьшается соответственно ряду: феофитин, цинковый комплекс, хлорофилл b, хлорофилл a, фталоцианин. Полное обратное окисление производных хлорофилла при комнатной температуре требует 1,5—2 часа, фталоцианина магния — до 10 час.

6. Сопоставление реакции Тимирязева с обратимым фотовосстановлением хлорофилла ([10–12]) позволяет притти к следующим выводам: а) необратимость восстановления цинком объясняется заменой атома магния на цинк, тогда как при фотохимической реакции удается наблюдать лишь побочное образование феофитина; б) красный промежуточный продукт фотовосстановления хлорофилла a имеет максимум при 525 мμ, тогда как при восстановлении цинком не происходит значительного накопления красных промежуточных продуктов; введение цинка в молекулу хлорофилла приводит в изменению спектральных свойств промежуточного продукта восстановления. Свойства продуктов темнового и фотохимического восстановления будут сопоставлены в последующих работах.

Приносим благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева и
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
18 V 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] К. А. Тимирязев, Nature, **32**, 342 (1885); Соч., **2**, 1937, стр. 268. [2] К. А. Тимирязев, C. R., **102**, 686 (1886); Соч., **2**, 1937, стр. 264. [3] К. А. Тимирязев, Nature, **34**, 52 (1886); Соч., **2**, 1937, стр. 270. [4] R. Kuhn u. A. Winterstein, Ber., **66**, 1741 (1933). [5] P. Rothemund, Cold. Spr. Harb. Symp. Biol., **3**, 71 (1935). [6] Т. Н. Годнев, Уч. зап. Белорусск. ун-та (сер. хим.), № 1, 15 (1939). [7] F. K. Zscheile and C. L. Comar, Bot. Gaz., **102**, No. 3, 463 (1941). [8] H. Fischer u. A. Stern, Die Chemie des Pyrrols, Leipzig, **2**, 1940, p. 329. [9] E. Rabinowitch, Photosynthesis and Related Processes, **1**, 1945, p. 457. [10] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 42 (1948). [11] А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [12] А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949).

Фотосинтез растений (биохимические представления).— В кн.: Успехи биологической химии: (Ежегодник). М.: АМН СССР, 1950, т. 1, с. 473—506, рис.— Библиогр.: с. 504—506.

ФОТОСИНТЕЗ РАСТЕНИЙ

(биохимические представления)

А. А. КРАСНОВСКИЙ

(Москва)

Введение

Зеленые растения используют лучистую энергию солнца для превращения простых неорганических веществ — воды, углекислого газа и соединений азота в углеводы, белки, жиры и многие другие органические соединения. Этот процесс ассимиляции углекислоты растениями — фотосинтез, обеспечивая пищу и кислород животным и растительным организмам, определяет возможность жизни на земле в ее нынешней форме [1]. Познание сути фотосинтеза нужно не только для того, чтобы уметь сознательно управлять многообразной синтетической деятельностью растений. Раскрытие природы фотосинтеза укажет пути искусственного превращения энергии солнца в потенциальную химическую энергию, в запасы пищи и топлива.

Классические труды К. А. Тимирязева создали основу развития науки о фотосинтезе; в современных исследованиях мы получаем все новые подтверждения его идей. Исследования М. С. Цвета над пигментами растений привели его к открытию хроматографического анализа, являющегося в своих многочисленных модификациях одним из величайших методических достижений нашего времени с необозримой областью применения.

Чрезвычайно велики заслуги в области изучения усвоения углекислоты наших выдающихся ученых: А. Н. Баха, В. Н. Любименко, И. П. Бородина, В. И. Палладина, В. В. Сапожникова, Д. И. Ивановского, А. Ф. Лебедева, С. П. Костычева, Ф. Н. Крашенинникова, А. А. Рихтера и многих других.

В обзоре предполагается изложить материал, нужный для понимания основного вопроса фотосинтеза: каким образом лучистая энергия солнца, поглощенная пигментной системой растения, превращается в потенциальную химическую энергию органических соединений. Этим опре-

[1] Появление жизни на земле, повидимому, не связано с фотосинтезом. В соответствии с гипотезой А. И. Опарина (1941) фотосинтез возник в процессе приспособления организмов к изменяющимся условиям среды, по мере исчерпания «готового» органического вещества, определявшего гетеротрофный характер первичного обмена. Развитие фотосинтеза в свою очередь явилось причиной изменения среды и организмов; кислородная атмосфера земли, определяющая нынешний «аэробный» тип жизни, возникла в результате фотосинтетической деятельности растений (Вернадский, 1940; Виноградов, 1947).

деляется преимущественно биохимический и физико-химический аспект дальнейшего изложения.

По ряду вопросов физиологии и экологии фотосинтеза имеются монографии (Бриллиант, 1949). Новейшая литература отражена в опубликованных в последние годы обзорах и сборниках (Виноградов, 1947; Бриллиант, 1947, 1948; Фотосинтез растений, 1949; Проблемы биохимии, 1948; Годнев, 1947; Гюббенет, 1946; Красновский, 1946, 1947; Ничипорович, 1948; Свешников, 1944; Степаненко, 1947; Таусон, 1947; Шпольский, 1947; Рабинович, 1945; Франк и Лумис, 1949). Поэтому нами при составлении данного обзора были использованы лишь наиболее существенные работы. Обзор не ставит своей задачей библиографическую полноту

Учитывая использование обзора лицами разных специальностей, мы сочли целесообразным изложить не только результаты исследований, но и кратко описать методику их выполнения.

Виды реакций, составляющих процесс фотосинтеза

Процесс. фотосинтеза состоит из фотохимических реакций, в которых участвует поглощающая свет пигментная система хлоропласта, и темновых реакций, управляемых ферментами. В разных условиях внешней среды (свет, температура) интенсивность фотосинтеза определяется либо световой, либо темновой стадией.

Еще К. А. Тимирязев, исследуя зависимость фотосинтеза от интенсивности света (1889), установил, что скорость процесса при усилении освещения приближается к предельной величине (световое насыщение) Дальнейшими исследованиями установлено, что при малой интенсивности освещения скорость процесса определяет световая стадия; при этом температурный коэфициент фотосинтеза близок к единице (т. е. скорость процесса мало зависит от температуры), что характерно для фотохимических реакций. При большой интенсивности света «узким местом» процесса становится уже темновая стадия. Это явствует из того, что при интенсивном освещении температурный коэфициент процесса лежит в области, характерной для темновых реакций (около двух).

Наличие темновой стадии фотосинтеза, было также показано опытами с прерывистым освещением (Эмерсон и Арнольд, 1932). Фотосинтез суспензии хлореллы измеряли манометрическим методом при освещении вспышками света длительностью 10^{-5} сек, с чередующимися темновыми интервалами переменной длительности. Оказалось, что выход фотосинтеза на вспышку растет с увеличением длительности темнового промежутка до 0,01—0,02 сек и затем (при дальнейшем увеличении темнового интервала) остается постоянным.

Фотосинтез как окислительно-восстановительный процесс

Как известно, А Н. Бах (1893) впервые развил представление о фотосинтезе как о сопряженном окислительно-восстановительном процессе Вообще, под окислением — восстановлением разумеют процесс, основу которого составляет перенос электронов от молекулы восстановителя (отдающей электрон) к молекуле окислителя (воспринимающей электрон). Обычный в биохимии перенос водорода рассматривают текущим в «два такта» (Теренин, 1947) — переноса электрона и протона (иона водорода); в зависимости от свойств системы первичным может быть либо присоединение протона, либо перенос электрона с последующим

отделением протона. При реакциях дыхания происходит самопроизвольный (в термодинамическом смысле) многоступенчатый перенос электронов и протонов от молекулы органического соединения (сахара) к конечному их акцептору — молекуле кислорода.

А. П. Виноградов и Р. В. Тейс (1941, 1947) показали методом определения изотопного состава, что выделяющийся при фотосинтезе кислород происходит из воды, а не углекислоты.

Таким образом, при фотосинтезе происходит ступенчатый перенос водорода от молекулы воды в конечном счете к молекуле углекислоты, причем кислород воды выделяется в свободной форме.

В свете этих работ схему фотосинтеза углеводов следует писать так:

$$CO_2 + 2H_2O^* \rightarrow (CH_2O) + O_2^* + H_2O,$$

где (CH_2O) условное обозначение продукта фотосинтеза, восстановленного до степени углевода; молекулы реакционной воды H_2O распределяются в большом избытке «обычной» воды, обозначенной здесь H_2O^*; поэтому различный изотопный состав (по кислороду) воды, образующейся при реакции, и обычной речной воды не сказывается на изотопном составе выделяющегося кислорода.

Распространенный на земле свободный и связанный кислород, кроме общеизвестного изотопа O^{16} содержит десятые процента тяжелого изотопа O^{18} и тысячные процента—O^{17}. Соответственно и вода содержит эти изотопы кислорода. Для определения изотопного состава кислорода воды пользуются измерением плотности изучаемой воды по сравнению с плотностью стандартной воды; увеличение содержания тяжелого изотопа приводит к увеличению плотности воды.

Определение изотопного состава сводится к измерению температуры флотационного равновесия погруженного в воду кварцевого поплавка.

Сравнивают плотность синтетической воды, приготовленной из стандартного водорода и исследуемого и стандартного кислорода. Кислород углекислоты, в соответствии с данными многих исследователей, на 10—11 γ тяжелее кислорода воды [1]. Исследование показало, что синтетическая вода из кислорода, выделяющегося при фотосинтезе, по своей плотности (изотопному составу) близка к обычной речной воде ($\Delta\gamma d + 2{,}0$).

Эти выводы подтвердились в работе Рубена и сотрудников (1941), питавших хлореллу водой и углекислотой, обогащенными O^{18}. Оказалось, что содержание O^{18} в кислороде фотосинтеза зависело лишь от изотопного состава кислорода воды, но не углекислого газа.

Подобным методом было установлено, что кислород, выделяющийся при фотохимических реакциях изолированных хлоропластов происходит из воды (Холт и Френч, 1948).

Фотосинтетический аппарат, однако, способен осуществлять не только перенос водорода воды к углекислоте, но и иные фотохимические окислительно-восстановительные реакции, использующие иные окислители и восстановители. Так, живые клетки могут использовать в качестве «окислителя» нитраты, ионы железа, хинон, нитромочевину, бензальдегид и другие соединения (Литературу см. в указанных выше обзорах). Изолированные хлоропласты, лишенные способности восстанавливать углекислоту, тем не менее способны восстанавливать ряд соединений при одновременном выделении молекулярного кислорода: ионы трехвалентного железа, хроматы, различные бензо-нафта- и антрахиноны, индофенолы, динитробензол (Хилл, 1937; Варбург и Лютгенс, 1946; Гуревич, 1947; Зубкович и Андреева, 1949; Андреева и Зубкович, 1948. Фотосинтез растений, 1949). В то же время некоторые одноклеточные водоросли, выращенные в атмосфере молекулярного водорода (Scenedesmus и др.), теряют способность выделять при фотосинтезе молеку-

[1] Изменение плотности Δd выражено в γ-миллионных долях плотности стандартной воды.

лярный кислород, сохраняя способность восстановления углекислоты, при этом происходит, повидимому, восстановление промежуточного перекисного соединения водородом с участием фермента гидрогеназы (Проблемы биохимии, 1948; Гаффрон, 1944).

Наконец, при бактериальном фотосинтезе, в качестве «окислителя» используется углекислота, а в качестве восстановителя (у различных видов бактерий) — молекулярный водород, сероводород, сера, сульфиты, тиосульфат и ряд органических соединений — пропиловый спирт, жирные кислоты и т. д.[1] (Ван-Нил, 1941). Эти факты показывают гибкость фотохимического аппарата, способного к переработке различных субстратов; в некоторых случаях у этих реакций не наблюдается превращения световой энергии в химическую, и свет используется лишь для преодоления активационных барьеров (например, в некоторых случаях бактериального фотосинтеза).

Отмеченная «неспецифичность» фотохимической системы позволяет сделать предположение, что фотостадия заключается в образовании активной «пары»— окислителя и восстановителя, гетерогенно разделенных для предотвращения обратной реакции и реагирующих с помощью ферментативных систем с рядом соединений. Современные данные, таким образом, подтверждают представления, которые высказал А. Н. Бах более пятидесяти лет тому назад (1893) «... оба продукта разложения, т. е. окислитель... и восстановитель... чрезвычайно склонны соединяться. Поэтому распад углекислоты может иметь место только в присутствии веществ, способных фиксировать, хотя бы временно, если не оба, то, по крайней мере, один из продуктов реакции».

Ниже мы увидим, что наиболее вероятно первичное фотовосстановление хлорофилла с последующими реакциями образующихся «стабильных» свободных радикалов — «активного восстановителя» (ХН) и «окислителя» (А).

$$X + HA \rightleftarrows XH + A$$

В восстановительных реакциях мы предполагаем участие дегидразных ферментных систем, воспринимающих активный водород ХН и передающих его в систему реакций восстановления; с этой точки зрения реакции изолированных хлоропластов мы склонны рассматривать как следствие взаимодействия окислителей с восстановленными формами дегидразных ферментов или активных продуктов, образующихся в результате фотохимической реакции.

Связь фотосинтеза с процессами обмена веществ зеленой клетки[2]

Обмен веществ организмов, существовавших в первичной бескислородной атмосфере земли, был основан (в соответствии с гипотезой А. И. Опарина, 1941) на использовании энергии анаэробных окислительно-восстановительных превращений «готовых» органических соединений. Фотосинтетическая система возникла, таким образом, на основе суще-

---

[1] В последних работах Гест и Камен (1949) было показано, что фотосинтезирующие бактерии Rhodospirillum rubrum и другие при анаэробном росте (в атмосфере гелия) на синтетических средах, содержащих фумаровую, глютаминовую кислоты и другие соединения, при освещении выделяют молекулярный водород; присутствие азота подавляет выделение водорода. Опыты с применением тяжелого изотопа азота N^{15}_2 показали его фиксацию при освещении Фотовосстановление молекулярного азота бактериями связывают с наличием ферментов «гидрогеназы» и «нитрогеназы».

[2] Рассмотрение связи фотосинтеза и дыхания см у А Н Данилова (1938, 1939), В А Бриллиант (1947, 1948, 1949) и Е Рабиновича (1945)

ствовавших каталитических систем анаэробного обмена, а дальнейшее ее развитие шло одновременно с развитием систем, использующих продукты фотосинтеза Фотосинтетическая система, будучи связанной с процессами темнового обмена, отличалась, однако, от них качественно, обладая фотохимической стадией, ведущей к превращению лучистой энергии солнца в потенциальную химическую энергию

Действие света определяет не только синтез полисахаридов, но также синтез белков и многих иных соединений. Не всегда ясно, связаны ли эти процессы с непосредственным использованием первичных продуктов фотосинтеза или они сопряжены с темновыми превращениями (дыханием) накопленных при фотосинтезе соединений Возможны оба пути синтеза Запасенные в процессе ассимиляции химически активные соединения освобождают свою энергию в процессах диссимиляции, оба эти вида процессов текут в зеленой клетке одновременно, отличаясь лишь по своей скорости, при ярком солнечном освещении скорость ассимиляции (фотосинтеза) значительно превосходит скорость диссимиляции (дыхания), тогда как в темноте доминируют процессы диссимиляции, сопряженные с синтетическими реакциями, использующими энергию, запасенную в продуктах фотосинтеза.

Какова же связь между основными процессами обмена веществ в зеленой клетке — фотосинтезом и дыханием?

Уже более 70 лет тому назад И П Бородин (1876) наблюдал значительное повышение интенсивности дыхания после освещения растения Явление это объясняется накоплением при фотосинтезе субстратов дыхания, вероятно, не только в форме конечных запасных продуктов-полисахаридов, но и в форме промежуточных продуктов обмена Растение может использовать для дыхания и гетеротрофного существования в темноте не только сахара, но и ряд более простых органических соединений, например, уксусную кислоту (Лит см Колесников, 1940, 1949б)

Хотя прямых опытных доказательств использования промежуточных продуктов фотосинтеза для дыхания и иных процессов обмена имеется мало, это предположение весьма вероятно Возможность того, что синтез аминокислот в растительной клетке может происходить в результате взаимодействия азотистых соединений с промежуточными продуктами фотосинтеза, иллюстрируется опытами, в которых меченый углерод при кратких периодах освещения растений с $C^{14}O_2$ был обнаружен в аланине, аспарагиновой кислоте и ряде иных аминокислот (Степка, Бенсон и Кальвин, 1948) Это путь светового синтеза аминокислот, в свое время предложенный В В Сапожниковым (1894), может существовать наряду с «темновым» синтезом, т е с использованием энергии дыхательных превращений запасных продуктов фотосинтеза

В настоящее время следует считать наиболее вероятным, что первичный процесс ассимиляции связан с карбоксилированием органического субстрата, поэтому возникает вопрос — могут ли использоваться при фотосинтезе (вместо CO_2) готовые карбоксилированные соединения, типа щавелевоуксусной или кетоглутаровой кислоты образующиеся в процессе дыхания Опыты, в которых применяли меченую углекислоту (C^{11} и C^{14}), свидетельствуют о том, что ди- и три карбоновые кислоты, участвующие в гетеротрофной бактериальной фиксации CO_2 и декарбоксилируемые при реакциях дыхания, не принимают видимого участия в стадии темновой фиксации при фотосинтезе, — молекулярный вес меченого карбоксилированного соединения (около 1000) значительно выше веса упомянутых нами «простых» карбоксилированных соединений

Недавно были приведены некоторые доводы, свидетельствующие о возможности использования промежуточных продуктов дыхания при фотосинтезе (Кок, 1948) Исследовалась скорость кислородного обмена и величина квантового выхода фотосинтеза хлореллы при разной интенсивности света При этом оказалось, что зависимость выделения кислорода от интенсивности света (до светового насыщения) не линейна, при слабом освещении (ниже компенсационного пункта) выделение кислорода растет быстрее с увеличением интенсивности света, чем при более сильном освещении Соответственно, квантовый выход фотосинтеза при слабом освещении (3,75 квант/мол CO_2) выше чем при более сильном (7—12 квант/мол CO_2)

Таким образом, при слабом освещении (ниже компенсационного пункта), когда дыхание доминирует над фотосинтезом, растение требует меньшей затраты световой

энергии, близкой к теоретической величине энергетического дефицита, тогда как при более сильном освещении затрачивается больше световой энергии [1].

Это снижение потребности световой энергии для фотосинтеза можно объяснить использованием химически активных соединений, образующихся при дыхании. Подобные представления развивались в работах А. Н. Данилова (1938, 1939). Мы не обладаем пока опытными данными о природе этих активных соединений; это могут быть восстановленные формы простетических групп дегидразных ферментов, либо фосфорилированные соединения типа аденозинтрифосфорной кислоты, облегчающие возможность первичного карбоксилирования и осуществления реакций ступенчатого восстановления.

О взаимоотношениях дыхания и фотосинтеза можно также судить, изучая влияние различных воздействий (преимущественно ядов) на процессы обмена.

Фотосинтез вообще более чувствителен к посторонним воздействиям, чем дыхание. Обычно применяемые «яды» (цианиды, гидроксиламин, фенилуретан, фтиокол) при концентрации порядка 10^{-3}—10^{-4} мол/литр угнетают фотосинтез, оставляя ненарушенным дыхание у большинства исследованных растений. Редким исключением явилась одноклеточная водоросль Scenedesmus, у которой дыхание оказалось более чувствительно к действию ядов (цианиды), чем фотосинтез (Гаффрон, 1944). Нужно указать, что действие ядов обычно исследуют по их влиянию на величину кислородного обмена; отравление «кислородной» стадии может оставить ненарушенным анаэробное дыхание. Известные данные о действии ядов на оба вида процессов не могут быть, однако, пока использованы для суждения о природе связи между фотосинтезом и дыханием. Лишь применение специфических ингибиторов, избирательно действующих на тот или иной фермент или связывающих определенные типы метаболитов, позволит притти к более определенным выводам.

Существует тесная взаимосвязь между фотосинтезом и иными процессами обмена веществ растения; дальнейшие исследования должны показать химическую и ферментативную природу этой связи.

Энергетика фотосинтеза

Суммарная реакция фотосинтеза углеводов:

$$CO_2 \text{ газ.} + H_2O \text{ жидк.} \rightleftarrows O_2 \text{ газ.} + {}^1/_6\, C_6H_{12}O_6 \text{ тв.}$$

сопровождается увеличением свободной энергии системы $\Delta F = +120$ кал. и увеличением теплосодержания $\Delta H = +112$ кал. (Рабинович, 1945). В соответствии со вторым законом термодинамики $\Delta F = \Delta H - T\Delta S$. Таким образом, член $T\Delta S$ в нашем случае имеет отрицательную величину, т. е. при фотосинтезе происходит уменьшение энтропии, иначе говоря, приведение системы из «беспорядочного» в более «упорядоченное» состояние. Обратный процесс — дыхание — сопровождается уменьшением свободной энергии и увеличением энтропии системы. Чтобы осуществить фотосинтез, нужно подвести извне минимум 120 кал. на молекулу ассимилируемой углекислоты. Для фотосинтеза используется лучистая энергия солнца, поглощаемая пигментной системой растения. У хемосинтезирующих организмов, усваивающих CO_2 в темноте, используется энергия сопряженных окислительных процессов (например, окисление Fe^{++} в Fe^{+++}, аммиака и нитритов, сероводорода, органических соединений).

Термодинамическим критерием возможности течения данной реакции является знак величины изменения свободной энергии (ΔF). В том случае, если реакция сопровождается убылью свободной энергии, ее течение самопроизвольно. Здесь идет

[1] В недавних работах Варбурга с коллективом сотрудников (1949а, б) было, однако, показано постоянство квантового выхода фотосинтеза хлореллы при разных режимах освещения — ниже и выше компенсационного пункта; в этой работе делается вывод о том, что освещение не влияет на газообмен дыхания.

речь лишь о термодинамической возможности; скорость течения реакции определяется величиной потенциального барьера (энергии активации), вообще независящего от ΔF реакции.

Если данная реакция имеет положительную величину $+\Delta F$, то самопроизвольно течение обратной реакции.

В биохимии распространено сопряжение реакций с положительной и отрицательной величиной ΔF. Сопряжение осуществляется путем использования химически активных продуктов, образуемых при реакции. Это дает возможность осуществления в живой клетке термодинамически невыгодных процессов. Так, например, энергия окислительных реакций используется для осуществления темновой (гетеротрофной) фиксации углекислоты в ряде организма, для синтеза пептидной связи и во многих других биохимических реакциях.

Величину ΔF можно подсчитать из константы равновесия реакции (К) по уравнению:

$$\Delta F = -RT\ln K$$

или по величине разности потенциалов (ΔE_0) реагирующих окислительно-восстановительных систем

$$\Delta F = -23{,}05\ n \cdot \Delta E_0.$$

В случае фотохимических реакций энергия поглощенного кванта (вернее, энергия длительно живущего возбужденного состояния) данным видом молекул должна учитываться в подсчете величины ΔF, так как является, по существу, «свободной энергией», которая может быть превращена в работу. Использование световой энергии дает возможность осуществления процессов в темновых условиях в изолированной системе термодинамически невозможных (фотосинтез).

Энергетической характеристикой фотохимического процесса является величина квантового выхода, т. е. число молекул вещества, превращаемых или образуемых на один квант поглощенного света. Величина квантового выхода определяется соотношением

$$\gamma = \frac{\text{число превращенных молекул}}{\text{число поглощенных квантов}}.$$

Часто употребляется величина $K = \frac{1}{\gamma}$, показывающая число квантов света, расходуемых на превращение одной молекулы вещества.

Чтобы определить величину γ или К процесса фотосинтеза растения, нужно опытным путем определить: 1) количество световой энергии, поглощаемой объектом исследования; 2) количество превращенных молекул. Обычно измеряют объем выделяющегося кислорода или поглощаемой углекислоты. Объектом исследования являются преимущественно суспензии одноклеточных водорослей. Наиболее часто применяют следующую методику определения. Суспензию водоросли помещают в сосуд манометрического прибора. Сосуд освещают снизу, со стороны дна. Толщину суспензии водоросли подбирают с таким расчетом, чтобы в ней поглощался весь падающий свет; это значительно упрощает технику измерения, позволяя определять лишь энергию падающего света. Энергия света, падающего на нижнюю поверхность сосуда, может быть определена обычными актинометрическими способами посредством болометра или термоэлемента. В работах некоторых авторов (Варбург с соавторами, 1949 а, б) применялся упрощенный метод измерения энергии света, поглощенного хлорофиллом, основанный на измерении количества потребляемого кислорода при сенсибилизированном хлорофиллом окислении тиомочевины. Эта реакция идет с квантовым выходом равным единице и может служить в качестве «химического актинометра» достаточной точности. Процедура измерения с помощью этого метода весьма проста: в сосуд манометрического прибора, в котором исследуется фотосинтез хлореллы, помещают раствор хлорофилла в пиридине (с концентрацией, обеспечивающей полное поглощение падающего света) с добавлением тиомочевины. При освещении происходит сенсибилизированное окисление тиомочевины, сопровождающееся падением давления кислорода над реакционной смесью, измеряемом в манометре прибора. По количеству молекул поглощенного кислорода определяют количество поглощенных квантов света.

Измерение фотосинтеза обычно производится с помощью микроманометрического метода, учитывающего выделение кислорода или поглощение углекислоты. Применяются следующие приемы газообмена (Варбург, 1919, 1949). Растения помещают непосредственно в среду, обладающую постоянным парциальным давлением углекислоты; для этого применяют карбонат-бикарбонатные буферные растворы; часто работают с буфером, обладающим pH 9,08. Изменение давления в со-

суде при этом будет связано лишь с кислородным обменом, при дыхании (в темноте) будет происходить поглощение кислорода и уменьшение давления; при достаточной интенсивности освещения — выделение кислорода и увеличение давления Этот метод применяют для водных растений, опыты должны быть кратковременными, чтобы избежать повреждения живых клеток в несвойственной им среде с высоким pH. В. М. Катунский разработал модификацию манометрического метода для высших растений; листья помещают в сосудах особой формы над карбонат-бикарбонатным буферм (см. Воскресенская, 1947)

Для измерения фотосинтеза применяют также наполнение манометрических сосудов смесью азота и углекислоты, в этом случае измеряют падение парциального давления углекислоты Чтобы измерять одновременно потребление углекислоты и выделение кислорода, применяют два манометрических сосуда с разными объемами жидкости, используя различную растворимость углекислоты и кислорода.

Кроме манометрического метода учета дыхания и фотосинтеза применяют также и другие методы. Здесь следует назвать. 1) определение растворенного в воде кислорода химическими или электрохимическими способами (например, посредством изменения силы тока, текущего через цепь, включающую поляризованный платиновый электрод, помещаемый непосредственно в среду, где идет фотосинтез), 2) определение потребления углекислоты по изменению pH раствора, содержащего бикарбонат, 3) анализ газов в камере, где происходит фотосинтез с помощью измерения поглощения в инфракрасной области спектра [1]

Во всех этих случаях при освещении учитывается газообмен, являющийся результатом двух одновременно и противоположно идущих процессов — дыхания и фотосинтеза. В темноте происходит потребление кислорода и выделение углекислоты; при постепенном увеличении интенсивности освещения уменьшается потребление кислорода и выделение углекислоты; при некоторой интенсивности освещения (компенсационный пункт) оба процесса уравновешиваются и манометрический метод показывает как бы отсутствие газообмена. При дальнейшем увеличении интенсивности освещения фотосинтез (выделение кислорода и потребление углекислоты) значительно перекрывает дыхание. Таким образом, чтобы определить истинную величину фотосинтеза, нужно из наблюдаемой при освещении величины газообмена вычесть газообмен дыхания. С этой целью в течение фотосинтеза делают темновые интервалы для учета дыхательного газообмена. При этом предполагают, что оба процесса — дыхание и фотосинтез — идут независимо друг от друга и при освещении интенсивность дыхания та же, что и в темноте. Однако имеются данные, указывающие на связь между процессами дыхания и фотосинтеза и на возможность использования для дыхания не конечных, а промежуточных продуктов фотосинтеза; в этом случае дыхание при освещении не будет подобно дыханию темновому. Возможно также влияние света на реакции дыхания. Ошибки опытов тем будут меньше, чем более интенсивно освещение, т. е. чем больше газообмен фотосинтеза по сравнению с газообменом дыхания.

Величина квантового выхода фотосинтеза, определенная в работах различных исследователей, колеблется от 0,25 до 0,05, т. е. на восстановление молекулы углекислоты требуется от 4 до 20 квантов света (лит. см. Фотосинтез растений, 1949).

Мы полагаем, что вообще нельзя говорить о постоянной величине квантового выхода фотосинтеза; использование световой энергии зависит как от внешних условий среды, так и от внутренних физиологических факторов Так, с увеличением интенсивности освещения падает величина квантового выхода; несомненна также связь с условиями подвода углекислоты и оттока ассимилятов (Курсанов, 1933), действием ферментных систем, перерабатывающих первичные фотопродукты, и др.

В оптимальных условиях наиболее вероятная величина К лежит в области от 4 до 12 квантов света на восстановление молекулы

[1] Обзор методов измерения фотосинтеза приводится у А А Ничипоровича (1940)

углекислоты; недавние работы показали, что суспензии хлореллы в оптимальных условиях используют лишь 3,7—5 квантов красного света (Варбург с соавторами, 1949 а, б). Согласно закона Эйнштейна поглощение одного кванта света ведет к одной элементарной фотохимической реакции. Как мы указывали, величина ΔF фотосинтеза составляет 120 кал., что соответствует $\frac{120}{42} = 3$ кванта красного света (в области максимума поглощения хлорофилла). Отсюда следует, что минимальное возможное число промежуточных ступеней не меньше четырех; энергия требуется также для преодоления активационных барьеров промежуточных реакций.

Выше рассмотрен вопрос об использовании поглощенного растением видимого света; в оптимальных условиях эта величина достигает 65%.

Эффективность использования годовой суммы общей солнечной радиации наземными и водными растениями имеет среднюю величину 0,5—0,8% (Винберг, 1948; Ланская и Сивков, 1949). Поверхность земли получает в год около 5×10^{23} калорий солнечного излучения (около половины приходится на долю инфракрасного и крайнего красного излучения, не используемого при фотосинтезе).

Принимая потери около 30% (поглощение пустынями, скалами, бесплодными почвами, а также отражение и рассеяние света поверхностью земли, льда и воды) использование солнечной энергии для фотосинтеза составит:

$$5 \cdot 10^{-3} \cdot 0{,}7 \cdot 5 \cdot 10^{-3} = 1{,}75 \cdot 10^{21} \text{ кал. в год.}$$

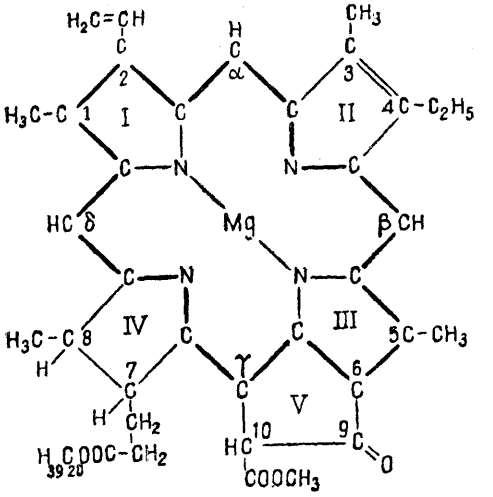
Теплота сгорания органического вещества составляет приближенно 10^{10} кал. на тонну содержащегося в нем углерода; годовую продукцию фотосинтеза на земле следует оценить около $2 \cdot 10^{11}$ тонн органического углерода в год. По приближенным подсчетам 70—90% от этого количества образуется в морях и океанах.

Растения используют лишь крайне малую часть солнечного излучения, достигающего поверхности земли. Возможности использования солнечной энергии для нужд человечества практически безграничны, не только путем повышения фотосинтетической продуктивности организмов, но и, например, путем искусственного «...фотосинтеза материалов, содержащих углерод, с помощью веществ, аналогичных хлорофиллу растений; сжигая эти материалы, можно будет производить энергию» (Жолио-Кюри, 1950).

Пигменты фотосинтезирующих организмов

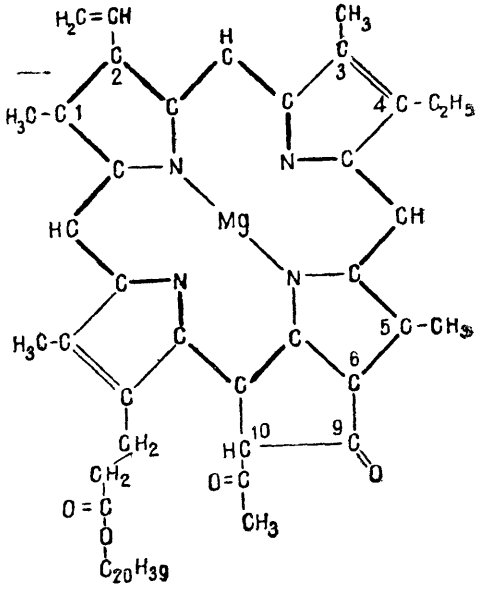
Известны следующие главные пигменты фотосинтезирующих организмов: хлорофиллы «a» и «b», являющиеся главными компонентами пигментного аппарата высших растений, мхов, водорослей; про-

Хлорофилл „a"

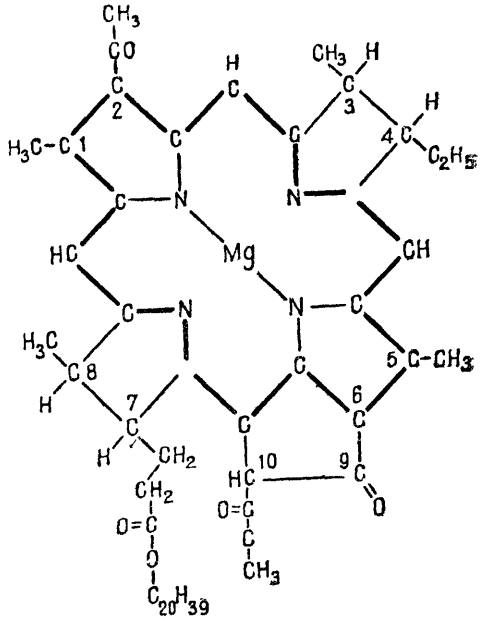


тохлорофилл, образующийся у высших растений в темноте и при освещении превращающийся в хлорофилл «а», бактериохлорофилл — пигмент различных видов фотосинтезирующих бактерий; фикобилины

Протохлорофилл



Бактериохлорофилл

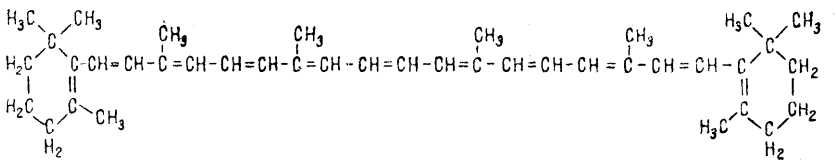


(фикоциан и фикоэритрин), содержащиеся в красных и сине-зеленых водорослях; каротиноиды, которые содержатся во всех фотосинтезирующих клетках в форме каротинов (β-каротин высших растений) и ксантофиллов, окисленных форм, обладающих спиртовыми

и кето-группами (ксентофиллы высших растений, фукоксантин бурых водорослей). Кроме того, растения содержат антоцианы и флавоны, окрашивающие плазму клеток и не принимающие видного участия в фотосинтезе.

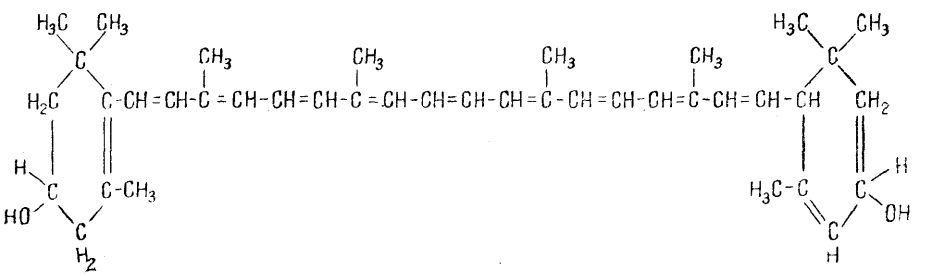
Пигменты растений и водорослей сосредоточены в особых образованиях — хлоропластах или хромопластах, обладающих сложной гетерогенной структурой. Исследования с помощью электронного микроскопа показали, что пластиды высших растений состоят из шаро- или дискообразных гранул (содержащих пигменты, липоиды и белки) и стромы, повидимому, не содержащей пигментов (Сисакян, Залковер и Бирюзова,

β-каротин



1948; Граник и Портер, 1947). У сине-зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий хлоропласты не обнаружены; пигменты распределены в плазме клетки.

Ксантофилл



При попытках выделения пигментов из структуры клетки оказывается, что пигменты обычно связаны с белками и липоидами. У хлорофилла эта связь относительно слаба, пигмент может быть отделен экстракцией органическими растворителями [1], тогда как фикобилины извлекаются в виде весьма прочного пигмент-белкового комплекса, разрушение которого возможно лишь при действии соляной кислоты. Флавоны и антоцианы, растворенные в клеточном соке, повидимому, находятся в форме глюкозидов.

Для того, чтобы установить участие пигментов в фотосинтезе применяется метод, разработанный К. А. Тимирязевым (1874). Суть метода заключается в следующем. Объект исследования освещается монохроматическим светом (обычно сколь возможно узкими участками спектра, выделяемыми с помощью монохроматора или системы светофильтров), а фотосинтез измеряется каким либо достаточно чувствительным способом, так как интенсивность света, выделяемого монохроматором, обычно невелика. К. А. Тимирязев ввел микрогазометрический способ, ныне применяемый большинством исследователей. Он же ввел способ получения

[1] В структуре молекул хлорофилла и его производных, показанных на рисунках, возможно иное расположение системы конъюгированных связей, обычно обозначаемой жирной линией (см. Фишер и Штерн, 1940; Степаненко, 1947).

«амилограммы» листа, описанный во всех учебниках физиологии растений. (Ввиду широкой известности этого способа мы его описывать не будем). Интенсивность фотосинтеза измеряется как функция длины волны возбуждающего света. Полученная кривая «спектра действия» сопо-

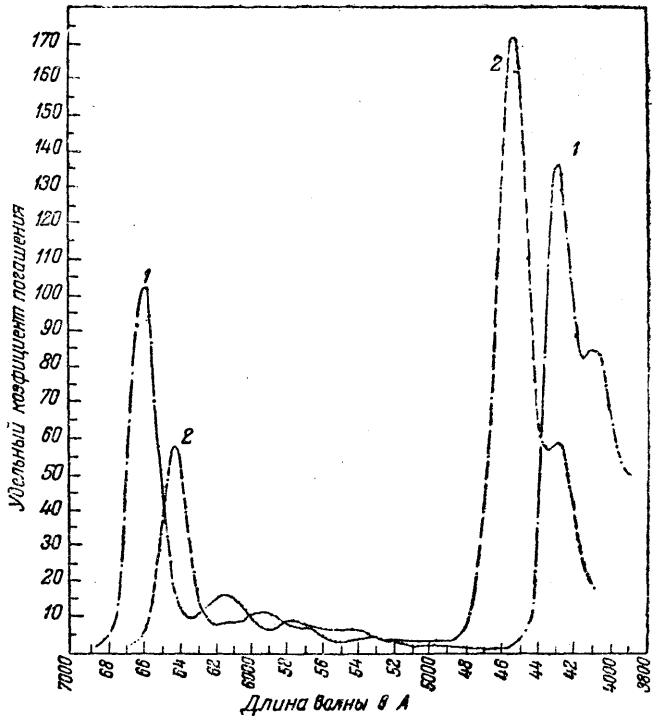


Рис. 1. Спектр поглощения растворов хлорофилла *а* и *в* в эфире (значение коэфициента погашения по Цшейле и Комару, 1941)
1—хлорофилл (*А*); *2* — хлорофилл (*В*)

ставляется с кривой поглощения света пигментом. Соответствие обоих кривых указывает на то, что свет, поглощенный данным пигментом, используется для процесса фотосинтеза. К. А. Тимирязев показал в своих классических работах, что фотосинтез идет в спектральной области поглощения хлорофилла, являющегося, таким образом, сенсибилизатором процесса.

Сложнее использование этого метода в том случае, когда в данной области спектра лучи света поглощают два типа пигментов (например, хлорофилл и каротиноиды в области короче 450 mμ). В этом случае приходится производить точные количественные измерения квантового выхода и поглощения пигментов, однако, трудность измерения раздельного поглощения света пигментами непосредственно в клетке приводит к недостаточной достоверности полученных таким образом данных. Поэтому следует считать недостаточно убедительным описанные нами в обзоре 1946 г. измерения Эмерсона и Льюиса (1943), показывающие участие каротиноидов в фотосинтезе хлореллы. Результаты будут лишь тогда достоверны, когда в данной области спектра поглощение света одним видом пигмента будет значительно выше поглощения его другим видом пигмента. Это имеет место у бурых и красных водорослей: максимумы поглощения фикоэритрина и фукоксантина находятся в зеленой области спектра (500—550 mμ), где поглощение хлорофилла значительно меньше.

А. А. Рихтер (1914) исследовал фотосинтез красных и зеленых водорослей при освещении через красный и зеленый светофильтр и пока-

зал, что у красных водорослей фотосинтез идет активнее в зеленом свете. Участие фикобилинов в фотосинтезе было также показано у Е. Р. Гюббенет и Т. В. Вобликовой (1928), В. Н. Любименко и З. П. Тиховской 1929), Вюрмзера (1933) и других авторов (см. Фотосинтез растений, 1949). Таким образом, для фотосинтеза используется свет, поглощенный фикобилинами.

Подобным же образом было установлено участие каротиноида фукоксантина при фотосинтезе диатомовых и бурых водорослей (Даттон и Маннинг, 1941; Вассинк и Керстен, 1946).

Пока неясно, используется ли свет, поглощенный этими пигментами, непосредственно для фотохимического процесса или энергия возбуждения передается хлорофиллу. Последнее как будто подтверждается наблюдениями красной флуоресценции при освещении бурых и красных водорослей в зеленой области спектра; однако не установлено, принадлежит ли наблюдаемая флуоресценция молекулам хлорофилла или связанным с хлоропластом молекулам каротиноидов и фикобилинов (Норман с соавторами, 1948; Вассинк, 1948). Некоторые авторы считают, что обратимое превращение каротин — ксантофилл связано с реакциями фотосинтеза (Сапожников, 1940, 1949).

Пигментные системы растений состоят обычно из восстановленных и окисленных форм пигментов: хлорофилл «а»— хлорофилл «в»; каротин — ксантофилл; фикоэритрин — фикоциан, причем считают, что та и другая формы принимают участие в фотосинтезе. Можно предположить, что соотношение обеих форм пигментов определяется окислительно-восстановительным режимом в хлоропласте и системах, синтезирующих пигменты.[1]

При более «восстановительных» условиях наблюдается большее содержание восстановленных форм пигментов; так, у светолюбивых и горных растений, существующих в условиях сильного освещения, преобладает более «восстановленная» форма — хлорофилл «а». Несомненна при этом роль световой адаптации, так как существующая пигментная система растений, как указывает К. А. Тимирязев, выработалась в результате приспособления к внешним условиям и световому режиму среды.

Состояние пигментов в живой клетке

Сравнение оптических свойств пигментов в растворе и в живой клетке показывает, что максимумы поглощения хлорофилла, бактериохлорофилла и фукоксантина в живой клетке значительно сдвинуты в красную сторону спектра по сравнению с раствором. Различны также и виды спектров. В растворе хлорофилл и бактериохлорофилл обладают одним острым максимумом поглощения в длинноволновой области спектра, тогда как у пурпурных бактерий явно видны три максимума поглощения в близкой инфракрасной области. У зеленых растений тоже иногда удается наблюдать наличие двух максимумов поглощения. При снятии микроспектров отдельных хлоропластов Spirogira, Zygnema и др. удавалось заметить два-три максимума поглощения в области 660—690 mμ (Альберс и Кнорр, 1937). Если медленно подогревать до 100° суспензии пурпурных бактерий или листья высших растений и по мере нагревания измерять спектры поглощения, то ясно будет заметно спада-

[1] При зеленении растения из протохлорофилла вначале образуется хлорофилл «а» (Фотосинтез растений, 1949). Недавние работы показали, что протохлорофилл, являющийся непосредственным предшественником хлорофилла, находится лишь в одной форме (повидимому, соответствующей хлорофиллу «а») (Красновский и Войновская, 1949; Коски и Смит, 1948).

ние длинноволновых максимумов и появление одного максимума поглощения в области более коротких длин волн.

Эти наблюдения говорят о том, что хлорофилл в клетке находится в состоянии, отличном от состояния в растворенном виде. Это состояние хлорофилла не устойчиво, но при нагревании переходит в устойчивое (повидимому, в раствор в липоидной фазе). Различная извлекаемость хлорофилла из клетки растворителями также указывает на существование различных форм пигментов (Годнев, 1947; Годнев, Терентьев и Пармон, 1949; Осипова, 1947).

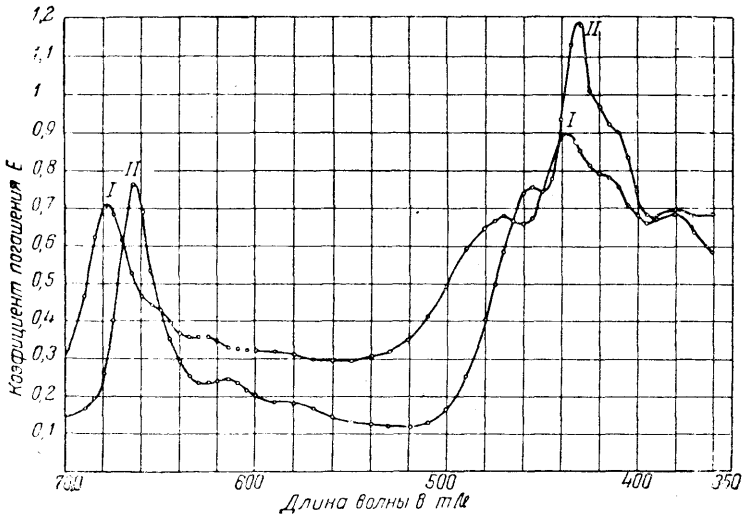


Рис. 2. Спектр поглощения хлорофилла в естественном состоянии и в ацетоновом растворе.

I — коллоидный раствор вещества хлоропластов из листьев огурцов; *II* — ацетоновый раствор вещества хлоропластов (в той же концентрации, что и *I*)

По средним данным (Рабинович, 1945) состав хлоропластов (считая на сухое вещество) следующий: белки 30—50%, липоиды и пигменты 20—40%, остальное — зола и углеводы. Сухое вещество цитоплазмы содержит 80—95% белков и 2—3% липоидов. Содержание хлорофилла (от сухого веса хлоропластов) составляет 5—15%. Так как пигмент локализован лишь в гранях, содержащих много липоидов, то его вероятная концентрация там составляет 10—30%.

В среднем на одну молекулу хлорофилла приходится приблизительно 0,2—0,3 «структурной единицы» белка с молекулярным весом 17 000 и 2—3 молекулы липоидов (считая условно на трипальмитат). Какова же природа различных форм хлорофилла в пластиде? М. С. Цвет (1901) высказал предположение, что хлорофилл адсорбирован на белке, В. И. Любименко (1923, 1935) развил представление о химической связи пигментов с белком, В. И. Палладин (1910) указал на значение липоидной фазы в связывании хлорофилла; Д. И. Ивановский (1907, 1909, 1913) показал, что коагулированные коллоидные растворы хлорофилла подобны по своим спектральным свойствам хлорофиллу в листе.

Эти исходные представления легли в основу последующих работ и гипотез. Однако вопрос до сих пор нельзя считать ясным. Имеющиеся опытные данные позволяют притти к следующим заключениям. В пластиде есть хлорофилл, ассоциированный с белком. Однако до сих пор не удалось выделить соединений постоянного состава по типу гемопроте-

инов (например, в гемоглобине или цитохроме одна молекула гемина связана с одной структурной единицей белка). У разных объектов это соотношение колеблется от 3 до 10 молекул хлорофилла на «структурную единицу» белка, т. е. эти соединения гораздо богаче пигментом, чем гемопротеины. Следует подчеркнуть, что хлорофилл кроме белка всегда связан с избытком липоидной фазы. Полученные искусственные хлорофилл-белковые соединения не обладают свойствами хлорофилла в листе: они не флуоресцируют и не дают сдвига максимума поглощения до 677—680 mμ (у искусственных соединений максимум поглощения лежит около 670 mμ).

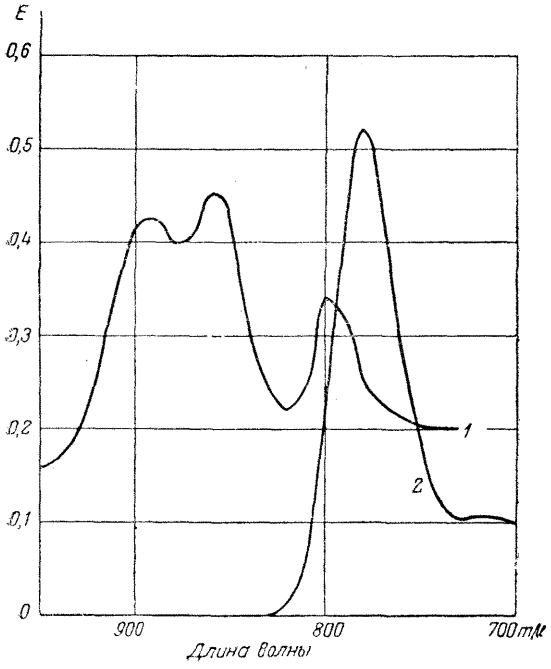


Рис. 3. Спектр поглощения бактериохлорофилла в естественном состоянии (*1*) и в пиридиновом растворе (*2*)

Известны лишь два вида искусственных форм хлорофилла, обладающие максимумом поглощения, соответствующим листу — это коагулированные коллоидные растворы (Ивановский, 1907, 1909, 1913) и твердые пленки, полученные испарением растворов хлорофилла на стекле (Красновский и Брин). Но эти формы не обладают ни фотохимической активностью, ни флуоресценцией, появляющейся лишь в присутствии липоидов.

Представление о хлорофилле как о «фотоферменте», подвергающемся обратимому восстановлению по типу дегидраз на разных типах специфического белка, приводит к представлению об обратимой диссоциации хлорофилл-белкового соединения. Действительно, связь с белком у хлорофилла весьма слаба (по сравнению, например, с гемоглобином) и нарушается уже при воздействии растворителей.

Все эти факты приводят к представлению, что хлорофилл, находящийся в состоянии высокой концентрации в гранах пластид, существует в различных формах, переходящих друг в друга (Красновский и Брин, 1948; Красновский, 1948). Равновесие между этими формами зависит от внешних и внутренних условий существования пластиды. Можно думать, что эти формы представляют собой.

1. Пигментно-белково-липоидные соединения (неустойчивые соединения, сочлененные координационной или водородной связью).

2. Пигменты, растворенные в липоидной фазе (свободный «кофермент»), находящиеся в равновесии с белково-липоидным комплексом.

3. Хлорофилл в запасной (буферной) форме высокой концентрации, схожей с коагулированной коллоидной фазой.

Последняя форма не участвует в фотохимическом процессе. Ниже мы приводим и другие доводы, доказывающие, что не весь хлорофилл клетки принимает участие в фотохимическом процессе.

Наблюдаемые факты соответствуют также тому представлению, что хлорофилл пластиды существует в форме белково-липоидного комплекса в виде сферических гранул, у которых лишь периферийная часть фотохимически реактивна Мы надеемся, что уже в ближайшее время будет определенно установлена природа связи хлорофилла в пластиде.

Т. Н. Годнев и О. П. Осипова (Годнев, 1947; Годнев и Осипова, 1947, Знаменская и Осипова, 1947; Осипова, 1947), основываясь на хорошей адсорбируемости хлорофилла на «кислых» белках (зеине, глиалине) предполагают, что хлорофилл связан остаточными валентностями пиррольных атомов азота с кислыми группами белка А. А. Красновский (1948), исходя из фотохимического поведения хлорофилла в среде органических оснований, обосновал возможность координационной связи атома магния хлорофилла с основными группами белка (гистидин) Наконец, возможна связь с липоидной частью липопротеинового комплекса посредством «фитольного хвоста» молекулы хлорофилла

Ферменты фотосинтетической системы

За последние годы у нас в Советском Союзе проведены обширные исследования ферментной активности хлоропластов.

Н. М. Сисакян с сотрудниками (1948, 1949) исследовал способность изолированных хлоропластов ряда высших растений катализировать реакции, специфические для данного типа ферментов (в ряде случаев им были применены ингибиторы ферментного действия). Эти опыты показали, что в хлоропластах имеются следующие ферменты: инвертаза, амилаза, протеазы, фосфорилаза, фосфоглюкомутаза, полифенолоксидаза, пероксидаза, цитохромоксидаза и различные дегидразы. Исследования показали, что эти ферменты адсорбированы на белково-липоидном комплексе пластид. Полученные данные приводят Н. М. Сисакяна к заключению, что «пластиды представляют собой депо биокатализаторов, которые последовательно вовлекаются в процессы клеточного обмена при смене циклов онтогенетического развития организмов».

В других исследованиях в хлоропластах были обнаружены каталаза, инвертаза, карбоангидраза и хлорофиллаза (Фотосинтез растений, 1949; Рабинович, 1945). Е. А. Бойченко в ряде работ (1943—1949) установила, что изолированные ненарушенные хлоропласты ряда высших растений обладают гидрогеназной активностью, т. е. катализируют реакцию темнового восстановления CO_2 молекулярным водородом и обратную реакцию дегидрогенизации. В этих работах приведены доводы, что продукты восстановления осаждаются из водной вытяжки хлоропластов хлористым барием в 80% этаноле.

Хлоропласты участвуют не только в фотосинтезе, но также и в дыхании и иных процессах обмена веществ. Поэтому локализация ряда ферментов в хлоропластах не является свидетельством их участия в процессе фотосинтеза, тем более, что имеется возможность участия в обоих типах процессов тех же ферментных систем.

Для суждения об участии тех или иных ферментов в процессе фотосинтеза или дыхания возможно применение ферментных ядов, избирательно действующих на данный вид фермента.

Имеющиеся данные по угнетению фотосинтеза (например, цианида-

ми) не позволяют сделать определенных заключений, так как цианид ингибирует большую группу ферментов. Исходя из установленных данных о природе реакций фотосинтеза, можно предположить участие следующих ферментов.

1. Карбоангидразы, управляющей скоростью обратимой реакции гидратирования — дегидратирования углекислоты (обсуждение значения этого фермента при фотосинтезе см. в работе Д. М Михлина и З. С. Броновицкой, 1945). Первичное связывание углекислоты из атмосферы происходит в клеточном соке, где существует равновесие между ионами CO_3'', HCO_3' и растворенной CO_2; это равновесие обычно сдвинуто в сторону бикарбонат-ионов, однако связывание углекислоты фотосинтетическим аппаратом происходит в виде CO_2 (лит. см. Рабинович, 1945).

2. Карбоксилазы, управляющей первичным карбоксилированием органического субстрата.

3. Дегидразы, переносящей водород. Поскольку роль фотохимической реакции заключается в первичной мобилизации водорода (электрона), то дальнейший перенос «активного» водорода от хлорофилла к цепи темновых реакций может происходить с помощью дегидраз; пока неясна возможность участия гидрогеназы в подобных процессах, так как при фотохимической стадии фотосинтеза не удавалось констатировать промежуточного выделения водорода воды в молекулярной форме.

Если считать «гидрогеназу» дегидразой, работающей при высоком восстановительном потенциале (близком с E_0' водородного электрода) и не специфичной к молекулярному водороду, то ее участие в процессе весьма вероятно. О наличии при фотосинтезе темновых реакций, связанных с переносом водорода свидетельствуют также опыты с применением тяжелой воды D_2O. При фотосинтезе одноклеточных водорослей в среде D_2O (Пратт и Трелиз, 1938) наблюдалось значительное замедление процесса (по сравнению с CH_2O) при большой интенсивности света, когда скорость реакции определяется темновой, ферментативной стадией; при малой интенсивности света, когда скорость процесса определяется фотохимической стадией, влияние D_2O на фотосинтез было невелико.

Следует привести также следующие доводы в пользу возможности участия дегидраз в реакциях восстановления углекислоты: а) наши опыты показали возможность обратимого фотовосстановления хлорофилла с последующей передачей «водорода» (электрона) простетическим группам дегидразных ферментов — рибофлавину и кодегидразе I; б) восстановленная форма кодегидразы I весьма медленно реагирует с кислородом, что определяет возможность предотвращения быстрой обратной реакции продуктов окисления и восстановления, образованных в результате фотопроцесса.

4. Каталазы, освобождающей молекулярный кислород из перекиси [1]. Возможно участие в ступенчатых превращениях окисленной формы системы иных железо-порфириновых ферментов.

5. Ряда ферментов, управляющих темновыми звеньями синтетических процессов. Вероятно, что это те же ферменты, которые управляют отдельными стадиями брожения и дыхания.

Промежуточные продукты фотосинтеза

Достоверно известна лишь природа некоторых конечных (запасных) продуктов фотосинтеза. Трудности обнаружения промежуточных продуктов реакции связаны с их неустойчивостью и высокой химической активностью, быстрыми превращениями при обычно применяемых способах извлечения, сопровождающимися разрушением структуры клетки.

---

[1] Ряд данных последнего времени говорит о том, что выделению кислорода в процессе фотосинтеза предшествует образование не перекиси водорода, а других — возможно, органических перекисей. При этом в выделении кислорода каталаза не участвует. (Примечание редактора).

В тех случаях, когда удается обнаружить ряд таких неустойчивых соединений, не всегда ясно в результате какого процесса они образуются, так как в растительной клетке одновременно с ассимиляцией происходят реакции диссимиляции, потребляющие продукты фотосинтеза. Сложность задачи усугубляется тем, что возможно сходство путей фотосинтетических и дыхательных реакций и образование в обоих случаях промежуточных продуктов одного типа. Можно ожидать образования следующих типов промежуточных соединений.

1. Продукты окисления — восстановления пигментов и ферментов, управляющих световыми и темновыми реакциями, о которых мы говорили выше.

2. Продукты окисления воды, приводящие к выделению молекулярного кислорода.

3. Продукты первичного связывания и восстановления углекислоты, приводящие к получению сахаров и иных органических соединений.

1. Продукты окисления воды

А. Н. Бах в 1893 г. впервые высказал предположение, что кислород при фотосинтезе выделяется из промежуточного перекисного соединения. Эта гипотеза легла в основу всех последующих схем фотосинтеза.

А. Н. Бах (1894) обнаружил перекисные соединения в зеленых листьях с помощью найденной им чувствительной цветной реакции (раствор двухромовокислого калия, анилина и щавелевой кислоты окрашивается в красный цвет в присутствии перекиси водорода). Им было исследовано 25 видов растений. Перекись удавалось отчетливо обнаружить в листьях лишь в солнечные дни.

А. М. Кузин и М. Я. Школьник (1949) для обнаружения перекиси в листьях применили цветную реакцию на гидроксамовую кислоту, дающую окрашенный комплекс с солями железа. Гидроксамовая кислота образуется при растирании листа с раствором гидроксиламина, окисляющегося под действием перекисей. При обработке освещенных листьев количество гидроксамовой кислоты оказывается большим, чем при обработке листьев, выдержанных в темноте; отравление фотосинтеза фенилуретаном или KCN также приводит к сокращению количества перекисей.

До сих пор не удалось выделить в чистом виде перекисное соединение, предшествующее выделению кислорода; пока также неясно, предшествует образованию кислорода органическая перекись или перекись водорода.

2. Продукты связывания и восстановления углекислоты

Для установления природы этих соединений за последние годы получили широкое применение изотопы углерода.

Вначале (Рубен с соавторами, 1939; Рубен, 1943) применяли радиоактивный изотоп углерода C^{11}, обладающий периодом полураспада 20,5 мин., что требовало чрезвычайно быстрого проведения всей аналитической процедуры. В настоящее время широкое применение нашел изотоп углерода C^{14}, обладающий периодом полураспада порядка 10^4 лет.

Некоторые авторы применяли тяжелый изотоп C^{13}, однако при малых количествах ассимилируемого углерода ошибки эксперимента, определяемые точностью применяемой аналитической процедуры (включая масс-спектрографическое определение C^{13} в продуктах реакции), по

имеющимся данным, весьма велики, поэтому предпочтительно применение изотопа C^{14}.

Растение ассимилирует в среде, содержащей меченый CO_2. При опытах на высших растениях в камеру вводят газообразный CO_2, при опытах на водных растениях (большинство работ проведено с одноклеточными водорослями) CO_2 вводят в форме карбонатов в буферный раствор, содержащий суспензию водоросли. Фотосинтез при этом учитывается манометрическим способом.

После опыта растение умерщвляют (обычно путем кратковременного кипячения в среде какого-либо реагента) и продукты реакции фракционируют и анализируют. Для фракционирования применяют методы, основанные на принципах хроматографического анализа М. С. Цвета.

Для разделения соединений с кислыми и основными свойствами применяют ионообменные адсорбенты. В работах последнего времени описано применение распределительной хроматографии (на бумаге) в сочетании с радиоаутографическим способом. Отдельные соединения имеют вполне определенные координаты на плоскости бумаги, служащей для разделения. Хроматограмму прикладывают к чувствительной рентгеновской пленке. После ее проявления получаются пятна, интенсивность которых соответствует количеству радиоактивного изотопа в данном соединении. Для идентификации соединения, содержащего радиоактивный изотоп, применяют также метод смешения. К реакционной смеси, содержащей предполагаемое «меченое» соединение, добавляют избыток искомого нерадиоактивного соединения, после чего это соединение выделяют из раствора обычными методами и определяют его радиоактивностью [1].

При исследовании промежуточных продуктов реакции с помощью изотопов особое внимание должно быть уделено природе реакций, определяющих нахождение изотопа в соединении, обнаруженном после опыта. Так, кроме фотосинтеза углекислота может связываться в темноте (по типу гетеротрофной фиксации), а также посредством обменных реакций с промежуточными продуктами дыхательных и иных ферментативных процессов.

Обратимость ступенчатых реакций дыхания также может привести к распределению радиоактивного CO_2 по всей лестнице промежуточных продуктов дыхания и гликолиза. Мы полагаем также, что в процессе обработки растения после опыта вероятны дальнейшие превращения нестойких соединений, содержащих C^{14}, в более устойчивые соединения, обнаруживаемые аналитически.

Таким образом, при питании растения $C^{14}O_2$ радиоактивный углерод может быть найден в ряде соединений, не связанных с процессом фотосинтеза. Это «растекание» C^{14} по многим путям обмена, в зависимости от условий опыта и анализа, повидимому, является источником противоречий в опубликованных за последнее время работах.

Попытаемся резюмировать результаты этих работ.

1. В темноте растительные клетки усваивают углекислоту в аэробных и анаэробных условиях. В первом случае фиксируется больше $C^{14}O_2$. Хлорелла фиксирует в темноте меньше $C^{14}O_2$, чем Scenedesmus (Аллен с соавторами, 1947).

Скорость темновой фиксации значительно ниже скорости фотосинтеза; связывание углекислоты в течение 30 сек. фотосинтеза (при его

[1] Здесь мы даем лишь краткое представление о принципах методов исследования, более подробно см. работы и обзоры (Цвет, 1910; Камен, 1948; Сенявин, 1949; Фукс, 1949; Айвазов, Нейман и Тальрозе, 1949).

наибольшей скорости) соответствует нескольким часам темновой фиксации.

Продукты аэробной и анаэробной темновой фиксации несколько отличаются друг от друга по своим свойствам; в водной вытяжке из клеток в опытах без воздуха находят относительно больше C^{14}, чем в аэробных опытах (Аллен с соавторами, 1947; Бенсон и Кальвин, 1947; Броун с соавторами, 1947; Кальвин и Бенсон, 1948).

2. Предварительное освещение водорослей в 10—15 раз увеличивает количество $C^{14}O_2$, потребляемое растениями, выдержанными в темноте (Кальвин и Бенсон, 1948).

3. Согласно исследованиям М. Кальвина и сотрудников (1947, 1948) при анализе продуктов фотосинтеза хлореллы и Scenedesmus (при кратком периоде освещения) C^{14} обнаружен во многих соединениях: яблочной и янтарной кислоте, фосфорглицериновой кислоте, триозофосфате, в аспарагиновой кислоте и аланине и, наконец, в глюкозе и фруктозе. В гексозах большая часть C^{14} находится в положении 3, 4.

4. Г. Гаффрон и сотрудники (1948) провели исследование фракционного состава продуктов фотосинтеза Scenedesmus в зависимости от длительности освещения. Клетки водоросли экстрагировались различными растворителями; при этом получены три фракции: I) растворимая в спирте и бензоле, преимущественно пигменты и липоиды (около 21% от сухого веса клеток; II) растворимая в воде и спирте (около 1% от веса клеток); III) нерастворимый остаток, преимущественно белки и полисахариды (около 78% от веса клеток).

При фотосинтезе в течение 30 сек. большая часть C^{14} находится в водорастворимой фракции (II), при более длительном процессе C^{14} переходит в III фракцию — конечные продукты фотосинтеза. После 30 сек. фотосинтеза продукты водорастворимой фракции в темноте не претерпевают быстрого превращения (при дыхательных и ферментативных реакциях), тогда как дальнейшее освещение приводит к переходу C^{14} во фракции I и III. Этот процесс идет медленно в отсутствии CO_2 и быстро при наличии его. Предполагается, что водорастворимый продукт (II) может сочетать в себе свойства промежуточного продукта восстановления и акцептора CO_2. Пока не опубликовано данных о химическом составе этого соединения, есть лишь указания на то, что он не сходен ни с одним из продуктов дыхательного обмена.

Мы видим таким образом, что данные, полученные в лабораториях Кальвина и Гаффрона, противоречивы. Сообщения об этих работах часто носят рекламный, сенсационный характер, столь типичный для американской печати. Поэтому пока преждевременно использование опубликованных работ с «меченым» углеродом для определенных выводов о пути ступенчатого восстановления углекислоты при фотосинтезе.

Недавно А. М. Кузин и Н. Г. Доман (1950) применили способ ионофореза для извлечения из листьев промежуточных продуктов в процессе фотосинтеза. Ими были обнаружены альдуроновые кислоты; авторы приходят к выводу, что не исключена возможность фиксации и восстановления угольного ангидрида на молекулах простого или сложного углевода с образованием альдуроновых кислот.

Фотохимические реакции при фотосинтезе

1. Условия использования световой энергии для химических превращений[1]. Квант света, поглощенный молеку-

[1] Подробно об этом см. у А. Н. Теренина «Фотохимия красителей» (1947).

лой, приводит к ее переходу на более высокий энергетический уровень. Это состояние молекулы, обладающее повышенной энергией, весьма неустойчиво, длительность его составляет для флуоресцирующих красителей в растворе 10^{-7}—10^{-8} сек.

В результате столкновений с другими молекулами и внутримолекулярных превращений возбужденная молекула дезактивируется с выделением энергии (в форме кванта света флуоресценции) или с передачей избытка энергии в той или иной форме другим молекулам.

В определенных условиях внешнего окружения существует возможность потери лишь малой части электронной энергии возбуждения с переходом молекулы в длительно живущее метастабильное состояние. Маловероятный переход с этого метастабильного уровня вниз на основной уровень определяет послесвечение — фосфоресценцию молекулы. А. Н. Теренин (1943, 1944, 1945) обосновал общепринятое ныне представление о бирадикальной природе метастабильного состояния, определяющего повышенную химическую активность поглотившей свет молекулы. (Лишь в 1944 г. подобные представления были развиты в работах Льюиса и его сотрудников). С этой точки зрения результатом поглощения кванта света молекулой хлорофилла является обращение спина одного из электронов валентной пары с образованием химически активного валентно ненасыщенного бирадикального состояния; превращение световой энергии возбуждения в химическую происходит в самой молекуле хлорофилла.

Обычно применяемые методы часто недостаточно чувствительны для обнаружения первичных фотопродуктов — свободных радикалов или ионов, стационарная концентрация которых очень невелика. Чтобы обнаружить первичные фотопродукты приходится прибегать к особым приемам торможения самопроизвольного темнового процесса, например, проводя реакцию при весьма низкой температуре (Теренин и Карякин, 1947).

Обычно среди «первичных» фотопродуктов удается обнаружить более устойчивые соединения, например, стабильные свободные радикалы типа семихинонов, либо валентно насыщенные соединения (например, лейкосоединений красителей). Всегда желательно иметь возможность обнаружить промежуточные фотопродукты каким-либо прямым методом, что представляет большие трудности и в простых системах и становится еще более сложным в биологических системах. Мы пока не обладаем надежными методами исследования промежуточных продуктов реакции непосредственно в живой системе без ее нарушения. Поэтому естественно стремление исследователей изучить фотореакции хлорофилла и закономерности его сенсибилизирующего действия в простых системах, моделирующих фотохимический аппарат растения.

2. Участие хлорофилла в процессе фотосинтеза. С давних пор существуют два основных представления о том, каким образом лучистая энергия, поглощенная хлорофиллом, используется для химических превращений углекислоты и воды.

Согласно первому представлению, хлорофилл в процессе своего сенсибилизирующего действия испытывает обратимое химическое превращение. Это представление было впервые развито в классических работах К. А. Тимирязева (1871—1874). В своей докторской диссертации «Об усвоении света растением» он писал: «...Участие самого вещества хлорофилла в реакции весьма возможно. В своем исследовании над хлорофиллом я указывал на вероятность разложения хлорофилла в живом растении (или вернее, на одновременное существование двух обратных реакций)... этот факт я считаю одним из главных результатов своей работы

и любопытно, что несмотря на обширное развитие литературы хлорофилла, он еще никем не был усмотрен».

Согласно второму представлению, хлорофилл, не изменяясь химически, передает воспринимаемую энергию света реагирующей системе. Это представление впервые было развито Рейнке.

В современных схемах фотосинтеза используется представление К. А. Тимирязева об обратимом превращении хлорофилла, однако и ныне ряд зарубежных исследователей развивает представление о «физической» передаче энергии от неизменной молекулы хлорофилла к реагирующей системе (Вассинк, 1948; Фёрстер, 1947; Риль, 1948). Подобные представления обычно связывают с теорией «фотосинтетической единицы».

За последние годы у нас в СССР в результате развития идей К. А. Тимирязева удалось получить прямые опытные доказательства обратимых химических превращений хлорофилла в процессе его фотосенсибилизирующего действия, обосновывающие химическое участие хлорофилла в процессе фотосинтеза.

3. Обратимые окислительно-восстановительные превращения хлорофилла при действии света. Наиболее естественно предположение, что хлорофилл под действием света способен к обратимому окислительно-восстановительному превращению по типу простетических групп дегидразных ферментов. Подобная точка зрения соответствует представлению об эволюции синтетической функции: ферменты первичных анаэробных организмов, вероятно, были построены по типу дегидраз, переносящих водород в анаэробных окислительно-восстановительных реакциях. По мере исчерпания активных доноров водорода эволюция дегидразных ферментов шла по пути использования световой энергии солнца с целью усвоения химически менее активных доноров водорода (в конечном счете воды). Действие ныне распространенных дегидраз основано на обратимом окислительно-восстановительном превращении простетической группы — фосфопиридин-нуклеотида или рибофлавина. Окисление и восстановление происходят в связи со специфическим белком, определяющим специфичность субстрата. Выделяемые из растительных и животных организмов препаративным путем простетические группы дегидраз обычно находятся в окисленной форме, так как имеющиеся в клетке восстановленные формы окисляются в процессе выделения.

Если рассматривать хлорофилл подобным образом, то возникает вопрос: является ли выделяемый обычными способами хлорофилл окисленной или восстановленной формой «фотокофермента». Рассмотрим обе эти возможности [1].

Если хлорофилл — восстановленная форма «фотокофермента», тогда его действие будет определяться возможностью обратимого перехода: хлорофилл $\rightleftarrows$ дегидрохлорофилл $+ e + H^+$.

Это предположение было сделано в работах Штолля (1932) и развито в схеме Франка и Герцфельда (1941). Однако до сих пор не удалось получить прямых опытных доказательств возможности обратимого окисления-дегидрирования хлорофилла под действием света, идущего с увеличением свободной энергии системы. Наши работы показали, что фотохимическая активность не связана с наличием лабильного атома в молекуле пигмента сенсибилизатора (Красновский 1947, 1948в; Красновский и Брин, 1947). Наблюдавшееся нами обратимое окисление фтало-

[1] Система хлорофилл «а» $\rightleftarrows$ хлорофилл «в» не является обратимой (Вильштеттер и Штолль); кроме того существуют водоросли, содержащие лишь один хлорофилл «а».

цианина магния и хлорофилла (Красновский, 1947) мы склонны объяснить взаимодействием бирадикального «фотоактивированного» состояния молекулы пигмента с молекулой кислорода, ведущим к образованию активного перекисного соединения.

С целью установления возможности обратимого окисления хлорофилла при фотосинтезе были поставлены опыты с водой, содержащей радиоактивный водород H^3-тритий (Норрис с соавторами, 1942). Если элементарные фотохимические реакции хлорофилла определяются чередующимися актами отдачи водорода в систему восстановления CO_2 и присоединения водорода воды, то выделенный из растения после фотосинтеза хлорофилл должен обладать радиоактивным водородом. Однако это не удалось обнаружить экспериментально (подробнее об этих опытах см. М. Камен, 1948). Некоторые авторы склонны интерпретировать результаты этих опытов как аргумент против представления о химическом участии хлорофилла в фотосинтезе. Однако это не так. Результаты этих опытов понятны в свете наших работ, показавших, что выделенный из клетки хлорофилл является не восстановленной (как это предполагается в вышеуказанных работах), а окисленной формой «фотокофермента».

Если хлорофилл — окисленная форма «фотокофермента», то его действие определяется возможностью обратимого фотохимического превращения:

$$\text{хлорофилл} + e + H^+ \rightleftarrows \text{восстановленная форма хлорофилла.}$$

К. А. Тимирязев (1886) впервые осуществил восстановление хлорофилла цинковой пылью и обратное окисление восстановленной формы хлорофилла на воздухе [1]. Нам удалось осуществить реакцию обратимого фотохимического восстановления хлорофилла (рис. 4) и его аналогов (протохлорофилла, феофитинов, фталоцианина магния), идущего с увеличением свободной энергии системы (Красновский, 1948а, б; Красновский и Войновская, 1949; Красновский, Брин и Войновская, 1949).

Реакцию удается наблюдать в анаэробных условиях в среде органических оснований (пиридин) или в других растворителях в присутствии оснований (пиридина, имидазола, гистидина и др.). Фотовосстановление удалось осуществить посредством следующих соединений: аскорбиновой и диоксималеиновой кислот, цистеина, сероводорода и фенилгидразина. В темноте эти соединения не реагируют с хлорофиллом. Неактивными оказались кислоты: щавелевая, яблочная, янтарная, пировиноградная, лимонная, уксусная, молочная, глиоксалевая; глицерин, глицеральдегид, пирокатехин, резорцин, гидрохинон и другие соединения.

При освещении раствора хлорофилла «а» в пиридине с аскорбиновой кислотой (или иным из указанных соединений) в эвакуированной трубке Тунберга образуется продукт восстановления красного цвета (с максимумом поглощения при 525 mμ). В темноте после выключения света реакция идет обратно: красный продукт восстановления превращается в зеленый хлорофилл. При пуске кислорода или иных окислителей обратная реакция значительно ускоряется. Количество побочных продуктов необратимого восстановления в соответствующих условиях ведения опыта (малый избыток восстановителя, кратковременное освещение красным светом, низкая температура) с хлорофиллом «а» невелико. Иными оказались результаты опыта с хлорофиллом «в», дающего в этих условиях преимущественно продукты необратимого превращения. Повидимому, при реакции происходит необратимое фотовосстановление альдегидной группы хлорофилла «в» до спиртовой.

Пока неясно, какова химическая природа продукта фотовосстановления хлорофилла, является ли этот продукт ионной формой свободного радикала типа семихинона или валентно насыщенным лейкосоединением. Наиболее вероятно, что фотовосстановление сопровождается раскрытием конъюгированной по кругу системы двойных связей молекулы хлорофилла; первичный, элементарный акт «раскрытия» этой си-

[1] Исследование продуктов реакции Тимирязева см. у Л. М. Кособуцкой и А. А. Красновского (1950).

стемы происходит уже при образовании длительно живущего бирадикального состояния хлорофилла.

Фотопроцесс можно выразить следующей схемой:

$$X + h\nu \rightarrow X^* \rightarrow X^v$$

$$X^v + AH_2 \ldots N< \rightleftarrows [X^- + AH_2^+ \ldots N< \rightleftarrows XH + AH \ldots N<];$$

где X^v — молекула хлорофилла в бирадикальном состоянии;
AH_2 — молекула аскорбиновой кислоты, связанная с органическим основанием N< посредством водородной связи; X^- и XH — восстановленная форма хлорофилла (показана в виде ионной и нейтральной формы семихинона).

Способность хлорофилла к обратимым превращениям в среде органических оснований напоминает подобную активность гемохромогенов, легкость окислительно-восстановительных превращений которых определяется координационной связью центрального атома железа с молекулой основания.

4. Участие хлорофилла в процессах переноса водорода. Хлорофилл способен сенсибилизировать не только фотосинтез — перенос водорода от воды к углекислоте, но также ряд более простых окислительно-восстановительных реакций. В этих реакциях свет, поглощаемый хлорофиллом, приводит к взаимодействию соединений, не поглощающих свет в этой области спектра. Исследование механизма действия хлорофилла в простых системах позволяет понять пути его участия в фотосинтезе.

Известна способность хлорофилла сенсибилизировать ряд термодинамически возможных реакций; световая энергия в этих случаях используется для преодоления активационных барьеров. Сюда относятся многие случаи сенсибилизированного хлорофиллом фотоокисления органических соединений кислородом воздуха [1] и иные окислительно-восстановительные реакции (лит. см. Теренин, 1947; Рабинович, 1945, а также Красновский и Брин, 1947; Гуревич, 1947, 1948, 1949; Ливингстон, 1948). Нами исследовались реакции, идущие «против» темновых равновесных условий — восстановление аскорбиновой кислотой сафранина Т, рибофлавина (Красновский, 1948 а, б) и дифосфопиридин-нуклеотида (кодегидразы I). Эти реакции не могут итти самопроизвольно в темноте, так как аскорбиновая кислота обладает более положительным значением редокспотенциала (+0,05 в), чем рибофлавин (—0,22 в), сафранин Т (—0,29 в) и ДПН (—0,3 в). Для осуществления этих реакций требуется подвод энергии извне — в виде света.

Пиридиновый раствор, содержащий аскорбиновую кислоту, одно из указанных выше соединений и хлорофилл освещали в вакуумной трубке через красный светофильтр RG—2, т. е. в области поглощения хлорофилла. За ходом сенсибилизированной реакции следили с помощью спектрофотометра, наблюдая изменение коэфициента поглощения в максимуме поглощения акцепторов водорода или образующихся восстановленных соединений. Опыты показали, что под действием света, поглощенного хлорофиллом, происходит восстановление взятых соединений; после выключения света в темноте происходит их обратное окисление. Механизм реакции заключается во взаимодействии активной фотовосстановленной формы хлорофилла рибофлавином, сафранином, ДПН и иными окислителями (Красновский и Брин, 1949, 1950). Это было показано в следующих опытах.

В трубку Тунберга вводили раствор хлорофилла и аскорбиновой кислоты в пиридине, в боковой отвод трубки — раствор рибофлавина, сафранина или ДПН. При освещении трубки происходило фотовосстановление хлорофилла. К восстановленному раствору в темноте приливали из бокового отвода растворы окислителей. За ходом темновой реакции следили с помощью спектрофотометра. Происходило быстрое взаимодействие «окислителей» с восстановленной формой хлорофилла, ведущее к обратимому образованию хлорофилла.

[1] Этот вид реакций определяет «фотодинамическое» действие хлорофилла и иных флуоресцирующих красителей.

Участие хлорофилла в переносе водорода от вещества АН к В выражается следующими реакциями [1]:

$$\text{световая реакция} — X + AH \rightleftarrows XH + A;$$
$$\text{темновая реакция} — XH + B \rightleftarrows X + BH.$$

Следует считать доказанным, таким образом, химическое участие хлорофилла в процессе сенсибилизирующего действия, идущего через этап его обратимого фотовосстановления.

О связи между фотохимическими и темновыми реакциями фотосинтеза

Из опытов с хлорофиллом в простых системах можно сделать вывод, что суть фотохимической реакции при фотосинтезе заключается в обратимом окислительно-восстановительном процессе, при котором образуется активная восстановленная форма хлорофилла (XH) и окисленная форма вспомогательной системы (аскорбиновая кислота?) или воды.

Фотопродукты включаются в систему темновых реакций. Весьма маловероятно непосредственное взаимодействие XH с фиксированной углекислотой; восстановление углекислоты, вероятно, происходит в цитоплазме или строме пластид [2], тогда как хлорофилл локализуется в богатых липоидами гранах; отсюда следует, что необходимо участие вспомогательных систем, транспортирующих водород от XH к связанной CO_2.

Перенос водорода в растительных клетках совершается с помощью дегидраз; мы показали возможность восприятия активного водорода XH окисленными формами простетических групп дегидраз — ДПН и рибофлавином, которые могут осуществлять перенос водорода в темновых процессах ассимиляции.

Некоторые авторы развивали представление о конверсии энергии света в энергию активных фосфорных эфиров (типа аденозинтрифосфата); с этой точки зрения хлорофилл рассматривается как своеобразная «фотофосфатаза» (Эмерсон с соавторами, 1944). Чтобы установить эту возможность, ставились опыты, в которых исследовалось накопление фосфорных эфиров и уменьшение количества неорганического фосфора при освещении зеленых клеток. В суспензию водорослей вводили неорганический фосфат, меченый P^{32}, и исследовали его распределением между органически связанной и свободной формами после освещения и в темноте. В пределах ошибки опыта различия наблюдать не удалось (Аронов и Кальвин, 1948; Гест и Камен, 1948). Таким образом, не получено убедительных данных, показывающих связь между образованием фосфорных эфиров и поглощением света. Вообще же трудно представить себе возможность конверсии электронной энергии бирадикального состояния хлорофилла в энергию пирофосфатной связи —O—P. Мы уже указывали, что потребность синтетической системы в активных фосфорных эфирах типа АТФ может вообще быть покрыта с помощью темновых окислительных процессов по известному пути дыхательных реакций.

Путь переноса водорода при фотосинтезе, при котором происходит смыкание фотохимических и ферментативных стадий, соответственно изложенному, представляется в следующем виде:

$$O_2 \leftarrow HOH \rightarrow (AH \rightleftarrows A) \rightarrow (XH \rightleftarrows X) \rightarrow (DH \rightleftarrows D) \rightarrow CO_2 \rightarrow \text{органические соединения},$$

где (АН ⇄ А) обратимая окислительно-восстановительная система, подобная аскорбиновой кислоте;
(XH ⇄ X) система хлорофилл- его фотовосстановленная форма (фотостадия).
(ДН ⇄ Д) ферментная дегидразная система.

---

[1] Восстановленная форма хлорофилла в обзоре обозначается символом XH; однако в действительности, вероятно, существует равновесие между ионной и неионной формой свободного радикала.

[2] Изолированные хлоропласты и гранулы лишены способности восстановления углекислоты, но могут фотохимически выделять кислород воды с участием иных «окислителей».

Перенос водорода от АН к Х происходит фотохимически, «против» равновесных условий. А входит в систему окислительных ферментативных реакций, ведущих к выделению O_2, ХН передает водород CO_2 посредством дегидраз.

Темновые (ферментные) реакции при фотосинтезе

Чтобы судить о химической реакции, нужно знать соединения как исходные, так и образованные в результате взаимодействия. В случае фотосинтеза мы знаем достоверно лишь исходные (CO_2 и H_2O) и конечные (полисахариды) соединения. Чтобы уяснить природу ступенчатых реакций фотосинтеза, нужно знать исходные и конечные вещества на каждой ступени, т. е. промежуточные продукты.

Выше мы изложили имеющийся материал о природе этих промежуточных соединений. К сожалению, противоречивые данные, полученные в работах с применением изотопов углерода, не позволяют пока притти к определенным выводам. Попытаемся все же перечислить виды темновых реакций, используя известный экспериментальный материал [1].

1. Первичное внедрение углекислоты в органическую молекулу. Меченый CO_2 в темноте и при освещении (сколь угодно кратком) обнаруживается в органическом соединении. Нахождение меченого углерода в карбоксильной группе указывает на возможность первичного карбоксилирования органического субстрата.

Бо́льшая часть известных реакций карбоксилирования органических соединений имеет положительную величину ΔF; сдвиг равновесия в сторону карбоксилирования в живой клетке осуществляется посредством дальнейших сопряженных реакций карбоксилированного соединения; таной путь показан при гетеротрофной фиксации углекислоты (Очоа, 1948).

2. Восстановление углекислоты (и в форме карбоксильной группы) до уровня сахара может быть осуществлено лишь путем ряда ступеней с помощью фотохимического процесса, мобилизующего водород воды. Мы уже указывали, что наиболее вероятно ступенчатое темновое восстановление углекислоты с участием промежуточных ферментных систем, передающих «активный водород» восстановленной формы хлорофилла.

Перечислим доводы в пользу этого положения:

а) восстановление углекислоты возможно и в темноте гетеротрофными организмами, а также зелеными клетками;

б) опыты Е. А. Бойченко (1948, 1949) показали возможность темновой фиксации и восстановления углекислоты хлоропластами при участии фермента гидрогеназы;

в) опыты с C^{14} показали усвоение и восстановление CO_2 в темноте в случае предварительного освещения (без CO_2) зеленых клеток;

г) после выключения света продолжается некоторое время потребление углекислоты зелеными клетками;

д) при освещении образуется активная восстановленная форма хлорофилла, способная к темновому восстановлению простетических групп дегидраз.

Каков химический путь темнового восстановления углекислоты? Наиболее вероятно образование органических соединений посредством системы реакций, идущих с регенерацией молекулы, первично присоеди-

[1] Здесь нужно указать, что открытие А. Ф. Лебедевым (1921) темнового усвоения углекислоты гетеротрофными организмами легло в основу нынешних представлений о темновой фиксации углекислоты при фотосинтезе.

няющей углекислоту. Известные опытные данные показывают, что CO_2 первично обнаруживают в связи с каким-то органическим соединением. Пока природа этого «носителя» достоверно не известна. А. М. Кузин предположил, что фиксация и восстановление углекислоты возможна на молекулах простого или сложного углевода (1940, 1950). Если представить синтез в виде обращения так называемых «циклов» ди- или трикарбоновых кислот, то первичным акцептором углекислоты, регенерируемым в системе реакций, будут молекулы кетокислот — пировиноградной или α-кетоглютаровой (см. Очоа, 1948, Кальвин и Бенсон, 1948).

Схемы, рассматривающие восстановление углекислоты как обращение реакций дыхания и гликолиза позволяют понять тесную связь дыхания и фотосинтеза посредством общих промежуточных продуктов и ферментных систем. Синтез аминокислот и жиров может происходить на основе промежуточных продуктов этих систем реакций. Промежуточные продукты — органические кислоты — могут также использоваться для дыхания.

Уместно указать здесь, что А. Н. Бах впервые указал на возможность рассмотрения промежуточных реакций фотосинтеза как обращения реакций дыхания; кислород, потребляемый при дыхании, реагирует в форме перекисного соединения — выделение кислорода при фотосинтезе также происходит из перекиси.

Однако представление о пути восстановления углекислоты посредством обращения реакций дыхания и гликолиза пока нельзя считать экспериментально обоснованным; мы уже указывали выше на противоречивость опытных данных, полученных с применением изотопов углерода [1].

3. Темновыми, ферментными следует также считать реакции выделения молекулярного кислорода, идущие с участием окисленной в результате фотохимического процесса промежуточной системы.

Возможность участия воды в фотохимическом процессе будет рассмотрена ниже.

Химическая схема фотосинтеза

Имеющиеся экспериментальные данные недостаточны для построения детально обоснованной схемы фотосинтеза, так как доныне достоверно не установлена природа промежуточных продуктов и реакций, составляющих процесс. Однако мы считаем возможным попытаться представить общую схему процесса, могущую играть роль рабочей гипотезы.

Общая схема фотосинтеза Франка и Герцфельда (1941) ныне не приемлема. Кроме ранее данной критики этой схемы (Красновский, 1946, 1947; Теренин и Красновский, 1949) здесь следует привести следующие основные возражения.

1. Схема исходит из представления об обратимом фотохимическом образовании монодегидрохлорофилла, не получившим опытного подтверждения.

2. Принятые в схеме два типа фотореакций основаны на представлении о существовании окисленной и исходной форм хлорофилла, сохраняющих подобные спектры поглощения, что также не получило опытного подтверждения. Напротив того, мы показали, что обратимое окисление и восстановление хлорофилла сопровождается исчезновением максимума поглощения в красной области спектра (Красновский, 1947, 1948 а, б; Красновский, Брин и Войновская, 1949).

3. Предположения о фотохимическом акте восстановления CO_2 маловероятны. Основными аргументами в пользу того, что CO_2 участвует в фотохимическом процессе являются наблюдения Франка и сотрудников о тушении флуоресценции хлорофилла в листе при повышении парциального давления CO_2 (Свешников, 1944; Фотосинтез растений, 1949).

[1] В последующих сборниках предполагается специальная статья о темновом усвоении углекислоты, поэтому здесь этот вопрос разбираться более подробно не будет.

Акт тушения флуоресценции вообще не связан с первым актом фотохимической реакции, в которой участвует длительно живущее возбужденное состояние красителя (см. Шпольский, 1947; Шпольский и Гришкун, 1945; Теренин, 1947).

Исследования хлорофилла и фталоцианина магния, проведенные в нашей лаборатории, показали отсутствие связи между тушением флуоресценции и фотореакцией (Евстигнеев и Красновский, 1948, Евстигнеев, Гаврилова и Красновский, 1950, Красновский, 1948 б). Например, хинон сильно тушит флуоресценцию хлорофилла, но фотохимически с ним не реагирует; кислород (в зависимости от растворителя и примесей в нем) или не оказывает действия, или тушит флуоресценцию хлорофилла, но во всех случаях фотохимически с ним реагирует; аскорбиновая кислота не тушит флуоресценцию хлорофилла, но реагирует с ним при освещении. Число этих примеров можно умножить.

4. Схемы Франка — Герцфельда (1941), Рабиновича (1945) имеют формальный характер, будучи «жестко» построенными из расчета восьми квантов на одну молекулу углекислоты, тогда как в действительности величина квантового выхода колеблется в весьма широких пределах.

Мы попытаемся изложить ниже схему фотосинтеза, основывая ее (поскольку это возможно) на современных опытных данных и используя предыдущие работы. Существенным отличием этой схемы от ранее предложенных является отказ от формального механизма 4- или 8-квантовых схем и представление о связи элементарных процессов фотосинтеза с иными окислительно-восстановительными реакциями обмена зеленой клетки. Изложим основные положения этой схемы, резюмирующие изложенный в обзоре материал (см. рис. 4).

1. Процесс фотосинтеза состоит из фотохимических и темновых ферментативных реакций. В условиях интенсивного дневного освещения узким местом процесса является наиболее медленная из ферментативных реакций [1], тогда как при слабом освещении скорость процесса определяет фотостадия.

2. Существует связь между фотосинтезом и иными реакциями обмена зеленой клетки.

При малой интенсивности освещения возможно включение в процесс синтеза активных соединений, образующихся при дыхательном обмене, тогда как при большой интенсивности освещения возможно включение активных фотопродуктов в синтетическую систему обмена растения, отличную от системы, ассимилирующей углекислоту.

3. При фотосинтезе выделяется в молекулярной форме кислород воды через промежуточную стадию перекисного соединения: водород воды передается в систему реакций, ведущих к восстановлению CO_2. Для восстановления молекулы CO_2 до уровня углевода требуются 4 атома водорода (4 электрона и 4 протона).

4. Фотохимический акт фотосинтеза, при котором происходит превращение световой энергии в потенциальную химическую энергию, заключается в реакции обратимого фотовосстановления хлорофилла с образованием химически активных фотопродуктов типа свободных радикалов.

Активный фотопродукт восстановления хлорофилла передает свой «водород» (электрон) в систему реакций восстановления углекислоты посредством дегидразных систем, а окисленный фотопродукт приводит к выделению кислорода из воды.

В наших работах было показано фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой, цистеином, сероводородом; однако осуществить фотореакцию хлорофилла с водой в простой системе не удалось.

---

[1] Возможно, что эта реакция первичного карбоксилирования, зависящая от парциального давления CO_2; известно, что обогащение воздуха углекислотой приводит к ускорению фотосинтеза.

Фотореакцию можно вообще представить с участием координационно-связанной молекулы воды [1] и без ее участия.

$$X \cdot HOH + AH \rightarrow XH + AHOH \rightarrow A + H_2O, \text{ либо } X + AH \rightarrow XH + A$$

Мы не обладаем пока опытными доказательствами, позволяющими выбрать тот или иной механизм. Реакция с сероводородом объясняет путь бактериального фотосинтеза посредством обратимого фотовосстановления бактериохлорофилла. В случае фотосинтеза растений при фотореакции с промежуточной системой следует предположить выделение кислорода в результате взаимодействия радикала А с водой.

Трудно представить себе возможность окисления воды соединением, образованным в результате действия красного света (42 кал.), однако использование энергии рекомбинации гидроксилов может значительно облегчить этот процесс.

$$A + HOH \rightarrow AH + OH; \quad 2OH \rightarrow H_2O + O_2 + 57 \text{ кал.}$$

Течение реакции в системе, обеспечивающей гетерогенное разделение активных продуктов и рекомбинацию ОН, смещает равновесие первой реакции и тем определяет возможность ее течения. Подобные случаи сопряжения известны в биохимии (например, Очоа, 1948). Исходя из обычных взглядов, трудно себе представить использование энергии рекомбинации в «одном акте» с первой реакцией. Эти соображения сохраняют силу при рассмотрении возможности элементарной реакции $X + HOH \rightarrow XH + OH$ за счет кванта красного света. Смещение равновесия при рекомбинации ОН может облегчить возможность этой реакции; так, например, Б. Я. Даин и А. А. Качан (1949) показали, что создание гетерогенной среды ускоряет выделение кислорода при фотовзаимодействии некоторых неорганических ионов с водой. Так как пока не удалось показать на опыте возможности фотореакции хлорофилла с водой, в схеме принята фотореакция с промежуточным соединением, осуществленная в наших работах.

5. Число элементарных фотореакций определяется величиной квантового выхода процесса. Эта величина не постоянна и зависит как от внешних факторов (например, интенсивность света), так и от внутренних физиологических причин. Поэтому нельзя жестко связывать схему фотосинтеза с определенной величиной квантового выхода [2].

Для восстановления одной молекулы CO_2 до уровня углевода требуется 4 атома водорода (см. также циклы ди- и трикарбоновых кислот) и наиболее вероятно предположение о том, что для мобилизации одного атома водорода требуется один квант света. Четырех квантов света энергетически достаточно для компенсации ΔF реакции фотосинтеза; дополнительная энергия при необходимости может быть получена за счет дыхательных реакций, например, в форме аденозинтрифосфата и восстановленных форм дегидразных ферментов. Фактически на восстановление молекулы CO_2 расходуется n квантов (известные измерения квантового выхода дают величины n от 4 до 20 квантов на молекулу CO_2). Если для мобилизации водорода воды нужно минимум 4 кванта, то на что же расходуется энергия $n - 4$ элементарных фотопроцессов? Эта энергия при большой интенсивности света не может быть израсходована целиком на мобилизацию водорода для восстановления CO_2 вследствие ограниченной пропускной способности ферментных стадий ассимиляционной системы.

Здесь имеются две возможности.

---

[1] При сравнительном исследовании хлорофилла и феофитина было показано, что связание молекулы воды и иных полярных соединений происходит посредством центрального атома магния молекулы хлорофилла (Евстигнеев и соавторы, 1949). Атом магния в молекуле хлорофилла обладает двумя «вакантными» координационными местами; по аналогии с геминовыми ферментами возможно представление о связи атома Mg с основными группами молекулы белка и молекулой воды или иного полярного соединения, участвующего в реакции.

[2] Автор прав в том отношении, что практически квантовые выходы фотосинтеза меняются в зависимости от конкретных условий, в которых совершается процесс. Однако это не исключает необходимости дальнейших работ по изучению вопроса и прежде всего для того, чтобы выяснить м и н и м а л ь н о е число квантов света, необходимых для восстановления одной молекулы CO_2 в оптимальных условиях течения процесса. Это принципиально важный вопрос для познания механизма фотосинтеза. (Примечание редактора).

а. Обратная реакция активных фотопродуктов с образованием исходных соединений. При этой реакции происходит потеря химической энергии фотопродуктов, превращаемой в тепло. Эта возможность проявляется в том случае, когда закрыты пути оттока фотопродуктов в после-

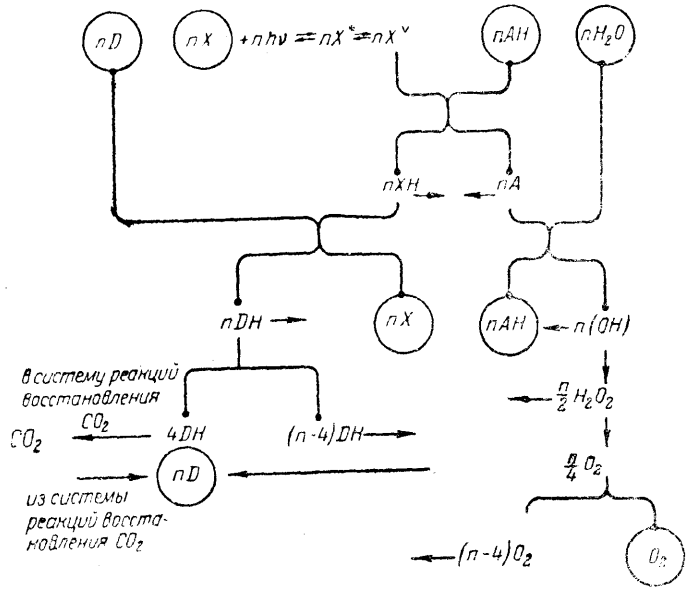


Рис. 4. Схема элементных процессов фотосинтеза.
$X \rightleftarrows XH$ — хлорофилл и его восстановленная форма; $A \rightleftarrows AH$ — промежуточная окислительно-восстановительная система; $D \rightleftarrows DH$ — дегидразная система; →←— обратные окислительно-восстановительные реакции разных типов

дующие реакции, например, при отравлении ферментативных процессов, а также в том случае, когда интенсивность света велика и ферментативные системы не могут справиться с переработкой фотопродуктов.

б. Включение фотопродуктов в систему окислительно-восстановительных реакций клетки с использованием их энергии в системе клеточного обмена вследствие ограниченной пропускной способности ассимилирующего темнового аппарата.

При этом с «восстановительной стороны» возможно включение дегидраз, образующихся при взаимодействии ДПН с восстановленной формой хлорофилла; с «окислительной» стороны можно ожидать включения промежуточных и конечных продуктов окисления воды, например, перекиси водорода или молекулярного кислорода.

В этом процессе возможно образование АТФ, участвующего в синтетических реакциях клетки. Ассимиляционный коэфициент $CO_2/O_2 = 1$ в цикле является постоянным, независимо от течения обратных реакций. Однако, если активные фотопродукты используются, например, для восстановления нитритов или нитратов, то величина ассимиляционного коэфициента должна вообще отличаться от единицы.

6. Фотохимический процесс связан с системой темновых реакций посредством дегидразных систем или иных вспомогательных окислительно-восстановительных систем, передающих активный водород восстановленной формы хлорофилла в системе темновых реакций восстановления углекислоты с обратной регенерацией исходной формы хлорофилла.

7. Первичная темновая реакция связывания углекислоты заключается в карбоксилировании органического субстрата, о чем свидетельствуют опыты с применением изотопов углерода.

8. Ступенчатые реакции восстановления связанной в форме карбоксильной группы углекислоты — темновые энзиматические реакции, осуществляемые с помощью «активного восстановителя», образующегося в результате фотореакции.

9. Химическая природа реакций восстановления углекислоты до углеводов и иных органических соединений достоверно не установлена. Известно многообразие путей и связей биохимических реакций обмена веществ растения; вероятно, нет и единого, фиксированного пути восстановления углекислоты. В химических схемах восстановления CO_2 путем обращения последовательности реакций, известных под названием «циклов» ди- и трикарбоновых кислот, энергетически наиболее трудным этапом является восстановление карбоксильной группы. Однако сопряжение с фосфорилированием может значительно облегчить эту реакцию. Так, система фосфоглицеральдегид $\rightleftarrows$ дифосфоглицериновая кислота обладает окислительно-восстановительным потенциалом E_o^1 (при pH=7)—0,28 вольта; т. е. восстановление кислоты до альдегида можно осуществить с помощью восстановленной формы кодегидразы I. Мы полагаем, что подача в систему реакций ассимиляции углекислоты восстановленных форм дегидразных ферментов (образующихся за счет действия света) может обеспечить ступенчатое восстановление углекислоты. Для восстановления 1 молекулы CO_2 нужно 4 молекулы соединения ДН (показанного на схеме также в виде свободного радикала).

10. Система ферментных реакций освобождает молекулярный кислород воды, используя окисленную при фотопроцессе часть системы. Здесь мы исходим из того предположения, что образованный при первичной фотореакции хлорофилла с соединением типа аскорбиновой кислоты активный «окислитель» (типа свободного радикала) в темноте реагирует с водой посредством реакций неизвестной нам пока природы, вероятно, управляемых железо-порфириновыми пигментами, с промежуточным образованием перекиси.

Заключение

Работы последних лет в области фотосинтеза растений и смежных разделов науки привели к открытию ряда новых фактов, однако еще очень многое остается в области предположений.

В обзоре сделана попытка отразить современное состояние вопроса, разграничивая положения, обоснованные опытным материалом, и положения, пока находящиеся в состоянии рабочих гипотез. Так, в значительной мере гипотетичной остается пока химическая схема фотосинтеза, так как достоверно не установлена природа промежуточных продуктов процесса. В обзоре развиты идеи К. А. Тимирязева о химическом участии хлорофилла в процессе фотосинтеза и показана связь фотосинтеза с иными биохимическими процессами обмена в растении; привлечение значительного физико-химического материала определяется основным назначением обзора: отразить представления о пути превращения световой энергии в химическую при фотосинтезе. Главные выводы из фактического материала изложены в разделе «Химическая схема фотосинтеза».

Поиски промежуточных продуктов фотосинтеза представляют особые трудности по сравнению с поисками промежуточных продуктов дыхания, идущего «вниз» в термодинамическом смысле. Элементарные реакции фотосинтеза происходят с «запасанием» энергии и всякое нарушение системы приводит к быстрым обратным реакциям активных промежуточных соединений, образованных в результате действия света. Нужно надеяться, что уже в ближайшее время будут преодолены методические

трудности исследования работающей фотосинтетической системы без ее нарушения.

Необходимо дальнейшее изучение фотосинтеза в процессе развития фотосинтетической функции организмов и во взаимосвязи с окружающей средой и иными процессами обмена веществ растения. Нужна осторожность в использовании результатов, полученных с изолированными системами для объяснения процессов, текущих в живом растении, учитывающая качественные особенности биологических систем.

Установление природы фотосинтеза нужно, чтобы сознательно управлять синтетической деятельностью растения, однако не менее важен путь воссоздания в искусственных условиях системы фотохимических реакций, близких к фотосинтезу, использующих энергию солнца более полно, чем это делают растения.

В заключение, приношу глубокую благодарность, акад. А. Н. Теренину, критически просмотревшему рукопись обзора.

ЛИТЕРАТУРА

Андреева Т. Ф., Зубкович Л. Е. (1948), ДАН СССР, **60**, 681.
Айвазов Б. В., Нейман М. Б., Тальрозе В. Л. (1949), Усп. хим., **18**, 402.
Бах А. Н. (1893), Moniteur Scientifique, сентябрь, Сб. избр. труд. 1, ОНТИ, 1937.
Бах А. Н. (1894), Moniteur Scientifique, август, Сб. избр. труд., **52**, ОНТИ, 1937.
Бах А. Н. (1894), Moniteur Scientifique, сентябрь, Сб. избр. труд., **61**, ОНТИ, 1937.
Бойченко Е. А. (1943), ДАН СССР, **38**, 200.
Бойченко Е. А. (1944), ДАН СССР, **42**, 359.
Бойченко Е. А. (1946), ДАН СССР, **52**, 525.
Бойченко Е. А. (1947), Биохимия, **12**, 153.
Бойченко Е. А. (1948), Биохимия, **13**, 219.
Бойченко Е. А. (1949), ДАН СССР, **64**, 545.
Бородин И. П. (1876), Физиологические исследования над дыханием листоносных побегов.
Бриллиант В. А. (1947), Изв. АН СССР, Сер. биол. **3**, 447.
Бриллиант В. А. (1948), Вестн. АН СССР, **32**.
Бриллиант В. А. (1949), Фотосинтез как процесс жизнедеятельности растений, Изд. АН СССР.
Варбург О. и Лютгенс В. (1946), Биохимия, **11**, 303.
Вернадский В. И. (1940), Биогеохимические очерки, М. — Л.
Виноградов А. П. (1947), Изв. АН СССР, Сер. биол., **3**, 409.
Виноградов А. П. и Тейс Р. В. (1941), ДАН СССР, 33, 497.
Виноградов А. П. и Тейс Р. В. (1947), ДАН СССР, 56, 57.
Винберг Г. Г. (1948), Природа, 37, 12, 34.
Воскресенская Н. П. (1947), Дисс. Ин-т физиол. растений им. К. А. Тимирязева, АН СССР.
Вюрмзер Р. (1933), Биологическое окисление и восстановление, ОНТИ.
Годнев Т. Н. (1947), VII Тимирязевское чтение, Изд. АН СССР.
Годнев Т. Н. и Осипова О. П. (1947), ДАН СССР, **57**, 161.
Годнев Т. Н., Терентьев В., Пармон Н. (1949), Изв. АН БССР, **1**, 93.
Гуревич А. А. (1947), ДАН СССР, **55**, 267.
Гуревич А. А. (1948), ДАН СССР, 59, 937.
Гуревич А. А. (1949), ДАН СССР, 65, 525.
Гюббенет Е. Р. (1946), Природа, **35**, 69.
Гюббенет Е. Р. и Вобликова Т. В. (1928), Изв. Ин-та им. Лесгафта, **1 — 2**, 14, 43.
Даин Б. Я., Качан А. А. (1949), ДАН СССР, **67**, 85.
Данилов А. Н. (1938), Труды Ботан. ин-та АН СССР, **IV**.
Данилов А. Н. (1939), Юбил. сб., посвященный В. Л. Комарову, 258.
Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А. (1949), ДАН СССР, **66**, 11, 33.
Евстигнеев В. Б. и Красновский А. А. (1948), ДАН СССР, **60**, 623.
Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А. (1950), ДАН СССР.
Жолио-Кюри Ф. (1950), Изв. АН СССР, сер. физ., **14**, 69.
Знаменская М. П., Осипова О. П. (1947), ДАН СССР, **57**, 705.

Зубкович Л. Е. и Андреева Т. Ф. (1949), ДАН СССР, **67**, 165.
Ивановский Д. И. (1907), Ber. Deutsch. Botan. Ges., **25**, 416.
Ивановский Д. И. (1909), Проток. засед. Об-ва естествоиспыт. при Варшавск. университете.
Ивановский Д. И. (1913), О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава.
Камен М. (1948), Радиоактивные индикаторы в биологии, ИЛ.
Колесников П. А. (1940), Дисс., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха.
Колесников П. А. (1948), Биохимия, **13**, 370.
Колесников П. А. (1949а), Биохимия, **14**, 124.
Колесников П. А. (1949б), Изв. АН СССР, Сер. биол., **3**, 282.
Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А. (1950), ДАН СССР.
Красновский А. А. (1946), Усп. совр. биол., **21**, 153.
Красновский А. А. (1947а), Изв. АН СССР, Сер. биол., **3**, 377.
Красновский А. А. (1947б), ДАН СССР, **58**, 617; 835.
Красновский А. А. (1948а), ДАН СССР, **60**, 421.
Красновский А. А. (1948б), Дисс., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.
Красновский А. А., Брин Г. П. (1946), ДАН СССР, **53**, 447.
Красновский А. А., Брин Г. П. (1947), ДАН СССР, 58, 1087.
Красновский А. А., Брин Г. П. (1948), ДАН СССР, **63**, 163.
Красновский А. А., Брин Г. П. (1949), ДАН СССР, **67**, 325.
Красновский А. А., Брин Г. П. (1950), ДАН СССР, **73**, 1239.
Красновский А. А., Брин Г. П., Войновская К. К. (1949), ДАН СССР.
Красновский А. А., Войновская К. К. (1949), ДАН СССР, **66**, 663.
Кузин А. М. (1940), Труды III Моск. мед. ин-та, вып. V, 1.
Кузин А. М., Доман Н. Г. (1950), ДАН СССР, **72**, 77.
Кузин А. М., Школьник М. Я. (1949), ДАН СССР, **65**, 527, 719.
Курсанов А. Л. (1933), Planta, **20**, 535.
Курсанов А. Л. и Манская С. М. (1935), Бюлл. Моск. об-ва испыт. природы, **44**, 205.
Ланская Л. А. и Сивков С. И. (1949), ДАН СССР, **67**, 1147.
Лебедев А. Ф. (1921), Изв. Донского гос. ун-та, **1**, 25 — 37.
Любименко В. Н. (1923), Изв. Росс. Акад. Наук, 129.
Любименко В. Н. (1935), Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, Сельхозгиз, М. — Л.
Любименко В. Н. и Тиховская З. П. (1929), Труды Севастоп. биол. ст. АН СССР, **1**, 153.
Михлин Д. М. и Броновицкая З. С. (1945), Биохимия, **10**, 326.
Ничипорович А. А. (1940), Сов. ботаника, **5 — 6**, 113.
Ничипорович А. А. (1948), О фотосинтезе растений.
Опарин А. И. (1934), Усп. химии, **3**, 200.
Опарин А. И. (1937), Изв. АН СССР, Отд. мат. и естеств., **6**, 1733.
Опарин А. И. (1941), Происхождение жизни на земле, изд. АН СССР.
Осипова О. П. (1947), ДАН СССР, 57, 371, 799.
Очоа С. (1948), Энзиматический механизм ассимиляции углекислоты, в сб. „Проблемы биохимии", ИЛ.
Палладин В. И. (1910), Ber. Deutsch. Bot. Ges., **28**, 120.
Проблемы биохимии (1948), Сборник, ИЛ.
Риль Н. В. (1948), Усп. физ. наук, **35**, 186.
Рихтер А. А. (1914), Изв. Росс. Акад. Наук.
Сапожников В. В. (1894), Белки и углеводы зеленых листьев как продукты ассимиляции, Томск.
Сапожников Д. И. (1940), Сов. бот. **5 — 6**, 93.
Сапожников Д. И. и Лопаткин Ю. (1950), ДАН СССР, **72**, 413.
Свешников Б. Я. (1944), Природа, **33**, 29.
Сенявин М. М. (1949), Усп. хим., **18**, 183.
Сисакян Н. М., Залковер А. М., Бирюзова В. И. (1948), ДАН СССР, **60**, 1213.
Сисакян Н. М., Кобякова А. М. (1948), Биохимия. **13**, 88.
Сисакян Н. М., Кобякова А. М. (1949), ДАН СССР, **61**, 1065, 1948, 67, 703.
Сисакян Н. М., Куваева Е. Б. (1948), ДАН СССР, **62**, 121.
Сисакян Н. М., Филиппович И. И. (1949), ДАН СССР, **67**, 517.
Сисакян Н. М., Чамова К. Г. (1949), ДАН СССР, **67**, 337.
Сисакян Н. М. (1949), Баховское чтение.
Степаненко Б. Н. (1947), АН СССР, Сер. Биол., **3**, 341.
Таусон В. О. (1947), Изв. АН СССР, **3**, 423.
Теренин А. Н. (1943), Acta Physicochimica URSS, 18, 210.

Теренин А. Н. (1944), Ж. физ. химии, **18**, 1.
Теренин А. Н. (1945), Изв. АН СССР, Сер. физ., **9**, 312.
Теренин А. Н. (1947), Фотохимия красителей, изд. АН СССР.
Теренин А. Н. (1947), Изв. АН СССР, Сер. биол., **3**, 369.
Теренин А. Н., Карякин А. В. (1947), ДАН СССР, **58**, 425.
Теренин А. Н., Красновский А. А. (1949), Усп. физ. наук, **37**, 65.
Тимирязев К. А. (1871), Спектральный анализ хлорофилла, Магист. дисс., соч. т. II, 27, Сельхозгиз, 1937.
Тимирязев К. А. (1874), Об усвоении света растением, Докт. дисс., Соч. т. II, 95, Сельхозгиз, 1937.
Тимирязев К. А. (1886), Nature, **32**, 342; **34**, 52, соч. т. II, 268, 270, Сельхозгиз, 1937.
Тимирязев К. А. (1889), Compt. Rend. Acad. Sci, 109, 379, соч. т. II, Сельхозгиз, 1937, 280.
Фотосинтез растений. (1949), вып. **1**, **2**, **3**, ИЛ.
Фукс Н. А. 1949, Усп. хим., 18, 206.
Цвет М. С. (1901), Физико-химическое строение хлорофильного зерна, Дисс. Казань.
Цвет М. С. (1910), Хромофиллы в растительном и животном мире, Варшава; Избр. работы, изд. АН СССР, 1946.
Шпольский Э. В. (1947), Изв. АН СССР, Сер. биол., **3**, 397.
Шпольский Э. В. и Гришкун Е. (1945), Ж. физ. хим., **19**, 107.
Albers V., Knorr H. (1937), Plant Physiol., **12**, 833.
Allen M., Gest H., Kamen M. (1947), Arch. Biochem., **14**, 335.
Aronoff S., Calvin M. (1948), Plant Physiol., **23**, 351.
Benson A., Calvin M. (1947), Science, **105**, 648.
Brown A., Fager E., Gaffron H. (1947), Arch. Biochem., **19**, 407.
Calvin M., Benson A. (1948), Science, 107, 476.
Dutton H., Manning W. (1941), Am. J. Bot, **28**, 516.
Emerson R., Arnold W. (1932), J. Gen. Physiol, **15**, 391, 16, 191.
Emerson R., Lewis A. (1942); J. Gen. Physiol., **25**, 579.
Emerson R., Stauffer T., Umbreit W. (1944), Am. J. Bot., **31**, 107.
Fischer G., Stern A. (1940), Die Chemie des Pyrrols, в. 2.
Förster T. (1947), Z, Naturforsch, **21**, 174.
Franck J., Herzfeld K. (1941), J. Physiol. Chem., **45**, 978.
Franck J., Loomis W. E. (1949), Photosynthesis in Plants.
Gaffron G. (1944), Biol. Rev., **19**, 1.
Gaffron G., Wohl K. (1936), Naturwiss., **24**, 87, 103.
Gest H., Kamen M. (1948), J. Biol. Chem., **176**, 299.
Gest H., Kamen M. (1949), Science, **109**, 558, 560; J. Bacteriol, **58**, 293.
Granick S., Porter K. (1947), Am. J. Bot., **34**, 545.
Hill R. (1937), Nature, **139**, 881.
Holt A., French C. (1948), Arch. Biochem., **19**, 368, 429.
Kok B. (1948), Enzymol. **13**, 1.
Koski V., Smith J. (1948), J. Am. Chem. Soc., **70**, 3558.
Livingston R. (1948), J. Phys. Coll. Chem., **51**, 775; **52**, 527, 662.
Norman R., French C., Macdowall F. (1948), Plant Physiol., **23**, 445.
Norris T., Ruben S., Allen M. (1942), J. Am. Chem. Soc., **64**, 3037.
Pratt R., Trelease S. (1938), Am J. Bot., **25**, 133.
Rabinowitch E. (1945), Photosynthesis v. 1, N. Y.
Ruben S., Kamen M., Devoult A. (1939), Science, **90**, 570.
Ruben S., Randall M., Kamen M., Hyde J. (1941), J. Am. Chem. Soc., 63, **377**.
Ruben S. (1943), J. Am. Chem. Soc., **65**, 273.
Stepka W., Benson A., Calvin M. (1948), Science, **108**, 304.
Stoll A. (1932), Naturwiss., **20**, 955.
Van-Niel K. (1941), Adv. Enzymol., **1**, 263.
Warburg O. (1919), Biochem. Z., **100**, 230.
Warburg O., Schocken V. (1949), Arch. Biochem, **21**, 363.
Warburg O., Burk D. и др. (1949), Arch. Biochem, **23**, 330, Science, **110**, 225.
Wassink E., Kersten I. (1946), Enzymol., **12**, 3.
Wassink E. (1948), Enzymol., **13**, 362.
Zscheile F., Comar C. (1941), Bot. Gaz., **102**, 463.

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXXIII, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 22 VI 1950)

В предыдущих сообщениях была описана реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла и его аналогов в различных средах и с участием различных соединений ([1–3]). Было показано, что обратимое восстановление хлорофилла происходит в явной форме лишь в среде органических оснований или при добавлении оснований к иным растворителям: реакция происходит с аскорбиновой и диоксималеиновой кислотами, цистеином, сероводородом и фенилгидразином. При фотовосстановлении хлорофилла «а» образуется промежуточный продукт красного цвета с максимумом поглощения при 525 мμ; в темноте и под действием окислителей происходит обратное образование хлорофилла.

В наших работах показано участие активной фотовосстановленной формы в сенсибилизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакциях ([4, 5]).

В настоящей работе исследуется темновое взаимодействие активной фотовосстановленной формы хлорофилла, обозначаемой ниже ХН, с красителями, обладающими разной величиной окислительно-восстановительного потенциала, простетическими группами ферментов, некоторыми соединениями биохимического значения и неорганическими ионами.

При постановке этих опытов исходной является фотохимическая реакция восстановления хлорофилла a + b аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе. Реакцию осуществляли в вакуумной трубке особой формы, позволяющей установить трубку в кюветодержатель термостатирующего устройства спектрофотометра Бекмана. В трубку вводили 5 мл пиридинового раствора хлорофилла a + b с концентрацией 10^{-5} мол/л и 0,1 мл водного 5% раствора аскорбиновой кислоты. В отвод пробки помещали 1 мл водного или пиридинового раствора исследуемого «окислителя» с концентрацией от 10^{-2} до $5 \cdot 10^{-4}$ мол./л. Трубку с раствором эвакуировали в течение трех минут масляным вакуумным насосом при взбалтывании, затем раствор хлорофилла освещали в течение трех минут в фокусе конденсора киноламповой 500 ватт через красный светофильтр RG-2 при 16°. Зеленый раствор после освещения становился розовым (вследствие фотовосстановления хлорофилла). Трубку немедленно помещали в кюветодержатель термостатирующего устройства спектрофотометра, измеряли коэффициент погашения при 670 мμ, затем приливали из отвода пробки раствор «окислителя» и вели измерения E_{670} через 3-минутные интервалы. Первый отсчет (до слива) делали через 30 сек. после прекращения облучения. Контрольные опыты с 1 мл воды или пиридина ставили в начале и конце серии: на рис. 1—4 приведены средние результаты нескольких контрольных опытов. Таким образом, о скорости обратной реакции окисления восстановленной формы хлорофилла судили по увеличению поглощения света в красном максимуме хлорофилла.

Темновое взаимодействие «окислителей» с аскорбиновой кислотой. Фотореакция осуществляется при значитель-

ном избытке аскорбиновой кислоты, ее концентрация составляет $5 \cdot 10^{-3}$ мол/л; концентрация вводимого «окислителя» в трубке (после слива) составляла $2 \cdot 10^{-3}$—10^{-4} мол/л.

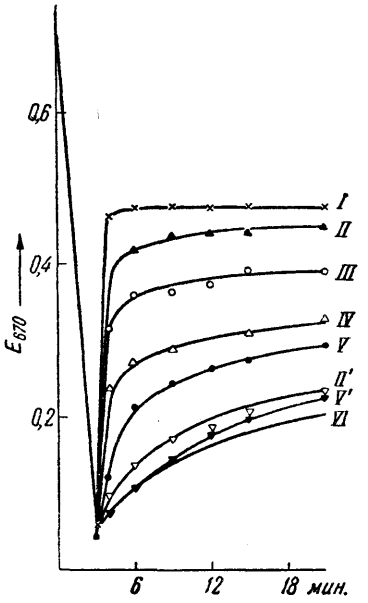


Рис. 1. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16°. *I* —тионин $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *II*— хинон 10^{-2} мол / л, *II'* — хинон $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *III* — метиленовый синий $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *IV* — фенолиндофенол $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *V* — дегидроаскорбиновая кислота $5 \cdot 10^{-2}$ мол / л, *V'* — дегидроаскорбиновая кислота $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *VI* — контроль (вода)

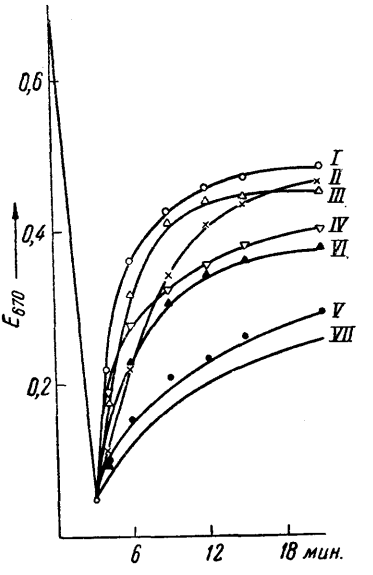


Рис. 2. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16°. *I* — гематин $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *II*— NO_2' 10^{-2} мол / л, *III* — NO_3' 10^{-2} мол / л, *IV* — Fe^{+++} 10^{-2} мол / л, *V* — Cu^{++} 10^{-2} мол / л, *VI* — кислород воздуха, *VII* — контроль (пиридин)

Ряд примененных «окислителей» способен к темновому взаимодействию с аскорбиновой кислотой. Раствор красителя из бокового отвода пробки приливали после откачивания воздуха к раствору аскорбиновой кислоты в пиридине (в темноте). Сразу происходило обесцвечивание следующих красителей (в скобках указано значение окислительно-восстановительного потенциала E_0' в вольтах при pH = 7): фенол-индофенола (+0,23), тионина (+0,062), метиленового голубого (+0,011). Не обесцвечивались нильский синий (—0,12), рибофлавин (—0,22), сафранин Т (—0,29), нейтральный красный (—0,32). Величина E_0' аскорбиновой кислоты в водном растворе составляет +0,060 в, таким образом самопроизвольно должны восстанавливаться красители с более положительным значением E_0', тогда как красители с более отрицательным значением E_0' в темноте не реагируют *. Эти соотношения наблюдаются на опыте, что свидетельствует о приближенном сохранении в случае пиридиновых растворов знака ΔE, полученного из табличных данных для водных растворов. Темновое восстановление аскорбиновой кислотой хинона, нитратов, нитритов и ионов железа известно.

Взаимодействие фотовосстановленной формы хлорофилла с системами, обладающими положительной величиной E_0'. Реакции с различными соединениями

* Одним из нас было ранее показано, что освещение в области поглощения красителя сдвигает равновесие таких систем (5).

этой группы видны из рис. 1, 2. ХН окисляется до хлорофилла красителями (тионин, метиленовый голубой, фенол-индофенол) хиноном, гематином, дегидроаскорбиновой кислотой, ионами Fe^{+++}, NO_2' и NO_3', а также кислородом воздуха.

Так как все эти соединения способны в темноте окислять аскорбиновую кислоту, то возникает вопрос, следствием чего является наблюдаемая обратная реакция: взаимодействия ХН непосредственно с «окислителем» или с окисленной формой аскорбиновой кислоты. Для выяснения этого нами были поставлены опыты с дегидроаскорбиновой кислотой,

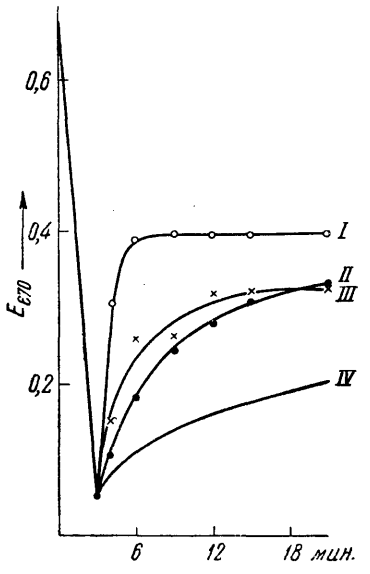


Рис. 3. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16°. *I* — сафранин Т $5 \cdot 10^{-4}$ мол /л, *II* — нейтральный красный $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *III* — нильский синий, $5 \cdot 10^{-4}$ мол /л, *IV* — контроль (вода)

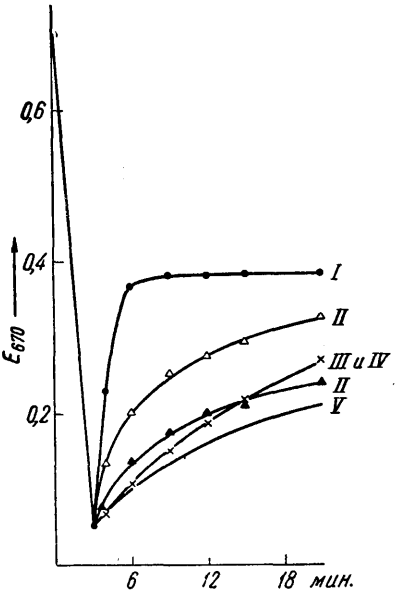


Рис. 4. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16°. *I* — рибофлавин $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, *II* — ДПН 10^{-3} мол / л, *II'* — ДПН $5 \cdot 10^{-4}$ мол / л, *III* — ксантин 10^{-2} мол/л, *IV* — контроль (пиридин), *V* — контроль (вода)

полученной окислением растворов аскорбиновой кислоты на активированном угле в водном растворе ([6]). Определение концентрации дегидроаскорбиновой кислоты производилось обычным способом титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолом после восстановления сероводородом. Из рис. 1 видно, что даже при большой концентрации дегидроаскорбиновой кислоты ($5 \cdot 10^{-2}$ мол/л) скорость обратной реакции значительно ниже, чем в случае красителей с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л. Отсюда следует, что исследованные окислители либо реагируют непосредственно с ХН, либо в результате реакции окислителя с аскорбиновой кислотой образуется ее активная «полуокисленная» форма — монодегидроаскорбиновая кислота, быстро реагирующая с ХН.

Взаимодействие фотовосстановленной формы хлорофилла (ХН) с системами, обладающими отрицательной величиной E_0'. Из рис. 3 и 4 отчетливо видно быстрое окисление фотовосстановленной формы хлорофилла всеми примененными соединениями, не реагирующими в темноте с аскорбиновой кислотой (в скобках — значения E_0' в вольтах): нильский синий* (—0,12 в),

* Нильский синий, в отличие от других примененных здесь соединений, поглощает свет в красной области спектра, поэтому на рис. 3 показан ход изменения *E* хлорофилла за вычетом *E* контрольного опыта без хлорофилла.

сафранин Т (—0,29), нейтральный красный (—0,32), рибофлавин (—0,22), дифосфопиридин-нуклеотид** (ДПН) (~—0,32).

Система ксантин — гипоксантин обладает потенциалом 0,37 в ([7]); ксантин уже не реагирует с фотовосстановленной формой хлорофилла (ХН). Эти опыты показывают, что потенциал системы $XH \rightleftarrows X$ лежит, вероятно, около —0,35 в. Примененный нами здесь метод индикаторов может дать лишь приближенное значение этой величины; в дальнейшем предполагается прямое электрометрическое измерение E_0'.

Предварительные опыты измерения потенциала золотого электрода в водно-пиридиновом растворе хлорофилла с аскорбиновой кислотой показали значительное изменение потенциала после освещения.

Взаимодействие ХН с органическими кислотами. Были испытаны следующие соединения: пировиноградная, щавелевая, яблочная, янтарная, фумаровая, молочная, уксусная, лимонная кислоты при концентрации 10^{-2} мол./л. Лишь в случае яблочной кислоты удалось наблюдать явное ускорение обратной реакции, тогда как щавелевая кислота замедляет реакцию; действие остальных соединений лежит в пределах ошибки контрольного опыта без «окислителя».

Температурная зависимость обратной реакции. Опыты показывают весьма малую зависимость от температуры.

Так, для первых трех минут реакции температурный коэффициент обратной реакции (16 и 26°) без вносимого «окислителя», а также с ДПН и нейтральным красным лежит в пределах 1,1—1,2.

Это приблизительно соответствует величине энергии активации 1,5—3 кал. Столь малая величина энергии активации свидетельствует в пользу высказанного нами представления о том, что ХН является не валентно-насыщенным соединением, а свободным радикалом типа семихинона, существующим в растворе, вероятно в ионной форме ([1]).

Из полученного материала можно сделать следующие заключения.

1. Освещение в области поглощения хлорофилла системы хлорофилл — аскорбиновая кислота приводит к образованию системы, способной восстанавливать соединения с потенциалом до —0,32 в. Предполагается, что E_0' системы после освещения лежит около —0,35 в, что близко к потенциалу фотосинтетической системы хлоропласта.

2. Фотовосстановленная форма хлорофилла реагирует со всеми красителями — окислительно-восстановительными индикаторами и простетическими группами дегидразных ферментов: рибофлавином и дифосфопиридин-нуклеотидом, что указывает на возможный путь переноса фотохимически мобилизованного водорода посредством дегидраз.

3. Восстановленная форма хлорофилла реагирует непосредственно или с участием промежуточной системы (аскорбиновая кислота $\rightleftarrows$ окисленная форма) с гематином, ионами железа, а также с нитритом и нитратом, что указывает на возможный фотохимический путь восстановления соединений азота в зеленой клетке.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терепину за указания и помощь в работе.

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

Поступило
15 VI 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [3] А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949). [4] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949). [5] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948). [6] В. Н. Букин, Биохимия, 8, 61 (1943). [7] D. E. Green, Biochem. Journ., **28**, 1550 (1934). [8] S. Williamson and D. E. Green, Journ. Biol. Chem., **135**, 343 (1940).

** В работе применяли препарат, содержащий 10% ДПН, выделенный нами из дрожжей по методу, близкому к описанному в ([8]); опыты привели к тем же результатам, что и в случае 60% ДПН ([4]) при той же концентрации ДПН в растворе.

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXXIV, № 3

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Т. Н. ГУРЕВИЧ

СВЯЗЬ МЕЖДУ АТМОСФЕРОУСТОЙЧИВОСТЬЮ ПИГМЕНТИРОВАННЫХ КРАСОЧНЫХ ПЛЕНОК И ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫМ ПИГМЕНТАМИ ОБРАЗОВАНИЕМ ПЕРЕКИСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 6 VII 1950)

В 1940 г. одним из нас совместно с В. С. Киселевым ([1-3]) была обнаружена способность двуокиси титана (анатаз) сенсибилизировать к ультрафиолетовой области спектра фотохимическое образование перекисных соединений в органических связующих красочных пленок (льняное масло). Исходя из этих наблюдений, малая атмосфероустойчивость верхнего слоя красочных покрытий, пигментированных двуокисью титана, так называемое „меление", было объяснено фотоокислительным разрушением органического связующего вокруг частиц пигмента. Было также показано, что двуокись титана при адсорбции ионов хрома, кобальта и других металлов фотохимически дезактивируется, что сопровождается изменением ее технических свойств ([3]).

Наши опыты показали, что фотохимическое действие окиси цинка не проявляется в безводных органических средах, а становится явным лишь в водной среде, что может быть поставлено в связь с известной реакцией фотосенсибилизированного окисью цинка образования перекиси водорода из кислорода и воды ([4]); TiO_2 в подобных условиях не приводит к образованию измеримого количества H_2O_2 ([2]).

Присутствие в водном растворе ряда органических соединений — глицерина, глюкозы, органических кислот — значительно увеличивает количество образующейся под действием ZnO перекиси ([4,2]). Возникающие в процессе образования и старения пленки водорастворимые органические соединения (в том числе глицерин) способствуют накоплению перекисей при действии ультрафиолетового излучения на ZnO и тем самым приводят к ускоренному окислению органического материала связующего.

Таким образом, технический недостаток наиболее распространенных титановых и цинковых белых пигментов, так называемое „меление" покрытий, можно связать со способностью этих пигментов сенсибилизировать к ультрафиолетовой области спектра фотоокислительные процессы с промежуточным образованием перекисных соединений. TiO_2 и ZnO обладают длинноволновой границей поглощения, лежащей около 400 мμ.

Ниже излагается опытный материал, показывающий связь между фотохимической активностью ZnO и TiO_2 и поведением пигментированных ими льняно-масляных пленок в условиях ускоренных испытаний атмосфероустойчивости.

Фотохимическая активность титановых пигментов определялась в системе моделирующей красочную пленку суспензии пигмента

в растворе связующего (льняного масла). Окисление ненасыщенных жирных кислот масла происходит, в соответствии с теорией А. Н. Баха, путем первичного образования перекисных соединений.

Исследовалось образование перекисей и ход общего поглощения кислорода в гетерогенной системе пигмент — раствор льняного масла или линолевой кислоты в темноте и при освещении. Для определения перекисей применялся колориметрический микрометод, основанный на измерении интенсивности окраски, возникающей при взаимодействии Fe^{+++} с CNS^- в спиртовом растворе; Fe^{+++} образуется при окислении Fe^{++} перекисным соединением (5).

Состав раствора для определения перекисей: в 100 мл сухого метанола растворяют избыток железо-аммиачных квасцов (Fe^{+++}) до насыщения, добавляют 0,5 г роданистого аммония и 0,5 мл 25% серной кислоты. Перед использованием раствора, обладающего светло-розовой окраской, снимали калибрационную кривую по метаноловому раствору железо-аммиачных квасцов (Fe^{+++}) известной концентрации, с помощью колориметра или фотометра (через зеленый светофильтр), против водного раствора хлористого кобальта, примененного в качестве постоянного стандарта в связи с неустойчивостью раствора реактива при хранении.

Для определения к 6 мл спиртового раствора реактива добавляли 0,2 мл 10% толуолового или спиртового раствора ненасыщенного соединения, содержащего перекиси. Окраска сравнивалась в колориметре с окраской стандартного раствора; количество перекиси находили с помощью калибрационной кривой. Этот метод дает более высокие результаты по сравнению с обычными модификациями иодометрического метода.

Общее поглощение кислорода при реакции определяли манометрическим методом Варбурга, распространенным в практике биохимических исследований, по убыли парциального давления кислорода над реагирующей системой.

Реакционный сосуд прибора помещали в темноте, либо на расстоянии 5 см от лампы накаливания 150 вт, расположенной в ванне термостата. В сосуд вводили 100 мг порошка пигмента и смачивали 3 мл толуола (или спирта); в боковое плечо сосуда вводили 0,75 мл раствора ненасыщенного соединения (в толуоле или этаноле). После термостатирования посредством наклонения прибора раствор масла приливали к пигменту.

С помощью водяного манометра прибора измеряли падение парциального давления кислорода над реагирующей системой во времени. Зависимость количества поглощенного кислорода от времени была линейной во всех случаях, реакция следовала нулевому порядку. Опыты велись при температуре 40° в течение 2 часов.

В области излучения лампы накаливания (коротковолновая граница около 350 мμ) поглощают свет пигменты и связующее — льняное масло и линолевая кислота. Измерялась скорость фотохимического окисления ненасыщенного соединения без пигмента (K_1), скорость каталитической реакции в темноте с пигментом (K_2), скорость общей световой реакции (K_3). При отсутствии фотосенсибилизирующего действия в общем случае $K_3 < K_1 + K_2$, так как экранирующее действие порошка пигмента приводит к уменьшению слагаемого K_1 в суммарной реакции.

При $K_3 < K_1 + K_2$ фотосенсибилизирующее действие пигмента $\Phi = K_3/(K_1 + K_2)$ нужно считать явным.

Количество кислорода, связанного в форме перекиси, обычно составляло 40—60% от общего количества поглощенного кислорода.

Для ускоренных испытаний атмосферостойчивости пигменты затирали с льняной олифой и наносили 2 слоя на железные пластинки.

Таблица 1

Титановые пигменты (K выражено в мм³ поглощенного кислорода в минуту)

Пигмент	K_1	K_2	K_3	Φ	Время наступления „меления" верхнего слоя покрытия в часах
Двуокись титана (анатаз)	1,66	0,31	5,0	2,5	48
Двуокись титана (рутил)	1,66	0,0	1,15	0,7	216
Двуокись титана (анатаз), обработ. ионами Cr^{+++}	1,66	4,62	2,18	1,2	144
Титанат свинца	0,67	0,22	0,43	0,5	264

Высохшие пленки испытывали в приборе для ускоренных испытаний (везерометр) при освещении угольной дугой 2000 вт*.

Опыты показывают, что двуокись титана со структурой анатаза обладает наиболее высоким сенсибилизирующим действием при образовании перекисных соединений в связующем и его окислении; соответственно, „меление" анатаза в покрасках наступает весьма быстро, через 48 час. испытаний. Двуокись титана, обладающая структурой рутила, менее активна фотохимически и более устойчива в отношении „меления"; титанаты свинца, цинка и магния фотохимически неактивны и практически не „мелят". Вообщее фотохимическая и каталитическая активность зависит не только от природы, но и от величины удельной поверхности пигмента. Более правильно сравнивать свойства этих пигментов, относя их к единице удельной поверхности порошка. Грубое определение этой величины с помощью примененного нами измерения количества десорбируемого газа при смачивании ([6]) показало, что испытанные образцы рутила и титанатов вообще обладают меньшей удельной поверхностью, чем молярная двуокись титана, имеющая структуру анатаза. Так например, удельная поверхность образцов со структурой анатаза составляла около 8—9 м²/г, рутила 5—6 м²/г.

Для испытания фотохимической активности ZnO вышеописанный способ мало пригоден, вследствие сравнительно малой активности ZnO в неводных средах.

По сравнению с прямым определением количества образованной в водной суспензии перекиси водорода более удобно измерение сенсибилизированного ZnO деструктивного окисления красителей. Мы измеряли выцветание метиленового голубого в водной суспензии ZnO.

На 20 мл раствора красителя с концентрацией 1,10 г/м² брали 0,2 г ZnO. Стеклянные пробирки с суспензией закрепляли радиально на вращающемся диске (60 об/мин) на расстоянии 30 см от ртутно-кварцевой лампы ПРК-2. После 15 мин. облучения суспензии отфуговывались и раствор красителя фотометрировался через красный светофильтр.

Контрольный опыт в темноте показывает величину адсорбции красителя. В табл. 2 показан процент оставшегося после взаимодействия с ZnO красителя (выцветания раствора красителя без ZnO в условиях 10—15-минутного освещения не наблюдается). Испытание атмосфероустойчивости покрасок с окисью цинка производилось так же, как и в случае титановых пигментов.

Приведем результаты наблюдений о связи между флуоресценцией и фотохимической активностью пигментов. При возбуждении группой ртутных линий при 365 мμ двуокись титана обладает весьма слабым темнокоричневым свечением. Муфельная окись цинка обладает яркой

* Испытания производились под руководством С. В. Якубовича.

желтой флуоресценцией, ослабляющейся при термической обработке. Окись цинка, полученная прокаливанием карбонатов, обладает темно-коричневой флуоресценцией.

Среди испытанных образцов обычно наименее фотохимически активные обладали наименее яркой флуоресценцией. Неясно, однако, в какой мере нарушения кристаллической решетки окиси цинка, определяющие флуоресценцию, определяют также ее фотосенсибилизирующее действие.

Таблица 2

Окись цинка

Пигмент	Адсорбция красителя в %	Выцветание красителя в %	Время наступления „меления" верхнего слоя в часах
Цинковые белила муфельные	4	80	48
Окись цинка, получ. прокаливанием углекислого цинка из муфельных цинковых белил	1	2	>240
Окись цинка, получ. прокаливанием хим. чистого $ZnCO_3$	6	13	>240
Цинковые белила образец 1	4	78	48
„ „ „ 2	5	38	96
„ „ „ 3	7	17	192

Полученные данные показывают связь между фотохимической активностью окиси цинка и двуокиси титана и атмосфероустойчивостью пигментированных ими покрытий. Эта зависимость определяется фотосенсибилизированными пигментами образованием перекисных соединений, приводящих к ускоренному разрушению (фотоокислению) связующего вокруг частиц пигмента верхнего слоя покрытия, следствием чего является так называемое „меление" ([1,2]).

Поступило
6 VII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский и В. С. Киселев, Журн. пром. орг. химии, **7**, 604 (1940). [2] А. А. Красновский, Диссертация, Моск. хим. технол. ин-т им. Д. И. Менделеева, 1940. [3] А. А. Красновский и В. С. Киселев, Журн. хим. пром., **18**, № 6, 20 (1941). [4] E. Baur u. C. Neuweiler, Helv. chim. Acta, **10**, 901 (1927). [5] А. А. Красновский, ЖОХ, **10**, 1094 (1940). [6] А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, Колл. журн., **11**, 172 (1949).

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXXV, № 5

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Т. Н. ГУРЕВИЧ

О ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ ОКИСЛОВ МЕТАЛЛОВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 11 IX 1950)

Л. В. Писаржевский и сотрудники ([1]) наблюдали при освещении ускорение разложения растворов перекиси водорода, катализированное перекисью свинца и другими соединениями. В работе одного из нас совместно с Г. П. Брин было обнаружено ускорение каталитического окисления растворов аскорбиновой кислоты при освещении в присутствии суспензии фталоцианинов и окиси меди ([2]). Ниже излагаются некоторые наблюдения о действии света на реакции в гетерогенных системах окисел металла — раствор.

Наблюдалось действие окислов на следующие реакции: 1) окисление кислородом воздуха линолевой кислоты и льняного масла в толуоловом и спиртовом растворах, 2) разложение водных растворов перекиси водорода.

Окислы цинка и титана белого цвета начинают поглощать свет уже в близком ультрафиолете (от 410—400 мμ и далее в сторону коротких волн). Окислы хрома, железа и свинца окрашены и поглощают также в видимой области спектра.

В качестве источника света, возбуждающего фотокаталитическую реакцию, применялась обычная лампа накаливания 200 вт. В области испускания этого источника света поглощают также и компоненты сенсибилизированной реакции. Выделение участка спектра, в котором поглощал бы свет лишь окисел металла, но не реагирующие вещества, в исследованных системах было трудно достижимо во всех случаях.

Поэтому в опытах контролировалось прямое фотохимическое действие освещения на систему без окисла металла. Чтобы сделать заключение о наличии положительного фотокаталитического эффекта, следовало измерить скорость: темновой каталитической реакции (K_1), прямой фотохимической реакции без окисла (K_2) и суммарной реакции при освещении в присутствии окисла (K_3). В случае явного фотокаталитического действия значение K_3 больше суммы $K_1 + K_2$.

Начальный период реакции окисления ненасыщенных кислот масла и разложения перекиси водорода следует нулевому порядку, что облегчает технику измерения (в табл. 1 и 2 K выражено в мм^3 поглощенного или выделенного O_2 в мин.).

Окисление ненасыщенных соединений. Опыты производились с суспензией окисла металла в спиртовом или толуоловом растворе льняного масла или линолевой кислоты. Окисление этих соединений происходит, в соответствии с теорией А. Н. Баха, путем первичного образования перекисных соединений. Образование перекисей измеряли с помощью колориметрического микрометода; ход общего поглощения кислорода измеряли посредством микроманометрического метода (Варбурга), распространенного в практике биохимических исследований. Эти

методы более подробно описаны в другом месте ([2], [3]). Опыты ставились в темноте и при освещении лампой накаливания 200 вт, расположенной в ванне термостата на расстоянии 6 см от реакционного сосуда. Льняное масло перед опытом прогревалось в вакууме для разрушения присутствующих в нем перекисных соединений. Результаты опытов показаны в табл. 1. Из них видно, что в данной системе явным сенсибилизирующим действием обладают лишь двуокись титана (рутил менее активен, чем анатаз) и окислы свинца; менее активна окись цинка и неактивны окислы железа и хрома.

Таблица 1

Окисление растворов льняного масла и линолевой кислоты при 40°

(0,2 г окисла, 3 мл растворителя, 1 мл 10 % раствора ненасыщенного соединения; а — линолевая кислота в этанале, б — льняное масло в толуоле)

Окисел	K_1		K_2		K_3		$\Phi=K_3/(K_1+K_2)$	
	а	б	а	б	а	б	а	б
TiO_2 . . .	0,39	1,31	0,67	1,66	4,3	5,0	4,0	2,5
ZnO . . .	1,77	1,60	0,67	1,66	1,87	2,55	0,79	0,76
Fe_2O_3 . . .	0,0	0,38	0,67	1,66	0,0	1,50	—	0,75
Pb_3O_4 . . .	0,79	1,65	0,67	1,66	4,12	4,18	2,8	1,26
PbO	2,46	—	0,67	—	5,05	—	1,6	—
Cr_2O_3 . . .	0,20	—	0,67	—	0,22	—	0,25	—

Примечание. Окись цинка получали прокаливанием химически чистого карбоната цинка; двуокись титана — со структурой анатаза, содержащая ок. 98% TiO_2; окись железа, окись хрома и окислы свинца — чистые реактивные.

Более детально исследовались свойства двуокиси титана; при этом были получены некоторые данные о влиянии состояния поверхности частиц на фотохимическое и каталитическое действие. Способы изменения поверхности TiO_2 были те же, что и в нашем исследовании десорбции газов при смачивании порошков двуокиси титана ([4]). Эти опыты также производили в двух растворителях — этиловом спирте, содержащем 5—6% воды, и сухом толуоле. В спирте во всех случаях реакция идет медленнее, что объясняется тормозящим действием воды, адсорбирующейся на поверхности частиц двуокиси титана. Однако величина коэффициента $\Phi = K_3/(K_1 + K_2)$, характеризующего фотохимическую активность пигмента, была близка в обоих растворителях. Воздушно-сухие порошки двуокиси титана содержат связанную воду, которая не удаляется в условиях сушки при 110°; в случае прокаливания при 600° удаляется больше адсорбированной воды: каталитическая активность титановых пигментов после прокаливания при 600° сильно возрастает. Однако этот эффект не наблюдается в случае двуокиси титана, обработанной раствором щелочи. Ранее мы установили, что адсорбированные ионы OH препятствуют гидратации поверхности частиц двуокиси титана ([4]). Эти наблюдения объясняют одинаковую каталитическую активность высушенных и прокаленных образцов, обработанных водным раствором щелочи.

Фотохимическая активность высушенных и прокаленных образцов была подобна по величине. Обработка растворами щелочей и кислот, изменяющая количество адсорбированных ионов OH на поверхности частиц TiO_2, не приводила к значительному изменению каталитической и фотохимической активности у прокаленных образцов.

Адсорбция ионов Cr^{+++} и Co^{++} (при коагуляции растворами солей стабилизированных щелочных суспензий TiO_2) в количестве около 10^{-4} г ионов на 1 г TiO_2 приводит к значительному увеличению каталитического действия и уменьшению фотохимической активности ([4], [5]).

Разложение перекиси водорода. Измерение производилось с помощью микроманометрического метода (по увеличению парци-

ального давления кислорода над суспензией пигмента в растворе перекиси водорода). Начальный период реакции также следует нулевому порядку. Опыты ставились в темноте и при освещении лампой накаливания 200 вт. Явное фотокаталитическое действие на разложение перекиси водорода наблюдается лишь в случае окислов титана, цинка и свинца (рис. 1).

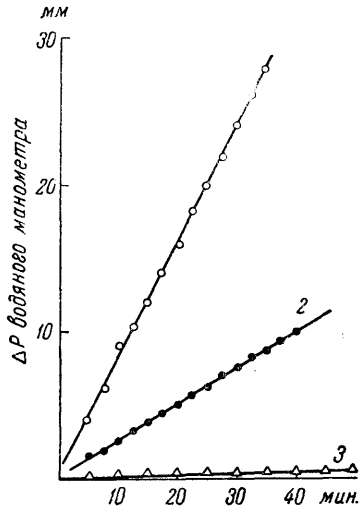


Рис. 1. Разложение раствора перекиси водорода (1,5%) под действием двуокиси титана при 40°. *1* — опыты при освещении, *2* — опыты в темноте, *3* — раствор перекиси водорода при освещении без TiO_2

В. И. Веселовский ([13]) обнаружил фотокаталитическое действие электрода $Fe \cdot Fe_2O_3$ на разложение перекиси водорода при действии ультрафиолетового излучения; в наших опытах применение видимого света не давало явного эффекта.

Ставились также опыты действия света на каталитическое разложение растворов перекиси бензоила в толуоле под действием окислов металлов. Количество перекиси в растворе определяли обычным иодометрическим методом. Ускоряющего действия света для всех перечисленных в таблице окислов металлов не удалось наблюдать.

Пока неясно, с какими особенностями структуры данного полупроводника связана его фотохимическая активность. ZnO обладает видимой флуоресценцией (при возбуждении группой линий ртути при 366 мμ), тогда как видимая флуоресценция TiO_2 незначительна и наблюдаема явно лишь при температуре жидкого воздуха, а окислы свинца и кристаллические фталоцианины вообще не флуоресцируют в видимой области. Также не удалось наблюдать явной фосфоресценции окислов свинца и титана. ZnO([6]) и Pb_3O_4 обладают фотопроводимостью; о фотопроводимости TiO_2 в известной нам литературе нет данных.

Таблица 2

Разложение растворов перекиси водорода при 40°

(0,1 г пигмента в 3 мл воды, 1 мл раствора H_2O_2)

Окислы	K_1	K_2	K_3	Φ	Концентрация H_2O_2 в %
ZnO	17,5	0,1	20,0	1,14	1
TiO_2	1,2	0,1	5,6	4,6	1
Fe_2O_3	4,1	0,1	4,4	1,05	1
Cr_2O_3	0,4	0,1	0,4	0,8	1
Pb_3O_4*	1,04	0,03	5,52	5,3	0,03
PbO*	3,25	0,03	9,75	3,0	0,03

* Для окислов свинца навеска 0,01 г, опыты при 25°.

А. Н. Теренин ([7]) предложил общую схему механизма фотосенсибилизированных реакций для полупроводников, обладающих электронным и «дырочным» (дефектным) типом проводимости, исходящую из представления об электронном переходе между твердым телом и адсорбированными на нем молекулами.

Один из нас ([8]) изложил в свое время упрощенную схему гетерогенных сенсибилизированных и каталитических окислительно-восстановительных реакций, основанную на представлении о перемещении электрона между реагирующими адсорбированными молекулами через посредство общей электронной системы кристаллической решетки

твердого тела; переход электрона в зону проводимости при поглощении кванта света кристаллической решеткой катализатора облегчает возможность электронного перехода между адсорбированной молекулой и поверхностью и вследствие этого снижает энергию активации процесса. Акты восприятия и отдачи электрона могут происходить на различных типах активных центров поверхности микрокристаллов. Обнаруженное в наших работах десенсибилизирующее действие адсорбированных ионов тяжелых металлов, вероятно, связано с обратимым приемом и отдачей электрона; мы уже указывали на связь между окислительно-восстановительным потенциалом адсорбированного иона и его десенсибилизирующим действием ([5], [8]).

Вообще можно, однако, представить, что снижение потенциального барьера реакции при освещении твердой фазы может быть также связано с восприятием адсорбированными молекулами реагирующих соединений вибрационной энергии, возникающей в процессе деградации энергии кванта света в кристаллической решетке твердого тела ([9]). На эту возможность указывает малое полезное использование кванта света, поглощенного полупроводником для «химических» нужд. Так, в случае сенсибилизированного кристаллическими фталоцианинами фотоокисления аскорбиновой кислоты ([2]), при поглощении кванта света с энергией 40—60 ккал., энергия активации световой реакции лишь на 3—4 ккал. ниже, чем у темнового каталитического процесса, т. е. лежит в пределах возможности вибрационного кванта.

В случае сенсибилизированного окисления кислородом вероятно фотохимическое образование промежуточных соединений типа перекисей на активных центрах поверхности частиц, реагирующих с окисляемой молекулой (по типу исследованных нами реакций в растворах ([12])), и дальнейшие цепные реакции в объеме раствора, идущие с участием перекисного соединения масла.

В случае сенсибилизированных окисью цинка реакций в водном растворе вероятно также первичное образование H_2O_2 или радикалов OH ([10], [11]) и вторичные реакции в растворе (TiO_2, по нашим наблюдениям ([8]), не сенсибилизирует реакции образования H_2O_2). Сенсибилизированное разложение водного раствора перекиси водорода, вероятно, индуцируется свободными радикалами, образованными на поверхности полупроводника при разложении адсорбированной молекулы H_2O_2 за счет энергии кванта света. При значительной концентрации перекиси водорода скорость разложения на окиси цинка превышает скорость сенсибилизированного ее образования ([10]). Описанные примеры показывают возможность изменения активности некоторых катализаторов при освещении, происходящую вследствие наложения фотосенсибилизирующего действия на каталитическое (см. также ([2])).

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и постоянный интерес к этой работе.

Поступило
11 IX 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Л. В. Писаржевский, Р. К. Корабельник и Е. С. Ринская, Изв. АН СССР, ОМЕН, 931 (1934). [2] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946). [3] А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, ДАН, **74**, № 3 (1950). [4] А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, Колл. журн., **11**, 172 (1949). [5] А. А. Красновский и В. Г. Киселев, Журн. хим. пром., **18**, № 6, 23 (1941) [6] Е. К. Пуцейко и А. Н. Теренин, ЖФХ, **23**, 676 (1949). [7] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [8] А. А. Красновский, Диссертация МХТИ им. Менделеева, 1940. [9] А. Н. Теренин и А. А. Красновский, Усп. физ. наук, **37**, 65 (1949). [10] E. Baur and C. Neuweiler, Helv. Chim. Acta, **10**, 901 (1927). [11] В. И. Веселовский, ЖФХ, **22**, 1427 (1948). [12] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947). [13] В. И. Веселовский, ЖФХ, **23**, 1095 (1949).

Доклады Академии Наук СССР
1950. Том LXXIV, № 4

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Я. Л. ШЕХТМАН, А. А. КРАСНОВСКИЙ и И. В. ВЕРЕЩИНСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЦВЕТАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО ГОЛУБОГО ПОД ДЕЙСТВИЕМ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

(Представлено академиком А Н Терениным 17 VII 1950)

В целях изучения закономерностей, связанных с механизмом действия радиации на водные растворы органических веществ, было исследовано выцветание водного раствора метиленового голубого под действием рентгеновских лучей.

Раствор метиленового голубого в 0,1 *N* серной кислоте отличается большой устойчивостью при хранении и достаточной чувствительно-

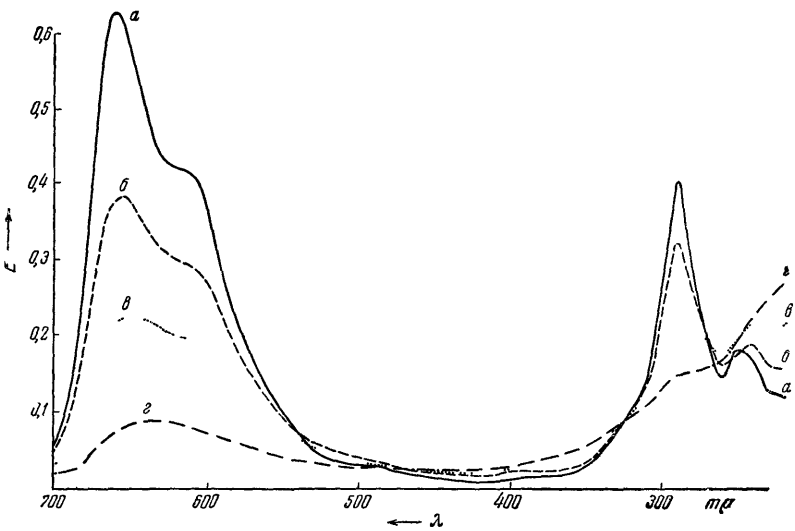


Рис. 1. Спектр поглощения метиленового голубого. *а* — до облучения, *б*, *в*, *г* — после облучения дозами, соответственно, 5, 10 и 20 kr. Измерения через каждые 10 мμ

стью к облучению. Под деистием облучения происходит необратимый деструктивный распад красителя — его выцвстание.

Раствор кристаллического метиленового голубого в 0,1 *N* серной кислоте имеет широкую полосу поглощения 670—580 мμ с четким максимумом при 660 мμ, отвечающим мономерной форме красителя, и вторым менее выраженным максимумом при 610 мμ, обусловленным димерной формой (см. рис. 1).

Следует отметить, что выцветание мономера при облучении происходит быстрее, чем выцветание димера. Подобное явление относительной устойчивости димерной формы часто наблюдается при фотохимических реакциях красителей [1].

Молярный коэффициент погашения кристаллического препарата метиленового голубого, измеренный на фотоэлектрическом спектрофотометре типа Бекмана, при 660 мμ, составляет $\varepsilon = 6{,}18 \cdot 10^4$.

Облучение производилось на полуволновом рентгеновском аппарате с конденсаторами, выравнивающими пульсации напряжения, на трубке типа Т-180. Для установления влияния колебаний напряжения в сети в цепь питания накала трубки был включен феррорезонансный стабилизатор. Ток, проходящий через трубку, контролировался миллиамперметром, а напряжение на трубке — вольтметром, включенным в первичную цепь высоковольтного трансформатора. Мощность дозы измерялась ионизационным дозиметром типа УД-ГРИ, градуированным в рентгенах [2].

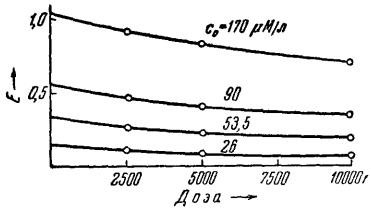


Рис. 2. Выцветание метилового голубого в зависимости от дозы рентгеновских лучей при различных концентрациях

Контроль постоянства показаний дозиметра обеспечивался радиоактивным препаратом, вводимым непосредственно в ионизационный объем. В измеренную мощность дозы вносилась поправка на квадрат расстояния и на поглощение в воздухе.

Общая доза на поверхности препарата определялась путем умножения мощности дозы на время облучения. Облучение производилось при напряжении 100 кв, токе 5 ма, с фильтром 1 мм картона. Мощность дозы составляла около 250 r / мин. Время облучения для разных доз менялось от 10 до 40 мин.

Облучение проводилось в стеклянных чашках высотой 30 мм и диаметром 47 мм. Чашки располагались симметрично в поле трубки на расстоянии 20 см от фокуса. Количество жидкости в каждой чашке было 6 мл. Сверху чашки покрывались листовым целлофаном для предупреждения испарения. Защиту от теплового действия обеспечивал картонный фильтр.

В ходе опытов выяснилась чувствительность реакции к примесям. Так, после обработки чашек хромовой смесью с последующей тщательной промывкой водой, адсорбированные на стенках следы хромата увеличивали выцветание под действием облучения.

Большое влияние оказывает и материал чашек. Так, облучение в эбонитовых чашках дает выцветание на 14% большее, чем в стеклянных чашках. Поэтому все опыты проводились в одних и тех же пронумерованных стеклянных чашках, промытых водой, но без обработки хромовой смесью.

Измерение коэффициента погашения E проводилось на фотоэлектрическом спектрофотометре типа Бекмана при $\lambda = 660$ мμ. Количество разложившегося вещества Δc определялось по изменению величины коэффициента погашения ΔE следующим образом:

$$\Delta c = \frac{\Delta E}{\varepsilon} = \frac{\Delta E}{6{,}18 \cdot 10^4} = 16{,}3 \Delta E \ \mu M / л.$$

Результаты измерений представлены на рис. 2 и 3. На рис. 2 показано изменение коэффициента погашения E в зависимости от дозы при различных исходных концентрациях облучаемого раствора. При рассмотрении рис. 2 обращает на себя внимание близкий к прямолинейному ход кривых для всех исследованных концентраций.

На основании результатов измерений может быть вычислен выход реакции в молекулах на пару ионов. Из кривых рис. 2 при дозе 10 000 r, в среднем для всех исследованных растворов, выход реакции составляет от 0,147 до 0,57 $\mu M/л \cdot 1000$ r, или от 0,054 до 0,21 молекул на пару ионов.

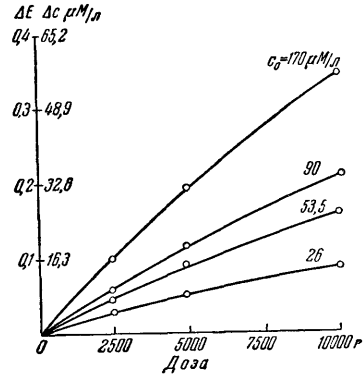


Рис. 3. Выход реакции выцветания метиленового голубого под действием рентгеновских лучей для различных концентраций

Полученные результаты согласуются с данными ряда авторов ([3,4]) о величинах ионного выхода радиохимических реакций, происходящих в водных растворах органических и неорганических соединений.

Нами было исследовано также влияние добавки хинона, гидрохинона, глюкозы и глицерина к раствору. Результаты опытов представлены на рис. 4. Полученные данные показывают, что прибавление к раствору красителя посторонних органических соединений оказывает значительное блокирующее действие.

Эти результаты могут служить подтверждением общепринятой теории действия радиации в водных растворах, согласно которой радиохимические реакции являются результатом воздействия радиации в основном не на растворенное вещество, а на воду, посредством образования в воде активных продуктов (радикалов и ионов), которые в свою очередь взаимодействуют с растворенным веществом. Блокирующее действие вводимых органических соединений следует объяснить их взаимодействием с образующимися в воде радикалами и ионами.

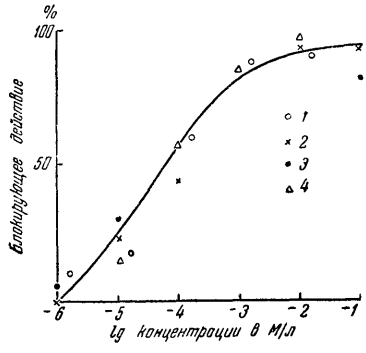


Рис. 4. Блокирующее действие органических соединений на выцветание метиленового голубого. Доза рентгеновских лучей 10 000 r. *1* — глицерин, *2* — глюкоза, *3* — гидрохинон, *4* — хинон

Удовлетворительная воспроизводимость реакции выцветания и ее достаточная чувствительность к дозам от 1—2 до 15—25 килорентгенов позволяет применить ее в ряде случаев в качестве „рентгено-химического дозиметра". При этом возможно использование более простых фотометрических приборов (например, фотометра Пульфриха).

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

Поступило
7 VI 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, 1947, стр. 91. [2] Я. Л. Шехтман, Изв. АН СССР, ОМЕН, **12**, 125 (1930); Советская рентгенология, **1**, 127 (1934). [3] E. Gallico and Cancerino, Experientia, **4**, 109 (1948). [4] D. E. Lea, Actions of Radiations on Living Cells, Cambridge, 1946, p. 46.

Академия Наук СССР
Биохимия
Том 16. Вып. 5. 1951

Г. П. Брин и А. А. Красновский

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ С РАЗЛИЧНОЙ ВЕЛИЧИНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕЗ И ДЫХАНИЕ ЭЛОДЕИ

Влияние соединений с различной величиной окислительно-восстановительного потенциала на фотосинтез и дыхание элодеи

Г. П. Брин и *А. А. Красновский*

Институт биохимии Академии Наук СССР, Москва

В предыдущих работах нашей лаборатории была показана способность хлорофилла к обратимому фотовосстановлению посредством ряда соединений [1, 2] и возможность переноса водорода (электрона) активной фотовосстановленной формы хлорофилла к окисленным формам простетических групп дегидразных ферментов (рибофлавину и дифосфопиридиннуклеотиду) и некоторым красителям [3, 4, 5]. На основании этих опытов было высказано предположение, что дегидразные ферменты связывают фотохимическую и темновую стадии фотосинтеза, воспринимая «активный» водород (электрон) фотовосстановленной формы хлорофилла и передавая его в систему темновых ферментативных реакций, ведущих к связыванию и восстановлению углекислоты [3]. Дегидразная активность хлоропластов была установлена в работах Н. М. Сисакяна с сотрудниками [6].

С целью получения данных о возможной природе промежуточных систем, управляющих переносом водорода (электрона) при фотосинтезе в живой клетке, нами поставлены опыты, в которых исследовалось влияние различных соединений на фотосинтез и дыхание элодеи.

I. Испытанные соединения

Было испытано действие следующих групп соединений:

1. Прижизненные красители — окислительно-восстановительные индикаторы, обратимо восстанавливающиеся «активным водородом» продуктов обмена веществ.

2. Антибиотические соединения, вероятно, избирательно отравляющие ферментативные системы.

3. Соединения, участвующие в биохимических окислительно-восстановительных процессах,— аскорбиновая кислота, рибофлавин, дифосфопиридин-нуклеотид (ДПН), а также некоторые неорганические ионы: NO_3', NO_2', Fe^{++}.

В работе испытывались большей частью вещества химически чистые, кристаллические, реактивные без дополнительной очистки. р-хинон возгоняли перед опытом. Фенолиндофенол синтезировали в лаборатории видоизмененным методом Геллера [6]. ДПН выделяли из пекарских дрожжей, следуя в основном опубликованному методу [8]. Содержание ДПН, определенное спектрофотометрическим способом в наших препаратах, было 15—16% (по величине коэффициента погашения восстановленной формы при 340 mμ. Раствор дегидроаскорбиновой кислоты был получен путем окисления аскорбиновой кислоты кислородом воздуха на активированном угле [9]. Концентрацию дегидроаскорбиновой кислоты определяли титрованием дихлорфенолиндофенолом восстановленной сероводородом дегидроаскорбиновой кислоты (после удаления H_2S путем продувания через раствор азота).

Антибиотические соединения: грамидицин С (в растворе), пенициллин и стрептомицин (кристаллические) были нам любезно предоставлены М. П. Знаменской и А. Г. Пасынским, которым приносим глубокую благодарность.

II. Метод измерения фотосинтеза и дыхания

Кислородный обмен элодеи при дыхании и фотосинтезе измеряли манометрическим методом (Варбурга) в карбонат-бикарбонатном буфере. При этом изменение давления газа в сосуде определяется лишь кислородным обменом, так как парциальное давление углекислоты остается постоянным. Опыты вели в плоских сосудах спе

циальной формы с боковым отводом при 25° (рис. 1). Освещение осуществлялось лампой накаливания в 150 ватт, помещенной в ванну термостата на расстоянии 6 см от дна сосуда через красный светофильтр RG-2 (5 мм). В сосуд вводили 1 г вегочек элодеи и 10 мл карбонатбикарбонатного буфера с pH 9,08 (8,5 мл $NaHCO_3$ 0,1 *М* и 1,5 мл Na_2CO_3 0,1 *М*), 1 мл испытуемого соединения вводили в боковой отвод сосуда. Ставили по два параллельных опыта. После термостатирования в темноте в течение 12 мин. измеряли поглощение кислорода при дыхании. Затем сосуд ставили над лампой и 12 мин. измеряли газообмен фотосинтеза, после чего из бокового отвода приливали испытуемое соединение и измеряли газообмен в течение 30 мин., затем сосуды снова переставляли в темноту и измеряли газообмен дыхания в присутствии испытуемого соединения.

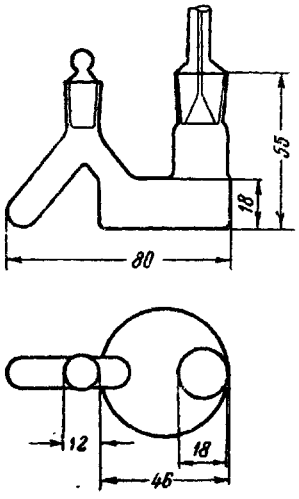


Рис. 1. Вид манометрического сосуда с плоским дном и боковым отводом

В другом варианте опытов измерялось дыхание и фотосинтез элодеи, предварительно обработанной водным раствором испытуемого соединения. 5 г элодеи выдерживали 30 мин. в 50 мл раствора красителя или другого соединения с концентрацией 10^{-3} и 10^{-4} *М*, затем однократно промывали водой и сразу ставили манометрический опыт; контрольный опыт ставили без предварительного вымачивания. Соединения для этих опытов не должны поглощать света в области пропускания светофильтра RG-2 (красная граница 620 mμ) с тем, чтобы избежать их экранирующего действия на поглощение света хлорофиллом.

Данные опытов, приведенные в таблицах, получены нижеследующим образом.

Как видно из рис. 2, процесс поглощения кислорода при дыхании до и после введения добавки является прямолинейным, скорость его выражается тангенсом угла наклона прямой к оси абсцисс. Сравнение тангенсов углов наклона прямых (дыхания) до и после реакции фотосинтеза дает возможность судить о влиянии добавки на скорость поглощения кислорода при дыхании. Начальная скорость этого процесса до фотосинтеза, выраженная, как $\operatorname{tg}\alpha$ (рис. 3) принята за 100%. Изменение скорости после фотосинтеза выражено в процентах $\frac{\operatorname{tg}\beta}{\operatorname{tg}\alpha}100$.

Процесс выделения кислорода при фотосинтезе без добавок также изображается прямой линией, тангенс угла наклона которой к оси абсцисс выражает скорость этого процесса. Наблюдаемое выделение кислорода при освещении отражает суммарный газообмен фотосинтеза и дыхания; поэтому «истинная» скорость выделения кислорода при фотосинтезе выразится разностью $\operatorname{tg}\alpha' - \operatorname{tg}\alpha$. При этом мы исходили из того допущения, что дыхание одинаково в темноте и при освещении. После введения добавок выделение кислорода не всегда идет по прямой, очевидно, вследствие увеличения количества диффундирующего в клетку красителя со временем.

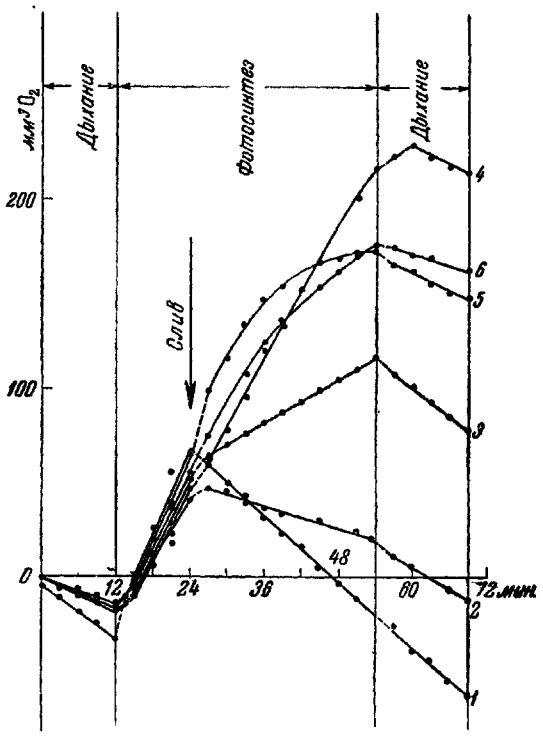


Рис. 2. Кривые фотосинтеза и дыхания элодеи. Растворы красителей приливаются из бокового отвода сосуда на 12-й минуте фотосинтеза:

1 — хинон; *2* — тионин; *3* — нильский синий, *4* — рибофлавин; *5* — сафранин Т; *6* — нейтральный красный. Концентрация в боковом отводе сосуда 10^{-3} *М*

В тех случаях, когда ход фотосинтеза выражается прямой линией, изменение скорости под влиянием добавки выражается соотношением $\frac{\operatorname{tg}\beta' - \left(-\frac{\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{tg}\beta}{2}\right)}{\operatorname{tg}\beta - (-\operatorname{tg}\alpha)} \cdot 100$, в котором учитывается среднее значение газообмена дыхания до и после введения добавки.

В тех случаях, когда процесс идет по кривой, за условную скорость процесса принимался тангенс угла наклона касательной, проведенной к кривой газообмена фотосинтеза в точке, соответствующей 30-й минуте процесса.

На рис. 3 показан пример расчета для опыта с нейтральным красным при концентрации его 10^{-2} *М* в боковом отводе сосуда. Для наглядности произведено совмещение начальных точек обоих процессов (в точке О — процессов дыхания, в точке O_1 — процессов фотосинтеза).

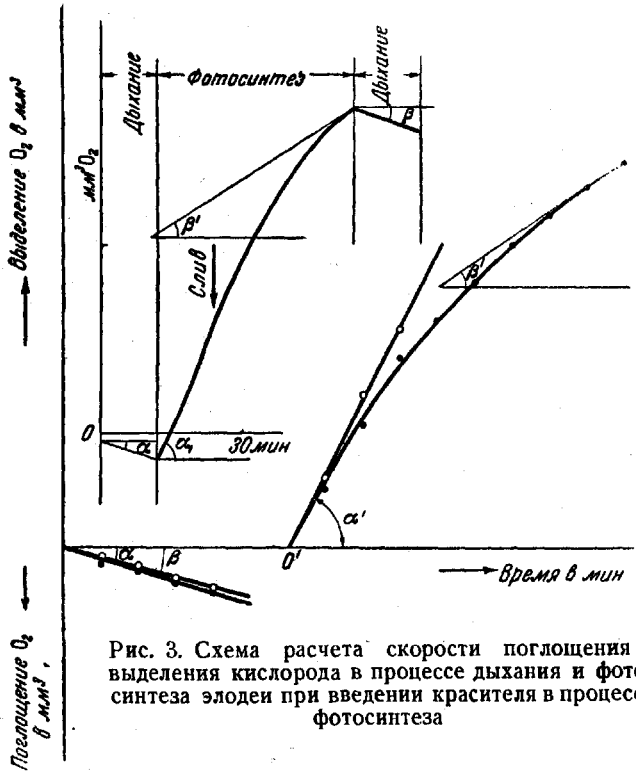


Рис. 3. Схема расчета скорости поглощения и выделения кислорода в процессе дыхания и фотосинтеза элодеи при введении красителя в процессе фотосинтеза

$\operatorname{tg}\alpha$ — выражает скорость первоначального процесса дыхания; $\operatorname{tg}\beta$ — скорость конечного дыхания; $\operatorname{tg}\alpha'$ — скорость фотосинтеза до введения добавки; $\operatorname{tg}\beta'$ — скорость фотосинтеза после введения добавки. Скорость начального процесса дыхания принята за 100%, тогда конечное дыхание будет $\frac{2{,}6}{2{,}4} \cdot 100 = 108\%$, т. е. ускорение процесса дыхания от введения нейтрального красного лежит в пределах ошибки опыта. Скорость фотосинтеза до введения добавки составляется из видимого фотосинтеза и дыхания $\operatorname{tg}\alpha' - (-\operatorname{tg}\alpha) = 19{,}4 - (-2{,}4) = 21{,}8$, что принято за 100%. Скорость фотосинтеза после введения добавки также является разностью измеряемого фотосинтеза и дыхания $\operatorname{tg}\beta' - \left(-\frac{\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{tg}\beta}{2}\right) = 6.4 - (-2{,}5) = 8{,}9$, т. е. введение нейтрального красного снижает фотосинтез до 41% от начальной величины.

Погрешность результатов опытов следует оценить ±10%, так как опыты проводились на растительном материале, стабильность которого зависит от многих внешних причин.

III. Действие красителей и хинона на фотосинтез и дыхание элодеи

Были выбраны следующие соединения, покрывающие область значений окислительно-восстановительного потенциала от +0,3 в до —0,3 в; хинон, фенолиндофенол, тионин, нильский синий *, рибофлавин, сафранин *Т*, нейтральный красный; все эти соединения, кроме хинонов и сафранина *Т*, являются прижизненными красителями. Их спектры поглощения измерены в воде при pH 6 и в карбонатно-бикарбонатном буфере при pH 9,08 (рис. 4). В особых опытах исследовалось влияние окисленной и восстановленной формы пары соединений: хинон-гидрохинон; применение лейкосоединений красителей не представлялось возможным вследствие их быстрого окисления кислородом воздуха. Исследование действия гидрохинона способом приливания было неудобно, так как он быстро окисляется при pH 9. Хинон также окисляется в этих условиях, так что в опытах с приливанием учитывался контрольный опыт без растения. Контрольные опыты с остальными соединениями (без растения) показывают незначительное поглощение кислорода.

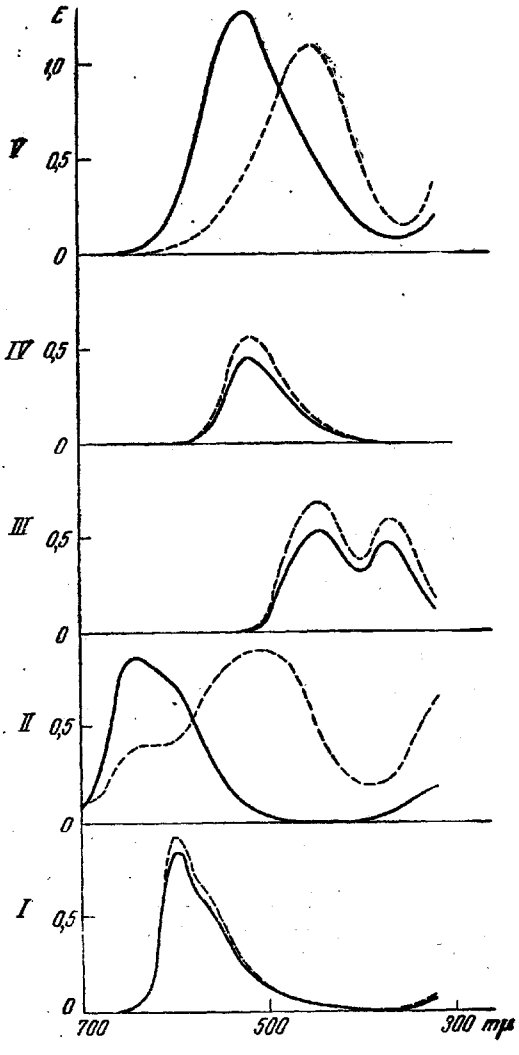


Рис. 4. Спектры поглощения растворов красителей в воде и в буфере при pH 9,08;

I — тионин; *II* — нильский синий; *III* — рибофлавин; *IV* — сафранин Т; *V* — нейтральный красный

После опыта прокрашенные листья рассматривали в обычном и флуоресцентном микроскопе (при возбуждении линиями ртути при 366 mμ). Несмотря на изменение цвета некоторых красителей в среде с pH 9,08, окраска клеток соответствовала pH 6—7. Заметное уменьшение красной флуоресценции хлоропластов наблюдалось лишь в случае хинона и тионина.

Опыты вели с исходными концентрациями красителей в боковом отводе сосуда 10^{-2} и 10^{-3} *М*, что соответствует концентрации в сосуде 10^{-3} и 10^{-4} *М*.

Нами была сделана попытка оценить, какое количество красителя проникает в клетки элодеи. Для этого были приготовлены растворы красителя с концентрацией 10^{-3} и 10^{-4} *М*; 5 г элодеи погружали в 50 мл растворов каждого красителя на 30 мин. Измерялся коэффициент пога-

* В случае нильского синего, повидимому, имеет место экранирующее действие, однако неясно, прокрашиваются ли гранулы хлорофилла красителем. Фенолиндофенол при pH 9 синего цвета, а при pH 6 — красного. Поэтому с этим соединением ставили опыты лишь с прокрашиванием.

ТАБЛИЦА 1

Красители	Максимум поглощения в видимой области ± 5 mμ		Окислительно-восстановительный потенциал в вольтах	Влияние красителей в % при концентрациях			
				10^{-3} *M*		10^{-4} *M*	
	при pH 6	при pH 9,08	*E* при pH 7	дыхание	фотосинтез	дыхание	фотосинтез
Хинон	425	425	+0,29	105	4	98	90
Гидрохинон**	—	—	—	130	101	119	93
Тионин	600	600	+0,062	160	14	186	13
Нильский синий	640	505*	—0,12	148	53	116	53
Сафранин Т	520	520	—0,29	92	15	91	51
Нейтральный красный	525	455*	—0,33	108	41	106	100

* Выпадает из щелочного раствора при стоянии.

** Данные для гидрохинона получены способом предварительной обработки раствором.

шения раствора до и после крашения и подсчитывалось, какое количество красителя адсорбировалось. Количество адсорбированных красителей лежало в пределах от $2—5 \cdot 10^{-6}$ моля/г элодеи при начальной концентрации красителя 10^{-3} *M* и от $1—3 \cdot 10^{-8}$ моля/г элодеи при начальной концентрации 10^{-4} *M*.

Предварительная обработка элодеи растворами хинона и фенолиндофенола при концентрации 10^{-3} *M* приводит к сильному угнетению фотосинтеза (до 5—10% от контроля), но не влияет на дыхание, так же как и в опытах с приливанием (рис. 5).

При концентрации 10^{-4} *M* эти соединения практически не оказывают действия ни на фотосинтез, ни на дыхание; также не удалось наблюдать явного действия гидрохинона при концентрации 10^{-3} и 10^{-4} *M* на оба процесса.

Предварительная обработка (прокрашиванием) растворами красителей усиливает дыхание и угнетает фотосинтез соответственно ряду: *1* — нейтральный красный; *2* — сафранин Т; *3* — нильский синий; *4* — тионин. Нейтральный красный мало влияет на фотосинтез и дыхание, тогда как тионин значительно усиливает дыхание и угнетает фотосинтез.

IV. Действие соединений, участвующих в биохимических окислительно-восстановительных системах на фотосинтез и дыхание элодеи

Были испытаны следующие соединения: аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты, дифосфопиридин-нуклеотид, рибофлавин и ионы NO_3', NO_2', Fe^{+++} (табл. 2).

В наших опытах не подтвердились данные Букача [10] о стимулирующем действии аскорбиновой кислоты на фотосинтез; наблюдалось некоторое усиление дыхания при действии дегидроаскорбиновой кислоты.

Введение ДПН, рибофлавина и NO_3' не оказывало заметного действия ни на фотосинтез, ни на дыхание. Нитрит натрия заметно снижает фотосинтез, вероятно, восстанавливаясь за счет фотореакции. Возможная ошибка данных табл. 2 ±10%.

ТАБЛИЦА 2

Соединение	Влияние в %		Концентрация вещества в *M*	Способ воздействия
	дыхание	фотосинтез		
Аскорбиновая кислота . . .	105	95	10^{-3}	Предварительная обработка элодеи растворами кислот
Дегидроаскорбиновая кислота	150	102	10^{-3}	
Рибофлавин *	109	106	2.10^{-4}	
ДПН	110	103	10^{-2}	Приливание растворов указанной концентрации на 12-й минуте фотосинтеза
$NaNO_3$	85	90	10^{-2}	
$NaNO_2$	100	57	10^{-2}	
$Fe_2(SO_4)_3$	124	60	(насыщ.)	

* Предельная концентрация рибофлавина, соответствующая его растворимости в воде, была $2 \cdot 10^{-4}$ *M*. Растворимость рибофлавина увеличивается в присутствии никотинамида [11], однако опыт с 5%-ным раствором амида никотиновой кислоты показал его угнетающее действие на фотосинтез.

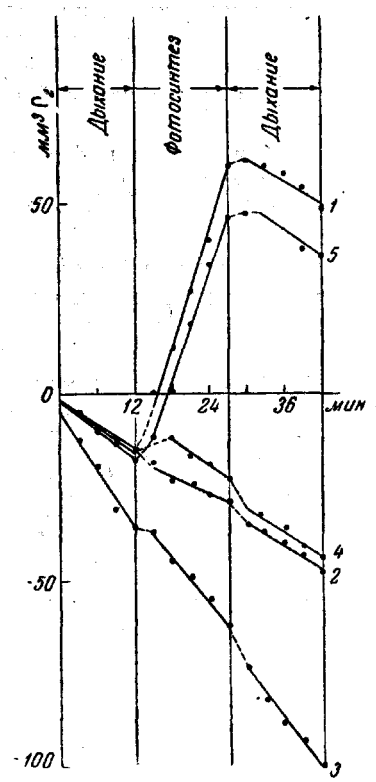


Рис. 5. Кривые фотосинтеза и дыхания элодеи, предварительно прокрашенной растворами красителей с концентрацией 10^{-3} *M*:

1 — контрольный опыт, без предварительной обработки; *2* — хинон; *3* — тионин; *4* — феполиндофенол; *5* — нейтральный красный

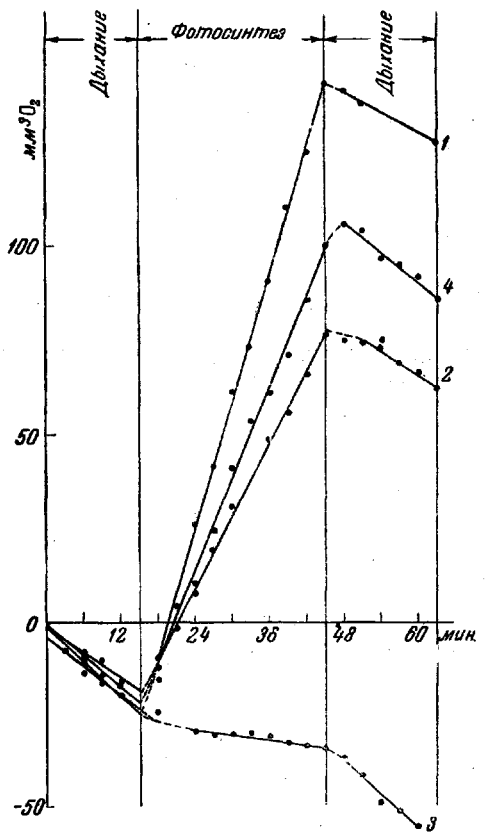


Рис. 6. Кривые фотосинтеза и дыхания элодеи, предварительно обработанной растворами антибиотиков:

1 — контрольный опыт, без предварительной обработки; *2* — пенициллин в концентрации 10^{-2} *M*; *3* — грамицидин в концентрации 0,7% (~10^{-3} *M*); *4* — стрептомицин в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ *M*

V. Действие антибиотических соединений на фотосинтез и дыхание элодеи

В поисках избирательных ингибиторов фотосинтеза и дыхания нами было также исследовано действие антибиотических веществ. В этих опытах 5 г элодеи вымачивали в 25 мл водного раствора антибиотиков в течение 1 часа, затем производилось определение фотосинтеза и дыхания вышеописанным манометрическим методом. Концентрация пенициллина и грамицидина С составляла 10^{-2} *М* стрептомицина — $5 \cdot 10^{-3}$ *М*. Пенициллин и стрептомицин мало влияют на фотосинтез и дыхание элодеи (рис. 6). Грамицидин С не влияет на дыхание и весьма значительно угнетает фотосинтез (на 80%). Возможно, что это явление связано с угнетающим действием грамицидина на дегидразные ферменты, обнаруженное в работе Поповой [12].

Заключение

Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Угнетение фотосинтеза исследованными красителями может быть связано с величиной их окислительно-восстановительного потенциала (E_0); обычно чем более положительна величина E_0, тем сильнее эффект угнетения.

2. Действие красителя на дыхание обычно противоположно их действию на фотосинтез: соединения с более положительной величиной E_0 увеличивают дыхание.

Усиление дыхания растительных тканей под действием некоторых красителей известно давно: В. И. Палладин с сотрудниками [13] впервые установил усиление дыхания тканей растения, прокрашенных метиленовым голубым. Обратимо реагирующий краситель играет при этом роль промежуточной каталитической системы, воспринимающей водород (электрон) метаболитов и окисляющейся кислородом воздуха.

Угнетающее действие исследованных соединений на фотосинтез следует объяснить подобным же образом — восприятием водорода (электрона) от фотохимически образованных активных восстановленных соединений, обладающих гораздо более отрицательным значением потенциала, чем метаболиты дыхания, и их окислением кислородом с промежуточным образованием перекисей (при помощи оксидазных ферментов). Эти реакции «захвата» мобилизованного при фотохимической стадии водорода изображаются схемой (опуская ступени образования семихинонов):

$$ДH_2 + К \rightarrow Д + КH_2$$
$$КH_2 + O_2 \rightarrow К + H_2O_2$$
$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + {}^1/_2\ O_2$$

где $Д \rightleftarrows ДH_2$ — дегидразная или иная система, первично воспринимающая водород восстановленной формы хлорофилла; $К \rightleftarrows КH_2$ — обратимая система краситель — лейкосоединение.

Однако маловероятна пригодность такой схемы для объяснения наблюдаемого угнетающего действия р-хинона и фенолиндофенола на фотосинтез; восстановленные формы этих соединений трудно окисляются кислородом воздуха в нейтральной среде; этим объясняется применение хинонов для измерения фотохимической активности изолированных хлоропластов. При этой реакции происходит восстановление хинона и выделение молекулярного кислорода, практически не расходуемого на окисление восстановленной формы хинона или фенолиндофенола. Угнетение фотосинтеза этими соединениями можно приписать либо реакции образуемых восстановленных форм с активными перекисями, образующимися при фотосинтезе, либо образованию из хинонов в водной среде отравляющих фотосинтез соединений, на что есть указания в литературе [14].

Возможность взаимодействия красителя с фотохимически образованным соединением $ДH_2$ определяется величиной их окислительно-восстановительного потенциала. Эта величина может изменяться при адсорбции красителя на структурах клетки; здесь мы оперируем лишь со значением E_0 при pH 7.

Значение E_0 красителя, при котором уже не будет наблюдаться угнетающего действия на фотосинтез, укажет приближенную величину E_0 активных восстановленных соединений, образующихся при фотосинтезе. Действие на фотосинтез нейтрального красного с $E_0 = -0{,}32$ в уже

невелико, что указывает на вероятное значение E_0 соединения $ДН_2$, лежащее выше — 0,32 в.

3. Отсутствие угнетающего и стимулирующего действия на фотосинтез окисленных форм соединений, участвующих в биохимических процессах (дегидроаскорбиновой кислоты, рибофлавина, ДПН), можно объяснить тем, что образующиеся восстановленные формы этих соединений участвуют в биохимических реакциях фотосинтеза. Возможны, однако, и другие объяснения, например то, что в живой клетке сбалансирована система биохимических реакций переноса водорода и введение избытка соединения уже не приводит к наблюдаемому действию.

4. Угнетающее действие на фотосинтез грамицидина при малом действии других испытанных антибиотиков может служить доводом в пользу представления об участии дегидразных ферментов при фотосинтезе.

5. В одной из наших предыдущих работ [5] было показано, что фотовосстановленная форма хлорофилла (в изолированной системе) реагирует в темноте со всеми исследованными окислителями до значения $E_0 = -0{,}32$ в. Таким образом, восстановительный потенциал работающей фотосинтетической системы и восстановленной формы хлорофилла близки по величине, что свидетельствует в пользу предположения об обратимом фотовосстановлении хлорофилла в процессе фотосинтеза.

Приносим глубокую благодарность академику А. Н. Теренину за указания и помощь в работе.

Поступила в редакцию
28.XI.1950

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., ДАН 60, 421, 1948.
2. Красновский А. А., Брин Г. П., Войновская К. К., ДАН 69, 393, 1949.
3. Красновский А. А., ДАН 61, 91, 1948.
4. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН 67, 325, 1949.
5. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН 73, 1239, 1950.
6. Сисакян Н. М., Чамова К. Г., ДАН 67. 337, 1949.
7. Heller, Ann. 392, 26, 1912.
8. Le Page G. A., J. Biol. Chem. 168, 623, 1947.
9. Букин В. Н., Биохимия 8, 61, 1943.
10. Bukatch F., Planta 31, 209, 1940.
11. Frost D., J. A. C. S. 69, 1064, 1947.
12. Попова Л. А., Диссертация, ВНИИП, 1948.
13. Палладин В. И., Гюббенет Е. Р., Корсаков М. Н., Biochem. Z. 35, 1 1911.
14. Варбург О. и Лютгенс В., Биохимия, 11, 303, 1946.

Академия Наук СССР
Биохимия
Том 16. Вып. 6. 1951

И. В. Верещинский и А. А. Красновский

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВА ХЛОРОПЛАСТОВ

Действие ультрафиолетовых лучей на фотохимическую активность вещества хлоропластов

И. В. Верещинский и *А. А. Красновский*

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии Наук СССР, Москва

Изучение действия ультрафиолетовых (УФ) лучей на фотосинтетический аппарат растения до сих пор не привлекло должного внимания исследователей. Литература, посвященная этому вопросу, крайне скудна. Изучение действия ультрафиолетового излучения (ртутная линия 253,7 mμ) на зеленую водоросль Scenedesmus показало [1], что процесс фотосинтеза менее чувствителен к облучению, чем способность водорослей к размножению. Суспензии гранул хлоропластов, облученные ультрафиолетовыми лучами, испытывались на их способность фотохимически выделять кислород после прибавления фенолиндофенола, соли гексацианоферрата или смеси щавелевокислого железа и гексацианоферрата. Степень ингибирования фотохимической активности была одной и той же при добавлении каждого из этих веществ. В настоящей работе изучалось действие ультрафиолетового излучения на состояние хлорофилла в веществе хлоропластов и их фотохимическую активность *.

Экспериментальная часть

Источник ультрафиолетовых лучей и определение энергии падающего излучения. Источником УФ лучей служила ртутнокварцевая лампа высокого давления ПРК-2. В опытах применялось либо нефильтрованное излучение лампы, либо его отдельные спектральные области, выделяемые светофильтрами Шотт UG-1 и UG-5 (рис. 1). Светофильтр UG-1 пропускал практически лишь ртутную линию 365 mμ, а светофильтр UG-5 пропускал, кроме того, ртутную линию 313 mμ. Для измерения энергии УФ излучения, пропускаемого этими светофильтрами, применялся уранилоксакатный актинометр [2]. Так как в биохимических исследованиях, связанных с облучением УФ лучами, иногда ограничиваются лишь указанием длительности облучения целесообразно дать здесь подробное описание методики химической актинометрии. Применение химического актинометра основывается в данном случае на сенсибилизированном солью уранила UO_2SO_4 фотолизе щавелевой кислоты с выделением CO и CO_2. Количество неразложившейся щавелевой кислоты определялось посредством титрования 0,1 *N* раствором перманганата калия. Равные объемы 0,01 *M* раствора х. ч. кристаллического уранилсульфата и 0,05 *M* раствора х. ч. кристаллической щавелевой кислоты смешивались непосредственно перед употреблением. Растворы, налитые в чашки Петри, помещались на столике ультратермостата в 35 см от оси ртутнокварцевой лампы. Чашки закрывались соответствующим фильтром и подвергались облучению в течение 1 часа. Температура, поддерживаемая ультратермостатом, составляла 15°. Следует отметить, что некоторая вибрация чашек, наступающая при работе ультратермостата, обеспечивала достаточное перемешивание находящихся в чашках растворов (при облучении чашек, установленных на массивной подставке, исключающей вибрацию, результаты получались менее воспроизводимыми). Облученные растворы количественно переносились в колбочки для титрования, после чего приливалась 9 *N* серная кислота в количестве $^1/_3$ начального объема раствора. Нагретые на водяной бане до 80°, растворы титровались 0,1 *N* раствором перманганата калия. Одновременно производилось титрование такого же количества контрольного необлучаемого раствора. Количество облучаемого раствора, а тем самым толщина слоя увеличивались до тех пор, пока количество разложившейся щавелевой кислоты не переставало зависеть от толщины слоя. Зная квантовый выход, площадь поверхности чашки и длительность облучения, можно было оценить энергию

* Во время печатания данной статьи появилась работа Арнольда с сотр. (J. Gen. Physiol. 34, № 5, 1951), в которой исследуется действие излучения резонансной линии ртути ($\lambda = 253{,}7$ mμ) на фотосинтез и фотохимическую активность хлоропластов.

УФ излучения, падающую на 1 см² поверхности раствора за 1 сек. Пример расчета: фильтр UG-1 практически пропускает только ртутную линию = 365 mμ. Разность между количествами 0,1 *N* раствора перманганата калия, пошедшими на титрование контрольного и облученного раствора, составила 1,1 мл. Количество разложившихся молекул щавелевой кислоты равно, $6{,}06 \cdot 10^{23} \cdot 1{,}1 \cdot 10^{-3} \cdot 0{,}1 \cdot 0{,}5 = 33{,}3 \cdot 10^{19}$. Число поглощенных квантов ($\lambda = 365$ mμ), вызвавших разложение этого количества молекул щавелевой кислоты.

$n = \frac{3{,}33 \cdot 10^{19}}{0{,}48} = 6{,}9 \cdot 10^{19}$, т. к. квантовый выход = 0,48 [2]. Отсюда энергия УФ излучения, выраженная в эргах, будет $E = nh\nu = nh\frac{c}{\lambda}$, где $h = 6{,}6 \cdot 10^{-27}$ эрг. сек.; $c = 2{,}99 \cdot 10^{10}$ см/сек. и $\lambda = 3{,}65 \cdot 10^{-5}$ см.

$E = 6{,}9 \cdot 10^{19} \cdot 6{,}6 \cdot 10^{-27} \cdot 2{,}99 \cdot 10^{10} / 3{,}65 \cdot 10^{-5} = 3{,}73 \cdot 10^{8}$ эрг. За 1 сек. на 1 см² поверхности падает $3{,}73 \cdot 10^{8} / 3600 \cdot 15{,}8 = 6{,}6 \cdot 10^{3}$ эрг/см² сек.

Полученные результаты измерений энергии УФ излучения приведены в табл. 1.

ТАБЛИЦА 1

Фильтр	Падающая энергия в эрг/см²·сек
UG-1	$0{,}7 \cdot 10^{4}$
UG-5	$1{,}1 \cdot 10^{4}$
Без фильтра . . .	$6{,}0 \cdot 10^{4}$*

* Энергия нефильтрованного излучения была оценена на основании измерений Шкловера [3].

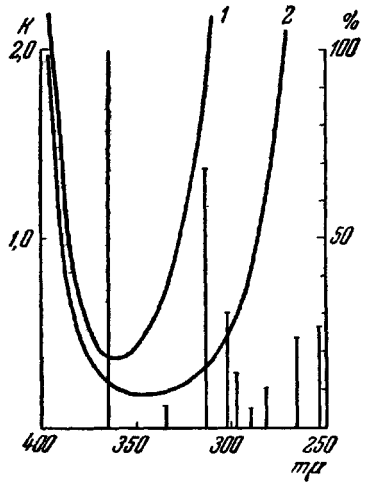


Рис. 1. Кривые поглощения примененных светофильтров:

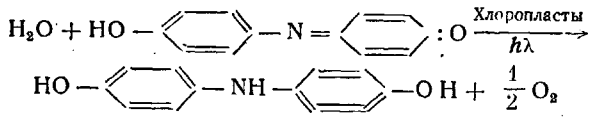
1 — UG-1 (толщина 5 мм); *2* — UG-5 (толщина 9 мм). Относительное распределение энергии УФ излучения лампы ПРК-2 по основным ртутным линиям *3* — (энергия линии γ = 365 mμ принята за 100%)

Выделение и хранение вещества хлоропластов. Вещество хлоропластов выделялось из листьев сахарной свеклы (сорт Верхнянка) и листьев огурцов (сорт Клинский) *. Промытые водой листья после удаления средних жилок измельчались при температуре, возможно более близкой к 0°. Полученная масса отжималась через полотно. Объем полученной из 250 г листьев жидкости доводился до 400 мл приливанием 0,04 *M* фосфатного буфера, содержащего 0,08 *M* хлорида калия. Для отделения крупных частиц и крахмала жидкость центрифугировалась в течение 5 мин. при 300 об/мин. Слитый с осадка, центрифугат подвергался повторному центрифугированию в течение 20 мин. при 3000 об/мин. На дне центрифужных стаканов образовывался небольшой плотный белый осадок крахмала, над которым находится весьма объемистый зеленый осадок вещества хлоропластов. Верхняя часть осадка стеклянной лопаточкой осторожно снималась со стенок центрифужного стакана и затем суспендировалась в 15—25 мл фосфатного буфера. Полученные темнозеленые суспензии по каплям при помощи пипетки вливались в высокий цилиндрический сосуд Дьюара, наполненный жидким азотом или воздухом.

Капли суспензии замерзли, образуя агрегаты величиной с горошину. В жидком воздухе (уд. в. 1,2) замерзшие агрегаты плавали на поверхности: в жидком азоте (уд. в. 0,8) — падали на дно. При длительном хранении в сосуд Дьюара периодически доливался жидкий воздух вместо испарившегося. По мере надобности замерзшая суспензия (агрегаты) специальной ложкой с длинной ручкой вынималась из сосуда Дьюара и переносилась в колбочку с фосфатным буфером. Благодаря быстрому размораживанию не происходило флокуляции, которая наблюдается при медленном оттаивании вынутой из жидкого воздуха замороженной суспензии. Хранение замороженной суспензии при низкой температуре обеспечивало длительное сохранение фотохимической активности вещества хлоропластов без изменения [5].

* Листья огурцов в зимнее время были получены в овощном комбинате «Марфино» благодаря любезному содействию Дирекции комбината.

Измерение фотохимической активности. Избранный нами метод испытания фотохимической активности суспензии хлоропластов основан на способности их при освещении осуществлять перенос водорода воды на подходящий акцептор. В качестве такого акцептора был взят раствор красителя фенолиндофенола [4]. В присутствии хлоропластов при освещении происходит восстановление фенолиндофенола до бесцветного лейкосоединения, сопровождающееся выделением кислорода.



Использованный препарат фенолиндофенола был синтезирован в нашей лаборатории Г. П. Брин. Применялся спектрофотометрический метод определения концентрации красителя. Раствор фенолиндофенола в 0,04 *M* фосфатном буфере (pH 6,5) имеет максимум поглощения при 490 mμ (рис. 2). Молярный коэффициент погашения фенолиндофенола составляет $\varepsilon_{490} = 7{,}9 \cdot 10^3$. Проводить измерения концентрации

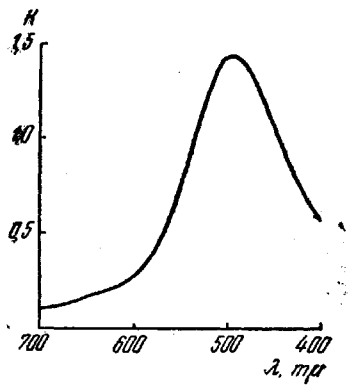


Рис. 2. Спектр поглощения раствора фенолиндофенола в 0,04 *M* фосфатном буфере

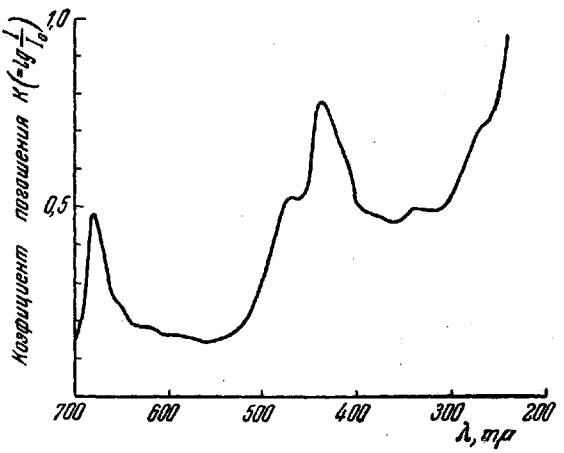


Рис. 3. Спектр поглощения суспензии вещества хлоропластов, выделенных из листьев сахарной свеклы. Суспензия в 0,04 *M* фосфатном буфере (pH 6,5)

красителя в смеси с испытуемой суспензией хлоропластов при 490 mμ не представляется удобным, так как в этой области уже весьма велико поглощение самой суспензии хлоропластов (рис. 3). Поэтому нами проводились измерения в минимуме поглощения самой суспензии при $\lambda = 550$ mμ, где поглощение фенолиндофенола достаточно велико ($E_{550} \simeq {}^1/_2 E_{max}$).

На рис. 4 представлен пример типичного определения фотохимической активности хлоропластов. Зная ΔE_{550}, разность в поглощении до и после освещения, можно вычислить количество восстановленного фенолиндофенола. В опыте, представленном на рис. 4, концентрация с

$$c = \frac{\Delta E_{490}}{\varepsilon_{490} \cdot l} \simeq \frac{2\Delta E_{550}}{\varepsilon_{490} \cdot l}$$

$$c = \frac{2 \cdot 0{,}22}{7{,}9 \cdot 10^3} = 0{,}0556 \cdot 10^{-3}\ M/л$$

Общее количество восстановленного фенолиндофенола, содержащегося в 10 мл смеси, составит $0{,}0556 \cdot 10^{-3} \cdot 10 \cdot 10^{-3} = 0{,}556 \cdot 10^{-6}$ *M*.

Соответствие количества восстановленного при освещении фенолиндофенола с количеством выделенного при этом кислорода было проверено нами в специальных опытах, проведенных на аппарате Варбурга. При параллельном опыте в каждый из сосудиков помещалось 8 мл раствора фенолиндофенола ($2{,}7 \cdot 10^{-6}$ *M* красителя) в 0,04 *M* фосфатном буфере (pH 6,5) и 3 мл суспензии хлоропластов, содержащей 0,1 мг хлорофилла. При освещении через красный фильтр Шотта RG-2 в течение 48 мин. 150-ваттной лампой накаливания, находящейся в 6 см от сосудиков, каждая из суспензий выделила по 36 μл кислорода. За время освещения фенолиндофенол полностью обесцветился, т. е. восстановилось $2{,}7 \cdot 10^{-6}$ *M* красителя. Этому количеству восстановленного фенолиндофенола должно соответствовать $1{,}35 \cdot 10^{-6}$ *M* выделенного кислорода, что в условиях опыта составляет 33,8 л и весьма близко к найденному из опыта значению (36 μл).

Так как в основу определений был положен спектрофотометрический метод измерения концентрации, было необходимо проверить, в какой степени растворы фенолиндофенола и суспензии хлоропластов подчиняются закону Бугера. На рис. 5 представлены зависимости по-

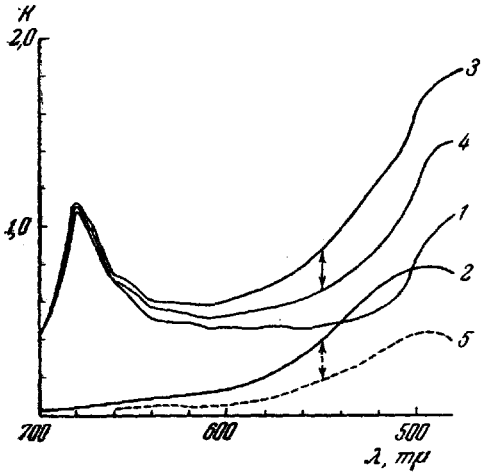


Рис. 4. Пример измерения фотохимической активности суспензий вещества хлоропластов:

1 — спектр поглощения суспензии вещества хлоропластов (5 мл исходной суспензии + 5 мл буферного раствора); *2* — спектр поглощения раствора фенолиндофенола (5 мл исходного раствора красителя + 5 мл буферного раствора); *3* — спектр поглощения смеси (5 мл исходной суспензии вещества хлоропластов + 5 мл исходного раствора красителя); *4* — спектр поглощения этой же смеси после освещения; *5* — спектр поглощения фенолиндофенола, оставшегося не восстановленным за время освещения смеси (построен графически вычитанием из ординат кривой *2* разности между ординатами *3* и *4*)

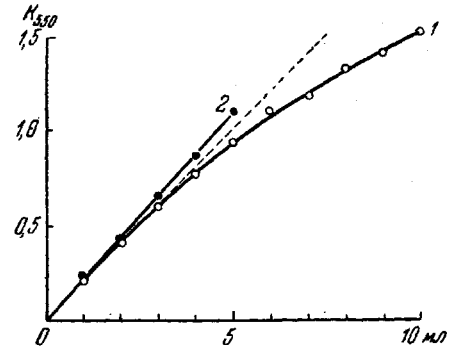


Рис. 5. Влияние разбавления на поглощение:

1 — суспензий хлоропластов и *2* — растворов фенолиндофенола. По абсциссе отложены количества мл исходного раствора красителя или исходной суспензии хлоропластов, содержащиеся в 10 мл измеряемого раствора

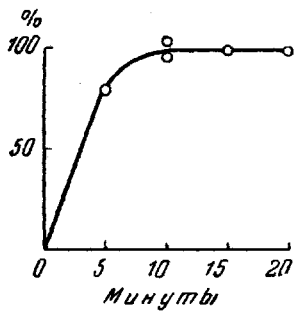


Рис. 6. Зависимость количества восстановленного фенолиндофенола от длительности освещения смеси

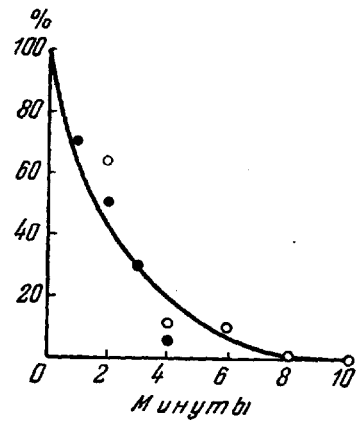


Рис. 7. Зависимость фотохимической активности суспензий хлоропластов, выделенных из листьев огурцов, от длительности облучения нефильтрованным излучением.

Фотохимическая активность необлученной суспензии принята за 100%. При облучении в течение 10 мин на поверхность раствора падает $5{,}7 \cdot 10^3$ эрг

глощения от изменения концентрации. Из рис. 5 видно, что раствор фенолиндофенола хорошо подчиняется закону Бугера, тогда как суспензии хлоропластов показывают отклонение, которым можно пренебрегать при работе с разбавленными суспензиями ($E_{550} \leqslant 1{,}0$).

Исследование влияния продолжительности освещения смесей на количество восстановленного фенолиндофенола показало, что восстанов-

ление происходит за короткое время и дальнейшее освещение не влияет на количество восстановленного красителя (рис. 6).

Были поставлены опыты по испытанию фотохимической активности суспензий различных концентраций, т. е. содержащих различные количества хлорофилла. Оказалось, что количество восстановленного фенолиндофенола прямо пропорционально концентрации суспензии при одной и той же длительности освещения.

На рис. 7 показана зависимость фотохимической активности суспензии хлоропластов из листьев огурцов от длительности освещения этой суспензии нефильтрованным излучением лампы ПРК-2. Следует отметить вполне удовлетворительную сходимость опытов, поставленных через длительный промежуток времени.

В описываемых ниже опытах всюду были взяты смеси 5 мл суспензии хлоропластов $E_{550} = 1{,}0$ и 5 мл раствора фенолиндофенола $E_{550} = 1{,}0$. Суспензии хлоропластов и растворы красителя приготовлялись в 0,04 *М* фосфатном буфере, содержащем 0,08 *М* хлорида калия на 1 л раствора. Добавление хлорида калия, как это было показано во многих исследованиях [4], способствует сохранению фотохимической активности суспензии хлоропластов при их хранении. При испытаниях фотохимической активности суспензий, предварительно подвергнутых облучению УФ лучами, была принята следующая методика. В чашки Петри, аналогичные тем, в которых проводилось УФ облучение, наливалось по 10 мл испытуемой смеси. Чашки устанавливались на подъемном столике ультратермостата и на $^1/_2$ их высоты погружались в воду. Освещение проводилось 150-ваттной лампой накаливания, отстоящей на 10 см от уровня жидкости. Во время освещения чашки термостатировались при 5° (в летнее время при 10°). Для каждой серии всегда ставились контрольные опыты.

Результаты экспериментов и их обсуждение

На рис. 8 показано изменение фотохимической активности суспензий хлоропластов, предварительно облученных либо нефильтрованным светом лампы ПРК-2, либо излучением, пропущенным через один из фильтров. Во всех случаях относительная фотохимическая активность выражена в зависимости от количества энергии (эрг.) ультрафиолетового излучения, падавшей на поверхность суспензии. Выражение фотохимической активности в зависимости от длительности облучения в данном случае не целесообразно, так как пропускаемое светофильтрами УФ излучение сильно различается как качественно, так и количественно. Обращает на себя внимание ход падения фотохимической активности, близкий к экспоненциальному. Инактивация вследствие действия ртутных линий 365 и 313 mμ весьма близка к инактивации под действием нефильтрованного излучения лампы. Наблюдаемое уменьшение фотохимической активности, очевидно, не связано с разрушением самого хлорофилла в хлоропластах. Контрольные опыты по определению количества хлорофилла, содержащегося в исходной и облученной суспензиях, показали, что за время, превышающее время, потребное для 100% инактивации в 5 раз, количество хлорофилла, экстрагируемое из суспензии ацетоном и определяемое спектрофотометрически, уменьшается лишь на 5%.

За время облучения, приводящее к подавлению фотохимической активности, не успевает произойти таких изменений в состоянии хлорофилла в суспензии хлоропластов, которые могли бы проявляться в изменении спектра поглощения суспензии. Положение (и высота) красного максимума поглощения суспензии еще сохраняется при полной инактивации ее фотохимической активности, что, повидимому, свидетельствует об отсутствии глубоких изменений в состоянии самого хлорофилла в веществе хлоропластов за это время.

Из рассмотрения кривых инактивации (рис. 8) видно, что спектральная область 313—365 mμ и область 365 mμ по своей эффективности близка к нефильтрованному излучению лампы ПРК-2.

В работах Сисакяна с сотрудниками было показано наличие в хлоропластах большого числа ферментативных систем, в том числе дегидраз

[7], вероятно связанных с системой фотохимических реакций [9]. При различных воздействиях ферменты пластид подвергаются существенным изменениям [7]. На основании этих работ можно предположить, что потеря фотохимической активности коллоидных растворов вещества хлоропластов при облучении связана с инактивацией какой-либо из промежуточных ферментных систем. Имеющийся ограниченный экспериментальный материал оставляет открытым вопрос об их природе.

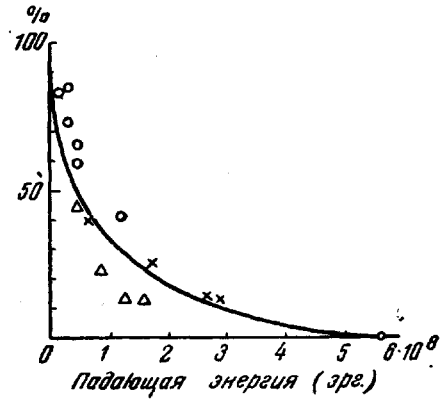


Рис. 8. Зависимость фотохимической активности суспензии хлоропластов, выделенных из листьев сахарной свеклы, от количества энергии падающего УФ излучения различных спектральных областей.

Фотохимическая активность необлученной суспензии принята за 100%. ○ — фильтр UG = 1; △ — фильтр UG = 5; × — нефильтрованное излучение

Необходимо отметить, что облучение суспензий хлоропластов рентгеновскими лучами (доза (500 000 г) в жидком состоянии при 4° и в замороженном состоянии при —120° полностью сохраняло их фотохимическую активность. Отсутствие инактивации в этих случаях служит подтверждением известного эффекта защитного действия (см., например, [8]).

Выводы

1. Установлен факт инактивации фотохимической активности вещества хлоропластов под действием УФ лучей. Эта инактивация не сопровождается уменьшением количества экстрагируемого хлорофилла и изменением характера его связи в веществе хлоропластов.

2. Высказано предположение, что инактивация фотохимической активности под действием УФ лучей в первую очередь обусловлена повреждением лабильных звеньев ферментативной системы хлоропластов.

В заключение приносим глубокую благодарность А. Н. Теренину и Н. М. Сисакяну за ценные советы и обсуждение результатов.

Поступила в редакцию
4.XII.1950

ЛИТЕРАТУРА

1. Arnold W. A., J. Gen. Physiol. **17**, 135, 1933; Holt A. S., Newton A. C., Arnold W. A., Am. J. Bot. **35**, 810, 1948.
2. Bowen E. J., Chemical aspects of light, Oxford, 1946, p. 283.
3. Шкловер Д. А., В Сборнике материалов Всесоюзной научно-технической сессии по светотехнике ВНИТОЭ, Москва, 1947.
4. Holt A. S., French C. S., Arch. Biochem. **19**, 268, 1948; McDowall D. H., Plant Physiology **24**, 345, 1949.
5. Верещинский И. В., **Биохимия 16**, 350, 1951.
6. Сисакян Н. М. и Кобякова А. М., Биохимия **13**, 88, 1948.
7. Сисакян Н. М., Ферментативная активность протоплазменных структур, Изд. АН СССР, Москва, 1951.
8. Шехтман Я. Л., Красновский А. А., Верещинский И. В., ДАН **74**, 767, 1950; Верещинский И. В., Усп. хим. **20**, № 3, 1951.
9. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия **16**, 453, 1951; ДАН **67**, 325, 1949.

Доклады Академии Наук СССР
1951. Том LXXXI, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ И ОКИСЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОФЕОФИТИНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 17 X 1951)

В предыдущих работах нашей лаборатории были обнаружены и исследованы реакции обратимого фотохимического восстановления (1) и окисления (2) хлорофилла, некоторых его аналогов и производных, а также показано участие образующихся при фотореакции активных промежуточных соединений в сенсибилизированных хлорофиллом реакциях (3). В публикуемой работе кратко описаны найденные нами окислительно-восстановительные превращения бактериохлорофилла (обозначаемого ниже БХ) и бактериофеофитина (обозначаемого ниже БФ), идущие под действием света близкой инфракрасной области спектра, где расположены главные максимумы поглощения этих пигментов.

Выделение БХ. Сернопурпурные бактерии выращивались на среде, содержащей яблочную кислоту (4)*, в люминостате. Взвесь бактерий фильтровалась через слой кизельгура; пигменты извлекались метанолом, затем переводились в петролейный эфир и хроматографически разделялись в колонке с сахарозой. Растворители предварительно насыщались сероводородом (5). Размывание зон и отмывка каротиноидов производилась смесью петролейного и серного эфира в отношении 4 : 1.

БХ снимали с синей зоны серным эфиром; опыты обычно ставились со свежевыделенным препаратом БХ. БФ получался в твердом виде путем обработки эфирного раствора БХ 10% соляной кислотой (6) с последующей отмывкой кислоты, сушкой и испарением эфира.

Методика опытов применялась та же, что и в наших работах с хлорофиллом. Фотореакции осуществлялись в вакуумных трубках особой формы, допускающей их установку в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана. 5 мл раствора пигмента (с коэффициентом погашения в инфракрасном максимуме поглощения $K = 0{,}5—0{,}8$), содержащего исследуемый окислитель или восстановитель, эвакуировались масляным насосом при взбалтывании (в опытах с кислородом воздуха эту операцию не делали), измеряли спектр поглощения, затем освещали в термостатирующем устройстве при 10° в фокусе конденсора киноламповой 500 вт через светофильтр RG-5. После освещения измеряли спектр поглощения; иногда это не удавалось сделать из-за быстро текущей обратной реакции. В случае реакции фотоокисления кислородом воздуха для обратной регенерации вводили восстановители: аскорбиновую кислоту, сероводород и др. При фотовосстановлении конечная регенерация пигмента про-

---

* Исходная культура сернопурпурных бактерий была нам любезно предоставлена Л. К. Осницкой (Институт микробиологии Академии наук СССР), которой мы выражаем свою благодарность.

исходила при действии кислорода воздуха. Некоторые данные опытов показаны в табл. 1 и 2 и на рис. 1 и 2.

Таблица 1

Обратимое фотоокисление кислородом воздуха БХ и БФ
Условия опыта. Освещение производилось на воздухе через светофильтр RG-5: растворов БХ 30 сек.; растворов БФ 3 мин. Обратная регенерация осуществлялась введением восстановителя сразу после облучения

Растворитель	Восстановитель	Колич. пигмента в % от исходного			
		БХ		БФ	
		фото-реакция	обратная реакция	фото-реакция	обратная реакция
Спирт этилов.	Аскорбиновая кислота	9,1	73,8	80,7	89,8
Спирт этилов.	Сероводород	7,1	68,6	—	—
Ацетон	Аскорбиновая кислота	11,2	38,9	—	—
Ацетон	Сероводород	14,5	35,5	—	—
Пиридин	Аскорбиновая кислота	20,0	23,9	87,0	78,7
Толуол	Сероводород	13,7	34,5	—	—

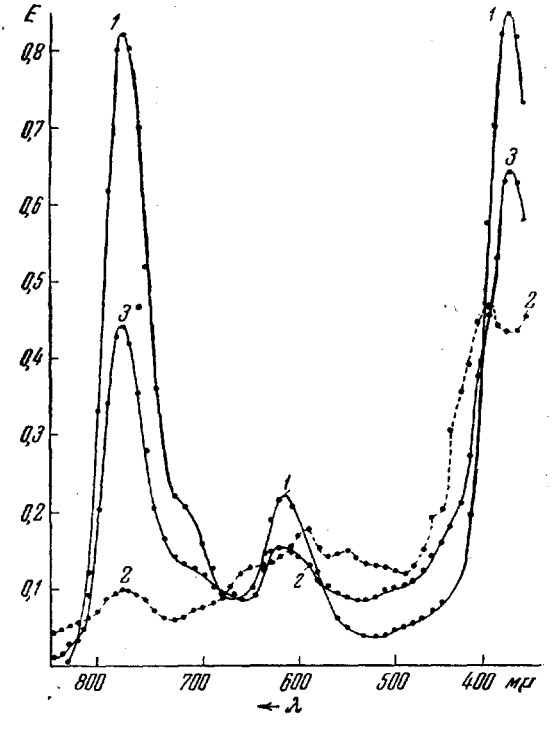


Рис. 1. Обратимое фотоокисление раствора бактериохлорофилла (БХ) в спирте кислородом воздуха с последующей регенерацией аскорбиновой кислотой. *1* — раствор БХ до облучения, *2* — после облучения (1 мин.), *3* — после введения аскорбиновой кислоты на 26 мин. после облучения и стояния в темноте в течение 1 часа.

Количество реагирующего пигмента подсчитано по изменению величины коэффициента погашения в инфракрасном максимуме.

Результаты опытов по фотоокислению. БХ весьма быстро окисляется под действием кислорода воздуха; быстрее всего в этиловом спирте, медленнее в пиридине; раствор в спирте после освещения дает интенсивную реакцию на перекиси с железородановым раствором ([7]). Обратная регенерация пигмента достигается при добавлении аскорбиновой кислоты или сероводорода; неактивными оказались яблочная, лимонная, пировиноградная, янтарная кислоты, тиозинамин. Промежуточный продукт окисления довольно устойчив; после 10 час. стояния раствора удается при добавлении аскорбиновой кислоты регенерировать бо́льшую часть пигмента. Другие окислители: *n*-хинон, нитрит и нитрат натрия, гематин оказались малоактивными. Однако БХ уже в темноте окисляется орто-хиноном (в растворе толуола) с образованием хлорофиллоподобного продукта, обладающего максимумом поглощения при 680 мμ. БФ более устойчив к фотоокислению, однако и здесь удается наблюдать обратимость реакции при добавлении аскорбиновой кислоты.

Таблица 2

Обратимое фотовосстановление БХ и БФ

Условия опыта. Освещение растворов производилось в вакууме через светофильтр RG-5 с восстановителем (аскорбиновой кислоты 20 мг, сернистого натра 5 мг): БФ — 1) в спирте 30 сек., 2) в пиридине 0,5—1 мин.; растворов БХ в пиридине 3,5 мин. Обратная регенерация осуществлялась введением кислорода через 5—10 мин. после облучения. Обратная реакция шла и в отсутствие кислорода воздуха.

Растворитель	Восстановитель	Колич. пигмента в % от исходного			
		БФ		БХ	
		фото-реакция	обратная реакция	фото-реакция	обратная реакция
Спирт	Аскорбиновая кислота	63,1	82,8	100	100
	Сернистый натр	82,0	90,4	93,3	94,8
Пиридин + 10% воды	Аскорбиновая кислота	18,4	52,1	28,9	50,1
	Сернистый натр	39,9	80,0	57,5	90,7

Результаты опытов по фотовосстановлению. БХ восстанавливается при действии аскорбиновой кислоты и сернистого натра *. Так же как и в случае хлорофилла, реакция идет глубже всего в пиридине, в этиловом же спирте явного течения реакции не удается наблюдать. Реакция весьма быстро обращается в темноте (секунды), без доступа воздуха, что затрудняет снятие спектра промежуточного продукта. БФ восстанавливается быстрее и глубже, чем БХ, и обратная реакция идет медленнее, чем в случае БХ. Промежуточный продукт восстановления зеленого цвета обладает характерным максимумом при 640 мμ. Испытанные в качестве восстановителей яблочная, янтарная, лимонная, пировиноградная кислоты, тиозинамин, тиосульфат натрия оказались неактивными.

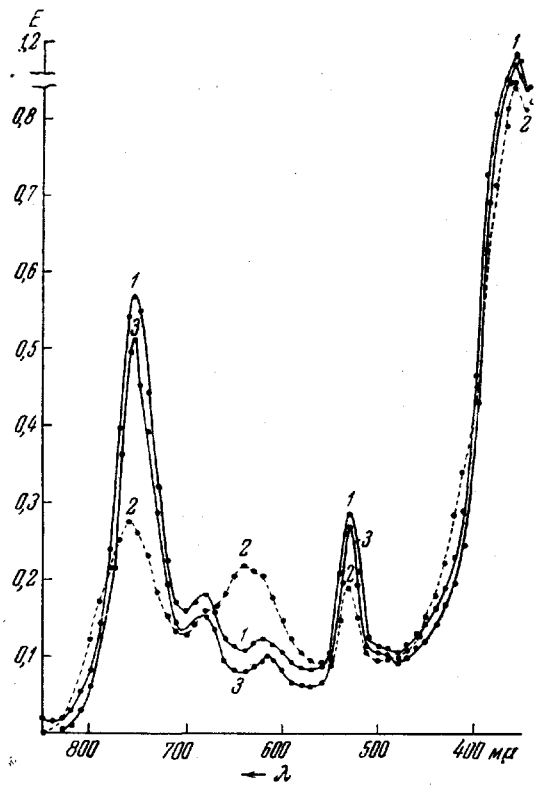


Рис. 2. Обратимое фотовосстановление раствора бактериофеофитина (БФ) в пиридине сернистым натром. *1* — раствор БФ до облучения, *2* — промежуточный продукт реакции после 30 сек. освещения, *3* — конечный продукт (после пуска воздуха и стояния в темноте)

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы.

1. БХ быстро фотоокисляется кислородом воздуха с образованием перекисного соединения, не обладающего характерным спектром порфиринов; наиболее вероятно взаимодействие кислорода с длительным бирадикальным возбужденным состоянием пигмента, в соответствии с теорией А. Н. Теренина ([8]), что

* Опыты велись в пиридине, содержащем 10% воды, для лучшего растворения сернистого натра.

сопровождается раскрытием сопряженной по кругу системы двойных связей молекулы пигмента; обратимое восстановление этой перекиси приводит к образованию исходной молекулы пигмента. Так же как и в случае хлорофилла, нам не удалось констатировать вероятность обратимого окисления — дегидрирования; необратимое окисление — дегидрирование орто-хиноном — приводит к образованию хлорофиллоподобного соединения, т. е. к дегидрированию с появлением одной изолированной двойной связи молекулы пигмента.

2. Фотовосстановление БХ и БФ также приводит к падению инфракрасного максимума поглощения; течение реакции этих пигментов свидетельствует о том, что восстановление не идет по месту изолированных двойных связей, полностью гидрированных у БХ; мы уже высказывали предположение ([1]), что фотовосстановление сопровождается раскрытием сопряженной по кругу системы двойных связей с образованием активного промежуточного продукта типа устойчивого свободного радикала («семи»- или «полухинона»).

3. Сравнение свойств БХ и БФ показывает, что первое соединение легче окисляется и труднее восстанавливается, чем второе; та же закономерность в случае хлорофилла и феофитина наблюдалась в нашей лаборатории В. Б. Евстигнеевым и В. А. Гавриловой ([9]).

4. Сравнение свойств хлорофилла и БХ показывает, что второе соединение фотоокисляется обратимо гораздо легче, чем первое, но восстанавливается несколько труднее; оба феофитина обратимо восстанавливаются быстро и полно.

5. Обнаруженные и исследованные нами обратимые реакции БХ и феофитина позволяют понять химический путь фотосенсибилизированных этими соединениями реакций: в случае сенсибилизированного фотоокисления органических соединений кислородом воздуха, так же как и в случае хлорофилла, в зависимости от природы среды возможно первичное образование перекиси пигмента или его фотовосстановление окисляемым соединением с последующими реакциями перекиси пигмента с субстратом окисления или реакцией кислорода с фотовосстановленной формой пигментов.

6. Полученные результаты обосновывают предположение о химическом участии исследованных пигментов в процессе бактериального фотосинтеза: фотовосстановленная форма пигмента, образующаяся при реакции с сероводородом, передает свой водород (протон и электрон) промежуточной ферментной системе, управляющей темновыми реакциями восстановления углекислоты.

В соответствии с этим можно предположить, что у Athiorhodaceae для фотореакции могут использоваться более активные соединения, образуемые при темновых превращениях исходных доноров водорода, неспособных к прямой фотореакции с пигментом.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терепину за ценные указания и помощь в работе.

Поступило
29 VIII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **64**, 663 (1949). [2] А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947). [3] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947); **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, Усп. биохимии, **1**, изд. Акад. мед. наук, 1950. [4] J. G. Eymers u. E. C. Wassink, Enzymologia, **2** (1948). [5] A. Manten, Ant. v. Leeuwenhoek Journ. Microb. and Serology, **14** (1948). [6] C. S. French, Journ. Gen. Phys., **23**, 483 (1940). [7] А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, ДАН, **74**, 569 (1950). [8] А. Н. Теренин, Acta Physicochim. URSS, **18**, 210 (1943); Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947 [9] В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950).

Доклады Академии Наук СССР
1951. Том LXXXI, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и В. А. ГАВРИЛОВА

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ СРЕДЫ НА РЕАКЦИЮ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА, РИБОФЛАВИНА И ДРУГИХ КРАСИТЕЛЕЙ ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 17 X 1951)

В настоящем сообщении кратко описаны результаты систематического сравнительного исследования влияния природы среды (растворителя) на реакцию фотохимического восстановления ряда натуральных пигментов и синтетических красителей (см. также [1]).

В качестве донора водорода (протона и электрона) использовались органические кислоты, распространенные среди продуктов обмена веществ: аскорбиновая, пировиноградная, лимонная, яблочная и янтарная. Реакции проводились в средах, обладающих различной величиной сродства к протону: пиридине, диоксане, этиловом спирте и воде (фосфатный буфер 0,035 *M* с pH 6,6). Были исследованы хлорофиллы а и б [2–5], рибофлавин, β-каротин, фталоцианин магния, а также красители с различной величиной окислительно-восстановительного потенциала (E_0), использованные в наших работах [6] в качестве акцепторов при сенсибилизированном хлорофиллом переносе водорода: фенол-индофенол ($E_0 = +28$ в), сафранин Т ($E_0 = -0{,}29$ в) и нейтральный красный ($E_0 = -0{,}32$ в). Метод работы был подобен описанному нами ранее [2–4]. За ходом реакции следили по изменению коэффициента погашения *K* пигмента в главном максимуме поглощения.

В 6 мл раствора пигмента с величиной $K = 0{,}6$—$0{,}8$ в максимуме поглощения вводили 5 мг органической кислоты и эвакуировали масляным насосом 3 мин. при взбалтывании в вакуумной трубке особой формы, допускающей ее установку в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра Бекмана. После 30 мин. стояния в темноте раствор освещали в термостатирующей рубашке при 15° в фокусе конденсора киноламлы 500 вт через красный светофильтр RG-2 (хлорофилл и фталоцианин) и без светофильтра для других пигментов. Измерения *K* производили после эвакуации, в течение 9 мин. освещения (каждые 3 мин.), после 15 мин. стояния в темноте и через 30 мин. после пуска воздуха. Контрольные опыты ставили без добавки «восстановителя». Часть полученных опытных данных приведена в табл. 1. Изложим кратко результаты опытов.

1. Хлорофилл а и б. В спирте и ацетоне фотореакция со всеми испытанными соединениями незначительна; в пиридине наблюдается быстрое фотовосстановление аскорбиновой кислотой, остальные кислоты неактивны [1, 3]. В диоксане также реагирует лишь аскорбиновая кислота, которая в темноте необратимо и, повидимому, деструктивно восстанавливает хлорофилл а и б. Освещение ускоряет эту реакцию. Пуск воздуха, а также введение других окислителей (хинонов) не приводит к обращению реакции: спектр поглощения продуктов восстановления не обладает характерным максимумом при 525 мμ, наблюдающимся в пи-

Таблица 1

Фотохимические реакции пигментов с органическими кислотами (оставшийся после реакции пигмент в % от исходного количества)

Пигмент	Растворитель *	Восстановитель **	Темновая реакция 30 мин.	Фотореакция 9 мин.	Обратная реакция: без воздуха 15 мин.	Обратная реакция: с воздухом 30 мин.	Пигмент	Растворитель *	Восстановитель **	Темновая реакция 30 мин.	Фотореакция 9 мин.	Обратная реакция: без воздуха 15 мин.	Обратная реакция: с воздухом 30 мин.
Хлорофилл	П	н	100	89	90	90	Нейтральный красный	П	н	100	89	94	98
		а	100	5	27	62			а	100	92	99	99
		п	100	86	86	87			я	98	54	64	98
		я	100	83	84	85		Д	н	100	72	74	76
	Д	н	100	100	100	100			а	84	69	73	81
		а	32	—	—	—			п	100	9	16	23
		п	98	96	96	96			я	100	82	82	81
		я	100	83	83	82		С	н	100	94	96	100
	С	н	99	99	99	99			а	98	91	94	94
		а	100	66	67	70			п	99	4	7	22
		п	100	96	95	95			я	100	46	48	83
		я	100	100	100	100		В	н	99	96	97	97
									а	100	99	99	90
									п	100	10	19	50
									я	100	100	100	100
Рибофлавин	П	н	100	11	17	81							
		а	100	13	42	63	Сафранин Т	П	н	100	40	42	84
	Д	н	97	10	15	26			а	95	57	92	103
		а	31	—	—	23			п	99	5	15	64
		п	101	11	18	24			я	100	27	41	87
		я	100	12	16	25		Д	н	100	100	100	100
									а	73	33	92	69
	С	н	100	13	13	73			п	98	10	21	34
		а	101	10	11	68			я	100	35	39	42
		п	100	13	13	66							
		я	99	14	13	80		С	н	99	91	91	100
									а	100	60	64	103
	В	н	100	15	17	79			п	98	1	9	74
		а	100	88	89	87			я	100	74	81	100
		п	100	14	17	100							
		я	100	19	22	81		В	н	98	98	98	98
									а	100	86	100	100
									п	100	6	16	86
									я	100	100	100	100

* П — пиридин, Д — диоксан водный 80%, С — спирт этиловый, В — вода (буферный раствор, pH 6,6).

** н — нет, а — аскорбиновая кислота, п — пировиноградная кислота, я — яблочная кислота.

ридине. Хотя введение кислорода и не оказывает влияния на скорость уже начавшейся в анаэробных условиях реакции, в присутствии кислорода (т. е. без откачивания) эта реакция не идет. Возможно, что это связано с обратимостью начальных этапов восстановления. Сероводород и цистеин, приводящие в пиридине к фотовосстановлению хлорофилла, в диоксане также восстанавливают хлорофилл в темноте, хотя равновесная концентрация хлорофилла в конце реакции с этими соединениями выше, чем с аскорбиновой кислотой.

2. Фталоцианин магния. Поведение сходно с хлорофиллом; в пиридине наблюдается фотовосстановление аскорбиновой кислотой с весьма быстрым (секунды) обращением реакции при выключении света; многократное повторение освещения приводит к постепенному замедлению обратной реакции, что, вероятно, связано с сенсибилизированным пигментом взаимодействием остающихся в трубке следов кислорода с аскорбиновой кислотой (7). В диоксане, при неактивности других кислот, наблюдается быстрое темновое деструктивное восстановление аскорбиновой кислотой; добавки диоксана к спирту приводят к тому же эффекту.

3. Рибофлавин. Водный раствор рибофлавина в темноте не реагирует со всеми испытанными соединениями. Освещение водного раствора без добавок ведет к фотовосстановлению с обратной регенерацией до 80% пигмента после пуска кислорода в темноте. Эта реакция, ведущая к образованию производных рибофлавина, известна. Введение лимонной и яблочной кислот мало влияет на эту реакцию, тогда как введение аскорбиновой кислоты (и в меньшей степени янтарной) в сильной степени тормозит реакцию. Пировиноградная кислота при освещении быстро реагирует с рибофлавином; обратное окисление приводит к 100% его регенерации. В спиртовом растворе без добавок и со всеми испытанными кислотами происходит быстрая фотореакция с регенерацией около 80% пигмента после пуска кислорода; подобным образом идет реакция в пиридине, где в опыте с аскорбиновой кислотой наблюдается более явно обратная темновая реакция. В диоксане без кислот и с кислотами происходит фотореакция, причем доминируют процессы деструктивного восстановления. Аскорбиновая кислота в диоксане также реагирует с рибофлавином в темноте; введение воздуха не приводит к обращению реакции.

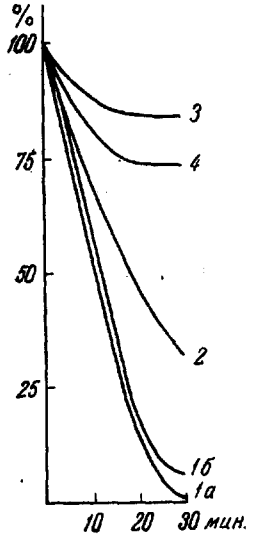


Рис. 1. Реакция красителей с аскорбиновой кислотой в диоксане, содержащем 20% воды (в темноте). 5 мг аскорбиновой кислоты на 6 мл раствора красителя с K в максимуме поглощения 0,5—0,7. *1а* — хлорофилл а, *1б* — хлорофилл б, *2* — рибофлавин, *3* — нейтральный красный, *4* — сафранин Т

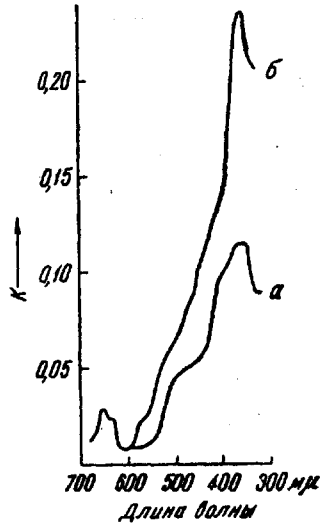


Рис. 2. Спектр поглощения продуктов восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в диоксане, содержащем 20% воды. 5 мг аскорбиновой кислоты на 6 мл раствора, через 30 мин. в темноте. *а* — хлорофилл а, *б* — хлорофилл б

4. β-каротин. В пиридине и спирте не реагирует ни с аскорбиновой ни с пировиноградной кислотой.

5. Сафранин Т. В водном растворе быстрая и полная фотореакция идет с пировиноградной кислотой, гораздо слабее с аскорбиновой, остальные соединения неактивны. В спирте наблюдается то же самое; реакция идет слабо с другими кислотами, а также весьма слабо с растворителем. В пиридине идет быстрая реакция с пировиноградной кислотой и более медленная реакция с другими кислотами и растворителями. В диоксане наблюдается фотореакция со всеми соединениями (кроме

растворителя и лимонной кислоты) и темновое восстановление аскорбиновой кислотой, ускоряющееся при освещении; после пуска кислорода реакция возвращается к темновому равновесию.

6. Нейтральный красный. В воде фотореагирует лишь с пировиноградной кислотой. В спирте и пиридине идет быстрая реакция с пировиноградной, затем с лимонной, янтарной и яблочной и слабее всего с аскорбиновой кислотой и растворителем. В диоксане идет темновая реакция с аскорбиновой кислотой, ускоряющаяся при освещении, быстрая фотореакция с пировиноградной и более слабая с другими соединениями и растворителем; после регенерации положение главного максимума поглощения красителя смещается.

7. Фенол-индофенол. Во всех растворителях наблюдается мгновенное темновое восстановление аскорбиновой кислотой и слабое фотовосстановление пировиноградной. Остальные соединения были неактивны.

Главные выводы из опытных данных

1. Все испытанные соединения (кроме β-каротина) способны к фотохимическому восстановлению. Положение равновесия исследованных реакций в органических растворителях отличается от равновесия в водных растворах; освещение сдвигает равновесие в сторону восстановления за счет энергии фотоактивированного состояния молекулы пигмента ([6]). В свою очередь, вероятность образования длительной фотоактивированной формы пигмента также зависит от влияния молекул среды, способных к образованию водородных связей с молекулами пигмента, на что указал в своих работах А. Н. Теренин ([8]). Таким образом, возможность фотохимических окислительно-восстановительных реакций пигмента определяется не только химическими свойствами реагирующих соединений, но и природой среды; при этом особое значение имеет величина сродства среды к протону, вероятно, определяющая возможность облегчения акта электронного перехода и устойчивость первичных продуктов реакции.

2. Среди испытанных доноров водорода — органических кислот — наиболее склонны к реакции с фотоактивированными молекулами пигментов аскорбиновая и пировиноградная кислоты; их поведение специфично: аскорбиновая кислота легко фотореагирует с хлорофиллом (в присутствии органических оснований), тогда как пировиноградная легко реагирует с красителями и рибофлавином; возможно, что эта реакция определяет наблюдавшееся некоторыми авторами ускорение дыхания при освещении. Поведение лимонной, яблочной и янтарной кислот в большинстве случаев было сходным.

3. Без добавок органических кислот в среде растворителей удается наблюдать обратимую фотореакцию некоторых пигментов, наиболее явно у рибофлавина. Вероятно, это связано с окислительно-восстановительным процессом внутри или между молекулами пигмента; в ряде случаев возможно также участие растворителя как «донора водорода».

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
28 V 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [2] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [3] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950). [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [5] В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950). [6] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948). [7] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947). [8] А. Н. Теренин, Acta Physicochim. URSS, **18**, 210 (1943).

Доклады Академии Наук СССР
1952. Том LXXXVII, № 1

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

УЧАСТИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ХЛОРОФИЛЛА А В РЕАКЦИЯХ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ВОДОРОДА В РАСТВОРЕ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 8 IX 1952)

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано участие хлорофилла в сенсибилизированных им реакциях переноса водорода (электрона) ([1], [2]). В настоящем сообщении кратко описаны результаты систематического сравнительного исследования фотохимических окислительно-восстановительных реакций, сенсибилизированных бактериохлорофиллом, хлорофиллом а и соответствующими феофитинами в растворе. В качестве исходных восстановителей были взяты вещества, характерные для обмена веществ зеленых растений (аскорбиновая кислота) и пурпурных серобактерий (сернистый натрий), в качестве «окислителей» (акцепторов водорода) — не поглощающие в красной области спектра простетические группы дегидразных ферментов: рибофлавин, дифосфопиридин-нуклеотид (ДПН) и краситель сафранин Т.

Опыты велись в среде этилового спирта и пиридина, содержащих 15% воды; в водных растворителях лучше растворим Na_2S. Хлорофилл а и бактериохлорофилл были выделены, соответственно, из листьев крапивы и культуры бактерий Rhodopseudomonas с конечным хроматографическим разделением согласно краткой описанной нами методике ([3]). Феофитины были получены действием 10% соляной кислоты на эфирные растворы хлорофиллов. Освещение раствора реагирующих соединений производили в отсутствие воздуха, в области максимума поглощения хлорофилла или бактериохлорофилла (см. рис. 1); за ходом реакции следили путем измерений K восстанавливаемого соединения.

В вакуумную трубку особой формы, допускающей ее установку в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра, вводили 6—7 мл раствора с концентрацией пигмента-сенсибилизатора около 10^{-5} мол/л, восстановителя около 10^{-2} мол/л, сафранина или рибофлавина около 10^{-4} мол/л ($K = 0{,}5$—$0{,}8$). Опыт вели по следующей схеме: 1) раствор в трубке эвакуировали масляным насосом при энергичном взбалтывании в течение 3 мин.; 2) измеряли K в максимумах поглощения пигмента и акцептора водорода; 3) выдерживали от 30 мин. до 1 часа в темноте с тем, чтобы проконтролировать возможное течение темновой реакции; 4) снова измеряли K в максимумах поглощения пигмента и акцептора; 5) освещали раствор в течение 3 мин. в фокусе конденсора кинолампы 500 вт на специальной термостатируемой установке при 20° (в опытах с хлорофиллом через светофильтр RG-2, в опытах с бактериохлорофиллом через RG-5); 6) снова измеряли K, оставляли на 9 мин. в темноте, проводя измерение K по ходу реакции; 7) наконец, пускали в трубку воздух и снова измеряли после 30 мин. стояния. Контрольные опыты в двойных системах: пигмент — восстановитель, акцептор водорода — восстановитель и пигмент — акцептор водорода ставили в тех же условиях.

В опытах по сенсибилизированному восстановлению ДПН ([2]) нужно

было констатировать сравнительно небольшие изменения поглощения при 340 мμ, так как молекулярный коэффициент погашения восстановленного ДПН при 340 мμ значительно меньше величины коэффициента погашения у красителей. В этом случае в вакуумную трубку вводили 1 мл водно-аммиачного раствора 3 мг козимазы с содержанием 25% ДПН, 3 мг аскорбиновой кислоты или сернистого натрия и 5 мл раствора пигмента в пиридине, затем эвакуировали 3 мин. масляным насосом, снимали спектр, освещали 3 мин. через соответствующий светофильтр и вновь снимали спектр.

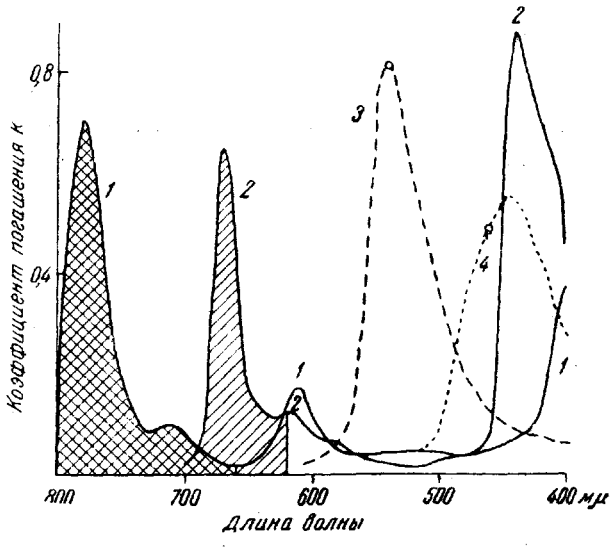


Рис. 1. Спектры поглощения: *1* — бактериохлорофилла, *2* — хлорофилла а, *3* — сафранина Т, *4* — рибофлавина в пиридине. Заштрихованы области спектра поглощения пигментов, в которых возбуждалась сенсибилизированная реакция. На спектральных кривых акцепторов обозначены точки, в которых вели измерение

Резюмируем результаты опытов.

1. Контрольные опыты в двойных системах в темноте (растворы пигментов и акцепторов водорода порознь в спирте и пиридине практически не изменяются): а) Пигмент — восстановитель. В течение часа темноты изменения практически не наблюдается. В спирте, содержащем воду, пигменты в присутствии аскорбиновой кислоты частично феофитинизируются (хлорофилл быстрее). б) Пигмент — акцептор водорода. Изменений обоих компонентов не наблюдается. в) Акцептор водорода — восстановитель. Исследованные соединения в темноте с аскорбиновой кислотой практически не реагируют ни в спирте, ни в пиридине; однако сернистый натрий уже в темноте восстанавливает рибофлавин и сафранин, наиболее явно в пиридиновом растворе.

2. Контрольные опыты в двойных системах при освещении в области поглощения пигментов: а) Пигмент — восстановитель. При освещении происходит обратимое фотохимическое восстановление пигментов, исследованное нами ранее; явное течение реакции наблюдается лишь в пиридине. Фотовзаимодействие хлорофилла с сернистым натрием невелико (реагирует не более 25% пигмента). б) Пигмент — акцептор водорода. Взаимодействия не наблюдается. в) Акцептор водорода — восстановитель. Так как эти соединения не поглощают в красной области спектра, пропускаемой светофильтрами RG-2 и RG-5, то результаты опытов те же, что и в темноте. Освещение в области собственного поглощения акцепторов водорода приводит к фотореакции, исследованной нами ранее ([4]).

3. Контрольные опыты в тройных системах в темноте. Нет существенных отличий от опытов с двойными системами в темноте.

4. Опыты в тройных системах при освещении в области поглощения пигментов (через светофильтры RG-2 и RG-5). а) Прежде всего нужно констатировать, что в присутствии

акцепторов водорода не наблюдается значительного падения максимума поглощения пигментов при фотореакции (падение не более 5—10%), что объясняется обратимым окислением фотовосстановленной формы пигментов акцепторами водорода. б) Хлорофилл а в спиртовом и пиридиновом растворе в присутствии аскорбиновой кислоты сенсибилизирует восстановление до 50% рибофлавина и до 25% сафранина (от начального их количества), пуск воздуха приводит к полной регенерации рибофлавина и сафранина. Феофитин а ведет себя подобно. В присутствии Na_2S (вместо аскорбиновой кислоты) в пиридине наблюдалось более глубокое восстановление сафранина (до 80%) и рибофлавина (до 60%). в) Бактериохлорофилл в спирте и пиридине в присутствии аскорбиновой кислоты сенсибилизирует восстановление до 25% рибофлавина и сафранина; в присутствии Na_2S в пиридиновом растворе восстановление акцепторов водорода идет глубже (до 70%). В спирте реакция с Na_2S идет своеобразно; в присутствии рибофлавина наблюдается почти полное выцветание бактериохлорофилла, тогда как с каждым из компонентов в отдельности реакция практически не идет. г) Бактериофеофитин в спирте в присутствии аскорбиновой кислоты почти не приводит к восстановлению рибофлавина и сафранина (5—7%); в присутствии Na_2S реагирует от 40 до 60% этих соединений. В пиридине с аскорбиновой кислотой реагирует до 60% рибофлавина и 25% сафранина; с Na_2S — до 70% рибофлавина и до 50% сафранина. д) Сенсибилизированное восстановление ДПН аскорбиновой кислотой и сернистым натрием удается наблюдать лишь у хлорофилла а в соответствии с опытами одного из нас с Г. П. Брин, сделанными в 1948 г. ([2]). В случае бактериохлорофилла явного течения этой реакции не наблюдается (см. табл. 1). Таким образом, бактериохлорофилл и бактериофеофитин, так же как хлорофилл а и феофитин а, сенсибилизируют в растворе окислительно-восстановительные реакции, связанные с переносом водорода (электрона). В случае хлорофилла в предыдущих работах лаборатории ([1, 2]) было показано прямыми опытами двухступенчатое течение реакции. Констатировать два этапа течения реакции удается вследствие достаточно длительной жизни активной фотовосстановленной формы хлорофилла. Однако при фотовосстановлении бактериохлорофилла обратная реакция идет столь быстро, что не удается измерить спектральные свойства фотопродукта ([4]), поэтому не удается осуществить раздельно второй этап процесса. Сходное поведение обоих пигментов дает основание полагать, что и в случае бактериохлорофилла сохраняется двухступенчатый механизм.

Таблица 1

Фотосенсибилизированное восстановление дифосфопиридин нуклеотида (ДПН). Значения коэффициента погашения раствора K

Длина волны в мμ	Хлорофилла			Бактериохлорофилл		
	K до освещ.	K после освещ.	ΔK	K до освещ.	K после освещ.	ΔK
360	0,595	0,798	0,203	0,660	0,628	—0,032
350	0,690	0,930	0,240	0,695	0,680	—0,015
345	0,775	1,020	0,245	0,751	0,751	0
340	0,880	1,140	0,260	0,840	0,870	0,030
335	1,040	1,280	0,240	0,970	1,040	0,070
330	1,280	1,500	0,220	1,140	1,290	0,150

Схему сенсибилизированного восстановления, например рибофлавина (Р) аскорбиновой кислотой (АН), можно выразить следующим образом, где $X^{\vee}$ — фотоактивированная молекула пигмента в длительно живущем (бирадикальном), по А. Н. Теренину ([5]), состоянии: 1) фотостадия $X^{\wedge} + AH \rightarrow XH + A$; 2) темновые стадии: $XH + P \rightarrow X + PH$ и. т. д.

При использовании сернистого натра вместо аскорбиновой кислоты восстановление происходит за счет отдачи электрона донора (Na_2S) и протона воды; вероятно участие в реакции ионов SH^-, образующихся при гидролитическом взаимодействии сернистого натрия с водой:

$$X^{\vee} + SH^- \rightarrow X^- + SH;\ X^- + H^+ \rightarrow XH;\ 2SH \rightarrow H_2S + S \text{ и т. д.}$$

Осуществление в растворах бактериохлорофилла сенсибилизированных реакций, сходных с элементарными реакциями бактериального фотосинтеза, дает основания для предположения об его механизме; однако нужно объяснить то, что фотовосстановление бактериохлорофилла не удается наблюдать при действии многих доноров водорода бактериального фотосинтеза, а лишь при действии Na_2S; так, неактивны яблочная кислота и пропиловый спирт ([3]). В этих случаях нужно предположить предварительную активацию этих соединений с вероятным участием специфических дегидраз, ведущую к образованию более активных продуктов обмена, которые могут фотохимически реагировать с бактериохлорофиллом. Так, в спиртовом растворе не удается наблюдать восстановления бактериохлорофилла сернистым натрием, однако добавка рибофлавина приводит к быстрому течению фотореакции. Темновое восстановление рибофлавина Na_2S ведет к предварительному образованию лейкоформы, вероятно реагирующей при освещении с бактериохлорофиллом.

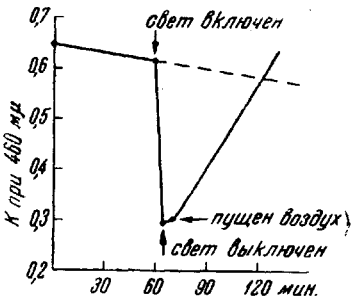


Рис. 2. Фотосенсибилизированное бактериохлорофиллом восстановление рибофлавина сернистым натрием

В свете полученных результатов схему переноса водорода (электрона) при бактериальном фотосинтезе можно представить в общем случае так: донор водорода $\rightarrow$ Ф $\rightarrow$ бактериохлорофилл $\rightarrow$Ф′ $\rightarrow$ реакция восстановления CO_2.

Здесь символом Ф обозначены ферментные и вспомогательные окислительно-восстановительные системы, переносящие водород (электрон). В недавних работах ([7]) было показано наличие у фотосинтезирующих бактерий ферментных систем, участвующих в переносе водорода. Фотостадия заключается в повышении восстановительного потенциала доноров посредством обратимо фотореагирующего бактериохлорофилла.

Наши исследования ([6]) показали, что бактериохлорофилл в клетке находится, главным образом, в агрегированном «полимерном» состоянии; в фотохимической реакции, вероятно, участвует находящаяся в равновесии с «полимерной» белково-липоидная мономерная форма бактериохлорофилла; в этом случае приходится предположить возможность передачи энергии поглощенного кванта света между разными состояниями бактериохлорофилла. Обсуждение связанных с этим вопросов см. у А. Н. Теренина ([8]), которому мы приносим благодарность за советы и помощь.

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

Поступило
31 VII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); **60**, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950); **67**, 325 (1949). [3] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). [4] А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951). [5] А. Н. Теренин, Acta physicochim. URSS, **18**, 210 (1943); ЖФХ, **18**, 1 (1944); Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947; Биохимия, **17**, в. 1 (1952). [6] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 389 (1952). [7] H. Gest, M. Kamen, Science, **109**, 558 (1949). [8] А. Н. Теренин. Усп. физ. наук, **43**, 347 (1951).

Доклады Академии Наук СССР
1952. Том LXXXV, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, К. К. ВОЙНОВСКАЯ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

ПРИРОДА ЕСТЕСТВЕННОГО СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В СВЯЗИ СО СПЕКТРАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ ЕГО КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ И ТВЕРДЫХ ПЛЕНОК

(Представлено академиком А. Н. Терениным 29 IV 1952)

Бактериохлорофилл (ниже обозначаемый буквами БХ) в растворе обладает одним главным максимумом поглощения в близкой инфракрасной области спектра при 760—780 мμ (в зависимости от природы растворителя), тогда как в живой клетке наблюдаются принадлежащие БХ 2—3 максимума поглощения ([2]) при 800, 850 и иногда при 890 мμ (± 10 мμ). Причины этого явления до настоящего времени не были установлены. Исследования нашей лаборатории ([3]) позволили притти к заключению, что положение главного максимума поглощения света хлорофилла в пластиде при 678 м определяется агрегированной коллоидной формой хлорофилла, в соответствии с исходными работами Д. И. Ивановского ([4]). Исходя из работы с хлорофиллом, можно было ожидать, что положение главных максимумов поглощения БХ в клетках также определяется его агрегированным, «полимерным» состоянием.

В настоящей работе были исследованы: спектральные свойства твердых пленок БХ, бактериофеофитина и их водных коллоидных растворов на разных стадиях коагуляции, а также влияние воздействий на спектральные свойства БХ в естественном состоянии.

Твердые пленки. БХ мы получали из пурпурных бактерий с конечным хроматографическим разделением на сахаре, кратко описанным в предыдущем сообщении ([1]). Пигмент снимали с сахара эфиром или иными растворителями. Промывка эфира водой, сушка прокаленным сульфатом натрия с последующим испарением и переводом в другие растворители не оказывала влияния на вид спектров поглощения пленок, так же как и присутствие избытка сахарозы.

1 мл раствора БХ испарялся под вакуумом масляного насоса в вакуумной трубке, приспособленной для установки в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра, на котором производилось измерение спектров. Оказалось, что пленки БХ, полученные из эфира, спирта и ацетона, обладали двумя четкими максимумами поглощения при 800 и 850 мμ (±10 мμ). Нагревание пленок до 60° приводило к снижению максимума при 850 мμ и увеличению максимума при 800 мμ (см. рис. 1). Охлаждение приводило к возвращению исходного спектра. Растворение пленок в эфире показало практическую неизменность БХ, обладающего до и после опыта максимумом поглощения в эфирном растворе при 770 мμ.

Конденсация паров воды на пленку БХ, полученную из эфира, приводила к перемещению максимума поглощения от 850—860 до 870 мμ. В случае введения в эфирный раствор БХ малого количества (около 1 мг) мочевины последующая конденсация водяного пара на пленку иногда приводила к сдвигу максимума поглощения до 890 м; в некоторых опытах при действии воды удавалось получить в одной пленке БХ

все три максимума поглощения — при 800, 850 и 890 мμ. Однако эти опыты были плохо воспроизводимы; условия получения структуры пленки, соответствующей поглощению при 890 мμ при сохранении структур 800 и 850 мμ, требуют дальнейшего исследования.

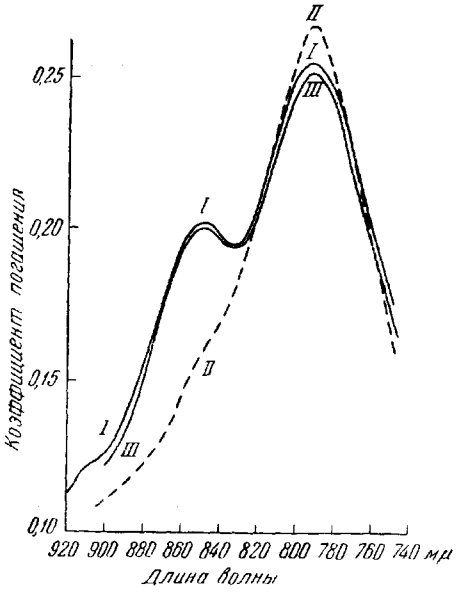


Рис. 1. Спектр поглощения твердой пленки БХ. *I* — пленка, полученная испарением эфирного раствора БХ; *II* — нагрета 5 мин. до 60°; *III* — охлаждена до 5° 45 мин. Все измерения при 20°

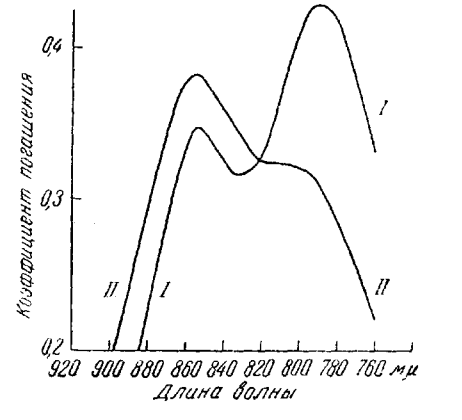


Рис. 2. Спектр поглощения коллоидного раствора БХ. *I* — к 1 мл раствора БХ в метаноле добавлено 8 мл воды; *II* — добавлено 0,5 мл 10% раствора $MgCl_2$ (коагуляция)

Органические соединения, вводимые в малом количестве (около 1 мг) в эфир перед испарением, либо не оказывали заметного влияния на положение максимумов поглощения пленок (сахар, пальмитиновая кислота, гликокол, дрожжевая нуклеиновая кислота, сера и др.), либо оказывали дезагрегирующее действие, приводя к устранению максимума при 850 мμ (липоиды, имидазол, цетиловый спирт) при сохранении максимума 790 мμ (± 10 мμ).

Весьма существенно, что пленки «сырого» БХ, полученного извлечением из бактерий метанолом с последующим переводом пигментов в эфир, обладали лишь одним максимумом поглощения при 780—790 мμ, что обязано наличию в бактериях извлекаемых метанолом липоидных соединений *.

Пленки бактериофеофитина обладали одним максимумом при 850 мμ (± 5 мμ), не изменяющимся при нагревании до 100°.

Коллоидные растворы БХ были получены двумя способами: 1) прямым растворением адсорбированного на сахаре БХ в воде с последующей коагуляцией $MgCl_2$; 2) разбавлением водой растворов БХ в спирте, ацетоне, диоксане, пиридине с последующей коагуляцией $MgCl_2$. Обычно к 1 мл раствора БХ добавляли 8 мл дестиллированной воды и затем 0,5 мл 10% водного раствора $MgCl_2$. Свежеприготовленные коллоидные растворы обычно обладали двумя максимумами поглощения при 800 и 850 мμ (± 10 мμ). Однако наблюдались некоторые различия вида спектра в зависимости от природы исходных растворителей.

Так, в случае сильного дезагрегирующего действия растворителя, например пиридина (5), не удается наблюдать максимума при 850 мμ.

* Катц и Вассинк (2) не смогли обнаружить описанных в нашей работе спектральных свойств пленок, так как ставили опыты с «сырым», неочищенным хроматографически бактериохлорофиллом; Рабинович, основываясь на этих опытах, развивает в своей книге (8) представление, что положение полос поглощения БХ в бактериях определяется взаимодействием пигмента с другими составными частями клетки, а не агрегацией его молекул; в свете результатов нашей работы эти выводы не являются убедительными.

В процессе коагуляции коллоидных растворов при действии хлористого магния наблюдалось перемещение доминирующего поглощения в длинноволновую область спектра; введение $MgCl_2$ сразу приводит к явному усилению светорассеяния.

Так же как и твердые пленки, коллоидные растворы «сырого» БХ обладали лишь одним максимумом поглощения при 790 ± ± 10 мμ. Нагревание коллоидных растворов приводит к ускорению коагуляции.

Влияние воздействий на БХ в естественном состоянии. Пурпурные бактерии* центрифугировали, промывали водой, растирали в ступке с порошком карборунда в фосфатном буфере pH 6,5 и снова центрифугировали. Полученная стойкая суспензия обладала теми же тремя максимумами поглощения, что и исходная ненарушенная культура.

1. Нагревание суспензии до 50—80° приводит к постепенному перемещению поглощения к 800 мμ; дальнейшее нагревание до 100° приводит к перемещению максимума поглощения до 770 мμ (± 10 мμ), вероятно, соответствующему полной дезагрегации и растворению БХ в липоидной фазе (см. также [2]).

2. Действие кислоты приводит к «спаданию» максимумов поглощения 800 и 890 мμ при повышении 850 мμ, что объясняется образованием из БХ бактериофеофитина, обладающего в агрегированной форме поглощением при 850 мμ. Существенно, что нагревание обработанных кислотой бактерий уже не приводит к перемещению поглощения в соответствии с поведением бактериофеофитина в твердых пленках.

3. Действие растворителей — метанола, ацетона, пиридина, диоксана — приводит к постепенному нарушению всех трех максимумов поглощения бактериальной суспензии с появлением, при достаточно большой концентрации

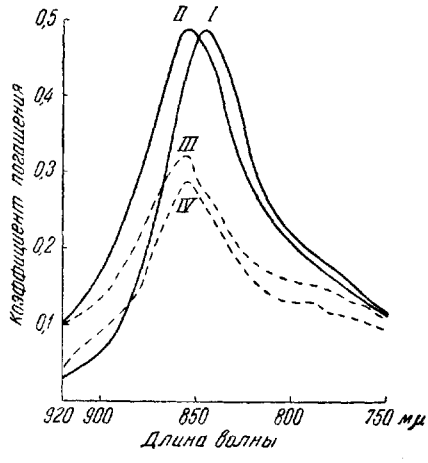


Рис. 3. Спектр поглощения твердой пленки и коллоидного раствора бактериофеофитина. *I* — к 1 мл раствора в спирте добавлено 8 мл воды; *II* — добавлено 0,5 мл. 10% раствора $MgCl_2$; *III* — пленка, полученная испарением эфирного раствора; *IV* — нагрета 5 мин. до 100°

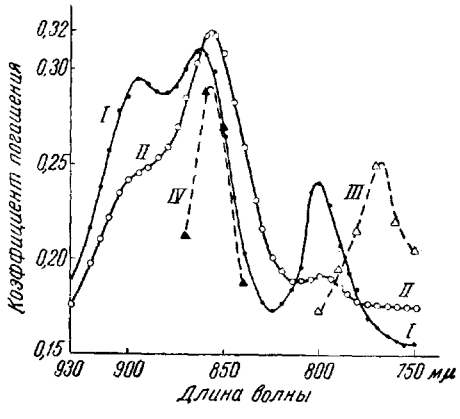


Рис. 4. Спектр поглощения коллоидного раствора вещества пурпурных бактерий. *I* — исходный спектр поглощения, подобный спектру ненарушенных бактериальных клеток (1 мл + 4 мл воды); *II* — к 1 мл раствора прибавлено 4 мл нормального раствора щавелевой кислоты; *III* — суспензия *I* нагрета до 100° 15 мин., *IV* — суспензия *II* нагрета до 100° 15 мин. Спектры *III* и *IV* по концентрации вещества не соответствуют спектрам *I* и *II*

* Исходная культура была нам предоставлена Институтом микробиологии АН СССР (Л. К. Оснищкая); определение, проведенное Е. Кондратьевой на кафедре микробиологии МГУ им. Ломоносова, показало, что эти бактерии принадлежат роду Rhodopseudomonas (Athiorodaceae).

растворителя в воде (больше 50%), спектров поглощения с одним главным максимумом, характерных для истинных растворов БХ. Наиболее активно было действие пиридина.

Результаты опытов приводят к следующим выводам.

1. Твердые пленки и водные коллоидные растворы БХ обладают двумя максимумами поглощения в близкой инфракрасной области спектра — при 790—800 мμ и при 850—890 мμ, тогда как растворы БХ в органических растворителях имеют в этой области один максимум поглощения при 760—780 мμ. Таким образом, взаимная агрегация, «полимеризация» молекул БХ приводит к появлению спектров поглощения, сходных со спектрами БХ в бактериальной клетке; наблюдаются также подобные результаты внешних воздействий на спектральные свойства твердых пленок и БХ в естественном состоянии.

2. Разные максимумы поглощения соответствуют разным типам агрегации; вероятно участие в структуре коллоидной частицы молекул растворителя (воды), что, например, известно для «полимеров» полиметиновых красителей ([6]) и вообще характерно для гидрозолей. Поглощение при 790—800 мμ следует приписать наименее агрегированной форме, а поглощение при 850—890 мμ — более высоко агрегированной форме, образуемой при дальнейшей коагуляции. Вряд ли здесь происходит истинная полимеризация за счет валентных связей; более вероятно сцепление молекул пигмента за счет координационных и водородных связей между боковыми группами или посредством «мостиков» из молекул растворителя (воды). Возможность связывания через «мостик» молекул воды по центральным атомам магния молекул пигмента иллюстрируется предыдущими работами нашей лаборатории ([7]).

В пленках и коллоидных растворах мы не наблюдали наименее агрегированной формы феофитина, при образовании которой, вероятно, играет роль сцепление через центральный атом магния, тогда как при образовании формы 850 мμ, сходной для бактериофеофитина и БХ, «сцепление» происходит с участием иных групп молекулы пигмента. Действие нагревания на пленки БХ свидетельствует о меньшей устойчивости состояния 850 мμ БХ, переходящего в форму 800 мμ.

3. Из всего вышеизложенного можно сделать тот вывод, что положение главных максимумов поглощения бактериохлорофилла в бактериальной клетке определяется, так же как и в случае хлорофилла в пластиде, агрегированными, «полимерными» формами пигмента, вероятно, существующими в равновесии с фотохимически активной, мономерной, связанной с липопротеином формой пигмента, обладающей максимумом поглощения в области 760—780 мμ.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
11 IV 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951) [2] E. Katz u. E. C. Wassink, Enzymologia, **7**, 97 (1939); E. C. Wassink, E. Katz u. R. Dorrenstein ibid., **7**, 113 (1939). [3] А. А. Красновский, Докт. диссерт., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948; доп. к сборн. Проблемы биохимии, 1948; Ежегодн. Усп. биол. хим., **1**, 473 (1950); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **63**, 163 (1948); А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, № 1 (1952). [4] Д. И. Ивановский, Протоколы засед. Об-ва естествоисп. при Варшавск. ун-те, 1909; О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. [5] А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [6] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. [7] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова и А. А. Красновский, ДАН, **70**, 261 (1950). [8] E. J. Rabinowitch, Photosynthesis, **2**, part 1, 1951, p. 651, 704.

Доклады Академии Наук СССР
1952. Том LXXXII, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, Г. П. БРИН и В. А. ГАВРИЛОВА

ВЫДЕЛЕНИЕ ФИКОЭРИТРИНА ИЗ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ, ЕГО СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 12 XII 1951)

Использование для фотосинтеза света, поглощаемого фикоэритрином красных водорослей, определяет интерес к исследованию свойств этого пигмента (ниже обозначаемого ФЭ), который можно выделить в кристаллической форме индивидуального белка (1).

Выделение фикоэритрина*. В опытах извлечения ФЭ дестиллированной водой из многих красных водорослей мы нашли, что Callithamnion rybosum весьма легко отдает ФЭ, будучи гораздо более удобным объектом, чем рекомендуемый в литературе Ceramium (1).

Свежесобранные отжатые водоросли промывали, заливали дестиллированной водой на 24 часа и отфильтровывали интенсивно флуоресцирующий раствор ФЭ через слой ваты. Фильтрат хранили под слоем толуола. Для выделения чистого продукта мы применяли, вместо описанного (1) фракционированного осаждения белков сернокислым аммонием, хроматографический способ разделения. В качестве адсорбентов нами были исследованы окиси магния и алюминия, кизельгур, углекислый магний, углекислый кальций, трикальцийфосфат и другие соединения. Лучше всего разделение происходило на трикальцийфосфате (реактивный, осажденный, химически чистый).

Предварительно экстрагированный эфиром раствор ФЭ пускали на колонку для разделения; малиновая зона ФЭ располагалась выше синей зоны фикоцианa. Размывание хроматограммы 0,15 *M* раствором Na_2HPO_4 приводило к полному разделению. Красную зону отделяли, набивали в колонку, вымывали раствором Na_2HPO_4, диализовали против дестиллированной воды и использовали для опытов.

Исследования раствора ФЭ в 0,15 *M* Na_2HPO_4 с помощью ультрацентрифуги ** показали, что раствор содержит две достаточно монодисперсные белковые компоненты: одну тяжелую с константой $S_{20} = 13{,}07 \cdot 10^{-13}$ сек., другую легкую с $S_{20} = 4{,}08 \cdot 10^{-13}$ сек. Полученная константа тяжелой компоненты близка к результату Сведберга ($12 \cdot 10^{-13}$). Из сопоставления с литературными данными (2) можно сделать предположение, что большие глобулы имеют молекулярный вес около 300 000, малые — около 50 000. Это соответствует наблюдениям Сведберга и сотрудников, которые также обнаружили в щелочной среде диссоциацию этого белка на 6 осколков.

* Эти опыты велись одним из нас на Севастопольской биологической станции Академии наук СССР в сентябре 1950 г.; пользуемся случаем принести благодарность директору станции В. А. Водяницкому и коллективу станции за оказанную нам помощь.

** Эти измерения, а также заключения о величине молекулярного веса были любезно проделаны С. Е. Бреслером, которому мы приносим свою благодарность.

Измерения электрофоретических свойств ФЭ при pH 6,98 на приборе Тизелиуса показали один высокий острый пик и один низкий размытый.

Спектральные свойства. В водных фосфатных буферных растворах были измерены спектры поглощения и флуоресценции ФЭ в пределах pH от 3,2 до 10,2 (на фотоэлектрическом спектрофотометре).

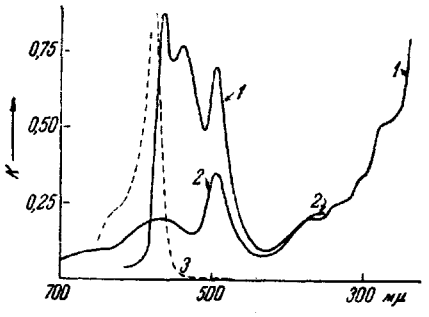


Рис. 1. *1* — спектр поглощения фикоэритрина при pH 6,9; *2* — спектр поглощения эритробилина в этиловом спирте; *3* — спектр флуоресценции фикоэритрина при pH 6,9. Ординаты, характеризующие интенсивность флуоресценции и поглощения, произвольны

В области pH от 3,6 до 10,2 при неизменности общего вида спектра относительная интенсивность всех полос поглощения несколько изменяется; в изоэлектрической точке белка при pH 4,3, интенсивность поглощения наименьшая (см. рис. 2); при pH более кислых, чем 3,7, и более щелочных, чем 8,5, происходит быстрое падение коэффициента поглощения (в видимых максимумах) вследствие коагуляции. Интенсивность главного максимума флуоресценции при 575 мμ наиболее велика при pH 7,5 и уменьшается в обе стороны, кислую и щелочную (см. рис. 1).

В пределах величины коэффициента погашения K при 565 мμ от 15,0 до 0,08 соблюдается закон Бера. Концентрационного тушения флуоресценции не удается наблюдать (в случае измерения флуоресценции при 610 мμ, где нет внутреннего поглощения света флуоресценции) в области концентраций, соответствующих величине K при 565 мμ от 0,08 до 15,0. Флуоресценция возбуждалась светом кинолампы без светофильтра.

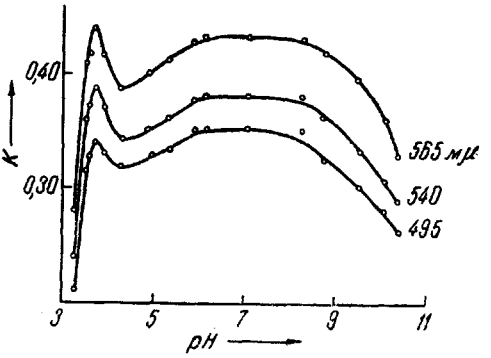


Рис. 2. Изменение коэффициента погашения в главных максимумах раствора фикоэритрина в зависимости от pH

Фотохимическое окисление и восстановление. Фотоокисление ФЭ в растворе в присутствии воздуха при различных pH оказалось незначительным. Источником света служила кинолампа 500 вт с конденсором; опыты вели при 10°. Добавка спирта и в особенности диоксана и пиридина к раствору ФЭ ускоряет фотоокисление. При этом падение максимумов поглощения ФЭ при 565 и 540 мμ происходит гораздо быстрее, чем максимума при 495 мμ (см. рис. 3). Вероятно, что при освещении происходит частичное нарушение связи белка с эритробилином, характеризующимся главным максимумом поглощения при 459 мμ. Опыты фотовосстановления фикоэритрина аскорбиновой кислотой и другими соединениями, в соответствии с описанной нами ранее методикой [3], показали устойчивость ФЭ и в этом случае.

Фотосенсибилизирующее действие. Наши опыты показали, что ФЭ не способен осуществлять реакцию изолированных хлоропластов — фотохимическое выделение кислорода воды, сопряженное с восстановлением хинона.

Более детально была исследована способность ФЭ сенсибилизировать фотоокисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха, согласно манометрической методике, описанной в наших работах [4]. Опыты, про-

веденные в пределах pH от 4,3 до 8,7, показали, что ФЭ не только не обладает фотосенсибилизирующим действием, но даже тормозит самопроизвольное (темновое) окисление аскорбиновой кислоты, идущее наиболее быстро в щелочной среде.

Опыты испытания способности ФЭ к фотохимическому переносу водорода от аскорбиновой и пировиноградной кислот к сафранину и рибофлавину, в соответствии с описанной нами методикой ([5]), показали неактивность ФЭ и в этом случае.

Выделение эритробилина. «Пигментная часть» ФЭ — производное билина, так называемый эритробилин, химически связан с белком, и его отделение достигается лишь путем гидролитического расщепления белка в кислой среде или при действии протеолитических ферментов ([1]). Образующийся красный эритробилин окисляется на воздухе в синий продукт, вероятно, соответствующий цианобилину из фикоциана. Мы проводили гидролиз диализованного раствора ФЭ 15% соляной кислотой в отсутствие воздуха в течение 24 час. при комнатной температуре, эритробилин переводили в амиловый спирт; для того чтобы иметь возможность снять спектр поглощения пигмента в ультрафиолете, амиловый спирт испаряли в вакууме и остаток растворяли в этиловом спирте. Раствор эритробилина, медленно синеющий при действии воздуха, обладает крайне слабой флуоресценцией. Эритробилин обладает главным видимым максимумом поглощения при 495 мμ, продукт окисления — при 600 мμ (см. рис. 1).

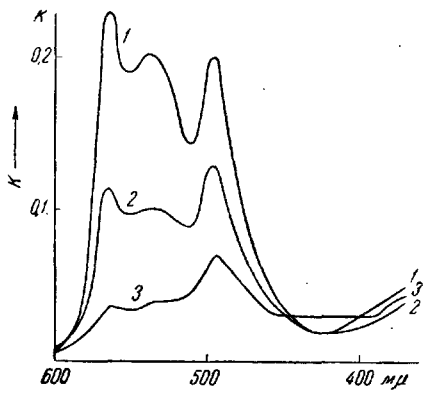


Рис. 3. Изменение спектра поглощения раствора фикоэритрина в 50% этиловом спирте, наступающее в результате фотоокисления. Освещение в фокусе конденсора киноламной 500 вт. *1* — до освещения, *2* — после 5 мин. освещения, *3* — после 15 мин. освещения (20°)

Опыты по сенсибилизированной флуоресценции были поставлены в системе ФЭ — рибофлавин в разбавленном водном растворе при концентрации пигментов около 10^{-4} мол/л. Рибофлавин обладает поглощением в «провале» спектральной кривой ФЭ. Освещение через монохроматор в области поглощения рибофлавина не приводило к видимому увеличению интенсивности флуоресценции по сравнению с контрольным опытом без рибофлавина.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие заключения: свойства ФЭ весьма сильно отличаются от свойств хлорофилла и естественных хлорофилл-белково-липоидных соединений в растворе.

По сравнению с хлорофиллом ФЭ крайне неактивен фотохимически, что делает маловероятным прямое, химическое участие ФЭ в элементарных реакциях фотосинтеза. Повидимому, более вероятна передача энергии света, поглощенного ФЭ в живой водоросли, к молекулам хлорофилла, о чем свидетельствуют также описанные в литературе ([6]) наблюдения сенсибилизированной флуоресценции хлорофилла под действием света, поглощенного фикобилинами. Подробное рассмотрение вопроса об энергетическом сопряжении пигментных систем и литература этого вопроса имеются в обзоре А. Н. Теренина ([7]).

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь в работе.

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

Поступило
26 XI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] H. Kylin, Z. Physiol. Chem., **69**, 169 (1910); R. Lemberg, Lieb. Ann., **461**, 46 (1928); **477**, 105 (1930). [2] Th. Svedberg et al., Journ. Am. Chem. Soc., **50**, 525 (1928); **51**, 3573 (1929); **54**, 3998 (1932); J. Eriksson-Quensel, Biochem. Journ., **32**, 585 (1938). [3] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [4] А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **63**, 1087 (1947). [5] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948). [6] R. Norman, C. French and F. MacDowall, Plant Physiol., **23**, 455 (1948). [7] А. Н. Теренин, Усп. физ. наук, **43**, 347 (1951).

Доклады Академии Наук СССР
1952. Том LXXXII, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ВОССТАНОВЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПЕРЕЖИВАЮЩИХ ПЕРИОД ОСВЕЩЕНИЯ В КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВА ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 3 XII 1951)

Исследование фотохимических реакций хлорофилла, бактериохлорофилла и их аналогов, проведенное в нашей лаборатории, привело к обнаружению активных продуктов фотохимического восстановления [1] или окисления [2] этих пигментов. Образованные активные фотопродукты обладают в определенных условиях внешней среды достаточно длительным периодом существования, что позволило исследовать их спектральные свойства и реакционную способность и установить их химическое участие в сенсибилизированных пигментами реакциях.

Для понимания природы элементарных реакций фотосинтеза мы считали существенной обнаруженную и исследованную в наших работах реакцию обратимого фотовосстановления хлорофилла, сопряженную с сенсибилизированным переносом водорода (электрона) ряду «окислителей», в том числе простетическим группам дегидразных ферментов — рибофлавину и фосфоропиридин-нуклеотидам [3]. В присутствии этих акцепторов водорода в растворе не удается обнаружить накопления фотовосстановленной формы хлорофилла, быстро реагирующей с указанными соединениями.

Обнаружение активных продуктов, переживающих период освещения в растворах, содержащих хлорофилл, определило поиски соединений, переживающих период освещения и у фотохимических активных коллоидных растворов вещества хлоропластов, способных при действии света к выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением хинонов и подобных соединений. В этих поисках мы применяли те же методы, что и в наших работах с растворами хлорофилла, — спектрофотометрическое измерение концентрации молекул «акцептора водорода» при его взаимодействии в темноте с предварительно освещенным «зеленым раствором» из листьев. В. Н. Любименко [4] показал, что листья некоторых растений при измельчении образуют весьма устойчивые зеленые коллоидные растворы «натурального хлорофилла», сохраняющие спектральные свойства хлорофилла в листе. Мы применяли листья фасоли (сорт Триумф).

Свежесорванные (обычно утром) верхние листья фасоли, выросшей на открытом грунте в июле — августе, растирали в ступке с 1/20 *М* фосфатным буферным раствором с pH 7, содержащим 0,1 *М* KCl (на 5 г листьев 30 мл буфера), отжимали через полотно и центрифугировали раствор при 400 *g* 20 мин.; полученный зеленый рас-

твор сливали с осадка и использовали для опытов, разбавляя его буфером до нужной концентрации. Все операции приготовления «зеленого раствора» производились по возможности при 0°. Раствор хранили не более 4 час. в темноте при 0°; хранение приводит к потере фотохимической активности.

Среди многих веществ, которые фотохимически восстанавливаются суспензией хлоропластов, для нас наиболее пригодны были соединения, обладающие наибольшей величиной молекулярного коэффициента погашения ($K_м$), с тем, чтобы возможно было спектрофотометрическое определение минимальных количеств активных восстановителей, переживающих световой период. Этим требованиям отвечает дихлорфенолиндофенол (ДХФИ) с $K_м = 0{,}8 \cdot 10^5$ при 600 мμ и при pH = 7. Условия его применения для определения активности промытых хлоропластов разработаны ([5]). Фотохимическая активность определялась нами в отсутствие воздуха. Ведение опыта в аэробных условиях ведет к обратному окислению образующегося лейкосоединения ДХФИ, вероятно, ускоряющемуся при действии оксидаз, присутствующих в растворе. Течение фотореакции с воздухом и без него показано на рис. 1. «Зеленые растворы» из листьев фасоли обладали высокой активностью. При 10-минутном освещении без воздуха восстановление ДХФИ было практически полным.

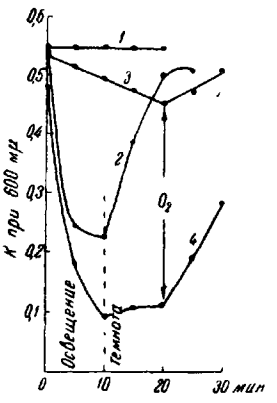


Рис. 1. Фотохимическое восстановление ДХФИ «зеленым раствором» с воздухом и без него. Совместный раствор: 3 мл «зеленого раствора» ($K = 1$ при 600 мμ) + 3мл ДХФИ ($K = 1$ при 600 мμ). Освещение через красный светофильтр RG=2. *1*—растворы в темноте с воздухом (контроль), *2* — освещение с воздухом, *3* — растворы в темноте без воздуха; *4* — освещение без воздуха; стрелка — пуск воздуха

Для обнаружения активных продуктов, переживающих период освещения, опыт ставился следующим образом. В вакуумную трубку с отводом особой формы, позволяющей ее установку в спектрофотометре Бекмана, вводили 3 мл «зеленого раствора» с $K = 1$ при 600 мμ, а в боковой отвод 3 мл раствора ДХФИ в фосфатном буфере с $K = 1$ при 600 мμ. Воздух эвакуировали (в течение 7 мин. вакуумным масляным насосом при взбалтывании) с тем, чтобы избежать обратного окисления промежуточных активных соединений. После эвакуации трубку с растворами оставляли стоять 3 мин. при 0°, после чего «зеленый раствор» освещали в фокусе конденсора 500-ваттной киноламповой через светофильтр RG-2 в течение 5 мин. при 0°. Через 1—5 сек. после выключения света к зеленому раствору из бокового отвода приливали ДХФИ и измеряли K при 600 мμ через 20—40 сек. после слива *. Для контроля проводили подобный опыт без освещения, приливая ДХФИ к эвакуированной суспензии, простоявшей 8 мин. в темноте при 0°. Разница $\Delta K = K_т - K_с$ в величине коэффициента погашения между контрольным темновым ($K_т$) и световым опытом ($K_с$) указывает на образование переживающих освещение активных продуктов. В результате десятков опытов были получены значения ΔK от 0,030 до 0,150. Величина ΔK в сильной степени зависит от физиологического состояния листьев и условий приготовления раствора. Подобные результаты были получены с растворами из промытых хлоропластов, но со значительно меньшей величиной эффекта ($\Delta K = 0{,}030 - 0{,}050$).

* Чтобы измерение вести при наименьшей погрешности показаний прибора ($K = 0{,}3—0{,}7$), в качестве «растворителя» ставили кювету с раствором ДХФИ с $K = 0{,}4—0{,}45$ при 600 мμ.

Для суждения о длительности жизни образованных активных соединений были проведены опыты со сливом ДХФИ через 30 сек., 1, 3 и 5 мин. после выключения освещения (стояние при 0°). Во всех этих опытах значение ΔK оставалось примерно одинаковым; активные продукты существуют более 5 мин. в условиях торможения обратных реакций (низкая температура, отсутствие воздуха).

В качестве акцептора водорода, кроме ДХФИ, были испытаны также красители с более низким окислительным потенциалом: тионин ($E_0 = +0{,}06$ в при pH 7), метиленовый голубой (+0,02 в), нильский синий (—0,12 в), рибофлавин (—0,22 в), сафранин (—0,29 в) и нейтральный красный (—0,30 в) с измерением поглощения света в соответствующем максимуме их спектра. При освещении без воздуха зеленого раствора, содержащего эти красители, полнота фотохимического восстановления красителей соответствовала ряду (в порядке уменьшения восстановления): тионин, метиленовый голубой, нильский синий; в случае других красителей степень восстановления была близка к ошибке опыта. Предварительно освещенные зеленые растворы восстанавливают тионин; значение ΔK при 600 мμ примерно вдвое меньше, чем в опытах с ДХФИ.

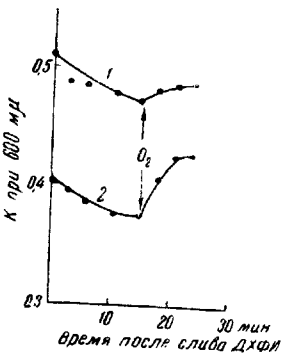


Рис. 2. Восстановление ДХФИ «зеленым раствором» (слив ДХФИ в темноте без воздуха). *1* — до слива зеленый раствор стоял в темноте при 0°; 2 — зеленый раствор до слива 5 мин. освещали при 0°. Стрелка — пуск воздуха

В опытах с приливанием ДХФИ наблюдается дальнейшее медленное восстановление в темноте (как в опыте с освещением, так и в темновом) обычно при сохранении той же величины ΔK. При впуске воздуха происходит обратное окисление лейкосоединения ДХФИ. Это свидетельствует о том, что наблюдаемое изменение K после освещения действительно связано с восстановлением ДХФИ. Однако с тем, чтобы исключить другие возможные причины изменения K при 600 мμ, были проведены опыты, определяющие устойчивость зеленого раствора к действию света без ДХФИ. Величина ΔK в этих опытах (т. е. в эвакуированных зеленых растворах) и при сливе 3 мл одного буферного раствора без ДХФИ была близка к погрешности измерения.

Темновое восстановление ДХФИ следует объяснить наличием веществ типа аскорбиновой кислоты и действием дегидразных ферментов за счет естественных доноров водорода. С тем чтобы проверить действие этих факторов, были поставлены контрольные опыты с нагретым в течение 30 мин. до 60° зеленым раствором, сохраняющим при этом способность восстанавливать ДХФИ в темноте, но в гораздо меньшей степени, чем исходный раствор. Это подтверждает наличие обоих факторов при темновом восстановлении ДХФИ. В работах Н. М. Сисакяна с сотрудниками была обнаружена высокая дегидразная активность вещества хлоропластов фасоли и других растений ([6]).

Итак, в описанных выше опытах получены следующие основные результаты.

1. Предварительное освещение при 0° эвакуированного зеленого раствора увеличивает количество активных веществ, приводящих к восстановлению ДХФИ, на 10—30% (по сравнению с контрольным опытом в темноте). Пуск воздуха приводит к обратному окислению образованного лейкосоединения ДХФИ *.

2. Подсчет молярной концентрации переживающих освещение активных фотопродуктов (исходя из эквимолекулярного соотношения

с лейко ДХФИ) показывает, что эта величина составляет 5—8% от концентрации хлорофилла, присутствующего в зеленом растворе.

3. Образуемые соединения не являются продуктами превращения хлорофилла, что следует из незначительных изменений коэффициента погашения хлорофилла в опыте; скорее всего, при реакции образуется восстановленная форма промежуточной системы, сопряженной с хлорофиллом, вероятно, по пути, показанному в наших модельных опытах с растворами ([3]). Конечным и промежуточным акцептором мобилизованного при фотореакции водорода воды (кроме выделяющегося кислорода) может быть система с наиболее высоким окислительным потенциалом; в зеленых растворах имеется весь набор клеточных ферментов и промежуточных систем. Захват фотохимически мобилизованного водорода, например дегидроаскорбиновой кислотой, не должен сказаться на результате наших опытов, так как аскорбиновая кислота и в темноте восстанавливает ДХФИ.

Проведенные опыты свидетельствуют о том, что фотовосстановление ряда соединений хлоропластами не происходит путем непосредственной фотореакции, а включает темновую стадию взаимодействия с «окислителем» активных продуктов, образованных при фотореакции.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
24 XI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949); А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950); А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **81**, № 5 (1951); Л. М. Кособуцкая и А. А. Красновский, ДАН, **74**, 103 (1950). [2] А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947); [3] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950); Г. П. Брин и А. А. Красновский, Биохимия, **16**, № 5 (1951); А. А. Красновский, Усп. биохим., 1, 473 (1950). [4] В. Н. Любименко, Дневн. I Всеросс. съезда ботаников. П., 1921, стр. 47; Хемосинтез и фотосинтез в растительном мире, 1935. [5] A. S. Holt, R. Smith and C. S. French, Plant Physiology, **26**, 164 (1951). [6] Н. М. Сисакян, Ферментативная активность протоплазменных структур, изд. АН СССР, 1951; Н. М. Сисакян и К. Г. Чамова, ДАН, **67**, 337 (1949). [7] A. H. Mehler, Arch. of Biochem. and Biophys., **33**, 65 (1951).

* В недавней работе Мелер ([7]) не смог обнаружить переживающие период освещения активные продукты, что следует объяснить недостатками методики его опытов, проведенных в присутствии воздуха и при комнатной температуре, т. е. в условиях, благоприятствующих течению обратных реакций.

Доклады Академии Наук СССР
1952. Том LXXXV, № 1

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

СПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА ПРИ ЕГО ОБРАЗОВАНИИ В РАСТЕНИИ И В КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВА ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 29 IV 1952)

Предыдущие работы нашей лаборатории ([1]), посвященные исследованию природы естественного состояния хлорофилла, позволили притти к следующим заключениям, нуждающимся в дальнейшем экспериментальном изучении: 1) хлорофилл в растении находится в различных формах агрегации и связи, равновесие между которыми зависит от стадии развития и условий внешней среды; 2) положение главного максимума поглощения света хлорофилла в пластиде при 677—678 мμ определяется агрегированной коллоидной формой хлорофилла, в соответствии с исходными работами Д. И. Ивановского ([2]); 3) фотохимически активной является мономерная, вероятно, связанная с липопротеином, форма хлорофилла.

Наши исследования ([3]) первичных фотопродуктов в коллоидных растворах вещества зеленых листьев подтвердили исследованную в работах В. И. Любименко ([4]) высокую фотохимическую устойчивость растворов естественной формы хлорофилла с максимумом поглощения при 677—678 мμ; обнаруженные в нашей работе активные фотопродукты, переживающие период освещения, являются, вероятно, восстановленной формой сопряженной с хлорофиллом промежуточной системы.

Если положение главного максимума поглощения хлорофилла в листьях при 677—678 мμ определяется взаимной агрегацией его молекул, находящихся в гранулах в устойчивой, высоко концентрированной форме, то можно было ожидать, что первично образующееся из протохлорофилла белково-липоидное соединение хлорофилла будет обладать максимумом поглощения, свойственным мономерным формам хлорофилла — около 670 мμ ([1]) и, соответственно, более высокой фотохимической активностью.

В настоящей работе изложены результаты исследования двух вопросов: 1) возможно ли фотохимическое образование хлорофилла из протохлорофилла в бесклеточных коллоидных растворах вещества этиолированных листьев *; 2) каковы спектральные свойства первично образованного естественного состояния хлорофилла и как они изменяются на начальной стадии онтогенеза.

---

* В предыдущих работах нашей лаборатории ([5]) исследовалась возможность фотохимического образования хлорофилла из химически индивидуального протохлорофилла в растворе; эту реакцию тогда нам осуществить не удалось, так как она сопряжена с ферментными реакциями (литература по вопросам образования хлорофилла см. ([6,7]).

Работу мы вели с листьями фасоли, дающими стойкий коллоидный раствор «естественного», или «натурального» хлорофилла (по В. И. Любименко), обладающий тем же спектром поглощения, что и живые листья.

1. Образование хлорофилла в бесклеточных коллоидных растворах вещества этиолированных листьев. Фасоль сорта Триумф замачивали в водопроводной воде 2—3 суток при температуре 23—24°, затем выращивали на питательной среде Кнопа в песке в темноте при температуре 23—25°. 7—9-дневные проростки растирали в темноте с фосфатным 0,02 *М* буферным раствором с pH 7, содержащим 0,01 *М* KCl, при температуре, близкой к 0°, и затем центрифугировали при 10 000 *g* в течение 5 мин. После центрифугирования получали устойчивый опалесцирующий зеленожелтый раствор.

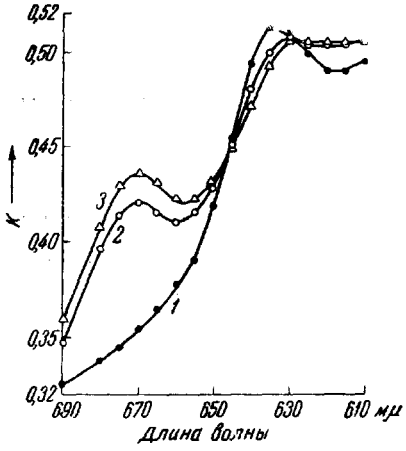


Рис. 1. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев с воздухом при слабом освещении (30 в на лампе). *1* — коллоидный раствор до освещения; *2* — 1 мин. освещения; *3* — 2 мин. освещения

Раствор освещали в вакуумной трубке особой формы, позволяющей ее установку в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра Бекмана, на котором производились измерения спектра поглощения. Опыты проводились в присутствии воздуха и при его эвакуации масляным вакуумным насосом при энергичном взбалтывании в течение 7 мин. В начале эвакуации происходило сильное вспенивание. В качестве источника света была применена киноламна 120 в мощностью 500 вт с конденсором (без светофильтра), работавшая при разном режиме напряжения тока, т. е. при разной интенсивности света. Мы проводили опыты при 30 в (около 1500 люкс) и при 90 в ($>40\,000$ люкс). Результаты опытов показаны на рис. 1, 2, 3.

Спектр поглощения исходного коллоидного раствора вещества этиолированных листьев фасоли обладает явным максимумом поглощения протохлорофилла при 635 мμ и не обладает максимумом в области поглощения хлорофилла. Освещение такого раствора во всех случаях приводит к появлению явного максимума поглощения при 670 мμ, сопровождающемуся падением максимума поглощения протохлорофилла.

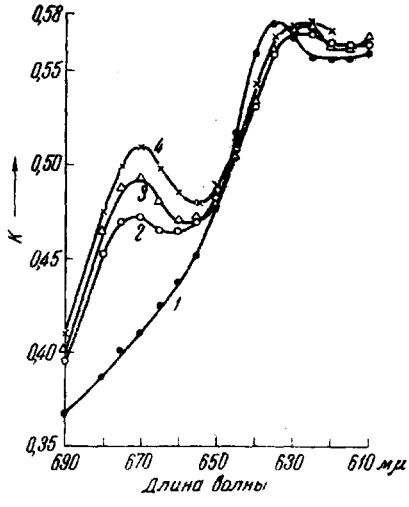


Рис. 2. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев без воздуха при слабом освещении. *1* — коллоидный раствор до освещения; *2* — 1 мин. освещения; *3* — 2 мин. освещения; *4* — 3 мин. освещения

В опытах при интенсивности света 1500 люкс бо́льшая часть хлорофилла с максимумом поглощения при 670 мμ образуется в пределах первой минуты освещения. При 90 в образование большей части хлорофилла происходит в пределах первых 15 сек. В присутствии воздуха при малой интенсив-

ности света образованный хлорофилл в пределах 6-минутного освещения не изменяется. При большой интенсивности света (90 в) в присутствии воздуха уже после первых 15 сек. происходит разрушение образованного хлорофилла и протохлорофилла. В опытах с эвакуацией воздуха изменение образованного хлорофилла происходит весьма медленно.

Из сопоставления опытов в присутствии и в отсутствие воздуха при слабом освещении можно притти к тому заключению, что эвакуация приводит к некоторому увеличению количества образовавшегося хлорофилла. Это можно объяснить относительным значением двух противоположно направленных процессов: фотохимического образования хлорофилла и его фотохимического изменения в присутствии кислорода; при сильном освещении скорость второго процесса превосходит скорость первого.

После того как максимум поглощения хлорофилла (в опытах со слабым освещением) переставал заметно повышаться, к водному коллоидному раствору приливали ацетон до его концентрации 60%; затем прибавляли эфир и разбавлением водой пигменты переводили в эфирный слой. Спектр поглощения эфирного раствора пигментов обнаруживает максимумы поглощения хлорофилла а (при 662±1 мμ) и протохлорофилла (625±1 мμ), который в условиях наших опытов не весь превращается в хлорофилл.

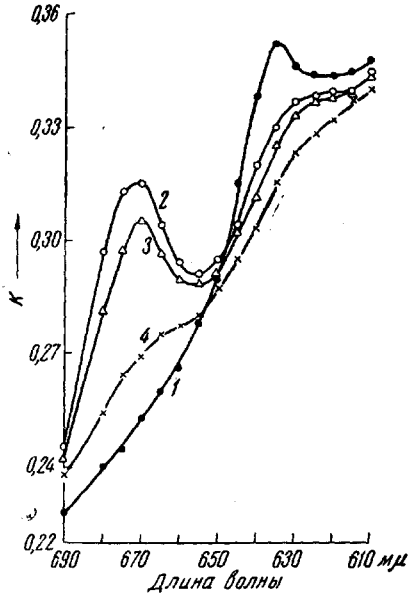


Рис. 3. Образование и разрушение хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев с воздухом при сильном освещении (90 в на лампе). *1* — исходный коллоидный раствор; *2* — 15 сек. освещения; *3* — 30 сек. освещения; *4* — через 2,5 мин. освещения

2. Изменение спектральных свойств естественного состояния хлорофилла в процессе онтогенеза. Этиолированные 7—9-дневные проростки фасоли освещали на расстоянии 50 см от набора 10 люминесцентных ламп дневного света (15 вт) при 22°. Через разные промежутки времени отбирали несколько проростков, готовили из них коллоидный раствор обычным способом (см. выше) и измеряли спектр поглощения раствора; затем 5 мл раствора освещали на воздухе через красный светофильтр RG-2 в фокусе конденсора киноламны 500 вт (120 в) в течение 6 мин. при температуре 20° с тем, чтобы испытать устойчивость образованного хлорофилла к фотоокислению.

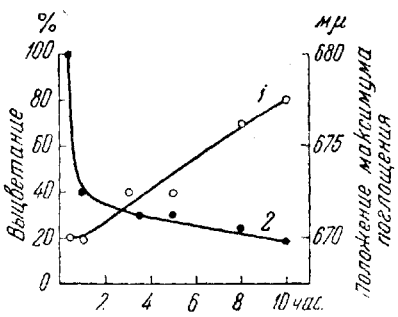


Рис. 4. *1*—изменение максимума поглощения естественного состояния хлорофилла при его образовании в этиолированных листьях; *2* — фотохимическое окисление образованного хлорофилла кислородом воздуха. Точность измерения положения максимума ±1 мμ

Из опытов следует, что первично образуется состояние хлорофилла с максимумом поглощения при 670 мμ, так же как и при освещении бесклеточного коллоидного раствора вещества этиолированных листьев. По мере дальнейшего синтеза происходит накопление хлорофилла со сдви-

гом максимума поглощения в длинноволновую сторону; через несколько часов достигается «обычный» максимум поглощения при 678 мμ. По мере накопления и агрегации хлорофилла увеличивается его фотохимическая устойчивость по отношению к окислению кислородом (см. рис. 4).

Таким образом, из работы следует заключение:

В этиолированных листьях и коллоидных бесклеточных растворах вещества этих листьев при освещении происходит образование хлорофилла, первоначально в виде формы, обладающей максимумом поглощения при 670 мμ; по мере накопления хлорофилла в листьях максимум поглощения передвигается до 677—678 мμ, что соответствует обычно наблюдаемому естественному состоянию хлорофилла. Первично образованный хлорофилл, вероятно, находится в форме белково-липоидного соединения.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов.

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

Поступило
25 IV 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Докт. диссерт., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948; Дополн. к сборн. Проблемы биохимии, 1948; Ежегодн. Усп. биол. хим., 1, 473 (1950); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 63, 163 (1948). [2] Д. И. Ивановский, Протоколы засед. Об-ва естествоисп. при Варшавск. ун-те, 1909; О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. [3] А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая, ДАН, 82, 761 (1951). [4] В. И. Любименко, Изв. Российск. Акад. наук, 129 (1923); Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. [5] А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, 66, 663 (1949). [6] Е. Р. Гюббенет, Растение и хлорофилл, изд. АН СССР, 1951. [7] Т. Н. Годнев, УИ Тимирязевское чтение, изд. АН СССР, 1947.

Академия наук СССР
Биохимия
Том 18, Вып. 5, 1953

К. К. Войновская и А. А. Красновский

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОФЕОФИТИНА

Метод выделения и спектральные свойства бактериохлорофилла и бактериофеофитина

К. К. Войновская и *А. А. Красновский*

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

Способность пурпурных бактерий к фотосинтетической ассимиляции углекислоты определяется присутствием в их клетках пигментной системы, состоящей из синего пигмента — бактериохлорофилла и ряда желтых пигментов — каротиноидов.

Бактериохлорофилл, которому принадлежит главная роль в осуществлении бактериального фотосинтеза, родствен хлорофиллу зеленых растений. Изучение спектральных и фотохимических свойств бактериохлорофилла является начальным этапом в познании путей его участия в бактериальном фотосинтезе [1, 2]. В настоящей работе описан метод выделения чистого бактериохлорофилла из культуры пурпурных бактерий и результаты изучения его спектральных свойств в растворе. Наряду с бактериохлорофиллом мы исследовали спектральные свойства бактериофеофитина — производного бактериохлорофилла, лишенного магния *.

1. Исходная культура бактерий

Для получения бактериохлорофилла нами использовалась культура Rhodopseudomonas (группа Athiorhodaceae) любезно предоставленная Институтом микробиологии АН СССР (Л. К. Осницкой) **. Определение этой культуры было осуществлено на кафедре микробиологии Московского государственного университета Е. Н. Кондратьевой.

Бактерии выращивались на синтетической среде следующего состава [4]:

На 1 л водопроводной воды вводилось: $Na_2S_2O_3$ — 1,6 г; NaCl — 20 г; $(NH_4)_2SO_4$ — 1 г; K_2HPO_4 — 0,5 г; $MgSO_4$ — 0,2 г; яблочной кислоты — 1,8 г; NaOH — 1,1 г. ***

После стерилизации в готовую среду вводились следующие соединения (эти соединения стерилизовались отдельно): 1,8 см³ 10% NaS*, 0,9 см³ 10% Na_2CO_2; 0,6 см³ 10% H_3PO_4.

При этом pH среды был близок к 7,8 (величина pH контролировалась индикаторами: нейтральным красным и феноловым красным).

После заражения среды культурой бактерий сосуды, заполненные доверху и закрытые резиновыми пробками, помещались в люминостат, где они освещались лампой накаливания в 40 W на расстояние 15—20 см (температура воздуха около сосудов достигала 35—37°). Необходимо отметить, что рост бактерий в таких условиях был, как правило, достаточно интенсивным, что выражалось в появлении яркой красной окраски на 2—3-й день после посева.

2. Метод выделения бактериохлорофилла

В настоящей работе мы испытали практическую применимость описанных в литературе способов и разработали метод выделения чистого бактериохлорофилла, основанный на хроматографическом методе М. С. Цвета. При помощи этого метода удается нацело отделить бакте-

---

* Исследование твердых пленок и коллоидных растворов этих пигментов кратко описано в другой нашей статье [2].

** Эта культура была в свое время выделена Б. Л. Исаченко из буровых вод нефтяных скважин бакинского месторождения [3].

*** Рост бактерий наблюдался и в отсутствии Na_2S.

риохлорофилл от сопутствующих ему желтых пигментов и иных примесей.

Фишер [5] при изучении химических свойств бактериохлорофилла применил следующий метод выделения его из бактериальных клеток. В качестве экстрагирующего растворителя он использовал ацетон. Для получения бактериохлорофилла ацетоновый экстракт сливался в петролейный эфир. Бактериохлорофилл, выпадавший при отмывании ацетона, отфильтровывался через тальк и очищался многократным переосаждением из серного эфира, путем добавления петролейного эфира.

Некоторым недостатком этого крайне трудоемкого метода является трудность полного освобождения от каротиноидов. Применение хроматографического разделения экстракта пигментов на окиси алюминия [6] явилось шагом вперед в получении чистого бактериохлорофилла. Однако окись алюминия мало пригодна для этой цели. Как показали наши опыты, на колонке из окиси алюминия, после ее высушивания, зоны пигментов легко смешиваются и бактериохлорофилл загрязняется каротиноидами. Очевидно, недостаточно полное разделение зон на такой хроматограмме требует применения многократной хроматографии.

При извлечении бактериохлорофилла необходимо соблюдать известные предосторожности для предохранения пигмента от окисления, которому он легко подвергается, особенно при освещении. С этой целью все процедуры при извлечении бактериохлорофилла следует вести в присутствии сероводорода [6] и все растворы тщательно предохранять от света. Нами был разработан следующий метод извлечения бактериохлорофилла.

Для отделения бактерий мы фильтровали суспензию бактерий вместе с культуральной жидкостью через слой талька или кизельгура. Экстракция пигментов производилась безводным метиловым спиртом * при тщательном растирании адсорбированной на тальке (или кизельгуре) бактериальной массы в фарфоровой ступке, с последующим фильтрованием; при этом бактериохлорофилл переходил в раствор, а бо́льшая часть каротиноидов оставалась адсорбированной на тальке.

Для того чтобы подготовить экстракт к хроматографическому разделению, необходимо было перевести пигменты в петролейный эфир, из которого велось хроматографическое разделение. Непосредственное переведение бактериохлорофилла в петролейный эфир из метилового спирта происходило неполно. Поэтому мы предпочли вначале перевести его в свежеперегнанный серный эфир, куда бактериохлорофилл переходит почти нацело. Эта операция производилась в делительной воронке разбавлением метанолового экстракта водой с последующим удалением водно-спиртового слоя. Вода, которая использовалась в этом случае, была предварительно настоена на карбонате магния, во избежание возможной феофитинизации бактериохлорофилла.

После кратковременного высушивания над прокаленным сульфатом натрия эфирный раствор сливался в фарфоровую чашку для удаления эфира испарением на воздухе. После удаления эфира остаток растворялся в петролейном эфире и раствор вновь сушился над сульфатом натрия в течение 40 мин.

Хроматографическое разделение пигментов осуществлялось на колонке из мелко измельченной сахарозы. Мы испытали ряд адсорбентов (в том числе окись алюминия, окись магния и другие), но только сахароза оказалась наиболее пригодной для этой цели; в этом случае можно было наблюдать хроматограмму с четкими, легко размываемыми зонами пигментов.

Для приготовления колонки сахароза растиралась в ступке и после просеивания через сито высушивалась в течение 2 час. при 90°. Хроматографическая колонка представляла собой стеклянную трубку диаметром 1—2 см и высотой 20—40 см. Набивание колонки осуществлялось вначале металлическим пестиком, а затем стеклянной палочкой для уплотнения краев колонки. При набивании колонки сахароза всыпалась в трубку небольшими порциями, причем каждый слой сахарозы тщательно утрамбовывался. При соблюдении этого условия удавалось добиться равномерного движения пигментов по колонке без образования «языков», мешающих разделению зон.

Процесс хроматографического разделения заключался в том, что весь раствор пигментов в петролейном эфире просасывался через колонку с адсорбентом. При этом на колонке наблюдались три, иногда четыре, окрашенные зоны: 1) верхняя — серая зона, принадлежала бактериохлорофиллу, частично превратившемуся в бактериофеофитин; 2) средняя, интенсивно окрашенная в синий цвет, зона принадлежала самому бактериохлорофиллу; 3) нижние зоны (одна, иногда две) принадлежали каротиноидам. Одна из них была обычно окрашена в желтый, другая — в розовый цвет. Получение на хроматограмме только одной зоны бактериохлорофилла свидетельствует о наличии в бактериях только одного бактериохлорофилла, вопреки данным Шнайдера [7].

Хроматограмма проявлялась смесью петролейного эфира с серным эфиром в отношении 4 : 1. При этом между синей зоной бактериохлорофилла и зонами каротиноидов возникала полоса, лишенная пигмента и позволявшая удалить зону бактериохлоро-

---

* Необходимо отметить, что все использованные растворители содержали сероводород, что достигалось кратковременным пропусканием тока этого газа из аппарата Киппа. Кроме того, все операции извлечения пигмента велись при максимальном затемнении рабочего помещения.

филла, свободную от каротиноидов. Извлечение зоны бактериохлорофилла производилось разрезанием колонки по этой полосе с последующим удалением адсорбента стеклянным скребком.

Необходимо отметить, что повторная хроматография не приводила к изменению степени чистоты бактериохлорофилла, полученного после первой хроматографии.

Особым вопросом было хранение полученного чистого бактериохлорофилла в течение более или менее длительного времени. Опытным путем удалось показать, что в неизменном виде бактериохлорофилл сохранялся лишь в адсорбированном на сахарозе состоянии при хранении хроматограммы в вакууме в холодильнике при 0—5°. Пигмент оставался практически неизменным в течение двух — трех недель хранения. Критериями чистоты полученного продукта являлись: 1) чистота хроматографической зоны и 2) чистота спектра бактериохлорофилла с четко выраженными максимумами поглощения в близкой инфракрасной области. Примеси каротиноидов легко можно было заметить по увеличению поглощения в области от 450 до 550 mμ.

Для получения бактериофеофитина необходимо было бактериохлорофилл подвергнуть действию кислоты, чтобы заменить атом магния в его молекуле атомами водорода. В основу использованного нами метода получения бактериофеофитина был положен метод, применявшийся Фишером [5].

Бактериохлорофилл элюировался с сахарозы свежеперегнанным серным эфиром. Эфирный раствор затем встряхивался в течение 30 мин. с равным объемом 10%-ной HCl. По истечении 30 мин. кислота отделялась и эфирный раствор бактериофеофитина многократно промывался дестиллированной водой. Эфирный раствор бактериофеофитина сушился над прокаленным сульфатом натрия и эфир удалялся испарением в фарфоровой чашке при комнатной температуре.

Как показал опыт, бактериофеофитин может длительное время храниться без изменения в твердом виде на дне фарфоровой чашки в вакуум-эксикаторе.

3. Спектральные свойства бактериохлорофилла и бактериофеофитина

Имеющиеся в литературе данные о спектрах поглощения бактериохлорофилла и бактериофеофитина весьма скудны [6, 8]. Поэтому задачей нашего исследования (после получения чистого бактериохлорофилла) явилось изучение его спектральных свойств с применением более точной методики измерения для получения спектров поглощения бактериохлорофилла и бактериофеофитина в области спектра, доступной измерению на фотоэлектрическом спектро-фотометре.

Измерение спектров поглощения производилось на фотоэлектрическом кварцевом спектрофотометре Бекмана, допускающем измерение в области 1000 — 220 mμ.

ТАБЛИЦА 1

Влияние растворителя на положение максимумов поглощения бактериохлорофилла

Растворитель	Область измерения в mμ	Положение максимумов в mμ (± 1 mμ)				
		I	II	III	IV	V
Метиловый спирт	850—350	772,5	~700	607,5	365	—
Этиловый спирт	850—240	772,5	700	607,5	365	250
Пиридин	850—350	780	710	610	375	—
Серный эфир	800—240	770	~700	575	357,5	260
Ацетон	850—350	770	700	575	355	—
Диоксан	850—350	770,5	~710	590	369	—
Толуол	800—350	780	~700	575	360	—

Источником бактериохлорофилла служила его хроматограмма на сахарозе, свежеполученная или хранившаяся в вакуумной трубке в холодильнике не более 2 дней. Бактериохлорофилл элюировался свежеперегнанным серным эфиром, освобожденным от перекисей.

Для этой цели сахароза с адсорбированным на ней бактериохлорофиллом набивалась в стеклянную трубку, через которую просасывался серный эфир. После элюции эфирный раствор промывался дестиллированной водой, настоенной на углекислом магнии в делительной воронке. После высушивания раствора над прокаленным сульфатом натрия и испарения эфира в фарфоровой чашке бактериохлорофилл растворялся в соответствующем растворителе. Все использованные химически чистые растворители перед употреблением очищались перегонкой.

Измерения спектров велись в стеклянных и кварцевых кюветах или измерительных трубках, вставляемых в кюветодержатель прибора.

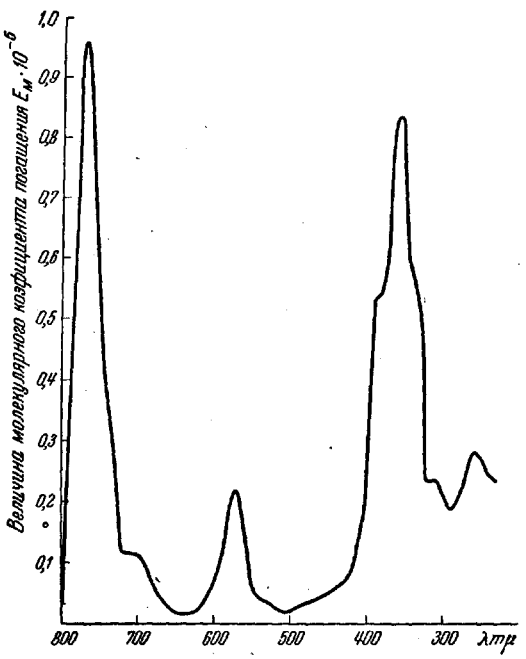


Рис. 1. Бактериохлорофилл в серном эфире

Данные табл. 1 дают представление о влиянии растворителя на положение максимумов поглощения бактериохлорофилла. На приводимых ниже рис. 1 и 2 даны виды спектров поглощения бактериохлорофилла в трех растворителях: этиловом спирте, эфире и пиридине (в случае измерения в ультрафиолете — за вычетом поглощения чистого растворителя).

ТАБЛИЦА 2

Влияние растворителей на положение максимумов поглощения бактериофеофитина

Растворитель	Область измерения в mμ	Положение максимума в mμ (± 1 mμ)			
		I	II	III	IV
Этиловый спирт	850—230	750	685	527,5—530	357,5—360
Пиридин	850—350	755	685	530	360
Серный эфир	850—350	750	680	525	355

Как видно из данных табл. 1, разница в положении максимумов колеблется в зависимости от растворителя в пределах 5—10 mμ.

При изучении спектральных свойств бактериофеофитина мы поставили перед собой те же задачи, что и в случае бактериохлорофилла. Бактериофеофитин, полученный описанным выше способом и хранившийся на дне фарфоровой чашки, переводился в испытуемый растворитель. Все измерения спектров производились так же, как и в случае бактериохлорофилла. В табл. 2 приведены данные, указывающие на положение максимумов поглощения бактериофеофитина в разных растворителях.

Как видно из данных табл. 2, различие в положении максимумов

бактериофеофитина в разных растворителях менее значительно, чем в случае бактериохлорофилла: оно колеблется в пределах 5 mμ. Подобная

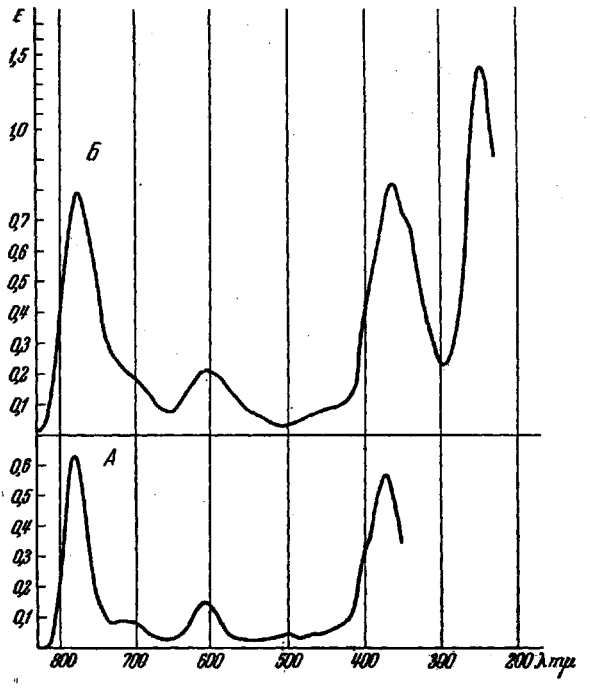


Рис. 2. Спектр бактериохлорофилла:
А — в пиридине; *Б* — в этиловом спирте

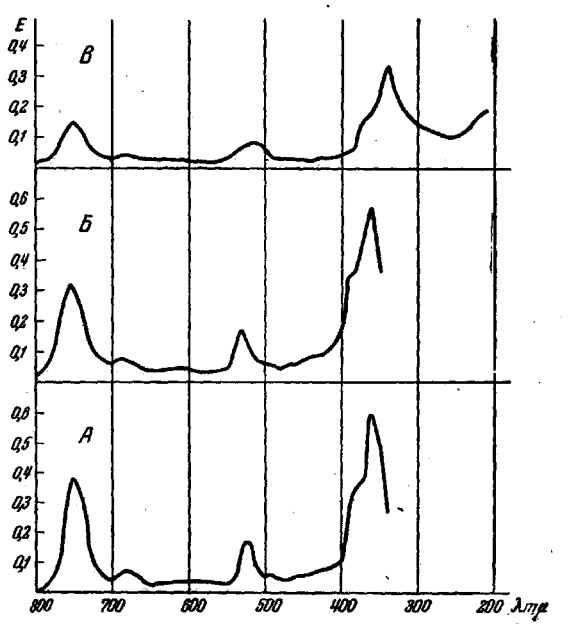


Рис. 3. Спектр бактериофеофитина:
А — в серном эфире; *Б* — в пиридине; *В* — в этиловом спирте

закономерность для хлорофилла и феофитина наблюдалась в нашей лаборатории В. Б. Евстигнеевым и В. А. Гавриловой [11].

Рис. 3 дает представление о виде спектров поглощения бактериофеофитина в тех же растворителях.

4. Определение молекулярного коэффициента погашения бактериохлорофилла

После того, как нами был получен достаточно чистый бактериохлорофилл, мы провели определение его молекулярного коэффициента погашения. Определение этой величины мы могли осуществить, исходя из определенного в работе Ван-Нила [9] удельного коэффициента погашения бактериофеофитина в эфирном растворе при длине волны 668,5 mμ.

Принцип определения заключался в количественном переведении бактериохлорофилла в бактериофеофитин с последующим измерением коэффициента погашения последнего (при длине волны 668,5 mμ) и соответствующим пересчетом на бактериохлорофилл. Молекулярный коэффициент погашения бактериохлорофилла оказался равным $0{,}95 \cdot 10^5$ при 770 mμ в серном эфире.

Эта величина близка к молекулярному коэффициенту погашения в красном максимуме хлорофилла *a* [10].

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов работы.

Выводы

В настоящей работе описан хроматографический метод выделения из клеток фотосинтезирующих бактерий чистого бактериохлорофилла и бактериофеофитина и спектры поглощения этих пигментов в растворах.

Поступила в редакцию
22.IV. 1953

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. и Войновская К. К., ДАН **81**, 879, 1951; **87**, 109, 1952.
2. Красновский А. А., Войновская К. К. и Кособуцкая Л. М., ДАН **85**, 389, 1952.
3. Исаченко Б. Л., Избранные труды, т. II, Изд. АН СССР, 1951, стр. 213.
4. Wassink E. C., Vermeulen D., Reman G. H., Katz E., Enzymologia **5**, 3, 1938.
5. Fisher H., Stern A. Die Chemie des Pyrrols, B. II, H. 2, 1938, стр. 305.
6. Manten A. Ant. v. Leeuv, J. of microb. and serol. **14**, 65, 1948
7. Schneider E., H. S. Z. physiol. Chem. **226**, 221, 1934.
8. French C. S., J. Gen. Phys. **23**, 483, 1940.
9. Van-Niel C. B., Enzymologia **5**, 4, 1938.
10. Zscheile F. P., Comar C. L., Botan. Gazette **102**, 463, 1941.
11. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН **85**, 1073, 1952.

Действие растворителей на спектральные свойства и фотохимическую активность хлорофилла в естественном состоянии

Л. М. Кособуцкая и *А. А. Красновский*

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Это исследование произведено с целью получения данных о природе состояния хлорофилла в гранулах хлоропластов. Мы изучали влияние смешивающихся с водой органических растворителей различной природы на спектральные свойства пигментов и фотохимическую активность вещества хлоропластов. Эти воздействия приводят к разной степени нарушения естественного состояния связи пигментов.

Любименко [1], исследовавший коллоидные растворы «натурального хлорофилла», в своих известных работах указал на то, что ряд органических растворителей приводит к быстрому нарушению связи хлорофилла с белком. Годнев и Осипова [2] произвели исследование влияния растворителей на извлекаемость хлорофилла из листьев растений на разных стадиях онтогенеза. В работе Смита [3] описано действие спирта, ацетона и некоторых детергентов на вещество хлоропластов.

Метод выделения и хранения вещества хлоропластов

Для получения воспроизводимых результатов, существенно ставить опыты на однородном материале, на веществе хлоропластов, выделенных из одной порции растительного материала. Так как хлоропласты в обычных условиях хранения весьма быстро теряют свою фотохимическую активность, в нашей лаборатории был применен способ консервации кусочков листьев или вещества хлоропластов путем их замораживания в жидком азоте или воздухе.

Коллоидные растворы вещества хлоропластов готовили дробным центрофугированием в условиях, по возможности близких к 0°. Свежие листья огурцов или сахарной свеклы * измельчали в растворе 0,05 *М* фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 0,1 *М* KCl, фильтровали через полотно, центрифугированием отделяли грубые частицы и крахмал (10 мин. при ~300g). Затем центрифугировали вещество хлоропластов (25 мин при ~3000g), снимали верхний слой, растирали его с небольшим количеством фосфатного буфера и в случае необходимости сохранения вводили каплями в сосуд Дьюара, наполненный жидким азотом. При консервации в жидком азоте кусочков листьев процедура приготовления суспензии была такой же.

Метод измерения фотохимической активности

Измерение фотохимической активности вещества хлоропластов мы производили спектрофотометрически — по восстановлению фенолиндофенола [4].

Коллоидный раствор вещества хлоропластов готовили с таким расчетом, чтобы при разведении 1 мл исходной суспензии до 5 мл буфером коэффициент погашения при 550 mμ равнялся единице. Раствор фенолиндофенола также готовили с коэффициентом погашения около единицы при 550 mμ.

В реакционном сосуде смешивали 5 мл суспензии (простоявшей 20 мин. во льду в темноте с растворителем) с 5 мл фенолиндофенола. Реакционные сосуды помещались в ультратермостат и освещались 150 вт лампой в течение 10 мин. Изменения концентрации фенолиндофенола измерялись величиной коэффициента погашения при 550 mμ. Контролем служила реакция с 1 мл суспензии, разведенной до 5 мл буфером.

* Работу с листьями огурцов (сорт Клинский) вели в течение всего года. Листья получали из теплиц овощного комбината «Марфино». Сахарная свекла — сорт «Верхнячка», выросшая на открытом грунте. Главные результаты получены с листьями огурцов. Существенных отличий во влиянии воздействий на оба вида растений не наблюдалось.

Действие органических растворителей на коллоидный раствор вещества хлоропластов

При всех воздействиях на коллоидный раствор вещества хлоропластов мы снимали его спектр поглощения на фотоэлектрическом спектрофотометре и измеряли флуоресценцию на фотоэлектрическом флуорометре при возбуждении группой ртутных линий при 365 $m\mu$.

К 1 мл суспензии хлоропластов в буфере приливали 9 мл смеси дестиллированной воды и растворителя в разных соотношениях. Пробирки стояли в темноте во льду 20 мин, после чего измеряли спектры поглощения и относительное изменение флуоресценции. Для сравнения в каждом опыте измеряли спектр исходной суспензии (1 мл суспензии + 9 мл воды).

Испытывалось действие растворителей различной природы, смешивающихся с водой во всех отношениях — спирта, ацетона, диоксана, пиридина, а также фенола и кислот. Эти растворители обладают различной «основностью», различной величиной сродства к протону, от наиболее «кислого» в этом ряду фенола до наиболее «основного» пиридина. Применялись растворители реактивной чистоты, перегоняемые с дефлегматором перед опытом; отсутствие в них перекисных соединений контролировалось.

В предыдущих работах нашей лаборатории было исследовано действие этих растворителей на течение фотохимических реакций хлорофилла и других пигментов [5].

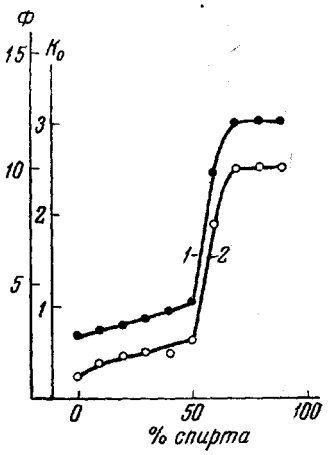


Рис. 1. Влияние этилового спирта на спектр поглощения и флуоресценцию суспензии гранул хлоропластов: *1* — K_0; *2* — флуоресценция в относительных единицах

Хлорофилл в естественном состоянии обладает максимумом поглощения, лежащим при 678 $m\mu$ ($\pm$ 1 $m\mu$) ($K_н$). У хлорофилла в растворе положение максимума ($K_р$) зависит от природы растворителя: в пиридине 669 $m\mu$, в диоксане 664 $m\mu$, ацетоне 662 $m\mu$. Содержание воды в растворителе приводит к изменению положения максимума в пределах 1—3 $m\mu$. В качестве критерия степени нарушения естественного состояния хлорофилла при воздействии растворителей нами взято соотношение $K_0 = \frac{K_р}{K_н}$, т. е. соотношение коэффициентов погашения хлорофилла при 678 $m\mu$ ($K_н$) и в максимуме, соответствующем данному растворителю ($K_р$).

Хлорофилл в естественном состоянии обладает весьма слабой красной флуоресценцией, тогда как в растворе его флуоресценция весьма интенсивна; измерение флуоресценции также является критерием перехода хлорофилла из естественного состояния в раствор.

Кратко опишем действие каждого из испытанных растворителей или видов воздействия.

При добавлении этилового спирта от 10 до 50% происходит постепенное смещение главного красного максимума от 678 $m\mu$ в сторону коротких длин волн (рис. 1). До 35% спирта в растворе не удается наблюдать коагуляции белка даже при последующем стоянии. При 35—50% спирта после часового стояния происходит образование хлопьев белка без заметного перехода пигмента в раствор. Концентрация спирта выше 50% вызывает перемещение красного максимума на 665 $m\mu$, хлорофилл переходит в растворенное состояние (рис. 2). При переходе от 50 к 60% спирта $K_р/K_н$ резко возрастает. Величина флуоресценции растет параллельно величине перемещения главного красного максимума, давая скачок при переходе от 50 до 60% спирта. Фотохимическая активность понижается вдвое при 25% спирта в растворе (рис. 3).

Действие ацетона на спектр суспензии хлоропластов и флуоресценцию подобно действию этилового спирта, но несколько более сильное при низких концентрациях. Переход пигмента в раствор происходит

также при 60% растворителя (рис. 4, 5). Ацетон понижает фотохимическую активность вдвое при 30% (рис. 3).

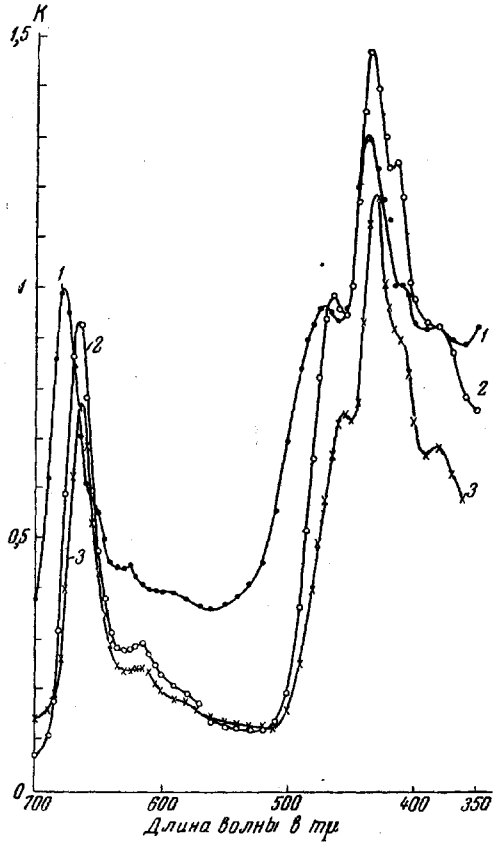


Рис. 2. Спектр поглощения хлорофилла в естественном состоянии и в ацетоновом и спиртовом растворах: *1* —1 мл суспензии гранул хлоропластов+9 мл воды; *2* — 1 мл суспензии гранул хлоропластов + 9 мл спирта; *3* — 1 мл суспензии гранул хлоропластов + 9 мл ацетона

Пиридин изменяет спектр суспензии по сравнению со спиртом и ацетоном значительно более резко. Уже 1% пиридина сдвигает красный максимум на 1—2 *mμ* при 6% пиридина максимум смещается от 678 до 671 mμ. При дальнейшем увеличении содержания пиридина в суспензии до 40% максимум очень медленно перемещается до 670 *mμ* и при достижении 50% переходит на 669 *mμ* (положение красного максимума хлорофилла в пиридине) (рис. 6).

При добавлении пиридина происходит осветление суспензии. При 60% пиридина выпадает при длительном стоянии легкая муть и только при 70% пиридина выпадает коагулированный белок; при 30—60% пиридина, видимо, происходит растворение белков пластид.

При переходе 40—50% соотношение $K_р/K_н$, характеризующее степень нарастания поглощения при 670 *mμ*, резко повышается (рис. 7). Фотохимическая активность подавляется пиридином чрезвычайно сильно уже при низких концентрациях, наполовину при 0,9—1% пиридина и полностью — при 2% (рис. 8).

0,6% фенола сдвигает красный максимум суспензии до 674,5 *mμ* 1,2% — до 675 *mμ*. При 5,4% фенола максимум остается при 675 *mμ*; 0,6% фенола подавляет фотохимическую активность полностью.

Весьма своеобразным оказалось действие диоксана. До 20% диоксана в растворе не влияет на положение максимума. 30% диоксана сдвигает красный максимум поглощения суспензии в красную сторону до 690 *mμ* и максимум лежит в этой точке вплоть до 60% диоксана в суспензии. В 70%-ном диоксане красный максимум перемещается к 664 *mμ*, что соответствует растворению хлорофилла в диоксане.

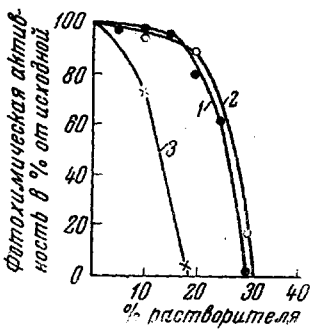


Рис. 3. Влияние растворителей на фотохимическую активность суспензии гранул хлоропластов: *1* — ацетон; *2* — спирт; *3* — диоксан

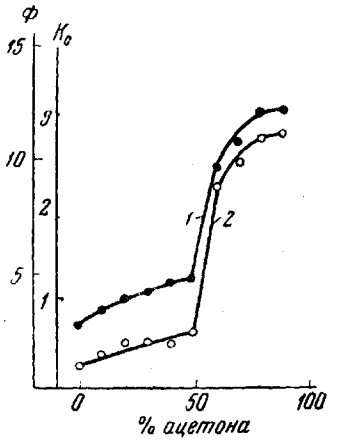


Рис. 4. Влияние ацетона на спектр поглощения и флуоресценцию суспензии гранул хлоропластов: *1* — K_0; *2* — флуоресценция в относительных единицах

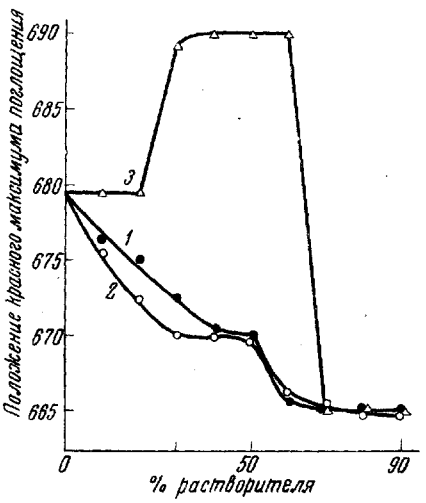


Рис. 5. Смещение красного максимума суспензии гранул хлоропластов при действии растворителей: *1* — спирт; *2* — ацетон; *3* — диоксан

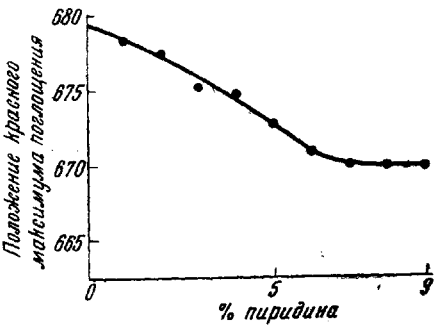
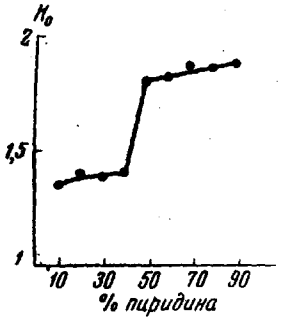


Рис. 6. Смещение красного максимума суспензии гранул хлоропластов при действии пиридина

Наши опыты показали, что при разбавлении водой раствора хлорофилла в диоксане образуется коллоидный раствор хлорофилла с максимумом поглощения также при 690m*μ*. При разбавлении водой растворов хлорофилла в спирте, ацетоне и пиридине образуется коллоидный раствор с максимумом поглощения ~ 670 *mμ*, и лишь дальнейшая его коагуляция (например $MgCl_2$) приводит к постепенному сдвигу поглощения в длинноволновую область до 690 *mμ*.

Белок выпадает в виде хлопьев, начиная с 30% диоксана. При 70% диоксана пигмент переходит в растворенное состояние и раствор из желтоватого становится темнозеленым. 12—15% диоксана подавляют фотохимическую активность вдвое, а 20% — полностью (рис. 3).

1 мл суспензии в буфере разводили до 10 мл дестиллированной водой и кислотой в различных соотношениях. Использовали 1 *N*, 0,1 *N* и 0,01 *N* соляную и щавелевую кислоты. Под действием соляной или щавелевой кислоты происходит постепенное понижение величины главного красного максимума суспензии. Фиолетовый максимум при этом сдвигается с 435 на 410 mμ, что свидетельствует об образовании феофитина. Под действием кислоты белок коагулирует. Следует отметить, что после обработки кислотой при



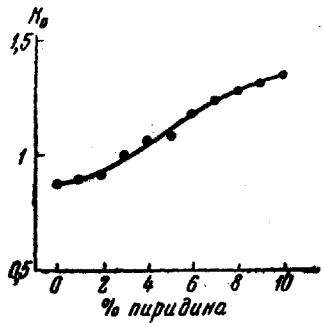


Рис. 7. Влияние пиридина на спектр поглощения суспензии гранул хлоропластов

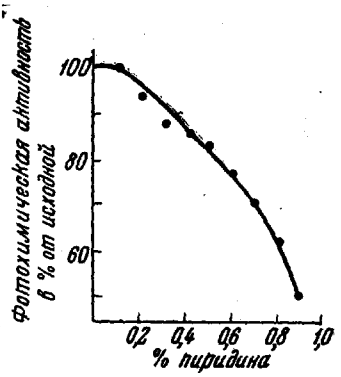


Рис. 8. Действие пиридина на фотохимическую активность суспензии гранул хлоропластов

кипячении суспензии в течение 15 мин. красный максимум оттается при 678 mμ, в то время как при кипячении суспензии без кислоты максимум поглощения перемещается к 670 mμ, что наблюдалось уже давно.

При хроматографическом разделении раствора пигментов в петролейном эфире после действия на суспензию кислоты на сахарной колонке образовалось 5 зон. Сверху слегка зеленоватая полоса со спектром, сходным с хлорофиллом «а» — вероятно, неизвестные продукты распада. Затем довольно широкая коричнево-бурая полоса — феофитин «в», 3-я полоса желтая — ксантофилл, 4-я полоса серая, широкая — феофитин «а». Каротин проходит сквозь колонку. Фотохимическая активность подавляется наполовину при добавлении к суспензии 3,3 мл 0,01 *N* щавелевой кислоты.

Итоги опытов

При действии растворителей на коллоидный раствор вещества хлоропластов наблюдаются следующие стадии воздействия: 1) при постепенном увеличении концентрации сначала происходит изменение положения максимума поглощения естественного состояния (678 mμ) без перехода хлорофилла в раствор и без явной коагуляции белка, о чем свидетельствует малая флуоресценция и остающееся отличие от истинного раствора в положении максимума поглощения; 2) при достижении определенной концентрации растворителя изменение максимума сопровождается резким усилением флуоресценции, идущим скачкообразно, что свидетельствует о переходе хлорофилла в растворенное состояние. Действие растворителей специфично. Так, пиридин уже при малой его концентрации нарушает естественную агрегированную форму, вероятно, образуя координационные соединения с хлорофиллом; малые количества диоксана

в растворе приводят к сдвигу максимума до 690 $m\mu$, который затем скачком перемещается до 664 $m\mu$, характеризуя растворенное состояние. Поведение спирта и ацетона сходно. Наши опыты показали, что разбавление водой растворов пигментов в перечисленных органических растворителях приводит к получению максимумов, соответствующих первой стадии действия растворителя — с диоксаном при 690 $m\mu$ с пиридином при 670 $m\mu$ и т. д.

Вероятно, растворитель распределяется между водой и липоидно-пигментной фазой гранулы и растворяет ее на первом этапе своего действия; дальнейшее действие воды на этот раствор приводит к образованию коллоидных растворов пигмента.

Видимая коагуляция белков в случае спирта, ацетона и диоксана обычно наблюдается в конце первой стадии воздействия, непосредственно перед достижением концентрации растворителя, вызывающей извлечение хлорофилла в раствор; в случае пиридина до концентрации 60—70% происходит не коагуляция, а стабилизация (растворение) белков; опалесцирующий мутный исходный раствор становится более прозрачным при введении пиридина; лишь при достижении 60—70% начинается частичное выпадение белков. В связи с этими наблюдениями нужно указать на работу Такашима [6], описавшего растворение хлорофилл-белково-липоидного соединения в 50%-ном водном растворе пиридина и α-пиколина.

Введение растворителя приводит к уничтожению фотохимической активности уже на первой стадии воздействия, до явной коагуляции белков и извлечения хлорофилла; можно полагать, что это воздействие связано с нарушением структуры, определяющей сопряжение фотохимических и ферментативных звеньев процесса.

В работе Сисакяна и Кобяковой [7] было показано, что обработка спиртом и ацетоном влияет на ферментную активность хлоропластов, вероятно, связанную с их способностью к фотохимическому выделению кислорода, сопряженному с восстановлением фенолиндофенола.

Состояние хлорофилла в гранулах хлоропластов и его изменения при исследованных воздействиях

Предыдущие работы нашей лаборатории позволили придти к тому заключению, что хлорофилл в растении может находиться в разных формах агрегации и связи, в зависимости от стадии развития и условий внешней среды [8].

Недавно нам удалось показать прямыми опытами изменение свойств естественного состояния хлорофилла в процессе его образования на начальных стадиях онтогенеза [9]. Вначале из протохлорофилла образуется белково-липоидное (мономерное) соединение хлорофилла, обладающее главным максимумом поглощения при 670 $m\mu$. В процессе дальнейшего накопления хлорофилла происходит передвижение максимума поглощения к «обычному» положению при 677—678 $m\mu$, определяющемуся «аггрегацией» молекул хлорофилла в соответствии с исходными работами Ивановского [10].

В наших работах было показано, что положение главных максимумов поглощения бактериохлорофилла в бактериальной клетке при 890, 850 и 800 $m\mu$ также определяется агрегированными формами бактериохлорофилла [11].

Здесь мы не рассматриваем вопроса о форме связи хлорофилла с белком; помимо связи «мономерной» формы хлорофилла с липопротеином возможна связь аггрегированных состояний с белковой структурой гранулы или аггрегация самих молекул хлорофилл-белково-липоидного соединения, приводящая к наблюдаемым свойствам хлорофилла в гранулах [13].

Т. Н. Годнев с сотрудниками [14] также пришли к заключению о различных состояниях хлорофилла в пластиде.

Рассмотрим результаты опытов по действию растворителей с этой точки зрения: действие растворителей приводит к постепенной дезагрегации высококонцентрированной формы хлорофилла, доходя до предельного ее случая — растворения. Подобным образом действуют растворители на водные коллоидные растворы хлорофилла.

Действие пиридина проявляется уже при весьма малых его концентрациях, что объясняется большим сродством пиридина и других органических оснований к хлорофиллу, показанным в предыдущих работах нашей лаборатории [12]; вероятно, как мы уже указывали ранее, пиридин приводит к образованию молекулярных соединений, сходных с гемохромогенами. Уместно указать здесь на подобное действие органических растворителей на растворы гемоглобина и образование гемохромогенов при действии ряда оснований.

На примере действия диоксана видно, что нарушение упорядоченной структуры гранулы, ведущее к дезагрегации, сначала приводит к образованию «беспорядочной» структуры коллоидной частицы, соответствующей «высаживанию» хлорофилла водой из диоксанового раствора; вероятно, мицеллы коллоидного хлорофилла обладают структурой, включающей в себя молекулы растворителя.

Действие растворителей на «мономерную форму» белково-липоидного соединения хлорофилла сводится сначала к его коагуляции, а затем, при увеличивающейся концентрации растворителя, к нарушению слабой связи хлорофилла с липопротеином и переходу хлорофилла в раствор.

Таким образом, явления, наблюдающиеся при действии растворителей, объяснимы, исходя из представлений о состояниях хлорофилла, изложенных выше. Опыты по действию кислоты на естественное состояние хлорофилла также соответствуют этим представлениям. Действительно, превращение хлорофилла в феофитин не изменяет положения главного максимума поглощения; отсюда следует то заключение, что во всяком случае, не связь с белком, нарушающаяся при действии кислоты, определяет известный сдвиг максимума поглощения хлорофилла в естественном состоянии. Опыты показывают, что агрегированные формы хлорофилла и феофитина обладают сходными максимумами поглощения при 677—678 $m\mu$.

Весьма существенно здесь то, что нагревание обработанной кислотой суспензии не ведет к перемещению максимума поглощения до 670 $m\mu$, что наблюдается при нагревании листьев и коллоидных растворов вещества хлоропластов и давно известно. Обычно это явление объясняют нарушением связи хлорофилла с белком и его растворением в липоидной фазе пластиды. Однако возможно другое объяснение, учитывающее аналогию с поведением гемоглобина, при нагревании которого происходит денатурация белка, ведущая к взаимодействию гистидиновых остатков с гемином, что сопровождается появлением спектра, характерного для гемохромогенов. Подобная связь хлорофилла с гистидиновыми остатками денатурированных белков возможна и у хлорофилла; в случае феофитина, лишенного атома магния, это взаимодействие не проявляется, почему и нет сдвига его спектра поглощения. Правда, это явление можно также объяснить значительно худшей растворимостью феофитина в естественных липоидах.

В заключение приносим глубокую благодарность А. Н. Теренину и Н. М. Сисакяну за обсуждение результатов работы.

Выводы

Исследовано действие пиридина, диоксана, ацетона, спирта, фенола и кислот на спектральные свойства и фотохимическую активность коллоидных растворов вещества хлоропластов. Обычно наблюдаются следующие стадии действия растворителей — дезагрегация коллоидного состояния хлорофилла, коагуляция белков и извлечение хлорофилла в раствор. Фотохимическая активность вещества хлоропластов обычно теряется уже на первой стадии воздействия.

Результаты опытов рассмотрены в связи с представлениями о различных формах естественного состояния хлорофилла.

Поступила в редакцию
26. XII. 1952

ЛИТЕРАТУРА

1. Любименко В. Н., Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, Сельхозгиз, 1935, стр. 37.
2. Годнев Т. Н., VII Тимирязевское чтение, Изд. АН СССР, 1947; Годнев Т. Н. и Осипова О. П., ДАН **57**, 161, 1947.
3. Smith E. L., J. Gen. Physiol. **24**, 565, 1941.
4. Holt A. S., French C. S., Arch. Biochem. **19**, 268, 1948; Верещинский И. В., Красновский А. А., Биохимия **16**, 621, 1951.
5. Красновский А. А. и Гаврилова В. А., ДАН **81**, 1105, 1951.
6. Takashima S., Nature **169**, 182, 1952.

7. Сисакян Н. М., Кобякова А. М., Биохимия **17**, 368, 1952.
8. Красновский А. А., Дополнение к сборнику «Проблемы биохимии», изд. ИЛ 1948; Ежегодник «Успехи биол. химии» **1**, 473, 1950, Изд. АМН; Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **63**, 163, 1948.
9. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН **85**, 177, 1952.
10. Ивановский Д. И., Протоколы заседаний Об-ва естествоиспытателей при Варшавском университете, 1909.
11. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М., ДАН **85**, 389, 1952.
12. Красновский А. А. и Брин Г. П. ДАН, **89**, 527, 1953 (там же ссылки на предыдущие работы).
13. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., ДАН XCI, № 2 (1953).
14. Годнев Т. Н., Терентьева М. В., Пармон К. П., Изв. АН БССР, **1**, 93, 1949.

Доклады Академии Наук СССР
1953. Том LXXXIX, № 3

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

О ПРИРОДЕ АКТИВИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ОСНОВАНИЙ НА РЕАКЦИЮ ОБРАТИМОГО ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ФЕОФИТИНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 20 I 1953)

Реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла, его аналогов и производных, изученная в предыдущих работах нашей лаборатории ([1-3]), идет достаточно глубоко лишь в среде органических оснований или при добавке оснований к другим средам, что, вероятно, определяется спецификой сольватации реагирующих молекул ([4]). Относительно природы активирующего действия оснований на эту реакцию в наших работах 1948—1949 гг. были высказаны следующие предположения: 1) среды, обладающие сродством к протону, приводят к стабилизации образующейся при реакции ионной формы свободного радикала — продукта фотовосстановления; 2) основания образуют с хлорофиллом координационные соединения по типу гемохромогенов.

В настоящей работе, с целью получения данных о природе активирующего действия оснований, произведено сравнительное исследование их влияния на спектральные и фотохимические свойства хлорофилла a и феофитина a.

Спектральные проявления взаимодействия хлорофилла и феофитина с основаниями. Ранее ([2]) мы обратили внимание на то, что хлорофилл a в пиридине обладает, наряду с главным красным максимумом поглощения при 669 мμ, новой полосой поглощения при 640—643 мμ, которая не наблюдалась в ранее изученных растворителях. Известно, что растворы хлорофилла в более сильных основаниях — пиперидине ([5]) и бензиламине ([6]) — обладают главным красным максимумом поглощения при 642 мμ. Мы детально исследовали спектры поглощения свежевыделенного (хроматографически) хлорофилла a и феофитина a в свежеперегнанных, высушенных над

Таблица 1

Положение явных максимумов поглощения (±1 мμ) (главные максимумы даны жирным шрифтом)

Растворитель	Хлорофилл a	Феофитин a
Эфир	**661**, 614, 576, 530, **427**, 409	**665**, 608, 531, 503, **408**
Пиридин	**669**, 640, 618, 540, 508, **442**, 417	**666**, 611, 536, 507, **413**, 400
Пиперидин	**643**, 612, 590, 533, 498, **424**, 408	**664**, 611, 561, 529, 501, **405**
Хинолин	**672**, 620, 540, 508, 435, **419**	**670**, 610, 540, 510, **420***
Никотин	**669**, 638, 618, **432**, 412	—
Фенилгидразин	**671**, 640, 625, 540, **437**	—
Пиррол	**666**, 615, 540, 508, **418**	—

* Феофитин a + b.

окисью бария, химически чистых основаниях; измерения вели на фотоэлектрическом спектрофотометре (табл. 1).

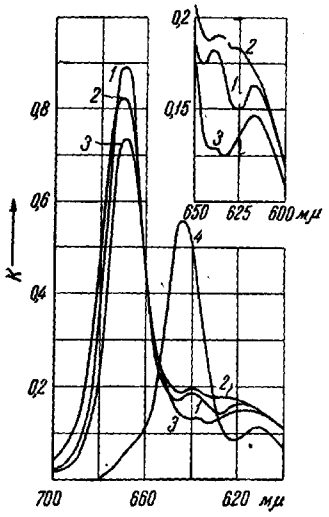


Рис. 1. Спектры поглощения хлорофилла а. *1* — в пиридине, *2* — в фенилгидразине, *3* — в никотине, *4* — в пиперидине

Спектр хлорофилла а наиболее сильно смещен в короткую сторону в пиперидине; в пирроле и хинолине сохраняется «обычная» структура спектра поглощения; в пиридине появляется максимум при 640 мμ; в фенилгидразине и никотине также удается наблюдать слабую полосу поглощения при 640—643 мμ. Существенно, что структура красной части спектра феофитина а является сходной во всех основаниях, в том числе и в пиперидине (см. также [7]). Полоса поглощения хлорофилла а в пиридине при 640 мμ, не связана с наличием в нем примесей пиперидина; об этом свидетельствуют следующие данные: 1) сухой химически чистый пиридин из разных источников и при разных методах очистки дает сходные спектральные кривые; 2) введение малого количества пиперидина в пиридин приводит при стоянии к постепенному росту поглощения при 643 мμ, что указывает на химическое взаимодействие хлорофилла с пиперидином. То, что эти спектральные смещения проявляются более отчетливо у хлорофилла, но не у феофитина, могло бы привести к предположению о связи оснований по центральному атому магния [8]; однако против этого говорит тот факт, что спектры поглощения координационных соединений хлорофилла с основаниями в неполярных растворителях [6, 8] не обладают сдвигом спектра и полосой поглощения при 638—643 мμ, наблюдаемым в растворе оснований, где, вероятно, доминирует иной тип взаимодействия, связанный с поляризацией молекулы пигмента и ионизацией «кислых» групп его молекулы. Это заключение находит подтверждение в наших измерениях спектра поглощения фталоцианина магния (не обладающего такими «кислыми» группами) в пиперидине; в этом случае полосы поглощения лежат при 670, 642 и 605 мμ, что мало отличается от их положения в пиридине, толуоле и спирте [9].

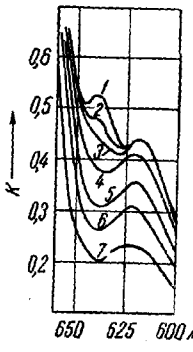


Рис. 2. Влияние добавок воды на спектр поглощения хлорофилла а в пиридине. *1* — в сухом пиридине; к 4,5 мл раствора (*1*) добавлено воды: *2* — 0,2 мл; *3* — 0,4 мл; *4* — 1,0 мл; *5* — 2 мл; *6* — 3 мл; *7* — 4,5 мл

В спиртовом растворе едкого калия (0,01—0,1 *N*) происходит постепенное перемещение красного максимума поглощения хлорофилла а к 640 мμ, и синего — к 615 мμ, что, вероятно связано с конечным образованием хлорина е [10]; введение щелочи, однако, не приводит к фотохимической активации. Введение исследованных оснований (до 1%) и аммиака в спиртовой раствор хлорофилла и феофитина не приводит к изменению «спиртового» спектра поглощения пигментов, но приводит к фотохимической активации, что видно из табл. 2. Таким образом, следует полагать, что спектральные проявления сольватации молекулы хлорофилла основаниями определяются различными типами взаимодействия, причем, вероятное связывание по магнию входит лишь в качестве одного из слагаемых, мало влияющих на спектр поглощения пигмента [6, 8].

Мы исследовали влияние добавок воды на вид спектра хлорофилла в пиридине; введение воды приводит к постепенному исчезновению максимума поглощения при 640 мμ (рис. 2); возможно, что образование «гидрата» пиридина, обладающего меньшей основностью, ослабляет поляризацию молекулы пигмента, определяющую появление полосы при 640 мμ. Введение воды мало влияет на глубину фотовосстановления, приводя к увеличению количества побочно образуемого феофитина ([1], [2]).

Действие оснований на фотохимическое восстановление пигментов. Опыты проводили в анаэробных условиях, согласно неоднократно описанной нами ранее методики ([1-4]) в жидких основаниях и при добавке оснований к спиртовому раствору хлорофилла.

Таблица 2*

Основания	Добавлено основания к 5 мл спирт. раствора в мг	Хлорофилл a		Феофитин a		Способность оснований к образованию гемохромогенов ([11])
		осталось после фотореакции в %	после обратн. реакции в %	осталось после фотореакции в %	после обратн. реакции в %	
Пиридин	—	6	87	15	68	дает
Пиперидин	—	31	39	5	50	»
Никотин	—	61	81	—	—	»
Пиррол	—	81	81	—	—	—
Хинолин	—	93	94	72	86	нет
Фенилгидразин **	—	4	62	—	—	—
Спирт этиловый	—	82	85	73	76	нет
В спирте						
Пиридин	50	42	52	43	54	дает
Пиперидин	50	19	29	16	36	»
Никотин	95	8	58	36	72	»
Уротропин	80	19	29	—	—	—
Хинолин	90	98	98	61	90	нет
Аргинин	насыщ.	94	93	—	—	»
Фенилгидразин **	100	52	85	—	—	—
Аммиак ***	—	9	26	—	—	дает
Едкий калий	0,1—0,01*N*	98	99	—	—	—

* В вакуумной трубке 5 мл раствора пигмента около 10^{-5} мол/л; 5 мг аскорбиновой кислоты. После эвакуации освещение 3 мин. через светофильтр RG-2 в фокусе конденсора киноламны 500 вт; водяное охлажление трубки, температура опыта 20°. Обратная реакция в темноте без доступа воздуха 2 часа. Подсчет процента от исходного количества пигмента, оставшегося после реакции, по величине *K* в красном максимуме поглощения; измерение в трубке на спектрофотометре.

** Опыты с фенилгидразином вели без аскорбиновой кислоты.

*** В боковой отвод головки вакуумной трубки вводили 1 мл водного раствора NH_3; после эвакуации раствор в отводе нагревали до 60°, при этом пары NH_3 насыщали спиртовой раствор пигмента, находящийся в трубке.

Реакция хлорофилла a в пиперидине сопровождается полным изменением характера спектра; вероятно, идет глубокое восстановление молекулы пигмента; феофитин в пиперидине восстанавливается более обратимо, однако спектр поглощения продукта после обратной реакции отличен от исходного; появляется новая полоса при 640 мμ. В хинолине и пирроле реакция практически не идет. Добавки хинолина к пиридину тормозят фотореакцию. В пиридине и фенилгидразине реакция идет достаточно глубоко и обратимо с образованием красного продукта фотовосстановления с максимумом поглощения около 523 мμ (рис. 2). Введение оснований в спирт ведет к глубокому и частично обратимому восстановлению; наибольшая обратимость наблюдалась при добавке

никотина. После пуска воздуха в трубку происходила более полная регенерация пигмента.

Рассматривая связь между спектральными и фотохимическими свойствами хлорофилла в присутствии оснований, можно придти к тому заключению, что в общем случае интенсивность полосы поглощения при 638—642 мμ не определяет глубины и обратимости фотовосстановления; наиболее активны основания, в которых эти полосы слабо выражены (пиридин, фенилгидразин, никотин) (рис. 3). Наконец, в спектрах спиртовых растворов в присутствии оснований вообще не удается наблюдать наличия этой полосы. Вероятно, на фотохимические свойства молекулы пигмента оказывает влияние также другой тип взаимодействия, не оказывающий столь значительного влияния на вид спектра,— координационное связывание оснований по центру молекулы пигмента. По аналогии с гемохромогенами, у которых связь гема с основаниями значительно повышает величину окислительно-восстановительного потенциала молекулы ([12]), следует предположить, что связывание хлорофилла с основаниями также приводит к увеличению сродства молекулы к электрону (т. е. к усилению ее окислительной способности) и тем самым дает возможность осуществления элементарного акта фотовосстановления за счет кванта красного света. Установленное в наших работах действие оснований позволяет подойти к пониманию природы активирующего действия белка на фотохимические свойства хлорофилла в естественном состоянии, на что мы указывали ранее ([2, 3]). Связь хлорофилла с основными (гистидиновыми) группами белка может определять высокую эффективность первичной фотохимической реакции белково-липоидного соединения хлорофилла в пластидах растений.

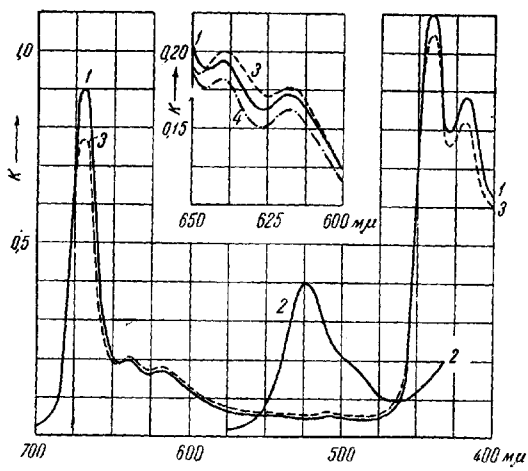


Рис. 3. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла а в пиридине. Спектры поглощения: *1*— хлорофилла а в пиридине с аскорбиновой кислотой после эвакуации; *2* — после фотовосстановления без воздуха; *3* — после обратной реакции без воздуха (в темноте); *4*— хлорофилл а в пиридине без аскорбиновой кислоты

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за советы и помощь в работе.

Поступило
7 I 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950). [4] А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951). [5] E. Katz, E. C. Wassink, Enzymol., **7**, 97 (1939). [6] R. Livingston, W. F. Watson, J. McArdle, J. Am. Chem. Soc., **71**, 1542 (1949). [7] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **85**, 1073 (1952). [8] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, **70**, 261 (1950). [9] В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, **58**, 417 (1947). [10] G. Fischer, A. Stern, Die Chemie des Pyrrols, **2**, T. 2, 1940. [11] R. Lemberg, J. Legge, Hematin Compounds and Bile Pigments, 1949. [12] E. C. Barron, J. Biol. Chem., **121**, 285 (1937). [13] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **16**, 453 (1951); А. А. Красновский, Усп. биохимии, **1**, 473 (1950).

Доклады Академии Наук СССР
1953. Том XCI, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

РАЗЛИЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 8 V 1953)

Исследование фотохимических и спектральных свойств хлорофилла в разных состояниях, проведенное ранее в нашей лаборатории, привело к заключению, что хлорофилл в растениях может находиться в различных состояниях в зависимости от стадии развития и внешних условий ([1], [2]). За последние годы нам удалось показать прямыми опытами взаимопереходы между разными состояниями хлорофилла в растениях и получить новые данные о природе этих состояний; краткому изложению этих результатов посвящена настоящая статья.

Изменение состояния хлорофилла в процессе его образования. При освещении этиолированных растений в них образуется и накапливается хлорофилл; мы исследовали в процессе зеленения: а) спектры поглощения коллоидных растворов вещества листьев фасоли *; б) общее количество образованного хлорофилла; в) фотохимическую устойчивость полученных коллоидных растворов при действии сильного освещения в области красного максимума поглощения хлорофилла.

Результаты опытов показаны на рис. 1. Этиолированные 7—9-дневные проростки фасоли освещали 200-ваттной лампой накаливания на расстоянии 70 см при 19°. Через разные промежутки времени отбирали пробы; 0,2 г листьев растирали при 0° с 4,5 мл фосфатного буфера (pH 7) 0,2 *M*, содержащего 0,01 *M* KCl, отжимали через полотно, центрифугировали 10 мин. при 3500 *g*. Спектр поглощения раствора измеряли на спектрофотометре Бекмана, затем освещали 5 мин. на воздухе в фокусе конденсора 500-ваттной киноламповой через светофильтр RG-2 при 16° с тем, чтобы определить количество хлорофилла, разрушаемого при фотохимическом окислении.

В начале освещения из протохлорофилла с максимумом поглощения при 635 мμ образуется форма хлорофилла с красным максимумом поглощения при 670 мμ (ниже мы будем именовать ее «формой 670»); по мере дальнейшего освещения происходит накопление хлорофилла, сопровождающееся постепенным перемещением максимума полосы поглощения в сторону длинных волн — до 677—678 мμ; этот максимум характерен для «обычной» формы хлорофилла в растениях («форма 678»). Первично образующаяся «форма 670» крайне неустойчива фотохимически и полностью выцветает в условиях опыта; по мере накопления хлорофилла растет его устойчивость к фотоокислению. Существенно, что на всех стадиях образования фотохимически разрушается количество хлорофилла, близкое к начальному количеству «формы 670»; при этом теряется красная флуоресценция раствора, наблюдаемая через светофильтр RG-5 при возбуждении группой ртутных линий при 365 мμ . Контрольные опыты по-

* Еще В. Н. Любименко показал подобие спектров поглощения хлорофилла в листьях и в коллоидных растворах «натурального хлорофилла» ([3]).

казали, что эту потерю флуоресценции нельзя приписать возможному ее тушению продуктами фотореакции или ростом их поглощения в области возбуждения; происходит разрушение флуоресцирующей фотоактивной формы хлорофилла.

Описанные опыты показывают, что хлорофилл в гранулах находится в различных состояниях: фотохимически неустойчивых, с красным максимумом поглощения при 670 мμ, и устойчивых, с конечным максимумом при 678 мμ. В начале зеленения доминирует «форма 670», тогда как через 16 час. в условиях опыта лишь около 3% хлорофилла находится в этом состоянии. Следует полагать, что именно активная «форма 670» подвергается обратимым фотохимическим превращениям при фотосинтезе ([1]), определяя также фотохимическую активность изолированных хлоропластов и коллоидных растворов вещества зеленых листьев. Действительно, фотоокисление, ведущее в условиях наших опытов к разрушению «формы 670» и к потере флуоресценции, приводит также к потере способности этих растворов к фотохимическому выделению кислорода, сопряженному с восстановлением фенол-индофенола.

Условия равновесия между разными состояниями хлорофилла. Повышение температуры ведет к сдвигу равновесия в сторону «формы 670». Давно известно, что нагревание листьев до 70—80° приводит к перемещению красного максимума поглощения от 678 до 670 мμ, что, однако, сопровождается нарушением структуры пластид. В работах Г. А. Тихова ([4]) показано, что у живых растений повышение температуры приводит к многократному усилению флуоресценции, что говорит о сдвиге состояний в сторону «формы 670». Подобным образом мы наблюдали усиление выцветания зеленых коллоидных растворов по мере повышения температуры. Пользуясь малой светопрочностью «формы 670», можно наблюдать взаимопереходы между состояниями хлорофилла у живых листьев. Если закрыть половину молодого листа фасоли черной бумагой и осветить лист конденсированным светом киноламиы либо ртутно-кварцевой лампой ПАРК-2 (в течение 3 мин. на расстоянии 30 см во льду), затем снять черную бумагу, то ясно видно ослабление флуоресценции у освещенной половины листа; при нагревании до ~30° флуоресценция снова восстанавливается, и различие между обеими половинами листа исчезает. После фотохимического разрушения «формы 670» в зеленых коллоидных растворах возвращение флуоресценции при нагревании происходит менее отчетливо и в меньшей степени, чем у листьев.

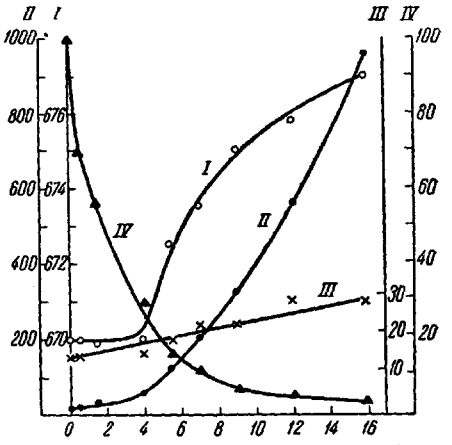
О природе разных состояний хлорофилла в растении. Исследования свойств хлорофилла в различных состояниях ([1]) показали, что флуоресценцией и максимумом поглощения от 660 до 670 мμ хлорофилл обладает в истинных растворах, эмульсиях и водных коллоидных растворах поверхностно-активных веществ (детергентов). Растворы хлорофилл-белково-липоидного соединения также обладают максимумом поглощения при 670 мμ ([5]). С другой стороны, агрегация молекул ведет к потере флуоресценции и перемещению красной полосы поглощения хлорофилла в сторону длинных волн. Так, твердые пленки, полученные при испарении в вакууме эфирных растворов хлорофилла a и a + b, имеют максимум при 675—677 мμ; в водных коллоидных растворах хлорофилла, в зависимости от степени коагуляции, максимум полосы поглощения лежит в пределах 670—690 мμ, что впервые было показано в работах Д. И. Ивановского ([6]).

Какова же природа первично образующейся в листьях «формы 670» хлорофилла? Известные факты указывают на то, что хлорофилл образуется из белково-липоидного соединения протохлорофилла ([2]); наиболее вероятно, что «форма 670» также связана с липопротеином, однако поглощением в области 668—670 м обладают также растворы хлорофилла в липоидах и его первично агрегированные формы, теряющие флуоресценцию и, соответственно, более светопрочные; такие формы получаются,

например, при разбавлении водой растворов хлорофилла в спирте или ацетоне; их дальнейшая коагуляция ведет к сдвигу поглощения в сторону длинных волн.

На рис. 1 видно, что на 2—3 часу зеленения при сохранении максимума 670 мμ резко увеличивается светопрочность хлорофилла, что следует объяснить начинающейся агрегацией.

Мы уже указывали на то, что слабая связь хлорофилла с липопротеином определяет возможность диссоциации ([1]). Таким образом, полоса поглощения в области 670 мμ соответствует белково-липоидному соединению хлорофилла, находящемуся в равновесии со свободным «коферментом» и начально-агрегированными формами. Накопление хлорофилла в процессе фотосинтеза приводит к его дальнейшей агрегации, упорядоченному расположению в гранулах, приводящему к конечному сдвигу максимума до 677—678 мμ.



Продолжительность освещения листьев в часах

Рис. 1. Изменение спектральных и фотохимических свойств хлорофилла в естественном состоянии по мере его образования в этиолированных листьях. *I*—положение главного красного максимума поглощения зеленого коллоидного раствора в мμ (± 1 мμ); *II*—количество образовавшегося хлорофилла в относительных единицах; *III*—количество выцветающего хлорофилла в относительных единицах; *IV*—процент фотохимически разрушенного через 5 мин. хлорофилла (по изменению коэффициента погашения в максимуме)

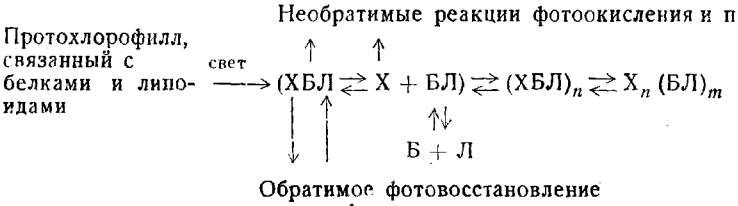
О том, что этот сдвиг определяется агрегацией, а не весьма слабой связью хлорофилла с липопротеином, свидетельствуют следующие факты:

1) искусственные хлорофилл-белковые соединения ([1], [8]) и хлорофилл-липопротеин, выделенный из листьев ([6]), обладают в растворе красным максимумом около 670 мμ, тогда как

2) взаимодействие между молекулами хлорофилла, проявляющееся при их высокой концентрации в коллоидных частицах и твердых пленках, приводит к сдвигу максимума в красную область до 675—677 мμ;

3) кристаллы «хлорофилл-липопротеина», выделенные из листьев фасоли одним из нас с М. А. Боруздиной по методу Такашима ([5]) *, обладают полосой поглощения при 690 мμ и лишены флуоресценции; их нагревание приводит к сдвигу полосы до 670 мμ и появлению флуоресценции вследствие дезагрегации; охлаждение снова приводит к перемещению полосы поглощения к 680 мμ и к потере флуоресценции; сходные явления с пленками бактериохлорофилла мы наблюдали ранее ([8]).

На основании вышеизложенного можно представить следующую схему состояний и превращений хлорофилла в растении (ХБЛ — хлорофилл-белково-липоидное соединение);



* Здесь не будет рассматриваться вопрос, являются ли эти кристаллы естественным липопротеином или образованием иной природы; в подобных ([5]) условиях кристаллизации хлорофилла a + b также образует кристаллы.

Итак, хлорофилл, непрерывно синтезируемый в растении и связанный с белками и липоидами, находится в различных состояниях и формах, испытывающих превращения, зависящие от стадии развития и условий среды. В начале зеленения доминирует «мономерная» дезагрегированная форма хлорофилла (ХБЛ); дальнейший синтез приводит к накоплению агрегированной формы $(ХБЛ)_n$. Нагревание хлоропластов при интенсивном солнечном освещении смещает равновесие в сторону активной мономерной формы, которая, в свою очередь, при интенсивном фотосинтезе переходит в фотохимически превращенное состояние. Таким образом, пигментная система реагирует на изменение условий среды переходом из неактивного в активное состояние и обратно. Непрерывно идущий синтез хлорофилла должен компенсировать необратимые его превращения за счет фотоокисления и иных побочных реакций, тогда как участие хлорофилла в процессе фотосинтеза определяется его обратимыми фотохимическими превращениями.

В случае фотохимической активности лишь части хлорофилла, находящегося в «мономерных» формах, обладающих флуоресценцией, возникают трудности в согласовании этих представлений с известными фактами высокого квантового выхода фотосинтеза. В качестве возможного объяснения можно привлечь представления о миграции и передаче энергии поглощенного кванта света от агрегированных к мономерным формам хлорофилла. Подобная междумолекулярная передача энергии возбуждения исследована в известных работах школы С. И. Вавилова ([9]) в области концентрационного тушения флуоресценции красителей; недавно А. Н. Теренин и В. Л. Ермолаев ([10]) показали возможность передачи энергии с переходом воспринимающей энергию молекулы в длительно живущее бирадикальное (триплетное) состояние.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов работы.

Поступило
2 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Докт. дисс., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948; Сборн. Проблемы биохимии, стр. 27, 1948; обзор Фотосинтез растений в сборн. Усп. биол. хим., **1**, 1950, стр. 473; А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **63**, 163 (1948). [2] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952). [3] В. Н. Любименко, Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. [4] Г. А. Тихов, ДАН, **78**, 133 (1951). [5] S. Takashima, Nature, **169**, 182 (1952). [6] Д. И. Ивановский, О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. [7] Т. Н. Годнев, О. П. Осипова, ДАН, **57**, 161 (1947); О. П. Осипова, ДАН, **57**, 371 (1947); **57**, 799 (1947). [8] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 389 (1952). [9] С. И. Вавилов, ЖЭТФ, **13**, 13 (1943). [10] А. Н. Теренин, В. Л. Ермолаев, ДАН, **85**, 547 (1952).

Доклады Академии Наук СССР
1953. Том XCII, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Л. М. КОСОБУЦКАЯ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

АКТИВНЫЕ И НЕАКТИВНЫЕ ФОРМЫ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА, ХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМАХ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 28 VIII 1953)

Наши работы, посвященные исследованию свойств хлорофилла в естественном состоянии связи с белками и липоидами гранул, привели к обнаружению фотохимически-активного состояния хлорофилла, свежеобразованного из протохлорофилла; в процессе дальнейшего синтеза накапливаются более устойчивые агрегированные формы пигмента ([1]). Исследование свойств протохлорофилла и бактериохлорофилла в естественном состоянии связи также привели нас к обнаружению активных и неактивных форм этих пигментов.

Прежде всего возникает вопрос, какие формы пигментов следует считать активными? Мы применяем этот термин к таким формам, фотобиохимические превращения которых удается установить прямыми опытами. Такими превращениями являются образование хлорофилла из протохлорофилла, а также обратимые превращения хлорофилла и бактериохлорофилла при фотосинтезе. В предыдущих работах нашей лаборатории было найдено и исследовано обратимое восстановление и окисление хлорофилла ([2]) и бактериохлорофилла ([3]), определяющее фотосенсибилизирующее действие этих пигментов в растворе ([4]). Однако подобные превращения пигментов непосредственно в живых организмах до сих пор не показаны в прямых опытах.

Мы вводим поэтому также другой, доступный экспериментальному исследованию критерий активности — способность пигментов к фотоокислению кислородом воздуха. Известно, что наиболее фотохимически активны «мономерные» формы пигментов, обладающие флуоресценцией, в отличие от нефлуоресцирующих агрегированных форм, гораздо более устойчивых к фотоокислению ([5, 9]). На примере протохлорофилла нами было показано, что фотобиохимическая активность (превращение в хлорофилл) соответствует малой устойчивости активной формы пигмента к фотоокислению; возможно, что и в случае хлорофилла и бактериохлорофилла наименее светоустойчивые состояния подвергаются обратимым фотохимическим превращениям в реакциях фотосинтеза. Рассмотрим свойства каждого пигмента.

Протохлорофилл, образуемый в этиолированных листьях растений, обладает в естественном состоянии связи красным максимумом поглощения при 635 мμ ([1]); наши опыты показали, что освещение листьев или коллоидных растворов вещества этиолированных листьев приводит к образованию активной формы хлорофилла с максимумом поглощения при 670 мμ («форма 670») (см. рис. 1); более интенсивное освещение в присутствии воздуха приводит к разрушению протохлорофилла и свежеобразованного хлорофилла ([1]). Следует указать и на то, что этиолированные листья фасоли обладают слабой красной флуоресценцией при возбуждении

линиями ртути при 365 мμ. Таким образом, естественное состояние протохлорофилла с максимумом поглощения при 635 мμ является бесспорно активным. Другим известным источником протохлорофилла являются внутренние оболочки семян тыквенных; идентичность протохлорофилла, выделенного из этих оболочек и этиолированных листьев, не вызывает сомнений ([6]). Однако наши опыты показали, что естественная форма пигмента в оболочках семян отличается своей неактивностью. Освещение семян кабачка, оболочек семян и коллоидных растворов, полученных из этих оболочек согласно описанному способу ([1]) не приводит к образованию хлорофилла.

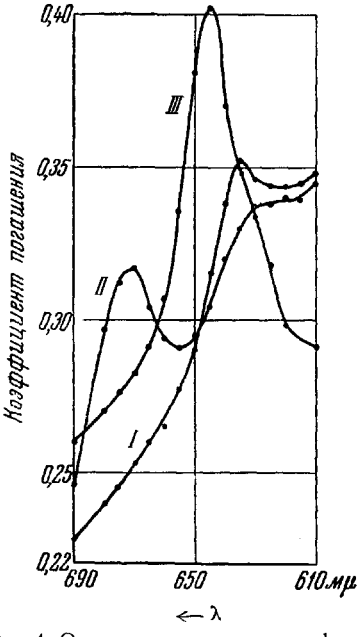


Рис. 1. Освещение протохлорофилла в естественном состоянии связи. *I* — коллоидный раствор вещества этиолированных листьев; *II*—после освещения 15 сек. (40 000 люкс) в присутствии воздуха; *III* — коллоидный раствор вещества внутренних оболочек семян кабачка до и после освещения

Введение в систему белков из этиолированных листьев также не оказывает активирующего действия на образование протохлорофилла. Максимум поглощения пигмента в оболочках лежит при 645 мμ, т. е. сдвинут в красную сторону по сравнению с этиолированными листьями на 10 мμ, что указывает на агрегацию пигмента в этой запасной форме, которая также не обладает заметной красной флуоресценцией (см. табл. 1).

Хлорофилл. В наших работах было показано существование обладающей флуоресценцией фотолабильной «формы 670» хлорофилла и его устойчивых агрегированных состояний с максимумом поглощения, сдвинутым в красную сторону до 678 мμ. Мы высказали предположение, что «форма 670» фотохимически участвует в реакциях фотосинтеза ([7]); в пользу этого можно привести следующие доводы: 1) опыты в простых системах указывают на фотохимическую активность «мономерных» форм хлорофилла, обладающих флуоресценцией; 2) еще в опытах Вильштеттера и Штолля ([8]) и В. Н. Любименко ([9]) было показано, что хлорофилл, свежеобразованный в листьях, обладает гораздо более высокой фотосинтетической продуктивностью, чем хлорофилл «взрослых» листьев; 3) известно, что интенсивное освещение листьев приводит к падению фотосинтеза и требует периода слабого освещения для восстановления активности ([10]); возможно, последнее явление связано с разрушением и образованием активной «формы 670» хлорофилла,— в наших опытах ([7]) интенсивное освещение приводило к падению фотохимической активности «зеленых растворов» и потере их флуоресценции.

Бактериохлорофилл обладает в клетках живых фотосинтезирующих организмов тремя максимумами поглощения в близкой инфракрасной области спектра — при 890, 850 и 800 мμ ([11]), тогда как пигмент в растворе имеет один пик при 760—780 мμ в зависимости от природы растворителя. В наших работах было показано, что агрегация молекул пигмента приводит к различным структурам, обладающим теми же тремя максимумами, что и пигмент в бактериях ([12]).

При крайней фотолабильности бактериохлорофилла в растворе его агрегированные формы и естественные состояния весьма устойчивы к действию света и воздуха. Мы предполагали, что в равновесии с агрегиро-

Таблица 1

Положение главных максимумов поглощения пигментов в естественном состоянии по сравнению с агрегированными формами (в мμ)

Состояние	Протохлорофилл (± 1 мμ)	Хлорофилл а (± 1 мμ)	Бактериохлорофилл (± 5 мμ)
В живых фотосинтезирующих организмах и коллоидных растворах, полученных из листьев (этиолированных и зеленых) и фотосинтезирующих бактерий путем диспергирования и центрифугирования			
активные формы	635	670	890, 780 (?)
неактивные формы	645	до 678	800—850
Твердые пленки, полученные на стекле при испарении в вакууме эфирных растворов хроматографически очищенных пигментов	635—640	675—676	800, 850, 890 *
Водные коллоидные растворы пигментов, полученные путем прямого растворения хроматограмм на сахаре в воде, либо путем разбавления с водой растворов пигмента с последующей коагуляцией $MgCl_2$ **	635—640	670—690	790—800, 850—860

* При испарении эфирных растворов свежевыделенного хроматографически бактериохлорофилла получаются пленки с двумя максимумами 800 и 850 мμ (± 15 мμ). Введение в эфирный раствор перед испарением малого количества мочевины приводит к образованию максимумов при 800 и 890 мμ; нагревание приводит к обратимому „опаданию" максимумов при 850 и 890 мμ ([12]).

** В таблице даны пределы: свежеобразованный — коагулированный коллоидный раствор.

ванными формами в клетках бактерий существует пигмент в активном «мономерном» состоянии ([12]). Чтобы обнаружить фотоактивное состояние пигмента были поставлены опыты по освещению суспензии бактерий интенсивным видимым светом с целью определения спектра нестойкой выцветающей формы бактериохлорофилла.

Суспензию бактерий Rhodopseudomonas, отфугованную от крупных частиц при 3500 g, освещали в культуральной среде и после многократной промывки водой на центрифуге; суспензию бактерий готовили при разных pH буферных растворах. Освещение осуществляли в условиях, неоднократно описанных ранее ([2], [3]).

В культуральной среде бактерии весьма светоустойчивы, после промывки их устойчивость становится несколько меньше; наиболее сильно выцветает «форма 890», однако в области «мономерных» состояний при 760—780 мμ нам не удалось обнаружить четких и воспроизводимых изменений спектра (рис. 3). «Форма 890» наименее устойчива также при действии растворителей. Например, при 30% пиридина в водной суспензии бактерий полностью исчезает максимум при 890 мμ, тогда как максимумы 850 и 800 мμ сохраняются (рис. 2). Вероятно, наименее устойчивая «форма 890» и является наиболее фотохимически-активной; недавно ([13]) была показана активность при фотосинтезе этой формы бактериохлорофилла. Возможно, однако, что «форма 890» наиболее легко диссоциирует с образованием действительно активных мономерных форм. На эту возможность указывают наши опыты по действию нагревания на спектры поглощения бактериальных суспензий: наиболее термолабильной оказалась именно «форма 890».

Резюмируя изложенное, можно придти к заключению, что пигменты в естественной форме связи находятся в активных и неактивных состоя-

ниях; мы уже указывали на то, что соотношение между этими состояниями меняется в процессе развития, зависит от физиологического состояния и внешних условий ([1, 5]). «Неактивность» исследованных пигментов определяется преимущественно агрегацией, защищающей связанные с белками и липоидами пигменты от необратимого фотохимического разрушения; наряду с этим возможно «блокирующее» действие связи с белком ([6, 9, 14]), наиболее сильно проявляющейся, однако, в случае высокой прочности

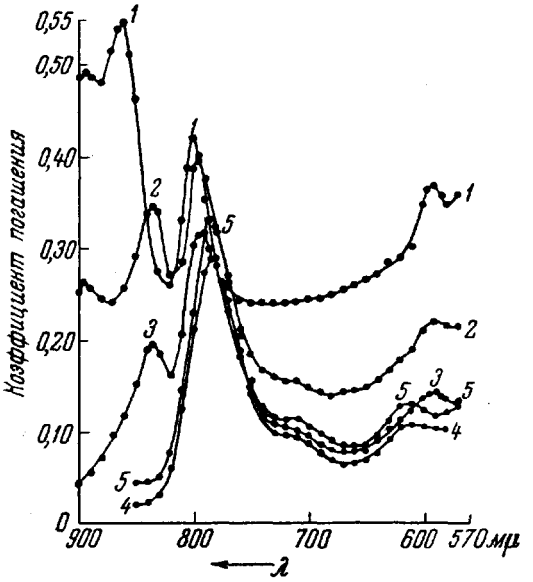


Рис. 2. Действие пиридина на спектры поглощения суспензии бактерий Rhodopseudomonas. *1* — исходная суспензия; к 5 мл суспензии добавлено: *2*— 1 мл пиридина; *3* — *2* мл пиридина, *4* — 3 мл пиридина, *5* — 4 мл пиридина

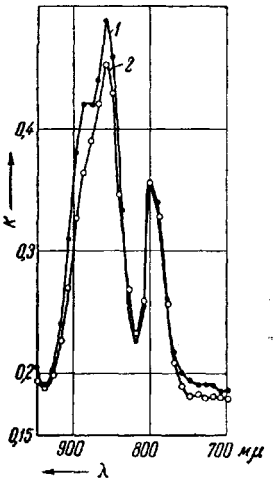


Рис. 3. Действие освещения на суспензию Rhodopseudomonas. *1* — исходная суспензия в фосфатном буферер H = 8; *2* — после освещения 5 мин. лампой 500 вт

этой связи, что было показано в нашей лаборатории для фикоэритрина ([15]), обладающего в растворе выдающейся устойчивостью к действию освещения.

Приносим глубокую благодарность А. Н. Теренину за советы и помощь.

Поступило
27 VI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952); **91**, 343 (1953). [2] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953). [3] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). [4] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952). [5] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **63**, 163 (1948). [6] В. Н. Любименко, В. А. Бриллиант, Окраска растений, 1924; А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949); V. M. Koski, J. H. C. Smith, J. Am. Chem. Soc., **70**, 3558 (1948). [7] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **91**, № 2 (1953); А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3 (1947). [8] R. Willstätter, A. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, 1918. [9] Е. Рабинович, Фотосинтез растений, **1**, 1945. [10] E. Steemann Nielsen, Physiol. Plantarum, **2**, 247 (1949); **5**, 334 (1952). [11] E. Katz, E. C. Wassink, Enzymol., **7**, 97 (1939); E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrenstein, ibid., **7**, 113 (1939). [12] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 389 (1952). [13] T. M. N. Duysens, Nature, **168**, 548 (1951). [14] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **89**, 523 (1953). [15] А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин, В. А. Гаврилова, ДАН, **82**, 947 (1952).

О связи фотохимической способности с энзиматическими процессами

Н. М. Сисакян, А. А. Красновский, Е. С. Михайлова и Г. П. Брин

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

В настоящее время накоплено значительное количество данных, указывающих на возможность сопряжения реакций фотосинтеза с другими процессами биологического обмена веществ. С указанной точки зрения наибольший интерес представляют исследования по выяснению взаимосвязи реакций фотосинтеза с процессами дыхания и выяснения на этой основе роли окислительно-восстановительных ферментов в процессе фотосинтеза.

Настоящая работа поставлена с целью выяснения роли дегидразных ферментов в реакциях фотосинтеза и фотохимической активности коллоидных растворов вещества зеленых листьев, а также изучения характера связи фотосинтеза с дыханием. Вероятность подобного допущения обусловлена нахождением в хлоропластах ряда дегидразных ферментов [1], а также установлением сопряжения реакций обратимого фотовосстановления хлорофилла с переносом водорода к простетическим группам дегидразных ферментов, рибофлавину и дифосфопиридиннуклеотиду (ДПН) [2].

При этом мы пользовались специфическими веществами и факторами, в той или иной степени подавляющими как фотохимическую, так и энзиматическую активность. Мы исследовали, прежде всего, влияние никотинамида, частично выключающего фотохимическую активность и при значительной его концентрации подавляющего активность дегидраз, обладающих в качестве простетических групп пиридиннуклеотидами.

Торможение ферментативных реакций связано с конкуренцией никотинамида и фосфопиридиннуклеотида за специфический белок и обратимо устраняется при введении в систему фосфопиридиннуклеотидов извне [3]. Таким образом, торможение энзиматической и фотохимической активности при введении никотинамида и их реактивация при помощи фосфопиридиннуклеотидов свидетельствовала бы об участии дегидраз этого типа в названных процессах.

В работе было использовано также воздействие ультрафиолетом как фактора, подавляющего ферментативные и фотохимические процессы.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были использованы 7—8-дневные проростки пшеницы и листья фасоли сорта Триумф. Коллоидные растворы вещества зеленых листьев получались следующим образом.

Навеска листьев (у фасоли за исключением нижних листьев брали 3, 4, 5, 6-й лист) растиралась на холоду с кварцевым песком и двойным количеством охлажденного 0,87%-ного раствора K_2HPO_4, pH 8,2. Кашица отжималась через полотно, и суспензия центрифугировалась (фасоль — 15 мин., пшеница — 5 мин.) при 2000—2500 об/мин. Для опытов использовался зеленый раствор вещества листьев. Определение фотохимической активности, дыхания и активности дегидраз проводилось на одном и том же материале.

Для определения дегидраз белки из зеленого раствора осаждались добавлением 1,5 объемов ацетона. Осадок центрифугировался и дважды промывался ацетоном, с

последующим центрифугированием, после чего цвет осадка становился желтовато-белым. Осажденные белки суспендировались в буфере K_2HPO_4 0,87% в объеме, равном взятому количеству зеленого раствора. Активность дегидраз определялась по методу Тунберга при 37—39°. На определение брали 2 мл суспензии белка 0,5 мл 0,1 *М* раствора донатора, предварительно доведенного до pH 8,2, 0,5 мл буфера K_2HPO_4, 1 мл метиленовой сини 1 : 20 000.

Кроме этого метода мы разработали способ определения дегидразной активности непосредственно в зеленых суспензиях, основанный на спектрофотометрическом измерении восстановления аналога метиленовой сини — тионина (описание опытов смотри ниже).

Измерение фотохимической активности производилось спектрофотометрическим методом по изменению окраски фенолиндофенола, восстанавливающегося при освещении зеленого раствора [4].

Зеленый раствор, так же как и суспензии хлоропластов, способен к реакции фотохимического выделения кислорода в тех случаях, когда в растворе присутствует окислитель, акцептирующий водород. В качестве акцептора водорода нами был использован фенолиндофенол, окисленная форма которого окрашена в розовый цвет при pH 6,5, а восстановленная форма — бесцветна. Измерения производились на спектрофотометре при 550 mμ. Исходный зеленый раствор разбавляли охлажденным фосфатным буфером, pH 6,5 до $E_{550} = 0{,}8$. Раствор фенолиндофенола в том же буфере имел тот же коэффициент погашения при 550 mμ. 3 мл испытуемого зеленого раствора и 3 мл фенолиндофенола наливались в круглую кювету спектрофотометра и измерялся коэффициент погашения при 550 mμ. Затем раствор освещали через красный светофильтр RG-2 в фокусе конденсора кинолампы 500 W 10 мин. В тех случаях, когда суспензия активна после 10 мин. освещения, фенолиндофенол восстанавливался и переходил в бесцветную форму; коэффициент погашения снижался пропорционально количеству убывающего фенолиндофенола. Это снижение определяет фотохимическую активность испытуемого раствора.

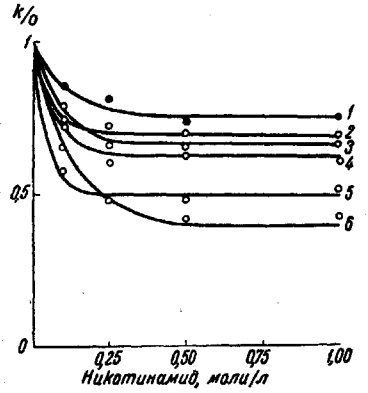


Рис. 1. Влияние никотинамида на активность дегидраз (фасоли):

1 — янтарной кислоты; *2* — гликокола; *3* — глютаминовой кислоты; *4* — глицерофосфата; *5* — лимонной кислоты; *6* — гексозодифосфата

Поглощение кислорода при дыхании измеряли манометрическим методом (Варбурга) при 20° на собственном субстрате исследуемой системы. Для определения брали 4 мл зеленого раствора, 0,3 мл 20%-ной КОН в центральном стаканчике сосуда.

Дыхание и фотосинтез 7—8-дневных проростков пшеницы измеряли в аппарате Варбурга в карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9,08 (8,5 мл $NaHCO_3$ 0,1 *М* и 1,5 мл Na_2CO_3 0,1 *М*) (в специальных сосудах с плоским дном).

Освещение осуществлялось лампой накаливания в 200 W, помещенной в ванну термостата на расстоянии 6 см от дна сосуда через красный светофильтр RG-2 (5 мм толщиной). В сосудах помещали 1 г нарезанных по 1 см проростков и 10 мл карбонат-бикарбонатного буфера, который давал возможность учитывать изменение давления газа в сосуде по поглощению кислорода, так как парциальное давление углекислоты над буферным раствором остается постоянным.

При графическом изображении активности дегидраз время выцветания метиленовой сини в контроле принято за единицу. Отношение контроля (к) к опыту (о) условно принято за активность дегидраз в опыте (рис. 1).

Для определения фотохимической активности мы сравнивали фотохимическую активность контрольного зеленого раствора с раствором, обработанным никотинамидом. Считая коэффициент погашения в контрольном опыте за 100%, рассчитывали, на сколько процентов данная концентрация никотинамида снижала фотохимическую активность (рис. 2).

Отношение количества кислорода, поглощенного зеленым раствором под влиянием никотинамида в опыте, к количеству поглощенного кислорода в контроле за 21 мин. дает представление о степени подавления дыхания (рис. 3).

Как это видно из рис. 1, 2 и 3, амид никотиновой кислоты в определенных концентрациях (от 0,1 *М*) оказывает тормозящее действие на дегидразную активность белков, выделенных из листьев фасоли, на дыхание и на фотохимическую способность коллоидных растворов вещества листьев фасоли. Наиболее сильное действие амид никотиновой кислоты оказывает на активность дегидразы гексозодифосфата, глицерофосфата, лимонной, глютаминовой и аспарагиновой кислот. Действие

никотинамида на дегидрадную активность белков зеленых листьев колебалось в зависимости от физиологического состояния и, в особенности, от возраста листьев; в ряде случаев степень подавления активности дегидраз была незначительной; в аналогичных случаях никотиновая кислота всегда оказывала явное подавляющее действие на дегидразную и фотохимическую активность. Следует указать, что при тех же концентрациях никотинамида фотохимическая активность зеленых растворов вещества листьев подавляется в значительно большей степени, чем активность дегидраз и дыхание.

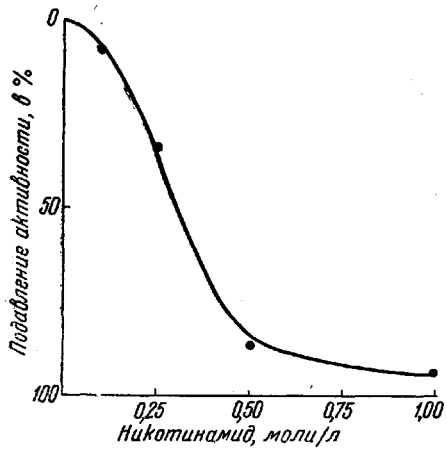


Рис. 2. Влияние никотинамида на фотохимическую активность зеленого раствора фасоли

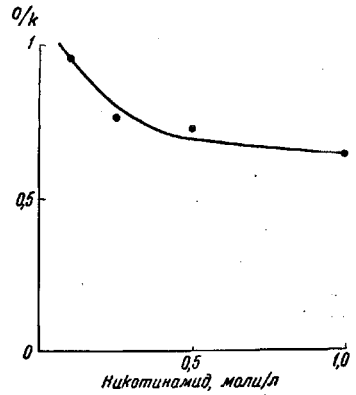


Рис. 3. Влияние никотинамида на дыхание зеленого раствора фасоли

Помимо амида никотиновой кислоты мы испытывали действие ультрафиолетового облучения (УФ) на активность дегидраз, фотохимическую способность и дыхание зеленых растворов фасоли.

Для этой цели 20 мл зеленого раствора листьев фасоли облучались в закрытой целлофаном чашке Петри в течение различного времени. Чашка Петри помещалась в лед на время всего опыта. Для облучения использовалась ртутно-кварцевая лампа ПРК-2. Расстояние от оси лампы до объекта 35 см. Контрольный раствор ставили на лед в темноте.

Данные по измерению активности дегидраз, фотохимической способности и дыхания под влиянием УФ приведены на рис. 4, 5, 6, из которых видно, что ультрафиолетовое облучение полным светом кварцевой лампы ПРК-2 приводит к торможению дыхания, дегидразной и фотохимической активности. И в данном случае фотохимическая активность подавляется сильнее, чем активность дегидраз и дыхание.

Необходимо, однако, указать, что дегидразы гексозодифосфата, глицерофосфата, лимонной, глютаминовой и аспарагиновой кислот оказались менее чувствительными к ультрафиолету, чем к амиду никотиновой кислоты.

Для выяснения природы инактивирующего действия амида никотиновой кислоты и УФ, а также установления связи между фотохимической способностью и активностью дегидраз и дыхания мы попытались реактивировать исследованные нами процессы посредством дифосфопиридиннуклеотида.

С этой целью нами был применен спектрофотометрический метод определения активности дегидраз.

В отличие от ранее описанного нами способа определения дегидраз (в белковой суспензии) в этих опытах мы использовали зеленый раствор вещества листьев фасоли. В качестве акцептора водорода мы применили тионин, максимум поглощения которого лежит около 600 мμ, в области наименьшего поглощения зеленого раствора. Раствор тионина (2 мл) с $E_{600} = 1$ вводили в головку трубки Тунберга, приспособленной для спектрофотометрического измерения. В трубку заливали зеленый раствор с $E_{600} = 1$ (4 мл) и донатор (1 мл) — раствор глютаминовой кислоты.

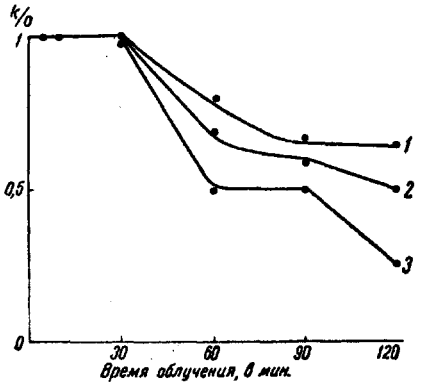


Рис. 4. Влияние ультрафиолетового облучения на активность дегидраз (фасоли):

1 — гистидина; *2* — глютаминовой кислоты; *3* — гексозодифосфата

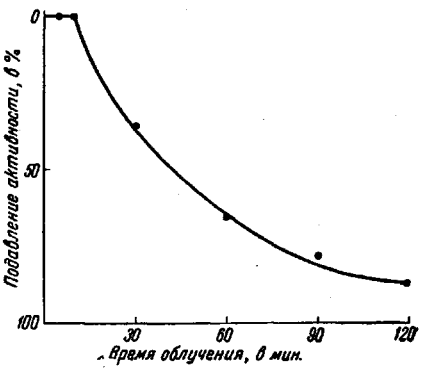


Рис. 5. Влияние ультрафиолетового облучения на фотохимическую активность зеленого раствора фасоли

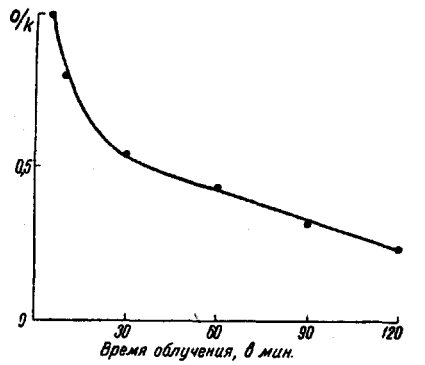


Рис. 6. Влияние ультрафиолетового облучения на дыхание зеленого раствора фасоли

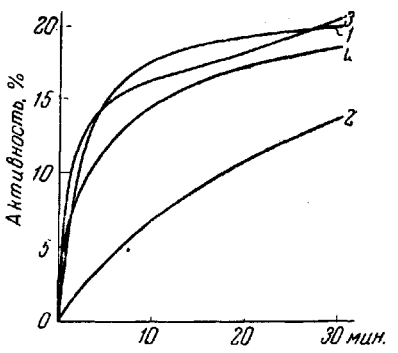


Рис. 7. Влияние никотинамида и ДПН на активность дегидразы глютаминовой кислоты:

1 — Зеленый раствор — контроль (баз добавок); *2* — Добавлен никотинамид 0,5 моля; *3* — Добавлен никотинамид 0,5 моля и ДПН (24%) — 15 мг; *4* — Добавлен ДПН (24%) 25 мг

В опытах по действию амида никотиновой кислоты и ДПН к зеленому раствору прибавляли амид никотиновой кислоты до концентрации 0,5 моля и ДПН (24%) — 15 мг. Трубки эвакуировались 3 мин. и термостатировались при 26°— 10 мин., после чего к зеленому раствору приливали из головки раствор тионина.

О дегидразной активности мы судили по изменению во времени коэффициента погашения тионина при 600 мμ. Результаты представлены на рис. 7.

Из рисунка видно, что амид никотиновой кислоты подавляет активность дегидразы глютаминовой кислоты, добавление же ДПН снимает эту инактивацию. Введение ДПН не влияет на дегидразную активность исходного зеленого раствора.



Рис. 8. Реактивация дыхания зеленого раствора проростков пшеницы, подавленного никотинамидом, посредством ДПН:

1 — контроль без добавки; *2* — добавлен никотинамид 0,5 *М*; *3* — добавлен никотинамид 0,5 *М* и ДПН 0,3 мг/мл

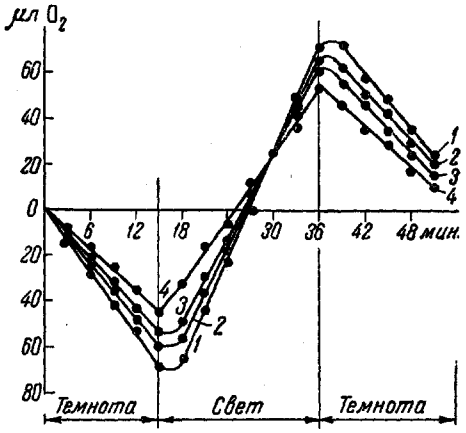


Рис. 9. Влияние различных концентраций никотинамида на дыхание и фотосинтез проростков пшеницы:

1 — инфильтрация воды; *2* — инфильтрация 0,25 *М* никотинамида; *3* — инфильтрация 0,50 *М* никотинамида; *4* — инфильтрация 0,75 *М* никотинамида

Для выяснения влияния амида никотиновой кислоты и ДПН на дыхание суспензия приготавливалась растиранием навески проростков с равным объемом буфера K_2HPO_4, pH 8,2. Полученный зеленый раствор для контроля разбавлялся равным количеством буфера, для опыта с никотинамидом — раствором никотинамида в буфере (конечная концентрация в зеленом растворе 0,5 *М*), для опыта с никотинамидом и ДПН добавлялся сначала раствор ДПН (конечная концентрация в зеленом растворе 0,3 мг/мл и после 15 мин. стояния добавлялся раствор никотинамида в буфере). Через 15 мин. определялось дыхание в аппарате Варбурга.

Результаты опытов представлены на рис. 8, из которого видно, что добавление ДПН почти полностью реактивирует подавленное никотинамидом дыхание. Дыхание, подавленное ультрафиолетом, практически не активируется введением ДПН.

Представлялось интересным исследовать влияние никотинамида на дыхание и фотосинтез живых листьев.

Для введения никотинамида и ДПН в листья нами был использован метод вакуум-инфильтрации. Навески проростков по 1 г инфильтрировались 0,5 *М* никотинамидом и 0,5 *М* никотинамидом + ДПН.

Режим опыта. Сосудики Варбурга выдерживались 15 мин. для термостатирования в ванне при 20°. Затем краны перекрывались и в течение 15 мин. сосуды оставлялись в темноте, при этом определялось дыхание, после чего сосуды переставлялись под лампу и в течение 21 мин. измерялся фотосинтез.

Определение дыхания и фотосинтеза проводилось в день инфильтрации (2-часовая экспозиция) и на следующий день после инфильтрации. В течение этого времени проростки держались во влажной камере при комнатной температуре.

Для того чтобы убедиться в том, что действие амида никотиновой кислоты не определяется изменением осмотического давления клетки, мы провели опыты с инфильтрацией глюкозы тех же концентраций в проростках. Опыты показали, что глюкоза в концентрации 0,25, 0,5 и 0,75 *М* не влияет на дыхание и фотосинтез как в день инфильтрации, так и через сутки после инфильтрации.

Опыты с никотинамидом тех же концентраций представлены на рис. 9, из которого видно, что повышение концентраций никотинамида влияет как на дыхание листьев, так и на фотосинтез. Для количествен-

ной оценки полученных данных мы рассчитывали скорости этих процессов по тангенсу угла наклона полученных прямых к оси абсцисс, принимая tg угла для контрольных опытов (инфильтрирована H_2O) за 100% (табл. 1).

Из данных табл. 1 видно, что степень подавления фотосинтеза и дыхания, как в день инфильтрации, так и на следующий день весьма близка.

В дальнейшем мы инфильтрировали никотинамид 0,5 *М* в присутствии ДПН. Концентрация ДПН в инфильтрируемом растворе была 1,5 мг/мл. Полученные данные приведены в табл. 2.

ТАБЛИЦА 1

Введено в лист	Дыхание		Фотосинтез	
	в день инфильтрации	на следующий день	в день инфильтрации	на следующий день
Вода	100	100	100	100
Никотинамид 0,25 *М* . .	78	79	77	89
" 0,5 *М* . .	78	73	78	72
" 0,75 *М* . .	63	73	72	68

ТАБЛИЦА 2

Введено в лист	Дыхание		Фотосинтез	
	в день инфильтрации	на следующий день	в день инфильтрации	на следующий день
Вода	100	100	100	100
Никотинамид	60	67	83	50
Нокотинамид + ДПН . .	73	57	83	51

Из данных табл. 2 видно, что никотинамид снижает дыхание как в день инфильтрации, так и на следующий день. Введение ДПН приводит к частичному восстановлению прежнего уровня дыхания, подавленного никотинамидом в опыте, поставленном в день инфильтрации; на следующий день влияние ДПН на дыхание не сказывается. Реактивирующее действие ДПН наблюдается в зеленом растворе и в живых листьях в одинаковой мере. Никотинамид снижает скорость фотосинтеза в день инфильтрации на 17%, а на следующий день — на 50%. Добавка же ДПН не влияет на фотосинтез ни в том, ни в другом случае.

Опыты, проведенные с инфильтрацией раствора одного ДПН (1,5 мг/мл), показали значительное усиление дыхания (130%) в день инфильтрации и отсутствие влияния на следующий день. На фотосинтез действие ДПН не сказывается.

Заключение

Ранее [3] было показано, что амид никотиновой кислоты подавляет некоторые дегидразы животной ткани. Подавление активности дегидраз амидом никотиновой кислоты определяется его взаимодействием со специфическим белком дегидраз, обладающих в качестве простетических групп ди- или трифосфопиридиннуклеотидами.

Введение в биохимическую систему определенного количества ДПН или ТПН в той или иной степени снижает эффект торможения амидом

никотиновой кислоты, являющимся таким образом «конкурентным» ингибитором.

Наши исследования были проведены с целью установления связи между активностью ферментов из группы дегидраз и фотохимической способностью зеленых коллоидных растворов вещества листьев.

Опыты показали, что амид никотиновой кислоты обладает не одинаковым сродством к специфическим белкам дегидраз; обычно, наиболее сильно угнетается действие дегидраз гексозодифосфата, глицерофосфата, лимонной и глютаминовой кислот. Введение ДПН приводит к реактивации подавленной никотинамидом дегидразы глютаминовой кислоты. Вследствие неодинакового сродства никотинамида к специфическим белкам дегидраз реактивация посредством ДПН может также происходить не в одинаковой мере.

Никотинамид угнетает дыхание зеленых растворов и живых листьев примерно в одинаковой степени; введение ДПН существенно снимает эффект торможения.

Никотинамид весьма сильно подавляет фотохимическую активность зеленых растворов уже при концентрации 0,1 *М*. Введение ДПН не приводит к восстановлению подавленной активности. Действие никотинамида на фотосинтез живых листьев проявляется в меньшей степени; введение ДПН также не приводит к снятию торможения.

Торможение фотосинтеза и фотохимической способности зеленых растворов никотинамидом указывает на то, что дегидразы могут быть звеном, участвующим в реакциях фотосинтетического переноса водорода. Отсутствие действия ДПН в данном случае можно объяснить либо более активным его взаимодействием с другими белками, присутствующими в системе, либо тем, что в данной системе процессов участвует не дифосфопиридиннуклеотид, а трифосфопиридиннуклеотид.

Таким образом, экспериментально установлено, что:

1) в зеленых растениях имеются дегидразные системы, действие которых подавляется никотинамидом и реактивируется дифосфопиридиннуклеотидом;

2) подавление фотохимической активности и фотосинтеза никотинамидом может быть использовано в качестве довода в пользу представления об участии дегидраз и в этих процессах; однако отсутствие реактивирующего действия ДПН в этих случаях открывает возможности для иного объяснения наблюдаемого явления.

Дальнейшие исследования с применением ТПН и повышенных концентраций ДПН позволят вынести более определенное суждение о связи между фотохимической способностью и энзиматическими процессами

Поступила в редакцию
8. VI. 1953

ЛИТЕРАТУРА

1. Сисакян Н. М. и Чамова К. Г., ДАН **67**, 337, 1949; Сисакян Н. М., Ферментативная активность протоплазменных структур, Изд. АН, 1951.
2. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **67**, 325, 1949; **73**, 1239, 1950; Брин Г. П. и Красновский А. А., Биохимия **16**, 453, 1951.
3. Feigelson F., Williams Y. N., Elvehjem C. A., J. Biol. Chem. **189**, 361, 1951.
4. French C. S., Holt A. S., Am. J. Bot. **33**, 835, 1946.

Условия образования хлорофилла в коллоидных растворах вещества этиолированных листьев фасоли

Л. М. Кособуцкая и *А. А. Красновский*

Институт биохимии им. Баха Академии наук СССР, Москва

К. А. Тимирязев [1] обнаружил в спиртовых вытяжках этиолированных проростков наличие пигмента с красным максимумом поглощения, сдвинутым в коротковолновую часть спектра по сравнению с хлорофиллом. При освещении проростков этот пигмент в течение нескольких минут превращался в хлорофилл; предшественнику хлорофилла Тимирязев дал название протофиллина.

Монтеверде и Любименко [2] подробно исследовали пигмент этиолированных растений, дав ему название протохлорофилла. Они обнаружили протохлорофилл в значительных количествах также во внутренних оболочках семян тыквенных. Они полагали, что в темноте в пластидах образуется бесцветное вещество — лейкофилл, которое затем преобразуется в предшественника хлорофилла — хлорофиллоген. Это вещество в свою очередь может претерпевать двоякое изменение — в растениях при освещении оно переходит в хлорофилл, при экстрагировании же хлорофиллогена органическими растворителями получается видоизмененный продукт — протохлорофилл. Следует думать, что протохлорофилл, связанный в растениях с белками и липоидами, является тем хлорофиллогеном, о котором пишут авторы. Монтеверде и Любименко указывали, что пигмент с главной полосой поглощения 680—660 mμ, возникающий в начале освещения этиолированных листьев, не совсем тождественен хлорофиллу листьев, выросших на свету.

За последние годы установлено, что при освещении этиолированных листьев протохлорофилл количественно превращается в хлорофилл [3].

Красновский и Войновская [4] и независимо от них Коски и Смит [5], выделив протохлорофилл из растений, показали, что существует только одна модификация этого пигмента, соответствующая хлорофиллу «а» (вопреки данным Зейбольда и Эгле о существовании двух модификаций протохлорофилла, аналогичных хлорофиллам «а» и «в») [6].

Как известно, отличие хлорофилла от протохлорофилла заключается в гидрировании изолированной двойной связи в IV пиррольном ядре, однако до сих пор не удалось восстановить протохлорофилл в виде химически индивидуального соединения до хлорофилла. Попытка Годнева и Калчишевич [7] восстановить протохлорофилл до хлорофилла по известной реакции Тимирязева (цинковой пылью с уксусной кислотой) не привела к положительным результатам.

В работе Красновского и Войновской [4] было установлено, что фотохимическое восстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой ведет к образованию активных фотопродуктов, обратимо окисляющихся до протохлорофилла; при длительном освещении удавалось заметить появление полосы при 675 m что свидетельствует о возможности частичного образования в этих условиях хлорофиллоподобных продуктов.

Для образования хлорофилла из протохлорофилла у покрытосемянных растений необходимо действие света, хотя вообще этот переход может осуществляться и в темноте путем ферментативных реакций, как, например, это происходит у хвойных, зеленеющих в отсутствие света.

В недавней работе Годнева и Терентьевой [8] удалось наблюдать образование хлорофилла в темноте в этиолированных листьях кукурузы, при погружении их в вытяжку из хвои ели с добавлением аскорбиновой кислоты или дрожжевого сока для обеспечения восстановительных условий.

Лиро [9] и Исаченко [10] наблюдали образование хлорофилла при освещении этиолированных листьев после сушки, растирания с песком и после замораживания.

Как известно, в суспензиях изолированных хлоропластов или гранул и в коллоидных растворах вещества зеленых листьев, т. е. при нарушении структуры листа, может совершаться при освещении часть реакций фотосинтеза, связанных с выделением кислорода и образованием продуктов [11], способных восстанавливать ряд окислителей — ионы железа, многие хиноны и т. д.

Возможность осуществления отдельных реакций фотосинтеза в коллоидных растворах вещества зеленых листьев позволила предположить возможность фотохимического образования хлорофилла из протохлорофилла вне клетки в подобных растворах. Действительно, нам удалось показать, что при освещении коллоидных растворов вещества этиолированных листьев в течение нескольких минут происходит превращение протохлорофилла в хлорофилл [12].

В данной работе исследованы свойства и особенности этого процесса.

Объект и методика исследования

Работу вели с фасолью сорта «Триумф», при растирании листьев которой, как известно, образуются устойчивые растворы «натурального хлорофилла» (по В. Н. Любименко), обладающие тем же спектром поглощения, что и листья.

Семена замачивали сутки в водопроводной воде при 22°, а затем выращивали в песке в темноте на среде Кнопа при температуре 22—23°. 7—10-дневные проростки растирали в темноте с фосфатным 0,02 *М* буферным раствором, содержащим 0,01 *М* KCl.

Полученную кашицу отжимали через полотно и центрифугировали 10 мин. при 3500 g. В некоторых случаях применяли коллоидные растворы, полученные в результате 5-минутного центрифугирования при 10000 g.

В результате центрифугирования получали устойчивый опалесцирующий раствор зелено-желтого цвета. Все описанные операции производили в темноте при температуре, по возможности близкой к нулю.

Спектры поглощения растворов снимали на фотоэлектрическом спектрофотометре Бекмана. Опыты проводили в присутствии воздуха и при его эвакуации. В опытах без воздуха раствор помещали в вакуумную трубку особой формы, позволяющей ее установку в кюветодержателе спектрофотометра, и производили эвакуацию масляным вакуумным насосом при энергичном взбалтывании в течение 7 мин. В начале эвакуации происходило сильное вспенивание. В качестве источника света для освещения коллоидных растворов была применена киноламна в 110 в, мощностью 500 ватт, с конденсором, работавшая при разной интенсивности света. Мы проводили опыты при 30 в ($\sim$ 1000 люкс) и при 90 в ($>$ 40 000 люкс). Для образования хлорофилла применяли освещение без светофильтра, при разрушении образованного хлорофилла сильным светом использовали красный светофильтр RG-2. Во время освещения вакуумную трубку помещали в стеклянный кожух, в котором циркулировала вода из ультратермостата.

Образование хлорофилла в аэробных и анаэробных условиях

Прозрачный чуть опалесцирующий зеленовато-желтый коллоидный раствор из листьев этиолированной фасоли обладает спектром поглощения с явным максимумом протохлорофилла при 635 mμ, и не обладает максимумом в области поглощения хлорофилла.

При освещении такого раствора во всех случаях можно наблюдать появление явного максимума при 670 mμ, сопровождающееся падением максимума протохлорофилла.

В опытах с освещением при 30 в ($\sim$ 1000 люкс) наиболее эффективной является первая минута. В пределах первой минуты образуется большая часть хлорофилла с максимумом при 670 mμ (рис. 1). Эвакуация приводит к некоторому увеличению количества образующегося хлорофилла (рис. 2).

Если коллоидный раствор, в котором был образован хлорофилл при 30 в, освещать светом при 110 в через красный светофильтр RG-2 в

присутствии воздуха, весь образовавшийся хлорофилл и оставшийся протохлорофилл полностью разрушаются.

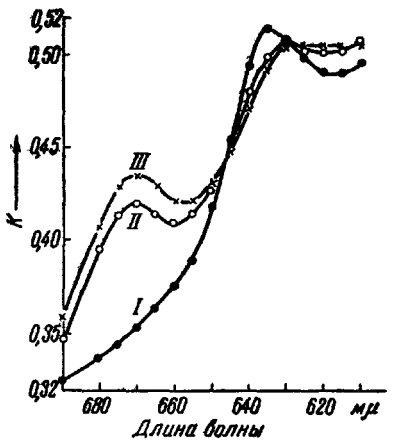


Рис. 1. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев с воздухом при слабом освещении (30 в на лампе)

I — коллоидный раствор до освещения; *II* — 1 мин. освещения; *III* — 2 мин. освещения

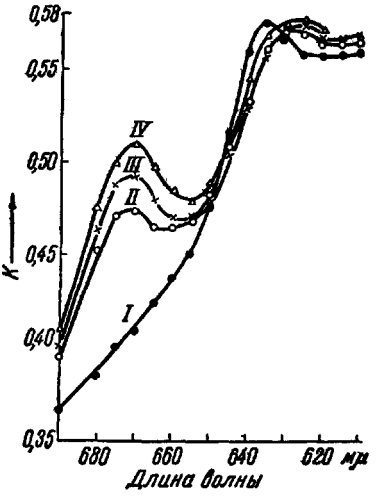


Рис. 2. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев без воздуха при слабом освещении

I — коллоидный раствор до освещения; *II* — 1 мин. освещения; *III* — 2 мин. освещения; *IV* — 3 мин. освещения

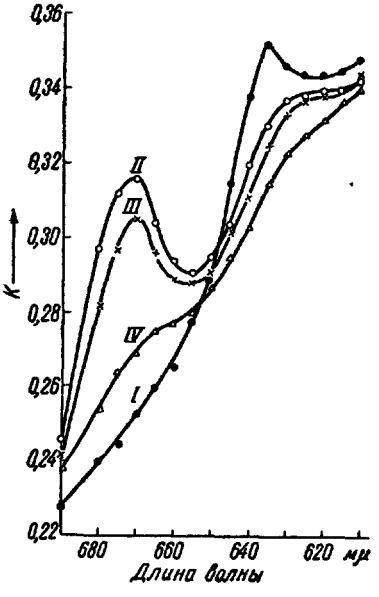


Рис. 3. Образование и разрушение хлорофилла вколлоидном растворе этиолированных листьев с воздухом при сильном освещении (90 в на лампе):

I — исходный коллоидный раствор; *II* — 15 сек. освещения; *III* — 30 сек. освещения; *IV* — 2,5 мин. освещения

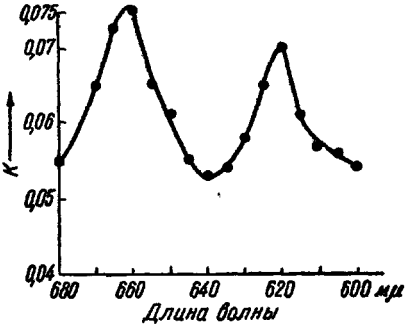


Рис. 4. Спектр поглощения пигментов в эфире после образования хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев

При освещении коллоидного раствора при 90 в образование большей части хлорофилла происходит в первые 15 сек. (рис. 3). В присут-

ствии воздуха при малой интенсивности света образованный хлорофилл в пределах 6-минутного освещения не изменяется. При большей интенсивности света (90 в), в присутствии воздуха уже после первых 15 сек. происходит разрушение образованного хлорофилла и протохлорофилла.

После того как максимум поглощения хлорофилла (в опытах со слабым освещением) переставал повышаться, к водному коллоидному раствору приливали ацетон до его концентрации 60%, затем прибавляли эфир и разбавлением водой пигменты переводили в эфирный слой. Спектр поглощения эфирного раствора пигментов (рис. 4) обнаруживает максимумы поглощения хлорофилла «а» (662 ± 1 mμ) и протохлорофилла (625 ± 1 mμ), который в наших опытах не весь превращался в хлорофилл.

Изменение свойств коллоидных растворов при хранении

Коллоидные растворы, применяемые в опытах по образованию хлорофилла, сохранялись нами при 20° и при 0°. Коллоидные растворы, стоявшие при 20°, сохраняют способность к образованию хлорофилла более 30 час. (рис. 5), хотя следует отметить, что количество образующегося хлорофилла в этих условиях сильно снижается в первые часы хранения (за 2 часа почти наполовину). По мере хранения при 20° уровень кривой поглощения повышается, вероятно, за счет изменения коллоидных свойств раствора.

При 0° количество образующегося хлорофилла в коллоидном растворе за 20 час. не изменяется. Спектральная устойчивость коллоидного раствора также увеличивается, изменение спектра, наблюдающееся при 20°, замедляется при низкой температуре.

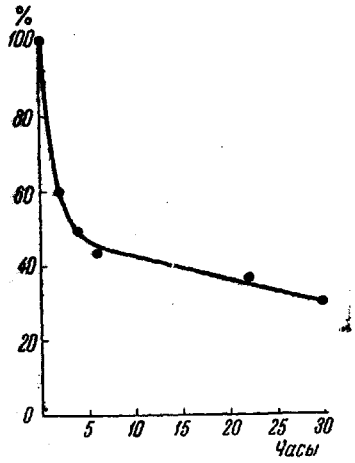


Рис. 5. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев при его хранении в темноте при 20°

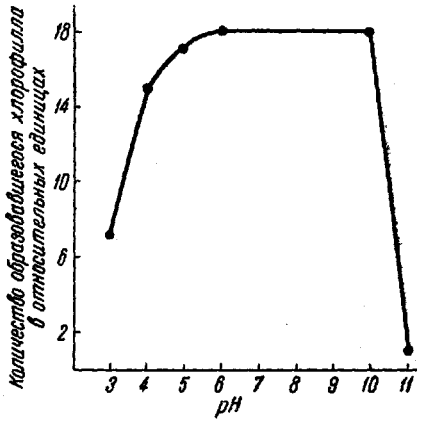


Рис. 6. Зависимость процесса образования хлорофилла от pH среды

Зависимость образования хлорофилла от pH

Мы изучали процесс образования хлорофилла в коллоидных растворах этиолированных листьев при различных pH фосфатного буфера (освещение при 30 в на лампе без эвакуации).

На основании проведенных опытов можно сделать вывод, что этот процесс идет в широком интервале pH, от 6 до 10. При pH 3 и pH 11 заметно лишь незначительное образование хлорофилла при освещении. Свой-

ства белковых коллоидных растворов сильно зависят от pH; они наиболее устойчивы в щелочной среде и менее устойчивы при кислых pH, в соответствии с известными данными о положении изоточки белковых растворов из листьев фасоли при pH 4,7 [13]. Это видно из рис. 6.

Зависимость образования хлорофилла от температуры

Мы исследовали образование хлорофилла в коллоидных растворах при 20° и 0° (при 30 в на лампе без эвакуаций). В этих условиях температуры образуется одинаковое количество хлорофилла (±10%).

Влияние различных воздействий на образование хлорофилла

Действие нагревания. Коллоидные растворы, приготовленные из этиолированных листьев, нагревались на водяной бане до различной температуры в течение 30 мин. После охлаждения в них определялась в присутствии воздуха способность образовывать хлорофилл при освещении (30 в). При нагревании происходило повышение уровня кривой поглощения. Нагревание до 30° полностью подавляло образование хлорофилла.

Действие растворителей. К 2,5 мл коллоидного раствора добавляли 2,5 мл буфера и растворителя в различных соотношениях (спирт до 50%, пиридин до 25%). После стояния 20 мин. в темноте вольду растворы освещались. Растворители уже при сравнительно низких концентрациях полностью подавляли образование хлорофилла — спирт при 10%, пиридин при 2,5%. При 10% спирта коллоидный раствор слегка мутнел, при 20% выпадал осадок белка. При добавлении пиридина вначале, до 13%, наблюдалось повышение кривой поглощения успензии, а затем происходило постепенное просветление. При 25% пиридина уровень кривой поглощения ниже контроля. Осадка белка с пиридином не наблюдалось; в соответствии с нашими предыдущими наблюдениями пиридин ведет к стабилизации белковых растворов из зеленых листьев [14].

Действие ингибиторов. Гидроксиламин солянокислый употреблялся нами в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ *М*/л, подавляющей реакцию Хилла на 100% [15], фенилуретан в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ *М*/л, подавляющей фотосинтез на 85—87% [16]. Опыты проводили при pH 8. Гидроксиламин и фенилуретан в этих концентрациях не оказывают воздействия на процесс образования хлорофилла в бесклеточных растворах этиолированных листьев.

Сернокислый кадмий применяли в водном растворе в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ *М*/л. Моноиодуксусную кислоту готовили на буфере pH 8,5 и применяли в концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ *М*/л. При приливании сернокислого кадмия и моноиодуксусной кислоты к коллоидному раствору выпадает белый осадок,— вероятно, коагулировали белки.

Действие ультрафиолетового света. Коллоидный раствор этиолированной фасоли (pH 8) помещали в кварцевую трубку и облучали в присутствии воздуха полным светом ртутно-кварцевой лампы ПАРК-2, расположенной на расстоянии 50 см от трубки с раствором. Во время облучения трубку помещали в кварцевый кожух, через который пропускали ледяную воду. Для сравнения ставили контроль образования хлорофилла в этой же трубке при слабом освещении лампой накаливания (30 в, на лампе).

Из опытов можно сделать заключение, что при облучении ртутно-кварцевой лампой идет образование хлорофилла, сравнимое с образованием его при освещении лампой накаливания (рис. 7). Быстрого разру-

шения образующегося хлорофилла, при облучении ультрафиолетом, в условиях опыта не происходит.

Если коллоидный раствор с хлорофиллом, образованным в результате облучения ультрафиолетом, освещать при 110 в через красный светофильтр RG-2, то хлорофилл полностью разрушается за 5 мин.

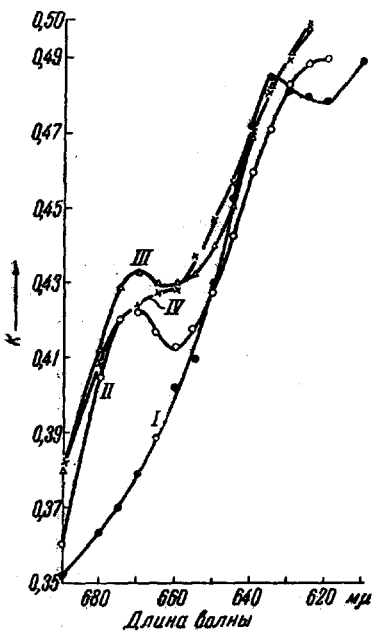


Рис. 7. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев с воздухом при облучении ультрафиолетовым светом:

I — коллоидный раствор до облучения; *II* — 30 сек. облучения; *III* — 2 мин. облучения; *IV* — 15 мин. облучения

Действие компонентов дегидразных систем

Для суждения о том, возможно ли образование хлорофилла в коллоидных растворах этиолированных листьев в темноте при добавлении доноров водорода, мы провели опыты с добавлением к 5 мл коллоидного раствора (pH 8) аскорбиновой или глютаминовой кислоты (по 7 мг).

Коллоидные растворы с добавками и контроль без добавок оставляли на ночь в холодильнике. Образования хлорофилла в темноте обнаружить не удалось. Освещение этих растворов не приводило к увеличению количества образуемого хлорофилла. Мы исследовали действие ДПН совместно с глютаминовой кислотой в аэробных и анаэробных опытах. В последнем случае вакуумная трубка с коллоидным раствором после эвакуации воздуха стояла 15 мин. и 1 час во льду в темноте. В темноте образования хлорофилла не удалось обнаружить.

Свойства протохлорофилла из оболочек семян тыквенных

В отдельных опытах нами исследовалась возможность перехода протохлорофилла из оболочек семян кабачка в хлорофилл при освещении. Со свежих семян кабачка снимали зеленую пленку протохлорофилла, растирали ее с буфером pH 8 и готовили раствор описанным выше образом. Получали зеленоватый коллоидный раствор, обладавший максимумом поглощения протохлорофилла при 645 mμ (вместо 635 mμ у этиолированной фасоли) и 480 mμ (рис. 8).

При освещении такого раствора образования хлорофилла установить не удалось. Добавление 10% пиридина сдвигало красный максимум до 630 mμ. Мы исследовали также возможность образования хлорофилла в коллоидном растворе оболочек семян кабачка в отсутствие воздуха при добавлении к 4 мл раствора 5 мг аскорбиновой кислоты. При освещении (110 в без светофильтра) спектр поглощения таких растворов не изменялся и хлорофилл не образовывался [18]. Также не удалось наблюдать образования хлорофилла при добавлении белков этиолированных листьев [17]. Интересно отметить следующие наблюдения. Семена кабачка замачивали в водопроводной воде; через сутки с части семян снимали кожуру вместе с пленкой протохлорофилла. Те и другие семена затем растили в песке на среде Кнопа при температуре 21—23° в темноте. Различия в росте обнаружить не удалось. У семян с кожурой последняя по мере прорастания сходила вместе с пленкой протохлорофилла.

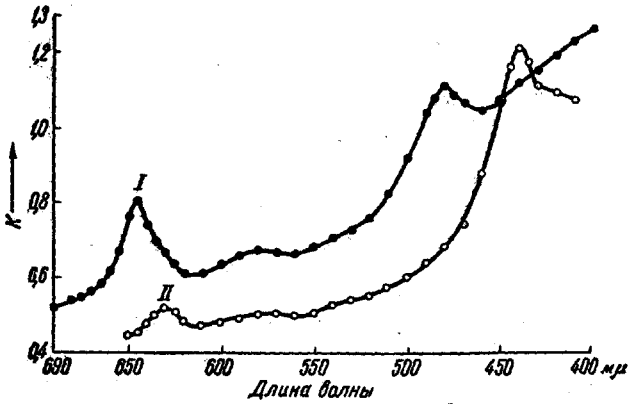


Рис. 8. Коллоидный раствор внутренних оболочек семян кабачка:

I — исходный коллоидный раствор в буфере; *II* — коллоидный раствор с 10% пиридина

Результаты работы

Известно, что часть реакций фотосинтеза, связанная с фотохимическим выделением кислорода и образованием восстановленных промежуточных продуктов, может осуществляться при добавлении окислителя в препаратах изолированных хлоропластов или коллоидных растворах вещества зеленых листьев (так называемая реакция Хилла); в нашей работе обнаружен другой вид бесклеточных фотохимических реакций, связанных с процессом фотосинтеза,— образование хлорофилла [12]. Результаты нашей работы позволили придти к следующим выводам.

1. В коллоидных растворах вещества этиолированных листьев при освещении слабым светом (30 в) происходит образование хлорофилла (с максимумом поглощения при 670 mμ). Максимум протохлорофилла при 635 mμ при этом снижается, хлорофилл образуется за счет протохлорофилла. При сильном освещении в присутствии кислорода образованный хлорофилл и оставшийся протохлорофилл быстро разрушаются. Поэтому для наблюдения реакции в аэробных условиях важно соблюдение определенной интенсивности освещения, чтобы избежать фотоокисления образующегося хлорофилла.

2. Белково-липоидное соединение хлорофилла с максимумом в 670 mμ, образующееся при освещении коллоидных растворов вещества этиолированных листьев, спектрально отличается от хлорофилла зеленого листа, главный максимум которого расположен при 678 mμ. Наши опыты показали, что в листьях растений также первично образуется белково-липоидное соединение хлорофилла с максимумом при 670 mμ [12]. По мере накопления хлорофилла максимум поглощения коллоидного раствора из зеленеющих листьев постепенно передвигается до 678 mμ. Хлорофилл, образующийся при освещении коллоидных растворов этиолированных листьев, отличается фотохимической неустойчивостью, разрушаясь полностью, тогда как коллоидные растворы вещества зеленых листьев при длительном освещении сильным светом заметно не выцветают.

3. Можно думать, что процесс превращения протохлорофилла в хлорофилл является чисто фотохимическим процессом, так как при 20° и при 0° при слабом свете образуется за 3 мин. освещения примерно одно и то же количество хлорофилла. В то же время хорошо известно, что процесс зеленения, т. е. процесс накопления хлорофилла при выставлении этиолированного растения на свет, в сильной степени зависит от температуры. При низкой температуре (до +5°) зеленение практически не идет,

что объясняется торможением темновых ферментных стадий синтеза протохлорофилла.

4. Способность образовывать хлорофилл при освещении коллоидных растворов, длительно хранящихся при 20°, сохраняется дольше, чем фотохимическая активность зеленых растворов из листьев фасоли. Следует указать на то, что зеленый раствор из листьев сахарной свеклы более устойчив при хранении.

5. Через 30 час. хранения коллоидного раствора в нем при освещении еще образуется 30% хлорофилла по сравнению с контрольным опытом, освещенным сразу после приготовления раствора. В то же время фотохимическая активность при хранении зеленого раствора при 0° за 15—20 час. теряется полностью.

6. В то время как зависимость фотохимической активности от величины pH буфера выражается кривой с максимумом при pH 6—7, образование хлорофилла в бесклеточном коллоидном растворе идет в широком пределе от pH 4,8 до pH 10, примерно на одном и том же уровне, резко падая при pH 3 и pH 11.

7. При освещении коллоидного раствора из оболочек семян кабачка, содержащего протохлорофилл, образования хлорофилла установить не удалось. Это, вероятно, объясняется особым состоянием протохлорофилла в пленке семян кабачка, отличным от состояния протохлорофилла в этиолированных проростках. Можно думать, что в пленке семян тыквенных протохлорофилл находится в запасной, неактивной агрегированной форме; сдвиг максимума поглощения пигмента в длинноволновую область подтверждает эти предположения [17].

Выводы

В коллоидных бесклеточных растворах вещества этиолированных листьев фасоли образуется при освещении из протохлорофилла белково-липоидное соединение хлорофилла с максимумом поглощения при 670 mμ. В работе изучались условия осуществления этой реакции.

В заключение приносим глубокую благодарность академику А. Н. Теренину за обсуждение результатов работы.

Поступила в редакцию
29. VI. 1953

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимирязев К. А., Сочинения, т. 2. Сельхозгиз, 1937, стр. 273, (С. г. **109**, 414, 1889).
2. Монтеверде Н. А., Любименко В. Н., Изв. АН СССР, **5**, **73**, 1911, Любименко В. Н. и Бриллиант В. А., Окраска растений, 1924 г.; Гюббенет Е. Р., Растение и хлорофилл, 1951 г.
3. Frank S., J. Gen.. Physiol. **29**, 157, 1946; Smith G. H., Arch. Biochem. **19**, 449, 1948.
4. Красновский А. А., Войновская К. К., ДАН **64**, 663, 1949.
5. Koski V. M., Smith J. H., J. Am. Chem. Soc. **70**, 3558, 1948.
6. Seybold K., Egle K., Planta **29**, 119, 1938—1939.
7. Годнев Т. Н., Калишевич С. В., Труды Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева, т. 4, вып. 2, 1945; стр. 160; Годнев Т. Н., Уч. зап. Белорусского университета (серия хим.), № 1, 15, 1939.
8. Годнев Т. Н., Терентьева В. М., Изв. АН БССР, № 6, 39, 1952.
9. Liro J., Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A **1**, 1, 1908.
10. Исаченко В. Л., Изв. СПБ. Ботан. сада **9**, 107, 1909.
11. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., ДАН **82**, 761, 1952.
12. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., ДАН **85**, 177, 1952.
13. Fishman M., Moyer L. S., J. Gen. Physiol. **25**, 755, 1942.
14. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
15. Ehrmantraut H., Rabinowich E. **38**, 67, 1952.
16. Warburg O., Biochem. Z. **100**, 230, 1919.
17. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К., ДАН, **92**, 1201, 1953.
18. Монтеверде Н. А., Любименко В. Н., Изв. Спб. Бот. Сада **9**, вып. 23, 1909

Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCV, № 3

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

О ПРИРОДЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ОБРАЗОВАНИЙ ХЛОРОФИЛЛА, ВЫПАДАЮЩИХ В СИСТЕМЕ ВОДА — ПИКОЛИН — ДИОКСАН

(Представлено академиком А. Н. Терениным 6 I 1954)

В работах нашей лаборатории было установлено, что агрегация молекул хлорофилла и его аналогов приводит к образованию состояний с разными спектрами поглощения, определяющимися, очевидно, различными типами упаковки пигмента в агрегированных структурах ([1], [2]).

Так, было показано, что бактериохлорофилл образует три типа структур ([2]) с максимумами поглощения при 890, 850 и 800 мμ (±10 мμ). Наименее устойчивыми оказались длинноволновые максимумы; нагревание до 50—60° приводило к обратимому понижению максимумов при 890 и 850 мμ; охлаждение возвращало их в первоначальное положение. Следует отметить, что бактериофеофитин дает лишь один тип структур с максимумом поглощения при 850 мμ.

Поиски различных структур агрегированных форм хлорофилла производились нами путем измерения спектров поглощения коллоидных растворов и твердых пленок хлорофилла на стекле, образующихся при испарении в вакууме растворов чистого хлорофилла (полученного путем хроматографического разделения) в разных условиях.

При этом оказалось, что растворы хлорофилла a и $a+b$ в спирте, ацетоне, эфире дают пленки с красным максимумом поглощения при 675—677 мμ, тогда как при испарении растворов в диоксане получаются пленки с максимумом при 690 мμ. Нагревание этих пленок до 60—70° ведет к перемещению максимума до 675—677 мμ (см. рис. 1).

Положение максимума поглощения хлорофилла в пленках из диоксана нельзя связать со специфическим взаимодействием растворителя с хлорофиллом, поскольку растворы хлорофилла в диоксане обладают максимумом поглощения при 664 мμ. Коллоидные растворы, полученные при разбавлении диоксановых растворов водой, также обладают максимумом поглощения при 690 мμ ([3]).

Таким образом, у хлорофилла наблюдаются наиболее вероятные типы структурной упаковки с поглощением при 675—678 и 690 мμ; следует, однако, указать и на то, что свежеприготовленные коллоидные растворы, полученные при разбавлении водой растворов хлорофилла в спирте, ацетоне или пиридине, обладают максимумом поглощения при 670 мμ. Значительное поглощение хлорофилла в гранулах при 690—700 мμ открывает возможность того, что наряду с доминирующей агрегированной структурой с максимумом при 677—678 мμ в гранулах имеется и структура, соответствующая максимуму при 690 мμ.

Весьма важно было бы иметь метод выделения из хлоропластов агрегированных белковолипоидных соединений хлорофилла в индивидуальной кристаллической форме. Недавно появилась работа Такашима ([4]) в которой сообщалось о выделении кристаллического хлорофилл-липопротеина из листьев клевера. Существенным отличием этой работы

от ранее проведенных явилось наблюдение над тем, что водный раствор α-пиколина (или пиридина) растворяет белки и пигменты пластид, и введение диоксана в этот раствор приводит к выпадению зеленых кристаллов «хлорофилл-липопротеина».

Следуя описанному методу, действительно получаются зеленые кристаллы — сферические игольчатые агрегаты, сходные с кристаллами, показанными на микрофотографии в статье ([4]). Однако, зная о малой прочности связи хлорофилла с белком и его склонности к образованию агрегированнных состояний, мы проверили, не выделяются ли подобные кристаллы из растворов чистого хлорофилла a + b, не содержащего белков, следуя описанной ([4]) процедуре.

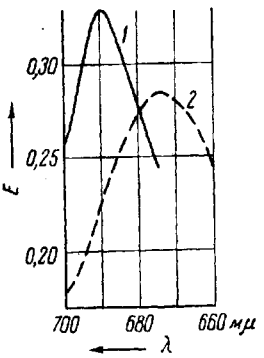


Рис. 1. Твердая пленка на стекле, полученная при испарении в вакууме раствора хлорофилла в диоксане. *1* — исходная пленка; *2* — та же пленка после нагревания до 80°

10 мг хлорофилла a + b (выделенного обычным методом из крапивы) растворяли в 10 мл α-пиколина, к раствору приливали 10 мл 0,02 *М* фосфатного буфера (pH 7) и через 30 мин. добавляли 5 мл диоксана. При стоянии выпадают зеленые кристаллы, сходные с кристаллами «хлорофилл-липопротеина», выделенного из листьев клевера. Этот опыт указывает на то, что полученные методом Такашима кристаллы в действительности могут быть образованиями хлорофилла, а не хлорофилл-липопротеина.

Мы провели сравнительное исследование кристаллов, полученных описанным методом, в присутствии белков и при отделении их от хлорофилла. Кристаллы были получены из свежих листьев клевера или фасоли следующим образом ([4]). Листья растирались на холоду с 0,02 *М* фосфатным буфером (pH 7) с кварцевым песком. Суспензию отжимали через полотно и центрифугировали 20 мин. при 2500 об/мин. После этого к суспензии добавляли равный объем α-пиколина и смесь сутки диализовали против 50% пиколина. Содержимое целлофанового мешочка центрифугировали для отделения осадка. Следует отметить, что, несмотря на наличие флуоресценции, свидетельствующей о дезагрегации хлорофилла, последний не диализуется через целлофан. Микроскопическое наблюдение показало наличие эмульсии зеленых капель, взвешенных в маточном растворе. К раствору добавляли диоксан до его содержания 20% в смеси. При стоянии смеси в холодильнике при +5° образовались кристаллы. Кристаллы эти представлены на рис. 2 (на вклейке к стр. 517); наряду с кристаллами видны неокрашенные бесформенные скопления, вероятно, белковые частицы.

Для того чтобы сравнить вид зеленых кристаллов, полученных в присутствии белков и без них, суспензия была разделена на три равные части, и после центрифугирования каждый осадок обрабатывался отдельно. Первая часть осадка растворена в 50% растворе α-пиколина в 0,01 *М* фосфатном буфере (pH 7); к раствору после центрифугирования добавлено до 20% диоксана, т. е. проведена перекристаллизация по описанному методу ([4]). Вторая часть осадка растворена в 100% α-пиколине с целью извлечения хлорофилла; после центрифугирования к раствору добавлен равный объем того же буфера и до 20% диоксана (при центрифугировании наблюдается значительно больший осадок, чем в первом случае). Третья часть осадка обрабатывалась ацетоном, при этом образовался раствор хлорофилла в ацетоне и белковый осадок, который отделялся центрифугированием. Ацетон испаряли под вакуумом и хлорофилл растворяли в 50% растворе α-пиколина в 0,01 *М* фосфатном буфере (pH 7). К раствору добавляли 20% диоксана. После суток стояния в холодильнике при +5° во всех трех порциях выпали кристал-

лы хлорофилла сходной формы (см. рис. 2), независимо от того, содержал исходный раствор белок или нет.

Дальнейшей проверкой того, что кристаллы имеют небелковую природу, были опыты по установлению постоянства состава осадков, образованных при многократной перекристаллизации. Первичный осадок, полученный вышеописанным методом, растворяли в 50% α-пиколине и осаждали диоксаном, после выпадения вторичные кристаллы растворяли и снова осаждали. Эту процедуру повторяли три раза. Порции осадков высушивали в вакууме, брали навески, извлекали хлорофилл эфиром и определяли количество хлорофилла спектрофотометрически.

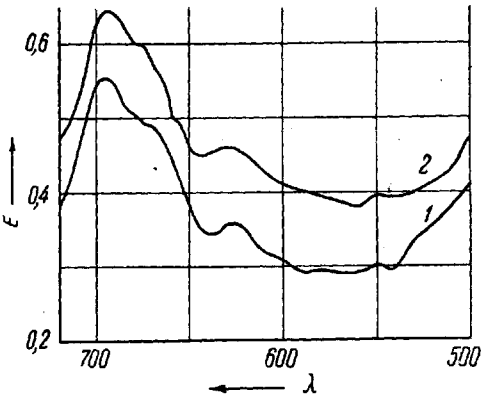


Рис. 3. Спектры поглощения кристаллов хлорофилла: *1* — из листьев клевера; *2* — из чистого хлорофила *a* + *b*

Количество хлорофилла, полученного в осадках, мы сравнивали с количеством хлорофилла в препаратах твердого хлорофилла a + b и выражали эту величину в процентах. После первой кристаллизации осадок содержал 16% хлорофилла, после второй кристаллизации количество хлорофилла возросло до 38%. После третьей кристаллизации количество хлорофилла доходило до 80%.

Осадки после первой и второй кристаллизации промывались большим количеством воды (при этом сохранялась кристаллическая форма осадков). Хлорофилл определяли в промытых и непромытых водой осадках. Оказалось, что промывка, удаляя сопутствующие белки, приводит к получению более богатых хлорофиллом осадков.

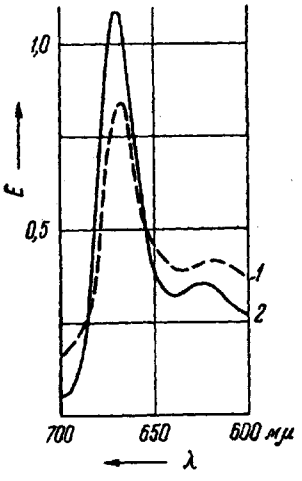


Рис. 4. Спектры поглощения растворов кристаллов хлорофилла в 50% пиридине. *1* — раствор первичных кристаллов, содержащий белок; *2* — раствор после ацетоновой обработки, не содержащий белка

Для суждения об идентичности кристаллов, полученных из хлорофилла a + b и из листьев клевера, были сделаны микрофотографии кристаллов и сняты спектры поглощения твердых кристаллов и их растворов в 50% пиколине.

Микроскопическое исследование показывает одинаковую форму кристаллов, полученных разными способами, с белками и без белков.

Измерение спектров поглощения твердых кристаллов (зажатых между двумя стеклянными пластинками) и растворов в 50% пиколине показывает подобие, независимо от содержания белка в осадке (см. рис. 3 и 4). Отчетливо видны различия агрегированных форм хлорофилла a и b. Спектры поглощения раствора кристаллов в пиколине и пиридине также подобны.

В предыдущих работах нашей лаборатории ([5]) было показано большое сродство хлорофилла и к органическим основаниям; можно было думать, что эти кристаллы принадлежат молекулярному соединению хлорофилла с α-пиколином. С целью проверки этой возможности мы промывали кристаллы водой до полного исчезновения α-пиколина в промывных водах (контролировали отсутствие α-пиколина в воде по исчезновению его максимума поглощения при

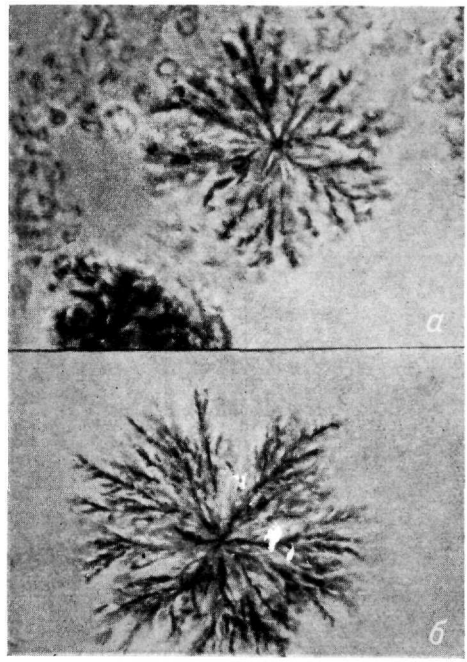


Рис. 2. Кристаллы хлорофилла, полученные из листьев клевера: *а* — перекристаллизованные после растворения в 50% α-пиколине; *б* — перекристаллизованные после ацетоновой обработки и растворения в 50% α-пиколине (без белков). ×900

262 мμ); при этом кристаллическая структура осадка сохранялась Промытые осадки растворяли в эфире и промывали эфирный раствор водой. В воде не удалось обнаружить α-пиколина. Таким образом, промытые осадки, повидимому, не содержат связанного основания.

Чрезвычайно характерным для этих осадков является положение максимума поглощения при 690 мμ и отсутствие флуоресценции. Весьма существенно, что нагревание кристаллов хлорофилла до 80° приводит к перемещению максимума до 675 мμ (рис. 4), так же как и у твердых пленок, полученных из диоксана. Наблюдавшееся нами ([1]) появление флуоресценции в хлорофилл-белковых осадках при нагревании, вероятно, связано с присутствием липоидов.

Изложенные опыты свидетельствуют о том, что выделенные по методу ([4]) зеленые кристаллы представляют собой агрегированные формы хлорофилла, не связанного с белком. Полученная кристаллическая форма с максимумом поглощения при 690 мμ, очевидно, обладает тем же типом структурной упаковки, что и коллоидные растворы и пленки хлорофилла, полученные из диоксана.

Наличие белков в осадках определяется их совместным осаждением с кристаллами хлорофилла, поэтому состав первичного осадка ([4]) близок к составу вещества пластид.

Установление молекулярной структуры различных агрегированных форм хлорофилла, его аналогов и производных является задачей дальнейших исследований.

В проведении ряда опытов принимала участие М. А. Боруздина. Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение работы.

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

Поступило
2 IX 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **63**, № 2, 163 (1948); А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **91**, № 2, 343 (1953). [2] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, № 2, 389 (1952); А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, **92**, № 6 (1953). [3] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, № 3, 340 (1953). [4] S. Takashima, Nature, **169**, 182 (1952). [5] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, № 3, 527 (1953).

Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCVI, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛОЙ ВОДЫ НА РЕАКЦИЮ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВА ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 31 III 1954)

Коллоидные бесклеточные растворы вещества зеленых листьев, полученные путем механического диспергирования ткани, сохраняют способность к осуществлению части реакции фотосинтеза — фотохимическому выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением ряда окислителей (реакция Хилла). Хлорофилл, извлеченный из листьев, теряет способность к осуществлению такого рода процессов, но, как было показано в наших работах, способен к фотохимическим реакциям, идущим «против» темновых термодинамически равновесных условий, с запасанием энергии в фотопродуктах ([1], [2]).

Работы нашей лаборатории показали, что фотохимическая стадия этих реакций определяется элементарным актом фотовосстановления (восприятия электрона) возбужденной светом молекулы хлорофилла. Можно предполагать, что дальнейшие стадии фотохимического переноса «водорода» в этих реакциях должны быть связаны с темновыми стадиями переноса протона ([3]). Известно, что в общем случае протолитические реакции идут медленнее в D_2O, чем в H_2O ([4]). Исследование фотосинтеза водорослей показало, что при световом насыщении фотосинтез весьма сильно замедляется в случае D_2O по сравнению с H_2O ([5]). Таким образом, различия в скорости фотохимического процесса, идущего в условиях светового насыщения в среде D_2O и H_2O, могут служить указанием на наличие темновой стадии переноса протона в этих реакциях.

Действие D_2O на фотохимическую активность вещества зеленых листьев. В качестве метода определения фотохимической активности нами была использована реакция фотохимического восстановления фенол-индофенола ([6]), окисленная форма которого окрашена в красный цвет при pH 6,5, а восстановленная форма не поглощает света в видимой области спектра. Буферные растворы pH 6,5, $^1/_{30}$ M, на которых готовили растворы фенол-индофенола и растирали листья, получали путем растворения Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 в D_2O и H_2O. «Зеленые растворы» получали растиранием 100 мг листьев огурцов, консервированных в жидком азоте, с 2,5 мл фосфатного буфера pH 6,5. Гомогенат фильтровали через полотно и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин. Полученный «раствор» доводили буфером до коэффициента погашения $K = 0{,}7$, при 550 мμ. 0,5 мл этого «раствора» смешивали с 0,5 мл раствора фенол-индофенола в том же буфере с $K = 0{,}7$ при 550 мμ. Путем вариаций соотношения объема растворов фенол-индофенола и «зеленого раствора», приготовленных на D_2O и на H_2O, получали нужные концентрации D_2O в рабочей смеси. Измерения производили на фотоэлектрическом спектрофотометре с диафрагмированием щели по высоте раствора в кюветах с толщиной слоя 1 см. Раствор освещали в фокусе конденсора киноламповой 500 вт через красный

светофильтр РГ-2 (около 10^6 эрг/сек · см^2) в условиях заведомого светового насыщения. Кювета при освещении помещалась в термостатирующее устройство. Опыты проводились при 20 и 30° (±0,1°). Снижение K при освещении было пропорционально количеству убывающего фенол-индофенола, что характеризовало величину фотохимической активности испытуемого раствора. На рис. 1 приведены результаты опытов. По оси ординат отложено K при 550 мμ в процентах от исходной величины; полному восстановлению фенол-индофенола соответствует падение K до 50%.

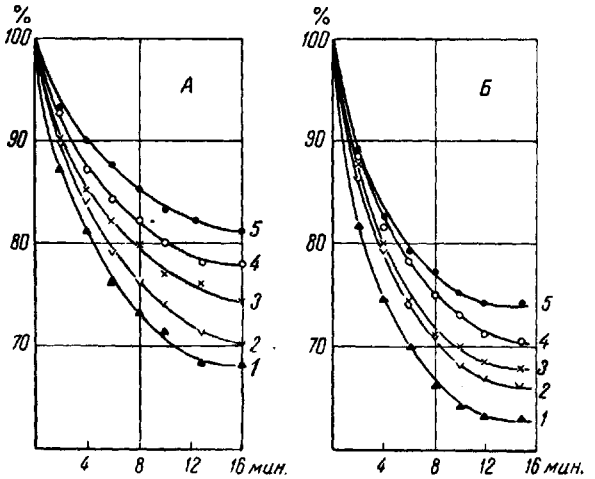


Рис. 1. Фотохимическая активность вещества зеленых листьев в системе H_2O — D_2O. *А* — при 20°, *Б* — при 30°. D_2O: *1* — 0%; *2* — 25%; *3* — 50%; *4* — 75%; *5* — около 100%

Попытки подсчета константы скорости реакций, исходя из моно- и бимолекулярной зависимости, не привели к получению постоянного значения константы. В работах нашей лаборатории было показано, что освещение интенсивным красным светом ведет к потере фотохимической активности более быстро при 30°, чем при 20° ([7]). Наложение процесса фотоинактивации на процесс восстановления фенол-индофенола может объяснить непостоянство эффективного порядка реакции.

Рассмотрение кривых рис. 1 показывает, что D_2O замедляет реакцию восстановления фенол-индофенола при 20 и 30°. В условиях, близких к равновесию (через 16 мин.), при 20° в D_2O реагирует 38% фенол-индофенола от начального количества, а в случае H_2O 64%; при 30° в D_2O 54%, в H_2O 74%. Для того чтобы приближенно охарактеризовать скорость процесса, мы подсчитали ее среднюю величину за первые 2 мин. реакции. При 20° скорость реакции в D_2O в 2 раза меньше, чем в H_2O; при 30° в 1,3 раза меньше. Величина температурного коэффициента для D_2O равна 2,1, а для H_2O равна 1,3, что указывает на бо́льшую энергию активации, ограничивающей процесс реакции в случае D_2O. Уменьшение скорости реакции прямо пропорционально концентрации D_2O в смеси, что видно из рис. 2. Результаты опытов указывают на наличие темновой стадии переноса водорода в этом процессе; перенос дейтерия, требующий большей энергии активации, происходит медленнее. Эти выводы находятся в соответствии с работами нашей лаборатории, показавшими наличие световой стадии образования активных восстановленных соединений в «зеленых растворах» и темновой стадии восстановления окислителя (фенол-индофенола) этими активными соединениями.

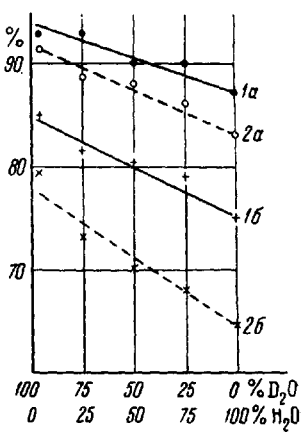


Рис. 2. Зависимость средней скорости реакции фотохимического восстановления фенол-индофенола от концентрации D_2O. *1* — опыты при 20°, *2* — при 30°; *а* — 2 мин., *б* — 10 мин.

Действие D_2O и H_2O на реакцию фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой. В вакуумную трубку специальной формы, позволяющей вести измерения на фотоэлектрическом спектрофотометре, вводили 5 мг аскорбиновой кислоты, 5 мл раствора хлорофилла а (выделенного хроматографическим методом из листьев крапивы) в сухом пиридине с $K = 0{,}8$ при 670 мμ и 0,5 мл H_2O или D_2O. При введении избытка D_2O (по сравнению с аскорбиновой кислотой) происходит обмен лабильных атомов водорода этого соединения на дейтерий; равновесие сдвинуто в сторону дейтероаскорбиновой кислоты. После удаления воздуха методом, принятым в наших работах ([1], [2]), трубку попеременно вставляли в спектрофотометр и в осветительное устройство, которое состояло из 500-ваттной киноламлы, конденсора, светофильтра РГ-2 и термостатирующего приспособления, соединенного с ультратермостатом; опыты вели при 10^5 эрг/см · сек^2.

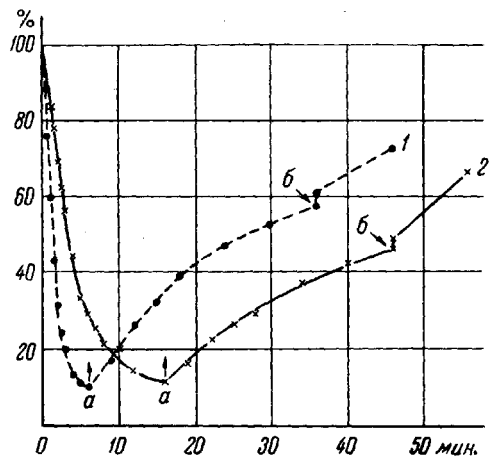


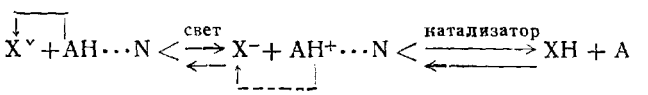
Рис. 3. Реакция фотовосстановления хлорофилла а аскорбиновой кислотой в пиридине с добавлением: *1* — 10% H_2O, *2* — 10% D_2O. *а* — конец освещения, *б* — пуск воздуха

После освещения следили за ходом обратной реакции в темноте, измеряя K при 670 мμ (см. рис. 3). Опыты показывают, что присутствие D_2O весьма сильно влияет на скорость фотохимического процесса. Известный экспериментальный материал по фотохимии окислительно-восстановительных реакций указывает на то, что перенос электрона является чисто фотохимическим процессом; темновой стадией процесса является перенос протона (дейтерона) ([3]), требующий энергии активации. Вероятно, что перенос протона катализируется органическими основаниями, в среде которых наиболее глубоко идет реакция фотовосстановления. Каталитическое действие основания определяется скоростью восприятия и отдачи протона восстановленной форме пигмента; вероятность этих процессов связана с величиной сродства к протону основания (среды, катализатора) и партнеров реакции. В более слабых основаниях, например в этиловом спирте, количество образуемой «устойчивой» фотовосстановленной формы пигмента невелико ([1]) вследствие быстрой обратимости первичного фотоакта переноса электрона. Следует полагать, таким образом, что присоединение протона, катализируемое основаниями, к «электронной» форме стабилизирует фотопродукт, приводя к торможению обратной темновой реакции, требующей некоторой энергии активации, тогда как обратимый «возврат» электрона в темноте является весьма быстрым процессом. В недавних работах нашей лаборатории ([9]) исследовалась реакция фотовосстановления хлорофилла и его аналогов при помощи потенциометрического метода и при низкой температуре. В этих работах прямыми опытами показано наличие быстрого фотопроцесса и более медленной темновой стадии, приводящей в случае хлорофилла и феофитина к образованию «красной» восстановленной формы, являющейся, вероятно, «протонной» формой продукта фотовосстановления.

В свете изложенных фактов можно, таким образом, изобразить схемы элементарных процессов исследованных реакций, на которых разделены процессы переноса электрона (сплошная линия) и протона (пунктир). Обозначения: $X^{\vee}$ — молекула хлорофилла в возбужденном, бирадикаль-

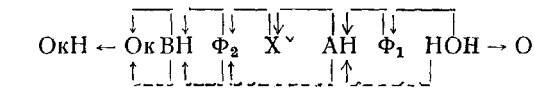
ном по А. Н. Теренину состоянии; АН и ВН — промежуточные окислительно-восстановительные системы; $Ф_1$ и $Ф_2$ — ферментативные системы, участвующие в переносе электронов и протонов; Ок — конечный окислитель, акцептор электрона и протона (водорода), в нашем случае фенол-индофенол.

1. Реакция фотовосстановления хлорофилла:



(с возможной дисмутацией образованных радикалов ХН и А).

2. Реакция фотохимической активности вещества листьев:



В случае фотосинтеза происходит перенос электронов и протонов от воды в систему ступенчатых реакций восстановления углекислоты.

На схеме показана возможность раздельного пути электронов и протонов на отдельных стадиях процесса. До сих пор не установлено с полной определенностью, участвует ли молекула воды в первичном фотопроцессе или окисление воды является следствием ферментативных реакций, в которых участвуют активные фотопродукты ([10]); на схеме показана последняя возможность.

Описанные в работе опыты указывают на то, что существенными чертами элементарных процессов исследованных реакций является сопряжение фотохимического переноса электрона, идущего с участием хлорофилла с темновыми (каталитическими) стадиями переноса протона.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
5 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **64**, 663 (1949); **81**, 879 (1951); А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953). [2] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952). [3] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947; Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 369 (1947). [4] А. Н. Бродский, Химия изотопов, Изд. АН СССР, 1952. [5] J. Curry, S. F. Trelease, Science, **82**, 18 (1935); F. N. Craig, S. F. Trelease, Am. J. Bot., **24**, 332 (1937); R. Pratt, S. F. Trelease, ibid., **25**, 133 (1938). [6] A. S. Holt, C. S. French, Arch. Biochem., **19**, 268 (1948). [7] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **91**, 343 (1953). [8] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **82**, 761 (1952). [9] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953); **95**, № 4 (1954). [10] А. А. Красновский, Усп. биол. хим., **1**, 473 (1950).

Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCVI, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОРФИРИНА ДО ХЛОРИНА И БАКТЕРИОХЛОРИНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 20 III 1954)

Реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла, открытая в нашей лаборатории ([1]), в последующих работах была распространена на весь ряд аналогов и производных хлорофилла — протохлорофилл, бактериохлорофилл, феофитины, фталоцианин магния. В результате этой реакции образуются активные неустойчивые промежуточные соединения, обладающие поглощением в более короткой области спектра, чем исходные пигменты. В темноте, в результате обратимого окисления фотопродуктов, происходит более или менее полная регенерация исходной молекулы пигмента в зависимости от условий проведения реакции.

В данной работе описаны результаты исследования фотовосстановления гематопорфирина, являющегося типичным представителем группы порфиринов, не содержащих координационно связанного центрального атома металла.

В проведенных ранее работах нашей лаборатории было показано чрезвычайное влияние величины сродства среды к протону на стабильность фотопродуктов ([2]), в соответствии с этим реакция исследовалась в средах, обладающих различной основностью: ледяной уксусной кислоте, спирте, пиридине и пиперидине. В качестве восстановителя мы использовали, главным образом, аскорбиновую кислоту в соответствии с нашими исходными работами ([1, 2]). 5 мл раствора гематопорфирина с величиной коэффициента погашения $K = 0{,}5$ во «втором» максимуме 495—500 мμ вводили в вакуумную трубку Тунберга, применяемую в наших работах для измерения на фотоэлектрическом спектрофотометре в анаэробных условиях. К раствору добавляли от 1 до 50 мг аскорбиновой кислоты, удаляли воздух, взбалтывая раствор при кипении растворителя под вакуумом масляного насоса в течение 3 мин., и освещали раствор в трубке в термостатических условиях (обычно 20°) в фокусе конденсора кинолампы 500 вт (обычно около 10^6 эрг/см^2 · сек). Спектрофотометрические измерения производили перед освещением, в течение освещения, после выдержки в темноте без воздуха и после пуска воздуха в трубку. Уже первые опыты показали, что конечные продукты фотовосстановления гематопорфирина отличаются от продуктов восстановления хлорофилла и его аналогов; после освещения наблюдалось появление новых характерных максимумов поглощения при 650—740 мμ, свидетельствующих о восстановлении молекулы порфирина с образованием хлорина и бактериохлорина *. Структура спектров поглощения этих соединений столь характерна ([3]), что для суждения об их образовании достаточными являются спектральные измерения. Появление интенсивных полос хлорина и бактериохлорина при малом падении максимумов порфирина

* Следует указать на то, что недавно ([9]) опубликованы наблюдения глубоко идущего восстановления порфирина с частичным образованием бактериохлорина в атмосфере водорода при действии ультразвука.

объясняется гораздо более высокой величиной молекулярного коэффициента погашения восстановленных соединений, что хорошо известно [3]. Более детальное исследование показало следующее:

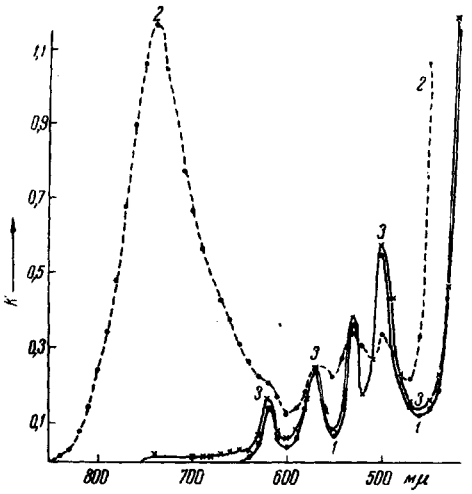


Рис. 1. Фотовосстановление гематопорфирина аскорбиновой кислотой в спирте с 10% пиридина. *1* — исходный спектр поглощения; *2* — после 3 мин. освещения; *3* — через 2 часа после пуска воздуха

1. Реакция идет быстрее всего в полном свете лампы накаливания. Исключение короткой области спектра, от 500 мμ, или выделение зеленой области 500—560 мμ приводит лишь к замедлению реакции.

2. В качестве восстановителя наиболее пригодна аскорбиновая кислота. В присутствии цистеина реакция идет медленно. Увеличение количества восстановителя ускоряет реакцию. Без восстановителя реакция не идет вообще.

3. Природа среды влияет на направление и скорость процесса. В спирте наблюдается преимущественное образование структуры бактериохлорина с максимумом при 745 мμ, т. е. восстановление двух двойных связей; в пиридине образуется новая полоса с максимумом при 650—655 мμ, свидетельствующая о преимущественном восстановлении одной двойной связи, т. е. об образовании структуры хлорина. Введение уже 1% пиридина в спирт приводит к ускорению реакции восстановления двух двойных связей; при 30—50% пиридина в спирте у продуктов восстановления наблюдаются два максимума при 660 и 740 мμ. В водной среде реакцию наблюдать не удается, но при добавлении к воде 10% пиридина происходит фотохимическое образование хлорина и бактериохлорина (см. рис. 1, 2 и 3).

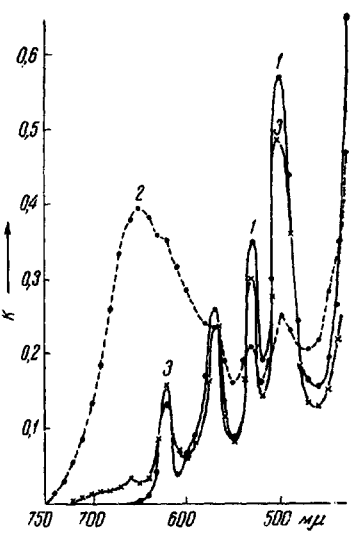


Рис. 2. Фотовосстановление гематопорфирина аскорбиновой кислотой в пиридине. *1* — исходный спектр поглощения; *2* — после 7 мин. освещения; *3* — через 1 час 10 мин. после пуска воздуха

4. Проведение реакции в среде весьма сильного основания—пиперидина—приводит к получению хлорина с максимумом поглощения при 650 мμ; в ледяной уксусной кислоте реакция образования конечных восстановленных продуктов идет весьма медленно.

5. Исследованные реакции обратимы в темноте. Следовало ожидать, что по мере образования хлорин и бактериохлорин будут претерпевать обратимое фотовосстановление с образованием лабильных продуктов, исследованных в предыдущих работах нашей лаборатории. Это явление наблюдается наиболее отчетливо в воде и спирте, содержащих 10% пиридина. В процессе освещения быстро растет максимум поглощения при 740 мμ, указывающий на образование бактериохлорина; при выключении света, в темноте, без доступа воздуха продолжается дальнейший рост этого максимума, свидетельствующий об обратной реакции частично образованных лабильных продуктов фотовосстановления бактериохлорина [4].

В анаэробных условиях образованный бактериохлорин устойчив, но при пуске воздуха происходит его обратимое окисление с возвратом к исходному спектру поглощения порфирина; эта реакция идет медленно и заканчивается обычно полностью за 2 часа (при 20°). Ход этих превращений виден на рис. 4. Возникает вопрос, можно ли окислить образованные продукты более слабыми окислителями, чем кислород. Мы проверяли эту возможность при помощи ряда соединений, испытанных нами для окисления фотовосстановленной формы хлорофилла; методика этих опытов описана нами ранее ([5]). Однако ни сафранин *T* ($E_0' = -0{,}22$ в), ни дихлорфенолиндофенол * ($E_0 = +0{,}3$в) не приводят к окислению конечных продуктов восстановления, что указывает на их относительную устойчивость.

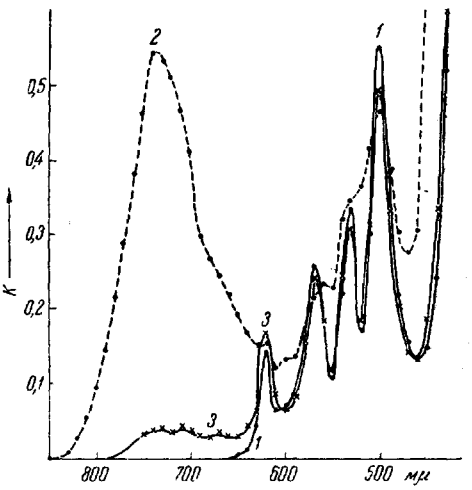


Рис. 3. Фотовосстановление гематопорфирина аскорбиновой кислотой в воде с 10% пиридина. *1* — исходный спектр поглощения; *2* — после 2 мин. освещения; *3* — через 1 час 20 мин. после пуска воздуха

6. Обратимость восстановления гематопорфирина указывает на его возможное фотосенсибилизирующее действие при реакциях переноса водорода ([6]). Наряду с образованием конечных устойчивых продуктов фотовосстановления следует ожидать, так же как и в случае хлорофилла, образования активных восстановленных продуктов, определяющих течение сенсибилизированных реакций; индикатором образования таких соединений является изменение окислительно-восстановительного потенциала системы при освещении ([5, 7]). Измерения фотопотенциала системы гематопорфирин — аскорбиновая кислота, проведенные в нашей лаборатории В. Б. Евстигнеевым и В. А. Гавриловой, показали, что величина потенциала лежит в пределах, обычно наблюдаемых у хлорофилла и его аналогов ([7]). Мы показали, что гематопорфирин сенсибилизирует восстановление рибофлавина до лейкосоединения в присутствии аскорбиновой кислоты. Опыты ставились следующим образом. В вакуумную трубку вводили 4,5 мл раствора гематопорфирина в этиловом спирте с $K = 0{,}5$ при 500 мμ, 0,5 мл раствора рибофлавина в пиридине с $K = 1{,}5$ при 440 мμ и 20 мг аскорбиновой кислоты; удаляли воздух при кипении раствора под вакуумом и освещали через желтый светофильтр с границей пропускания при 510 мμ в течение 1—2 мин. В этих опытах трудно следить за восстановлением рибофлавина путем спектрофотометрических измерений ([6]) из-за наложения спектров поглощения реагирующих компонентов в области 400—500 мμ. Поэтому за восстановлением рибофлавина удобнее следить, наблюдая его флуоресценцию. В растворе

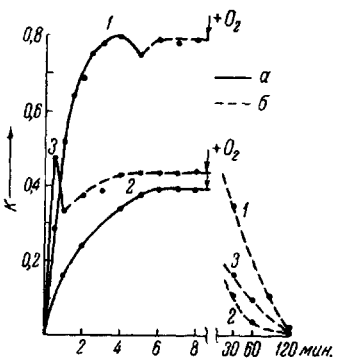


Рис. 4. Кинетика фотовосстановления гематопорфирина. *1* — спирт + 10% пиридина (*K* при 740 мμ); *2* — пиридин (*K* при 650 мμ); *3* — вода + 10% пиридина (*K* при 740 мμ), *а* — освещение; *б* — темнота; + O_2 — пуск воздуха

* В этом случае окислителем должен быть продукт взаимодействия дихлорфенолиндофенола с аскорбиновой кислотой.

гематопорфирин обладает полосой флуоресценции в красной области спектра, а рибофлавин — в зеленой. Наблюдая через зеленый светофильтр за флуоресценцией раствора при возбуждении линиями ртути при 365 мμ, можно судить о превращениях рибофлавина. После освещения раствора через желтый фильтр зеленая флуоресценция пропадала и снова появлялась после пуска воздуха в трубку. В контрольном опыте без гематопорфирина изменения рибофлавина не наблюдалось. Эти опыты показывают сенсибилизированное порфирином восстановление рибофлавина. Возможно, что подобные реакции лежат в основе фотодинамического действия порфиринов в живых организмах.

Полученный материал позволяет высказать следующие соображения о механизме реакции. В результате поглощения кванта света молекула порфирина переходит, в соответствии с представлениями А. Н. Теренина ([8]), в бирадикальное состояние. В случае хлорофилла и его аналогов «раскрытие» двойной связи происходит, вероятно, в системе сопряженных связей, тогда как у порфирина велика вероятность раскрытия «полуизолированных» двойных связей; в первичном процессе происходит восприятие электрона, вторичным является перенос протонов, катализируемых молекулами среды — основания. Вероятность «раскрытия» связи в том или ином месте молекулы пигмента также связана с взаимодействием пигмента и молекул среды, определяющим, таким образом, течение первичного фотоакта и последующих темновых стадий ([2]). Исследованные реакции типичны для этого класса соединений; поведение порфиринов, выделенных нами из культуры фотосинтезирующих бактерий и полученных нами из протохлорофилла, оказалось подобным гематопорфирину.

В заключение следует указать на то, что исследованная в нашей работе реакция фотовосстановления порфирина до хлорина и бактериохлорина позволяет подойти к пониманию биохимической природы и воспроизведению вне организма конечных световых стадий биосинтеза хлорофилла и бактериохлорофилла.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
6 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953). [3] Е. Рабинович, Фотосинтез, **2**, 1952. [4] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). [5] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950). [6] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952). [7] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **91**, 899 (1953); **92**, 381 (1953). [8] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947. [9] И. Е. Эльпинер, Л. А. Блюменфельд, С. Е. Красовицкая, ДАН, **79**, 495 (1951).

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОРФИРИНА ИЗ КУЛЬТУРЫ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

К. К. ВОЙНОВСКАЯ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии Академии наук СССР, Москва

Исследуя фотохимические и спектральные свойства пигментов фотосинтезирующих бактерий [1; 2], мы обратили внимание на яркую красную флюоресценцию бактериальной культуры при возбуждении ультрафиолетовым светом ртутно-кварцевой лампы со светофильтром, пропускающим лишь группу линий ртути при 365 mμ. Наблюдение этой флюоресценции через спектроскоп показало резкую полосу около 620mμ. Наши исследования проводились с культурой пурпурных бактерий Rhodopseudomonas из буровых вод [3], выращенной в анаэробных условиях в люминостате (при 30° и освещении 500 люкс), на жидкой среде, содержащей неорганические соли и яблочную кислоту [2]. После центрифугирования бактерий при 6000 g флюоресценция сохранялась как в культуральной жидкости, так и в бактериальном осадке; таким образом, флюоресцирующий пигмент может частично переходить в раствор. Растворимость пигмента в водной среде в сочетании с характерной красной флуоресценцией привела нас к предположению, что этот пигмент является порфирином, обладающим карбоксильными группами. Это предположение подтвердилось в процессе дальнейшего исследования.

Эти наблюдения, сделанные нами около трех лет назад, согласуются с недавним сообщением Лассельс [4], в котором описано образование порфирина в клетках Rhodopseudomonas spheroides в случае их выращивания на среде, содержащей глицин, α-кетоглютаровую и фумаровую кислоты; удаление этих соединений затрудняло синтез порфирина в клетках. Культура, с которой мы работали, образует порфирин на среде с яблочной кислотой.

В настоящем сообщении описаны метод выделения, спектральные и фотохимические свойства порфирина, выделенного из нашей культуры бактерий.

Выделение порфирина из бактерий и его спектральные свойства

Для отделения бактерий от культуральной жидкости мы применили тот же метод фильтрования их через слой талька, что и при извлечении бактериохлорофилла [2].

Центрифугирование не давало достаточно полного отделения бактерий от культуральной жидкости и приводило к частичной потере флюоресцирующего пигмента. Для выделения мы использовали свойство порфирина адсорбироваться на тальке вместе с суспензией бактерий из водной среды. Таким образом, вместе с флюоресцирующим пигментом на тальке адсорбировалась вся масса бактериальных пигментов, удаление которых составляло задачу всех последующих операций. Тальк, через который фильтровались бактерии, распределялся ровным слоем поверх двойного бумажного фильтра на воронке Бюхнера. Фильтрование проводилось просасыванием суспензии бактерий через слой талька. Перед промыванием тальк с адсорбированными на нем бактериями переносился в стеклянный фильтр № 2 и плотно в нем утрамбовывался. Многократное промывание талька этиловым эфиром приводило к полному удалению каротиноидов. Удаление каротиноидов считалось полным, когда эфир, прошедший через тальк, становился бесцветным. Эфирный раствор каротиноидов был окрашен в желтовато-оранжевый цвет и не обладал флюоресценцией.

После отделения каротиноидов тальк многократно промывался безводным метиловым спиртом. Первые порции фильтрата обладали слабой флюоресценцией и содержали бактериохлорофилл. В спектре поглощения этих фракций наблюдался характерный для бактериохлорофилла максимум при 770 mμ.

При последующем промывании можно было получить фракции раствора пигмента, обладавшие яркой красной флюоресценцией и почти не содержащие примеси бактериохлорофилла.

Фракции метанолового раствора, обладающие флюоресценцией, очищались от примесей бактериохлорофилла хроматографией на Al_2O_3 (по Брокману). При пропускании раствора пигментов в метиловом спирте через колонку с Al_2O_3 на ней появлялась одна красная ярко флуоресцирующая зона. Бактериохлорофилл и другие примеси проходили через колонку, не адсорбируясь. Раствор, прошедший через колонку, был окрашен в зеленовато-синий цвет и не обладал флюоресценцией. Верхнюю красную, флюоресцирующую зону мы элюировали смесью ледяной уксусной и концентрированной соляной кислот (в отношении 98 : 2) [5]. Ярко флюоресцирующий раствор пигмента нейтрализовали аммиаком до pH 3,5—4 (pH раствора контролировался индикаторами: тропеолином 00 и метилоранжем). Из нейтрализованного раствора разбавлением водой в делительной воронке пигмент переводился в этиловый эфир. Эфирный раствор сушился над Na_2SO_4, и эфир удалялся испарением в фарфоровой чашечке. Остаток после удаления эфира растворялся в этиловом спирте, и полученный раствор использовался для дальнейших исследований.

Флюоресцирующий пигмент обладал в спирте четырьмя максимумами поглощения в видимой части спектра и пятым, характерным для порфиринов, максимумом при 395 mμ (полоса Соре).

Для сравнения нами был снят спектр поглощения кристаллического гематопорфирина в метаноле; при этом было обнаружено полное соответствие максимумов поглощения бактериального порфирина и гематопорфирина, лежащих при 620, 570, 530, 495 и 395 mμ. Известно, что для идентификации порфирина недостаточно соответствия спектров поглощения — необходим ряд других анализов. Однако полный анализ порфирина бактерий не входил в задачу этой работы, являющейся результатом попутных наблюдений; наше внимание привлекают преимущественно фотосинтетически активные пигменты бактерий [1].

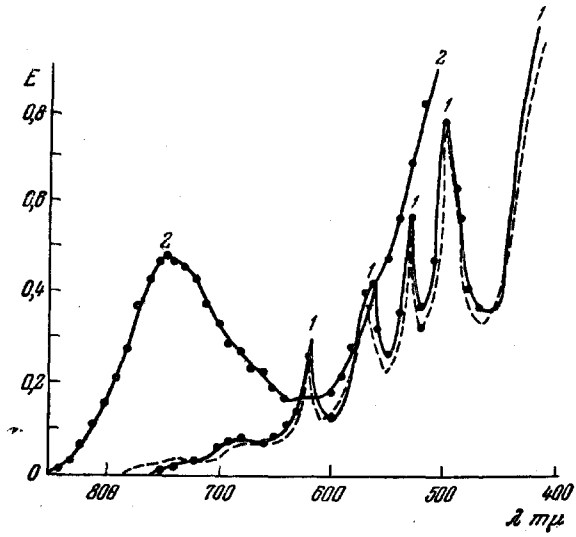
Фотохимическое восстановление порфирина пурпурных бактерий

Нами недавно была показана способность порфиринов подвергаться обратимым фотохимическим окислительно-восстановительным превращениям [6]. Продуктами конечного фотовосстановления гематопорфирина являются соединения типа хлорина и бактериохлорина, в зависимости от природы среды, где проводилась реакция. Мы предприняли изучение фотохимических окислительно-восстановительных свойств выделенного нами порфирина, исходя из предположения о возможной роли его, как прямого предшественника бактериохлорофилла в бактериальной клетке.

Опыты фотовосстановления порфирина проводились в спирте и в спирте с добавкой 10% пиридина, согласно описанной нами методике [6]. Порфирин переводился в соответствующий растворитель из эфира после удаления его испарением в фарфоровой чашке. Фотовосстановление порфирина проводилось в вакуумной трубке, специально приспособленной для ее помещения в кюветодержатель фотоэлектрического спектрофотометра. Для опыта в вакуумную трубку вводилось 4—5 мл раствора порфирина в соответствующем растворителе и 20 мг аскорбиновой кислоты, которая служила восстановителем. После эвакуации раствора в вакууме масляного насоса в течение 3 мин. снимался спектр поглощения исходного порфирина. Затем трубка с раствором помещалась в особую осветительную установку с термостатирующим устройством и раствор освещался в фокусе конденсора киноламой в 500 W без светофильтра. О ходе фотовосстановления порфирина мы судили по появлению максимума поглощения в области 730—750 mμ. Для опыта в спирте с добавкой 10% пиридина достаточно было 1 мин. освещения для получения явного эффекта ($E_{740} = 0{,}690$). В чистом спирте для получения вдвое меньшего эффекта необходимо было освещать раствор в течение 15 мин.

После освещения раствора снимался полный спектр промежуточного продукта реакции, и в трубку пускали воздух. По истечении 1 часа обратная реакция практически заканчивалась. На рисунке представлены спектры поглощения, иллюстрирующие фотовосстановление бактериального порфирина в спирте с добавкой 10% пиридина.

Таким образом, порфирин, выделенный нами из культуры пурпурных бактерий, способен испытывать обратимые окислительно-восстановительные превращения с образованием в процессе реакции продуктов, спектрально соответствующих бактериохлорину [7]. Однако это соединение по своему спектру поглощения не соответствует бактериофеофитину, обладающему максимумом поглощения в том же растворителе при 755 mμ.



Фотовосстановление бактериального порфирина аскорбиновой кислотой в спирте с 10% пиридина

1—исходный раствор порфирина, *2*—продукт фотовосстановления после 1 мин. освещения; пунктирная линия — спектр поглощения порфирина после 1-часовой обратной регенерации в темноте в присутствии воздуха

О биологической роли порфирина в бактериях можно высказать следующие соображения. Вероятно порфирин является промежуточным соединением на пути синтеза бактериохлорофилла и цитохромов; в недавних работах было обнаружено высокое содержание цитохромов в фотосинтезирующих бактериях [8].

Следует указать и на то, что наши поиски в бактериальной культуре предшественника бактериохлорофилла со структурой хлорина не увенчались успехом. Исследование фотохимических свойств бактериального порфирина указывает на то, что вряд ли этот порфирин является непосредственным предшественником бактериохлорофилла. Фотовосстановление этого порфирина не дает соединения, спектрально идентичного бактериофеофитину [2]. Более вероятно, что выделенный нами порфирин — более ранний предшественник на пути синтеза бактериохлорофилла и цитохромов.

Возможно, что порфирин, вырабатываемый бактериальной клеткой, может играть роль «фотоантибиотика» за счет известного фотодинамического действия этой группы соединений.

Поступила в редакцию
26.VI.1954

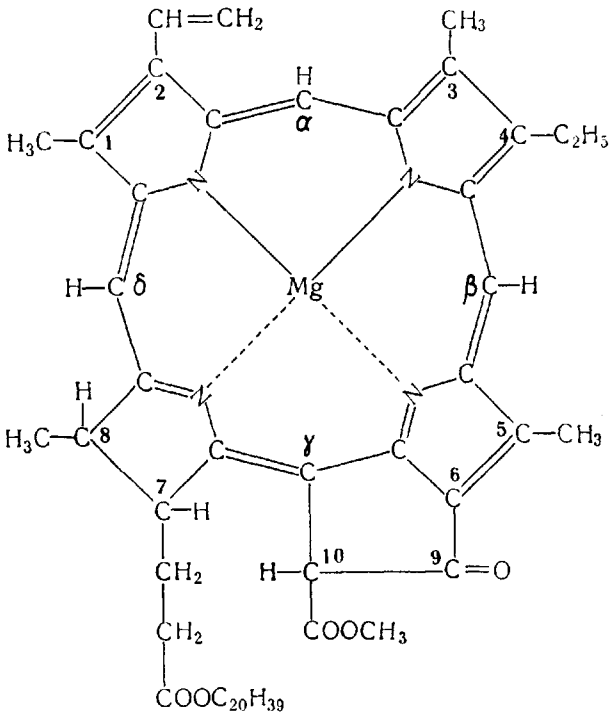
ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. и Войновская К. К., ДАН **81**, 879, 1951; **87**, 109, 1952; Красновский А. А., Войновская К. К. и Кособуцкая Л. М., ДАН **85**, 389, 1952.
2. Войновская К. К. и Красновский А. А., Биохимия **18**, 626, 1953.
3. Исаченко Б. Л., Избранные труды, т. II, Изд. АН СССР, 1951, стр. 213.
4. Lascelles J., Biochem. J. **55**, 4, 1953.
5. Granick S., J. Biol. Chem. **202**, 793, 1953.
6. Красновский А. А. и Войновская К. К., ДАН, **96**, 1209, 1954.
7. Рабинович Е., Фотосинтез, т. II, ИЛ, 1953.
8. Vernon L. P., Arch. Biochem. Biophys. **43**, 492, 1953; Vernon, L. P., Kanien, M. Arch. Biochem. Biophys. **44**, 298, 1953.

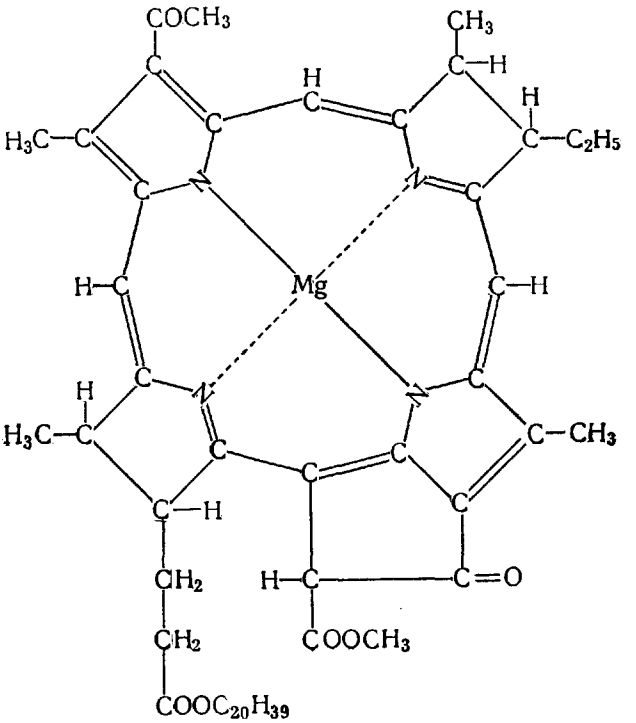
А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ХЛОРОФИЛЛОМ, ЕГО АНАЛОГАМИ И ПРОИЗВОДНЫМИ

Свет, поглощаемый хлорофиллом в листьях растений, используется для фотосинтеза органических веществ из простых неорганических соединений; это положение, установленное в работах К. А. Тимирязева, определяет роль хлорофилла как оптического и химического сенсибилизатора процесса. У фотосинтезирующих бактерий ту же роль, что и хлорофилл зеленых растений, выполняет бактериохлорофилл — пигмент, обладающий главным максимумом поглощения в близкой инфракрасной области спектра.



Хлорофилл а



Бактериохлорофилл

Суммарный процесс фотосинтеза углеводов: $H_2O+CO_2 \rightarrow \frac{1}{6} C_6H_{12}O_6+O_2$ сопровождается увеличением свободной энергии (120 ккал на 1 моль CO_2), что соответствует минимальной затрате 3 квантов красного света на покрытие энергетического дефицита этой реакции (при $\lambda = 680$ мμ $Nh\nu \approx 40$ ккал). Таким образом, энергия квантов света, поглощенных пигментами, преобразуется в потенциальную химическую энергию разнообразных конечных продуктов фотосинтеза — углеводов, белков и т. д.

Следует указать, что в фотохимии конденсированных сред известно немного случаев, при которых энергия квантов света запасается в устойчивых продуктах реакции; в большей части известных фотохимических процессов энергия квантов света используется для преодоления энергетических барьеров при термодинамически самопроизвольном (в темноте) суммарном процессе.

Поглощение кванта света органической молекулой в определенных условиях ведет к элементарному фотохимическому процессу, при котором образуются чрезвычайно реакционноспособные свободные радикалы, несущие часть энергии кванта света; при элементарном фотопроцессе, таким образом, возможно достаточно полное преобразование квантов света в потенциальную химическую энергию продуктов реакции.

А. Н. Теренин [1] обосновал ныне общепринятое представление о переходе органических молекул в результате поглощения кванта света в длительно живущее бирадикальное или «двухвалентное состояние», обладающее высокой химической активностью, что определяет исключительное значение этого состояния для проявления фотохимических свойств молекул. Высокая реакционная способность образованных радикалов

ведет к быстрому темновому процессу их взаимодействия с другими молекулами и друг с другом. Это приводит к конечному образованию устойчивых продуктов и конечной деградации энергии квантов света в форме тепла.

Важной особенностью процесса фотосинтеза является то, что образованные при действии квантов первичные фотопродукты перерабатываются каталитическими ферментными системами с образованием устойчивых, богатых энергией соединений [2].

Процесс фотосинтеза состоит из чередующихся фотохимических и ферментных процессов, текущих в сложно организованной биологической системе: фотостадия процесса управляется пигментной системой растения и прежде всего хлорофиллом.

Один из путей выяснения природы участия хлорофилла в реакциях фотосинтеза состоит в изучении кинетики и механизма простых (по сравнению со всем процессом фотосинтеза) сенсибилизированных реакций, в которых участвует хлорофилл. С этой точки зрения для нас наиболее интересны сенсибилизированные хлорофиллом окислительно-восстановительные реакции, сопровождающиеся переносом «водорода» — электрона и протона, т. е. реакции, сходные с элементарными процессами фотосинтеза, при которых по существу происходит перенос водорода воды к углекислоте под действием света, поглощенного хлорофиллом.

Для решения указанной задачи следовало осуществить и изучить сенсибилизированную хлорофиллом реакцию, идущую «против» условий равновесия в темноте. Применение компонентов, обладающих определенной величиной окислительно-восстановительного потенциала, дает в этом случае возможность оценить степень отклонения от состояния темнового равновесия. Дополнительным свидетельством превращения энергии квантов света в потенциальную химическую энергию было бы течение обратной реакции в темноте после выключения света.

Необходимым методическим условием при выборе подобных систем является отсутствие у компонентов поглощения света в красном максимуме поглощения хлорофилла с тем, чтобы эти системы могли быть использованы для изучения сенсибилизированных хлорофиллом и его аналогами реакций.

ВЫБОР ФОТОХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Следовало осуществить суммарную реакцию по схеме:

$$AH_2 + K \underset{\text{темнота}}{\overset{\text{свет}}{\rightleftharpoons}} KH_2 + A,$$

идущую в области поглощения света красителя К.

Перенос водорода при реакциях такого типа в действительности осуществляется за «два такта» (лит. см. у А. Н. Теренина [1,3]); разделены стадии переноса электрона и протона. Весьма часто при окислительно-восстановительных процессах фотохимическим является перенос электрона, после чего перенос протона идет самопроизвольно, в темноте, требуя иногда известной энергии активации; А. Н. Теренин и А. В. Карякин [4] показали также возможность фотохимического переноса протона в системе янтарная кислота — акридин «против» градиента термодинамического потенциала.

В наших опытах в качестве окислителя — акцептора водорода (К) были использованы красители, обратимо восстанавливающиеся с образованием

неокрашенных лейкосоединений; работы Михаэлиса [5] показали, что восстановление этих красителей идет через стадию образования устойчивого свободного радикала — семихинона, могущего существовать в ионной и нейтральной форме ($КН \rightleftarrows К^- + Н^+$).

В качестве доноров водорода нами был использован ряд органических кислот, универсальных участников биохимических процессов, а также сернистый натрий (сероводород), являющийся типичным восстановителем при бактериальном фотосинтезе. Реакция осуществлялась в различных растворителях—в воде, спирте, пиридине, диоксане — в отсутствие воздуха.

Кинетика реакций исследовалась с помощью фотоэлектрического спектрофотометра, путем наблюдения за изменением коэффициента погашения реагирующих соединений при освещении и в темноте. Ставились соответствующие контрольные опыты. Весь полученный материал [6] невозможно изложить в рамках короткого доклада; здесь укажем лишь, что наиболее пригодным донором водорода оказалась аскорбиновая кислота (E_0' при pH = 7; 0,05 в), а акцепторами водорода — красители сафранин Т ($E_0' = -0{,}29$ в) и рибофлавин ($E_0' = -0{,}22$ в).

При освещении системы $АН_2 + К$ идет фотопроцесс, частично обратимый в темноте без воздуха; введение кислорода полностью окисляет образованное лейкосоединение красителя, как это показано на рис. 1. Действительная величина окислительно-восстановительного потенциала $АН_2$ и К в спирте и пиридине, конечно, отличается от «табличных» значений E_0', полученных в водном растворе; однако величина $\Delta E_0'$ системы краситель — аскорбиновая кислота достаточно близка (в пределах 0,1 в) для пиридина, спирта и воды, на что указывают наши опыты с применением красителей — редокс-индикаторов [7].

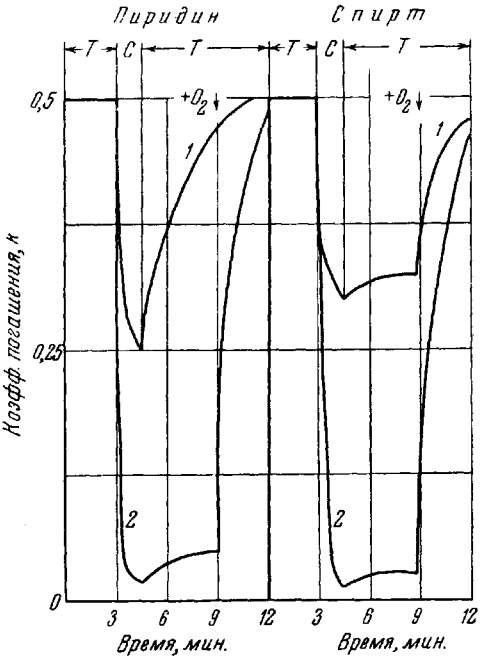


Рис. 1. Обратимое фотовосстановление сафранина Т в спирте и пиридине

1 — реакция с аскорбиновой кислотой; *2* — реакция с пировиноградной кислотой; *С* — свет, *Т* — темнота. Пуск воздуха на 9-й минуте

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ К КРАСНОМУ СВЕТУ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ПОСРЕДСТВОМ ХЛОРОФИЛЛА, ЕГО АНАЛОГОВ И ПРОИЗВОДНЫХ

Фотохимические процессы, описанные выше, идут под действием света в области собственного поглощения красителя-акцептора водорода (аскорбиновая кислота поглощает лишь в ультрафиолетовой области спектра). Следовало установить, приводит ли введение пигментов растений к сенсибилизации этой реакции фотохимического переноса водорода к длинноволновой области спектра.

В качестве пигментов-сенсибилизаторов были исследованы изолированные в нашей лаборатории с помощью хроматографического метода пигменты растений — протохлорофилл, хлорофилл «а» и «в», бактериохлорофилл, их безмагниевые производные — феофитины и синтетический аналог хлорофилла — фталоцианин магния (тетрафенилтетразапорфин).

В исследованных реакциях применялись также акцепторы водорода, представляющие большой биохимический интерес: рибофлавин (витамин B_2) и дифосфопиридин-нуклеотид (ДПН),—простетические группы ряда дегидразных ферментов. ДПН не окрашен и обладает поглощением в ультрафиолетовой области спектра; его восстановленная форма имеет максимум поглощения при 340 мμ; за фотовосстановлением этого соединения можно наблюдать путем измерения коэффициента поглощения при 340 мμ. Вид спектров поглощения реагирующих соединений представлен на рис. 2.

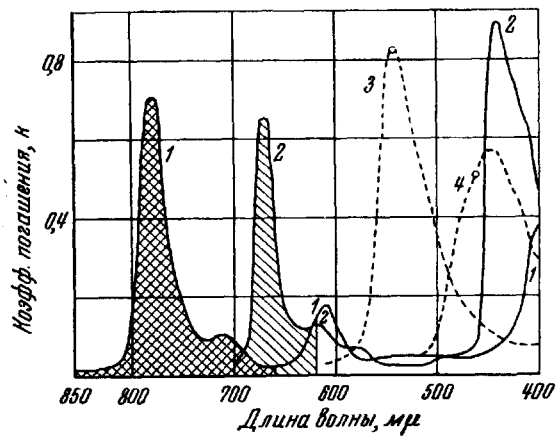


Рис. 2. Вид спектров поглощения пигментов-сенсибилизаторов и акцепторов водорода в пиридине

1 — бактериохлорофилл; *2*—хлорофилл а; *3*—сафранин Т; *4* — рибофлавин. Заштрихована область возбуждения сенсибилизаторов (пропускание светофильтров)

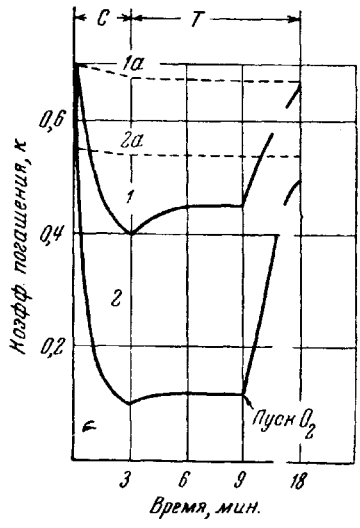


Рис. 3. Течение сенсибилизированного восстановления

1 — система хлорофилл — аскорбиновая кислота — сафранин в спирте; измерения $\varkappa$ при 530 мμ, т. е. в максимуме поглощения сафранина; *1а* — измерение $\varkappa$ при 665 мμ, т. е. в максимуме хлорофилла; *2* — система бактериохлорофилл—сернистый натрий — сафранин в пиридине; измерение $\varkappa$ при 540 мμ; *2а* — измерение $\varkappa$ при 670 мμ; *С* — свет, *Т* — темнота

В раствор, содержащий аскорбиновую кислоту и акцептор водорода, вводили пигмент-сенсибилизатор и освещали эвакуированную трубку в области длинноволнового максимума поглощения пигмента-сенсибилизатора. За ходом реакции следили с помощью фотоэлектрического спектрофотометра. Опыты показали, что во всех случаях шла реакция восстановления акцептора водорода за счет света, поглощаемого сенсибилизатором, который при кратковременной реакции практически не изменялся. Результаты некоторых измерений представлены на рис. 3.

Все перечисленные выше пигменты оказались способными к сенсибилизации реакций переноса водорода; различия наблюдались лишь в величине фотостационарного равновесия.

Таким образом, были осуществлены сенсибилизованные хлорофиллом (к красной области спектра) и бактериохлорофиллом (к близкой инфра-

красной области спектра) реакции переноса водорода от донора водорода (электрона) к его акцептору [6—8]. Главной задачей исследования было установление химической природы элементарных процессов этих реакций.

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИЙ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ХЛОРОФИЛЛОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ

С давних пор существуют два крайних представления о пути элементарных процессов сенсибилизированных реакций: 1) представление, в соответствии с которым химически неизменяющийся сенсибилизатор, поглотив квант света, передает энергию реагирующим молекулам — «физический» путь процесса и 2) «химический» путь, когда сенсибилизатор, поглотив квант света, претерпевает обратимые химические взаимодействия с реагирующими молекулами, оставаясь, в конечном счете, в неизмененном состоянии. Это представление было развито в исходных работах К. А. Тимирязева. Рассмотрим возможность того и другого механизма исследованных нами реакций.

«Физический» путь

Молекулы хлорофилла, его производных и аналогов, поглотив квант света, переходят в возбужденное состояние с длительностью жизни около 10^{-8} сек.; обратный переход на нижний уровень приводит к испусканию флуоресценции, квантовый выход которой для хлорофилла в растворе лежит в пределах 0,1—0,2. Переход возбужденной молекулы пигмента в метастабильное длительно живущее «двухвалентное» состояние определяет, согласно А. Н. Теренину, ее фотохимическую активность; переход из метастабильного состояния на нижний уровень приводит к замедленному свечению — фосфоресценции, являющейся индикатором долгоживущего возбужденного состояния молекулы. Пока еще не найдены условия обнаружения фосфоресценции хлорофилла, хотя у некоторых его аналогов это явление обнаружено. Есть, однако, также другой путь спектроскопического обнаружения бирадикального состояния хлорофилла — путь поисков слабой полосы поглощения, соответствующей весьма маловероятному переходу «снизу» вверх, в метастабильное состояние. Обычно у органических молекул метастабильный уровень лежит на 2—10 кал ниже возбужденного уровня [1]. Следовательно, у хлорофилла слабую полосу поглощения нужно искать в близкой инфракрасной области спектра. Измерения спектров поглощения весьма концентрированных растворов хлорофилла в некоторых средах позволили обнаружить крайне слабую полосу в области 740—760 мμ, которую следует приписать именно этому переходу.

Установленное в нашей лаборатории отсутствие связи между тушением флуоресценции хлорофилла и его фотохимическим взаимодействием с тушащими молекулами также указывает на участие длительно живущего состояния хлорофилла в фотореакциях [9].

Таким образом, возникает вопрос о возможности передачи энергии от возбужденной молекулы хлорофилла другим молекулам. Прежде всего следует указать, что в работах С. И. Вавилова и его школы была исследована возможность обмена энергией между молекулами красителей, результатом чего является концентрационное тушение их флуоресценции в растворе.

Недавно в работе А. Н. Теренина и В. Л. Ермолаева [10] была показана возможность передачи энергии с переходом воспринимающей энергии молекулы в длительно живущее бирадикальное состояние.

Однако доныне не удалось наблюдать сенсибилизированной флуоресценции (или фосфоресценции), свидетельствующей о такого рода передаче энергии между возбужденной молекулой красителя и молекулой, не обладающей полосами поглощения в области спектров поглощения и флуоресценции красителя. Близость энергетических уровней молекул является одним из условий возможности передачи энергии. В ряде работ установлена и изучена сенсибилизированная флуоресценция хлорофилла в красных и бурых водорослях под влиянием света, поглощенного фикобилинами и фукоксантином. Условием такого рода передачи энергии является расположение спектра поглощения, воспринимающего энергию пигмента, в более «красной» области спектра по сравнению с пигментом, возбуждаемым светом, при частичном «перекрывании» их спектров поглощения и флуоресценции; обсуждение этих вопросов дано в обзоре А. Н. Теренина [11] и в книге Е. Рабиновича [13].

Однако все эти условия неприменимы к нашему случаю (и к явлению фотосинтеза), так как реагирующие молекулы поглощают свет в более короткой области спектра по сравнению с поглощением сенсибилизатора.

Повидимому, возможен также другой путь передачи энергии возбуждения. В случае длительного контакта между молекулами сенсибилизатора и акцептора путем, например, координационного связывания, молекула пигмента в «бирадикальном» парамагнитном состоянии может индуцировать образование бирадикальной формы связанной с ней молекулы-акцептора, подвергающейся дальнейшим превращениям [12]. Однако до сих пор отсутствуют прямые экспериментальные доводы в пользу такого рода процесса при фотохимических окислительно-восстановительных реакциях.

Таким образом, мы не располагаем экспериментальным материалом, свидетельствующим о передаче энергии от молекулы пигмента-сенсибилизатора к реагирующим молекулам, тогда как обширный экспериментальный материал по фотохимии органических молекул в конденсированной фазе, накопленный за последние годы, показал чрезвычайное распространение окислительно-восстановительных превращений молекул в результате поглощения кванта света. Эта возможность рассматривается в следующем разделе доклада.

«Химический» путь

В системе, состоящей из молекул сенсибилизатора (X), восстановителя (AH) и окислителя (K), находящихся в растворе, можно представить нижеследующие чередования элементарных процессов, где $\cdot X \cdot$ — молекула сенсибилизатора в «двухвалентном», по А. Н. Теренину, фотоактивном состоянии. Здесь не будет рассматриваться возможность промежуточного взаимодействия возбужденных молекул с молекулами среды; их участие в переносе фотохимически мобилизованного электрона и протона весьма вероятно [23].

Наиболее вероятен элементарный фотопроцесс, при котором молекула сенсибилизатора в бирадикальном состоянии, взаимодействуя с молекулой AH или K, приводит к образованию пары радикалов в результате первичного электронного перехода (первичного окислительно-восстановительного процесса). Возможно либо элементарное фотовосстановление молекулы пигмента-сенсибилизатора

$$\cdot X \cdot + AH \leq\!\!> \cdot X^- + \cdot AH^+, \qquad (1)$$

либо элементарное фотоокисление молекулы пигмента-сенсибилизатора

$$\cdot X\cdot + K \leftrightarrows \cdot X^{+} + \cdot K^{-}. \qquad (2)$$

Согласно этим схемам, образуется пара свободных радикалов в ионной форме; последующий переход протона приводит к образованию радикалов-семихинонов в нейтральной форме. Вторичные темновые реакции фотохимически образованных радикалов приводят к образованию конечных продуктов реакции; суммарным результатом является реакция $AH + K \rightarrow KH + A$ при регенерации молекулы хлорофилла.

Таким образом, для того чтобы установить, что пигменты участвуют в реакции по «химическому» пути, следует искать активные продукты фотохимического взаимодействия хлорофилла с окислителем и восстановителем. Свободные радикалы красителей — семихиноны обладают в особых условиях достаточно длительным периодом существования, допускающим ведение их поисков путем спектрофотометрических измерений после освещения интенсивным светом, вызывающим фотореакцию; существенным в этих поисках является выбор среды, стабилизирующей эти промежуточные продукты.

Итак, поиски промежуточных продуктов фотореакции сводятся к исследованию процессов первичного фотовосстановления или фотоокисления молекулы красителя-сенсибилизатора. До работ нашей лаборатории была распространена гипотеза о первичном фотоокислении хлорофилла, основанная на косвенных данных [13]; отсутствовали достоверные эксперименты, свидетельствующие об обратимых окислительно-восстановительных превращениях хлорофилла и других пигментов, несмотря на то, что поиски этих превращений велись в течение нескольких десятков лет.

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА

Основываясь на опытах К. А. Тимирязева, который впервые в 1886 г. показал возможность восстановления хлорофилла цинковой пылью, мы предприняли несколько лет назад поиски реакции фотохимического восстановления хлорофилла; нам удалось установить [14], что хлорофилл фотохимически восстанавливается аскорбиновой кислотой, фенилгидразином, цистеином и некоторыми другими соединениями с образованием продукта восстановления, обратимо реагирующим в темноте с образованием исходного хлорофилла; обратная реакция ускорялась в присутствии окислителей. Протекание реакции хлорофилла с аскорбиновой кислотой показано на рис. 4.

Таким образом, была найдена фотореакция хлорофилла, при которой энергия квантов света, поглощенных пигментом, частично превращалась в потенциальную энергию фотопродуктов; поскольку элементарный процесс такого типа мог бы лежать в основе фотосинтеза, эта реакция была исследована более детально в последующих работах нашей лаборатории, результаты которых кратко резюмируются ниже.

Реакцию удается наблюдать в наиболее явной форме в среде органических оснований, например в пиридине, а также при добавке органических оснований или аммиака к другим растворителям. В спирте и ацетоне также удается наблюдать фотореакцию, идущую, однако, менее глубоко. Активирующее действие органических оснований при образова-

нии долгоживущей восстановленной формы хлорофилла можно объяснить следующими причинами:

а) смещением кислотно-основного равновесия реагирующей системы, что облегчает фотоперенос электрона;

б) образованием координационных соединений оснований с пигментами, что влияет на величину сродства молекулы пигмента к электрону;

в) каталитическим действием оснований на перенос протона.

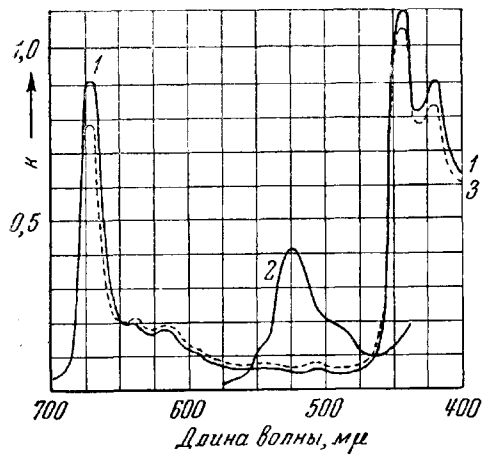


Рис. 4. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой.

1—спектр поглощения до фотореакции; *2*—спектр продукта фотовосстановления; *3* — спектр поглощения после обратной реакции в темноте

Реакция фотовосстановления является общей реакцией для хлорофилла, его аналогов и производных. Удалось осуществить обратимое фотовосстановление хлорофилла, протохлорофилла, бактериохлорофилла и соответствующих безмагниевых производных — феофитинов. Подобным было поведение Zn-феофитина, тогда как не обладающий флуоресценцией Cu-комплекс оказался неактивным. Недавно в работе с К. К. Войновской нам удалось осуществить фотовосстановление гематопорфирина до хлорина и бактериохлорина [24]. В тех случаях, когда обратная реакция фотопродуктов идет достаточно медленно (несколько минут), удается снять спектр поглощения неустойчивой фотовосстановленной формы; ее максимум поглощения обычно смещен на 100—150 мμ в сторону коротких длин волн по сравнению с положением главного длинноволнового максимума поглощения пигмента. Так, например, максимумы поглощения пигментов и их фотовосстановленных форм в пиридиновых растворах расположены следующим образом:

Хлорофилл	670 мμ;	Фотовосстановленная	форма	523 мμ
Протохлорофилл	633 мμ	»	»	470 мμ
Бактериофеофитин	755 мμ	»	»	640 мμ

В случае бактериохлорофилла и фталоцианина спектр фотопродукта пока не удалось снять вследствие чрезвычайно быстрого протекания обратной реакции.

Опыты В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой [15], проведенные в нашей лаборатории, показали, что длительно живущей восстановленной форме хлорофилла предшествует первичная, более лабильная восстановленная форма. Проводя опыты фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой при низких температурах, и в ряде других опытов удалось показать, что первично возникающая фотовосстановленная форма при повышении температуры переходит в «красную форму»; эти опыты указывают на раздельное течение фотоакта — переноса электрона, и темнового акта — переноса протона.

Определение окислительно-восстановительного потенциала продукта фотовосстановления хлорофилла с помощью метода редокс-индикаторов в наших опытах с Г. П. Брин [7] показало, что потенциал системы хлоро-

филл — аскорбиновая кислота при освещении увеличивается на $\sim 0{,}3$ в (в «восстановительную» сторону). Работы нашей лаборатории показали значительное изменение потенциала инертного электрода при освещении указанной выше системы, что говорит об образовании электродноактивных фотопродуктов. Детальные исследования фотопотенциала системы пигмент — аскорбиновая кислота, осуществленные в нашей лаборатории в работах В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой [35], показали, что при освещении системы потенциал электрода изменяется в отрицательную сторону приблизительно на 0,3 в.

Изменение потенциала обнаруживают лишь пигменты, способные к реакции обратимого фотовосстановления. Таким образом, система отклоняется от положения темнового равновесия на 0,3 в за счет квантов света, поглощенных хлорофиллом.

Существенно то, что потенциалы «красной» восстановленной формы и первичной формы близки по величине, что указывает на приблизительно одинаковый «уровень восстановленности» этих соединений.

В первых работах [14] мы предположили, что обнаруженные нами продукты фотовосстановления имеют природу свободного радикала типа семихинона; в пользу этого представления были приведены следующие доводы:

а) валентно насыщенные продукты восстановления порфиринов — лейкосоединения обычно не обладают окраской в видимой области спектра, тогда как фотопродукты пигментов интенсивно окрашены;

б) фотопродукты весьма реакционноспособны и быстро взаимодействуют с окислителями; энергия активации этой реакции была оценена в 1—2 ккал.

Впоследствии в работе Ури [22] и в наших работах было показано, что фотореакция хлорофилла с аскорбиновой кислотой инициирует полимеризацию метилметакрилата, что является указанием на радикальную природу образующихся при освещении активных соединений.

Наиболее вероятно, что первичный продукт фотовосстановления, обнаруженный В. Б. Евстигнеевым, является ионной формой свободного радикала, возникающего при реакции $X + AH \rightarrow X^- + AH^+$, тогда как «красная форма» вероятно образуется в результате темнового присоединения протона и образования нейтральной формы свободного радикала $X^- + AH^+ \rightarrow XH + A$.

Ионная и нейтральная формы семихинона находятся на одном уровне восстановления; действительно, величина фотопотенциала (реакция на электродноактивную форму) и проба с редокс-индикаторами (реакция с «красной формой») приводят к сходным значениям потенциала. Роль оснований в этом процессе, повидимому, заключается в катализе процесса переноса протона, требующего некоторой энергии активации; мы уже указывали, что «красная форма» достаточно полно образуется лишь в присутствии органических оснований.

Какова химическая структура продуктов фотовосстановления? Нужно прежде всего указать на то, что до сих пор не преодолены экспериментальные трудности выделения этих соединений в индивидуальной форме вследствие их большой реакционной способности. Здесь следует привести лишь следующие соображения. Общий характер спектра поглощения хлорофилла определяется системой сопряженных связей. При переходе молекулы в бирадикальное состояние обращение спина электрона, так же как и восприятие электрона системой сопряженных связей в результате фотовосстановления, вероятно, приводит к разрыву сопряжения. В связи с этим существенно то, что молекулы разной структуры, имеющие в основе сходную систему сопряженных связей — фталоцианины, хлорофилл и его производные, сохраняют сходную способность к реакции фотовос-

становления. Однако место разрыва связей и присоединения водорода пока не установлено.

В литературе последних лет появились новые данные об обратимых спектральных изменениях хлорофилла при освещении. А. А. Качан и Б. Я. Даин [25] наблюдали изменения поглощения в красном максимуме хлорофилла при температуре жидкого воздуха.

Ливингстон и Райан [26], применив освещение растворов хлорофилла световыми импульсами большой интенсивности в сочетании с быстрой регистрацией спектральных изменений, происходящих в результате фотопроцесса, обнаружили образование лабильных фотопродуктов со спектром поглощения, сходным со спектром фотовосстановленной формы хлорофилла, полученным в наших работах.

Можно предположить, что высокое сродство к электрону фотоактивированной молекулы хлорофилла, показанное в наших опытах, определяет течение элементарного фотовосстановления хлорофилла молекулами среды в опытах названных выше авторов.

Итак, мы приходим к выводу, что обратимое фотовосстановление хлорофилла и его аналогов ведет к образованию первичных активных продуктов, типа свободных радикалов.

ОБ ОБРАТИМОМ ФОТООКИСЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА

Представление о возможности обратимого окисления — дегидрирования хлорофилла основывалось преимущественно на данных о наличии в молекуле хлорофилла «лабильного» атома водорода у 10-го атома углерода. Хотя эти представления легли в основу ряда схем фотосинтеза Штолля, Франка-Герцфельда и других авторов, они не имели достоверных экспериментальных оснований.

Работы Б. Я. Даина и его сотрудников [16] показали, что взаимодействие хлорофилла с Fe^{3+}, изученное в работах Е. Рабиновича и Вейсса [13], определяется не обратимым окислением хлорофилла, а образованием Fe-комплекса.

Имеется, однако, прямой экспериментальный подход к определению этой возможности. Если сенсибилизующее действие хлорофилла в растворе основано на чередующихся процессах «отдачи» лабильного водорода окислителю и приема атома водорода от восстановителя, то, применяя дейтерированный восстановитель, можно попытаться обнаружить дейтерий в молекуле хлорофилла после осуществления сенсибилизированного процесса. Конечно, нужно вначале убедиться в том, что хлорофилл не обменивает свой «лабильный» водород на дейтерий в темноте. Такие опыты были проведены в недавних работах Ливингстона и сотрудников [17], поставленных в значительной мере под влиянием работ нашей лаборатории, в которых было показано, что фотохимическая активность не связана с наличием лабильного атома водорода в молекуле пигмента [6—8, 18].

В этих работах не удалось обнаружить дейтерия в хлорофилле ни в темноте, ни после фотореакции; поэтому был сделан вывод, что, во всяком случае, не фотоокисление (дегидрирование) хлорофилла определяет его сенсибилизирующее действие в растворе. Правда, эти заключения нельзя применить в том случае, если первичное фотоокисление хлорофилла и обратная реакция являются чисто электронным процессом, без вовлечения протона молекулы хлорофилла в цепь чередующихся окислительно-восстановительных актов.

С целью обнаружить возможность фотоокисления хлорофилла нами был поставлен ряд опытов, в которых в разных средах исследовалось,

с помощью спектральных методов, фотовзаимодействие хлорофилла с «окислителями» — ионами железа, хиноном, некоторыми красителями и т. д. Ни в одном случае нам не удалось наблюдать обратимое фотоокисление.

Лишь при освещении растворов пигментов в присутствии кислорода удается наблюдать фотоокисление, ведущее к образованию лабильных продуктов, вероятно перекисей, обратимо восстанавливаемых в темноте посредством аскорбиновой кислоты и некоторых других соединений [18]. Эта реакция наиболее явно происходит в случае бактериохлорофилла [19] и фталоцианина магния. Возможно, что такого рода реакции могут иметь значение при фотосенсибилизированном окислении некоторых органических соединений молекулярным кислородом [12]; однако при сенсибилизированном переносе водорода возможность первичного фотоокисления хлорофилла, в свете известного материала, не подтверждается данными опыта.

ТЕМНОВАЯ СТАДИЯ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ РЕАКЦИИ

Изложенные данные опытов указывают, что при сенсибилизированном переносе водорода от соединения АН к К следует ожидать темновой стадии процесса — восстановления соединения К путем реакции с фотовосстановленной формой хлорофилла.

Для того чтобы исследовать это взаимодействие, были поставлены опыты, в которых в отсутствие воздуха в трубку вводили раствор хлорофилла в пиридине с аскорбиновой кислотой, в отвод трубки — раствор «окислителя» — сафранина, рибофлавина, дифосфопиридин-нуклеотида, либо других соединений. При освещении трубки быстро образовывалась «красная» фотовосстановленная форма хлорофилла; затем в темноте из отвода приливали к фотопродукту раствор окислителя и следили за ходом реакции по величине коэффициента погашения в максимуме поглощения хлорофилла и его фотовосстановленной формы. Результаты измерений показаны на рис. 5. Реакция проходила весьма быстро с обратимым окислением фотовосстановленной формы до хлорофилла [7]. Этот опыт, таким образом, дает возможность осуществить сенсибилизированный процесс раздельно по стадиям — световой и темновой.

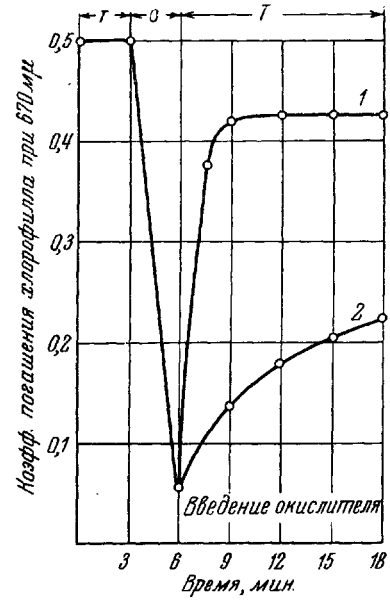


Рис. 5. Взаимодействие акцептора водорода с фотовосстановленной формой хлорофилла.

1 — сафранин введен после фотореакции (на 6 мин.); *2* — контрольный опыт без введения сафранина; *С* — свет; *Т* — темнота

В свете последних опытов В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой [27] в нашей лаборатории, при освещении тройной системы восстановитель — сенсибилизатор — окислитель более вероятно взаимодействие с окислителем первичной фотовосстановленной формы хлорофилла с последующим восприятием протона ионно-радикальной формой семихинона окислителя.

Весьма важно указать на то, что в присутствии окислителя в тройной системе с помощью спектрофотометрических методов не удается наблюдать фотовосстановление хлорофилла вследствие быстрой темновой реакции, следующей за фотопроцессом (см. рис. 3). Мы пытались следить за изменением концентрации хлорофилла во время фотореакции путем измерения

его флуоресценции; действительно, удается наблюдать весьма малое снижение интенсивности флуоресценции в первые минуты освещения; после темнового периода восстанавливается прежняя интенсивность флуоресценции. С помощью электрометрических методов удается наблюдать взаимодействие между компонентами во время освещения [15, 27].

Хотя описанные выше опыты убедительно показывают, что сенсибилизированная реакция идет через стадию фотовосстановления хлорофилла, нами получены и другие экспериментальные доказательства именно такого течения реакции. Так, сенсибилизированный перенос водорода к «окислителям» наблюдается в явном виде лишь с теми восстановителями, которые способны к фотовосстановлению хлорофилла (испытывалось около 20 соединений). Наиболее разительный пример этого наблюдается в случае применения в качестве восстановителя пировиноградной кислоты. Это соединение при прямой фотореакции быстро и полно восстанавливает сафранин, рибофлавин и другие красители, но не вступает в фотореакцию с хлорофиллом [6]. Соответственно этому, в тройной системе хлорофилл — пировиноградная кислота — сафранин практически не происходит сенсибилизированное восстановление сафранина.

Явный сенсибилизированный процесс наблюдается при использовании в качестве восстановителей аскорбиновой кислоты, фенилгидразина, цистеина, сероводорода, т. е. тех соединений, которые способны к фотохимическому восстановлению хлорофилла.

Таким образом, изложенные опыты свидетельствуют о следующем чередовании элементарных процессов при сенсибилизированных пигментами растений реакциях:

1) образование фотоактивированного бирадикального состояния хлорофилла (X^V).

$$X + h\nu \rightarrow X^* \rightarrow X^V,$$

2) первичная фотореакция с восстановителем с образованием пары свободных радикалов:

$$X^V + AH \rightarrow (X^- + AH^+ \rightleftarrows XH + A);$$

3) темновая реакция радикальной восстановленной формы хлорофилла с «окислителем»:

$$(XH \rightleftarrows X^- + H^+) + K \rightarrow X + KH;$$

4) образование конечных продуктов окисления и восстановления путем дисмутации свободных радикалов KH и AH

$$2KH \rightarrow KH_2 + K \text{ и } 2AH \rightarrow AH_2 + A;$$

суммарная реакция

$$AH_2 + K + X \rightarrow A + KH_2 + X.$$

О ПРИЛОЖЕНИИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ К ДРУГИМ ТИПАМ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ХЛОРОФИЛЛОМ РЕАКЦИЙ

Весьма распространен случай сенсибилизированного хлорофиллом окисления кислородом органических соединений; здесь также вероятен показанный выше механизм с тем отличием, что в качестве окислителя используется молекула кислорода.

Однако подробное рассмотрение сенсибилизированных реакций, идущих с участием молекулярного кислорода, лежит вне рамок настоящего доклада.

Рассмотренные выше случаи элементарных процессов возможны и в случае гетерогенной сенсибилизации с тем отличием, что первичная фотореакция происходит на фазовой границе с вероятным образованием поверхностных фотопродуктов [20]. В работе В. Б. Евстигнеева и А. Н. Теренина [21] по изучению фотопотенциала твердых пленок хлорофилла показана зависимость знака фотопотенциала первичного элементарного фотопроцесса от природы среды, с которой граничит твердая пленка хлорофилла.

Рассмотрение вопроса о природе элементарных фотореакций фотосинтеза также нельзя охватить в этом докладе; здесь следует указать лишь, что возможность элементарного фотовосстановления хлорофилла, сопряженного с ферментными биохимическими процессами, рассматривается в биохимической литературе [2].

В заключение приношу глубокую благодарность академику А. Н. Теренину за обсуждение всего круга вопросов, затронутых в докладе.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Теренин. Фотохимия красителей и родственных органических соединений. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1947.
2. А. А. Красновский. Фотосинтез растений. Сб. «Успехи биологической химии», т. I, Изд. АМН, 1950.
3. А. Н. Теренин. Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 377 (1947).
4. А. Н. Теренин, А. В. Карякин. ДАН СССР, 58, 425 (1947).
5. L. Michaelis. Обзор работ, например, в Currents of Biochem. Research, Ed. D. Green, 1946.
6. А. А. Красновский. ДАН СССР, 61, 91 (1948); А. А. Красновский, В. А. Гаврилова. ДАН СССР, 81, 1105 (1951); А. А. Красновский, К. К. Войновская. ДАН СССР, 87, 109 (1952).
7. А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР 73, 1239 (1950).
8. А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР, 67, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская. ДАН СССР, 64, 663 (1949).
9. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский. ДАН СССР, 74, 315 (1950); см. также Э. В. Шпольский, Е. В. Гришкун. Журн. физ. химии, 19, 107 (1945).
10. А. Н. Теренин, В. Л. Ермолаев. ДАН СССР, 85, 547 (1952).
11. А. Н. Теренин. Усп. физ. наук, 43, 347 (1951).
12. А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР, 58, 1087 (1947).
13. Е. Рабинович. Фотосинтез растений, ИЛ, т. 1, 1945; т. 2, 1951.
14. А. А. Красновский. ДАН СССР, 60, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская. ДАН СССР, 69, 393 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская. ДАН СССР, 81, 879 (1951), А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР, 89, 527 (1952); В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. ДАН СССР, 91, 899 (1953).
15. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. ДАН СССР, 92, 381 (1953); 95, 841 (1954); 96, 1201 (1954).
16. М. С. Ашкинази, Б. Я. Даин. ДАН СССР, 74, 385 (1951); М. С. Ашкинази, Т. С. Гликман, Б. Я. Даин. ДАН СССР, 73, 743 (1950).
17. J. W. Weigl, R. Livingston. J. Am. Chem. Soc., 74, 4160, 4211 (1952).
18. А. А. Красновский. ДАН СССР, 58, 617, 835 (1947).
19. А. А. Красновский, К. К. Войновская. ДАН СССР, 81, 879 (1951).
20. А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР, 53, 457 (1947); А. А. Красновский, Т. Н. Гуревич. ДАН СССР, 74, 569 (1950); 75, 715 (1950).
21. В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин. ДАН СССР, 81, 223 (1951).
22. N. Uri. J. Am. Chem. Soc., 74, 5808 (1952).
23. А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР 96, 1025 (1954).
24. А. А. Красновский, К. К. Войновская. ДАН СССР, 96, 1206 (1954).
25. А. А. Качан, Б. Я. Даин. ДАН СССР, 80, 619 (1951).
26. R. Livingston, V. A. Ryan. I. Am. Chem. Soc., 75, 2176 (1953).
27. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. ДАН СССР, 98, 1017 (1954).

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ФОТОКАТАЛИЗА

А. А. Красновский

(Институт биохимии АН СССР)

В связи с интересом к проблеме фотокатализа, возникшим на совещании, мне хотелось бы остановиться на результатах некоторых наших работ, проведенных преимущественно в 1937—1940 гг.[1]

1. ФОТОКАТАЛИЗ И ТЕХНОЛОГИЯ КРАСОЧНЫХ ПЛЕНОК

Окись цинка, которая была объектом исследования большинства доложенных на совещании экспериментальных работ, так же как и двуокись титана, имеет широкое применение в технике в качестве белого пигмента. Краска представляет собой гетерогенную систему, содержащую пигмент и органические пленкообразующие вещества. Покрытия, содержащие окись цинка и двуокись титана, обладают малой атмосфероустойчивостью — так называемым «мелением», наступающим при действии солнечного света, кислорода и влаги.

Наши работы показали, что двуокись титана способна сенсибилизировать в ультрафиолетовой области спектра фотоокислительные процессы и образование перекисных соединений в органических связующих красочных пленок (льняное масло и пр.). Окись цинка сенсибилизирует образование перекиси водорода и окисление органических соединений. Оба пигмента обладают длинноволновой границей поглощения света — около 400 мμ; их сенсибилизирующее действие проявляется, таким образом, в ультрафиолетовой области спектра. Исходя из этих наблюдений, малую атмосфероустойчивость верхнего слоя красочных покрытий, пигментированных окисью цинка и двуокисью титана, следовало объяснить фотосенсибилизированным окислительным разрушением органического связующего вокруг частиц пигмента. Проведенные нами испытания образцов окиси цинка и двуокиси титана, полученных разными методами, показали связь между их фотосенсибилизирующим действием и устойчивостью покрытий («мелением») в условиях реальной эксплуатации, что позволило разработать ускоренный метод испытания фотоактивности пигментов, нашедший применение на практике[2, 3]. В этих работах мы обратили внимание на резкие различия свойств окиси цинка, полученной прокаливанием карбоната и сжиганием металлического цинка (муфельные цинковые белила). В первом случае получались малоактивные фотохимически препараты, обладавшие слабой коричневой флуоресценцией, во втором случае—ярко флуоресцирующие активные образцы, приводившие к сильному «мелению» покрытий.

2. АДСОРБЦИЯ ИОНОВ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Исследуя фотосенсибилизирующее действие двуокиси титана (анатаз), мы обратили внимание на то, что образцы не чисто белого цвета, вероятно, содержавшие примеси тяжелых металлов, обладали меньшей фотохимической активностью. Эти наблюдения легли в основу систематического исследования влияния адсорбции ионов частицами TiO_2 и ZnO на их фотохимическую активность. Образцы обрабатывали растворами солей различной концентрации; для TiO_2 применяли также метод коагуляции стабилизированных в щелочной среде суспензий различными ионами [1,4].

В этих исследованиях установлена связь между десенсибилизирующим действием адсорбированных ионов и их окислительно-восстановительным потенциалом. Обычно ионы — сильные окислители (высшей валентности), например кобальт, значительно уменьшали фотоактивность TiO_2, что следует объяснить их «отсасывающим» действием по отношению к фотохимически мобилизованным электронам полупроводника. В соответствии с этим мы наблюдали весьма сильное тушение флуоресценции окиси цинка ионами-окислителями и соответствующее подавление фотохимической активности, измеряемое, например, по величине выцветания некоторых красителей. Двуокись титана практически не флуоресцирует в видимой области спектра; лишь при температуре жидкого воздуха удается наблюдать ее слабое коричневое свечение.

3. ОБ ЭЛЕМЕНТАРНОМ МЕХАНИЗМЕ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ОКИСИ ЦИНКА

Эта реакция была открыта в 1928 г. в лаборатории Е. Баура, однако поныне ее механизм до конца не выяснен. Проф. В. И. Веселовский, основываясь на наблюдениях о тушении флуоресценции ZnO кислородом, полагает, что элементарным процессом является реакция на поверхности

$$ZnO \cdot O_2 \rightarrow ZnO^+ + O_2^-$$

с последующими реакциями $O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2$ и т. д.

Однако желательно было бы рассмотреть иную возможность. Мы наблюдали, что ионы водорода также тушат флуоресценцию окиси цинка, которая, являясь слабым основанием, обладает известным сродством к протону; поэтому вероятным является также элементарный процесс:

$$ZnO \cdot H^+ + h\nu \rightarrow ZnO^+ \cdot H,$$

$$ZnO^+ \cdot H + O_2 \rightarrow ZnO^+ + HO_2$$

и т. д. Компенсирующим является, например, элементарный процесс: ZnO^+ + глицерин → Zn + окисленный глицерин и т. д.

Быть может, в отсутствии органического восстановителя донором электрона может быть примесь металлического цинка в ZnO (см. статью В. И. Веселовского и Д. М. Шуб в настоящем сборнике, стр. 43).

4. О ВЛИЯНИИ СВЕТА НА ДЕЙСТВИЕ КАТАЛИЗАТОРА

Термины «фотосенсибилизация» и «фотокатализ» часто употребляются как синонимы для обозначения термодинамически самопроизвольных реакций, текущих при освещении системы в области поглощения света сенсибилизатором (фотокатализатором). Возможны случаи, когда в темноте исследуемая реакция практически не идет (например, окисление метиленового голубого) либо идет и в темноте, когда сенсибилизатор оказывает также «темновое» каталитическое действие.

Л. В. Писаржевский с сотрудниками[5] в своих работах наблюдали усиление каталитического действия Pt, PbO_2 и графита на разложение перекиси водорода при освещении системы ультрафиолетовым светом. Некоторые трудности в интерпретации этих опытов определяются тем, что перекись водорода также разлагается при освещении ультрафиолетовым светом.

Мы исследовали (при помощи микроманометрического способа) действие света лампы накаливания на ряд каталитических реакций:

1) окисление аскорбиновой кислоты, катализируемое кристаллическими фталоцианинами, их медными и магниевыми комплексами, окисью меди и ионами Cu^{++} в растворе[6];

2) каталитическое разложение перекиси водорода в присутствии двуокиси титана, окиси цинка, окислов свинца и ряда других соединений;

3) каталитическое окисление кислородом ненасыщенных соединений — линолевой кислоты, льняного масла — в присутствии тех же соединений, которые испытывались с перекисью водорода[7].

Эти реакции катализируются в темноте кристаллическими фталоцианинами, окислами цинка, титана, свинца, меди, железа, хрома. Освещение ускоряет реакцию лишь в присутствии первых четырех соединений; наиболее активны двуокись титана и окись цинка. Следует указать, что окисление метиленового голубого и образование перекиси водорода в присутствии окиси цинка идут лишь при освещении, но не в темноте. При отравлении фотосенсибилизирующего действия двуокиси титана и окиси цинка адсорбированными ионами был подавлен эффект действия света, но темновое каталитическое действие обычно усиливалось. Эти опыты указывают на то, что темновой катализ и фотосенсибилизация, вероятно, связаны с различными типами активных центров. Весьма заманчивы представления, согласно которым нарушения решетки, определяющие люминесценцию окиси цинка, определяют также ее каталитическую активность. Однако в действительности адсорбция молекул, тушащих флуоресценцию, инактивирует фотохимическую активность, но не уменьшает темновой каталитический эффект.

Более детально исследовалось действие кристаллических фталоцианинов на окисление аскорбиновой кислоты[6]; энергия активации реакции при освещении снижалась на 3—4 ккал; энергия моля квантов в области максимума поглощения испытанных соединений составляет 40—50 ккал. Таким образом, в этих опытах для химического действия используется лишь малая часть энергии кванта света, близкая по величине к вибрационному кванту. Возможно, что электронная энергия возбуждения, деградируя в кристаллической решетке катализатора, передается адсорбированным молекулам в виде вибрационной энергии[8], но более вероятным является электронный механизм процесса.

Отметим, что в работах 1937—1940 гг. нами в примитивной форме излагалась ныне распространенная картина «электронного» механизма гетерогенного катализа: адсорбция реагирующих молекул на электронодонорных и электроно-акцепторных центрах поверхности и перемещение электрона в зоне проводимости катализатора-полупроводника.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Красновский, Диссертация, МХТИ, 1940.
2. А. А. Красновский и В. С. Киселев, ЖХП № 6, 17 (1941).
3. А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, ДАН СССР, **74**, 569 (1950).
4. А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, Колл. журнал **11**, 172 (1949).
5. Л. В. Писаржевский, Р. К. Корабельник, Е. С. Ринская, Изв. АН СССР, ОМЕН, 931 (1934).
6. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН СССР, **53**, 447 (1946).
7. А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, ДАН СССР, **75**, 715 (1950).
8. А. Н. Теренин, А. А. Красновский, Усп. физ. наук, **37**, 65 (1949).

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК СССР
№ 2 Серия биологическая 1955

А. А. КРАСНОВСКИЙ

УЧАСТИЕ ПИГМЕНТОВ В РЕАКЦИЯХ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ

Образуемые в результате фотосинтеза многочисленные органические соединения построены из водорода воды и углерода углекислоты.

Для синтезов этих соединений используется энергия солнечного света, поглощаемого пигментной системой растения, прежде всего хлорофиллом. Процесс биосинтеза органического вещества из воды и углекислоты нельзя осуществить в обычных условиях путем ферментативных, каталитических реакций, ускоряющих лишь термодинамически-самопроизвольные процессы; так, для компенсации энергетического дефицита реакции синтеза глюкозы из воды и углекислоты по уравнению $CO_2 + H_2O \rightarrow \rightarrow O_2 + {}^1/_6C_6H_{12}O_6$ нужно подвести 120 ккал на граммол CO_2 или минимум три кванта красного света, а в действительности гораздо больше (судя по измерениям величины квантового выхода фотосинтеза).

Установление конкретного фотохимического пути участия пигментов в реакциях фотосинтеза равнозначно познанию того, каким образом энергия квантов света, поглощенных пигментной системой, преобразуется в потенциальную химическую энергию продуктов фотосинтеза.

В своих классических работах К. А. Тимирязев обосновал представление о том, что хлорофилл включается в систему реакций в качестве фотосенсибилизатора непосредственно, участвующего в цепи реакций фотосинтеза, путем обратимых химических превращений.

Если в основе действия пигментов лежат их обратимые фотохимические превращения, то они осуществляются лишь в результате поглощения квантов света с образованием активных фотопродуктов, несущих энергию этих квантов.

В соответствии с этим уже давно возник вопрос, способен ли хлорофилл к фотохимическим превращениям, идущим с «запасанием» энергии света в продуктах реакции.

Со времени К. А. Тимирязева многие исследователи пытались обнаружить такие превращения хлорофилла вне организма растения. Трудность этих поисков определяется чрезвычайной активностью первичных фотопродуктов, стремящихся прореагировать с образованием устойчивых соединений.

А. Н. Теренин в 1943 г. обосновал ныне общепринятое представление о переходе органических молекул в результате поглощения кванта света в длительно живущее бирадикальное или «двувалентное» состояние, несущее большую часть энергии светового кванта. Это состояние играет чрезвычайную роль в проявлении фотохимических свойств органических соединений (Теренин, 1947, 1950). Таким образом, в элементарном фотопроцессе возможно достаточно полное преобразование квантов света в потенциальную химическую энергию продуктов реакции. Однако высокая реакционноспособность образованных радикалов определяет их быстрое темновое взаимодействие друг с другом, с другими молекулами, что ведет к образованию устойчивых соединений и к конечной деградации энергии света в форме тепла.

Эти обстоятельства являются причиной того, что в большинстве известных фотохимических реакций энергия света используется для преодоления потенциальных барьеров, не «запасаясь» в конечных продуктах.

Особенностью фотосинтеза растений является то, что первично образованные фотопродукты не теряют свою энергию таким путем, а перерабатываются с образованием устойчивых богатых энергией соединений.

Вне организма мы не умеем еще воспроизводить реакций подобного типа. Для того чтобы познать природу реакций, составляющих процесс фотосинтеза, весьма важно исследовать образование из хлорофилла активных фотопродуктов, участвующих в цепи окислительно-восстановительных реакций, и выяснить природу связи этих продуктов с системой темновых, ферментативных процессов.

Можно представить себе следующие возможности первичных окислительно-восстановительных превращений хлорофилла в результате действия света: 1) первичное фотоокисление, т. е. отдача электрона и протона другой молекуле, и 2) первичное фотовосстановление, т. е. восприятие электрона и протона от молекулы — донора. Оба типа реакций должны идти лишь при освещении; образованные, богатые энергией соединения должны реагировать обратимо с образованием исходных молекул пигмента.

Нам удалось в 1948 г. показать в прямых опытах обратимое фотовосстановление хлорофилла такими донорами водорода, которые неспособны его восстановить в темноте (Красновский, 1948а). Эти работы были поставлены, исходя из наблюдений К. А. Тимирязева, показавшего в 1886 г. возможность обратимого восстановления хлорофилла цинковой пылью (см. также Кособуцкая и Красновский, 1950). На примере реакции фотовосстановления нам удалось впервые осуществить превращение хлорофилла с запасанием энергии в продуктах фотореакции.

Возможность подобного элементарного процесса при фотосинтезе определило детальное исследование этой реакции в нашей лаборатории.

Пока не удалось показать в достаточно убедительных прямых опытах реакций обратимого окисления хлорофилла под действием видимого света, идущего с «запасанием» энергии (Красновский, 1947; Качан, Даин, 1951; Рабинович, 1951). В недавних опытах Ливингстона и Риана (1953), повидимому, имело место фотовосстановление хлорофилла молекулами растворителя — спирта.

Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла

Наши исследования были поставлены преимущественно при помощи спектральных методов — измерения спектров поглощения и флуоресценций реагирующих пигментов и продуктов, образующихся при действии света. Существенным в этих работах был выбор доноров водорода и среды, природа которой сильно влияет на течение реакции. Хлорофилл, его аналоги и производные при освещении восстанавливаются аскорбиновой кислотой, цистеином и некоторыми другими соединениями; при выключении света в темноте идет обратная реакция, в результате которой хлорофилл возвращается в исходное состояние. Наиболее глубоко реакция идет в среде органических оснований (пиридин), хотя ее можно наблюдать и в других средах. Эта реакция является общей для порфиринов, их аналогов и производных: обратимое фотовосстановление удалось наблюдать у бактериохлорофилла, протохлорофилла, соответствующих безмагниевых производных — феофитинов, гематопорфирина, а также у фталоцианинов, (Красновский, Брин, Войновская, 1949; Красновский и Войновская, 1949, 1951, 1954; Красновский и Брин, 1953, 1954б; Красновский и Гаврилова, 1951; Евстигнеев и Гаврилова, 1950, 1953, 1954). Фотореакцию обнаруживают лишь магниевые и цинковые комплексы, обладающие флуоресценцией; нефлуоресцирующие медные комплексы оказались неактивными. Имеющиеся данные указывают на то, что фотовосстановление сопровождается «раскрытием» сопряженной по кругу системы двойных связей, характерной для порфиринов и их производных.

Если ввести в раствор, содержащий хлорофилл и восстановитель, какой-либо акцептор водорода (не реагирующий в темноте с восстановителем) и осветить систему в области поглощения хлорофилла, то мы сможем наблюдать быстрое фотосенсибилизированное восстановление акцепторов водорода — окислителей (Красновский, 1948б; Красновский и Брин, 1949; Красновский и Войновская, 1952). При выключении света реакция пойдет в обратном направлении. Таким образом, в этих опытах удалось показать, что за счет света, поглощенного хлорофиллом, можно осуществить реакции переноса водорода, идущие с «запасанием» энергии квантов света в продуктах реакции.

Существенно установить степень «запасания» света в этих реакциях, степень отклонения фотореакции от условий темнового равновесия. Это удалось сделать измерив изменение величины окислительно-восстановительного потенциала (E_0) реагирующей системы, содержащей хлорофилл при освещении. Измерение потенциала фотопродуктов осуществляли двумя методами: «испытанием» восстановительной силы фотопродуктов красителями — редокс-индикаторами (Красновский и Брин, 1950) и прямым электрометрическим методом, измерением потенциала инертного электрода, погруженного в среду, где идет фотореакция (Евстигнеев и Гаврилова, 1953). Оба метода дали близкие результаты: E_0 увеличивается при освещении приблизительно на 0,3 в в восстановительную сторону, достигая —0,35 в, что превосходит E_0 пиридин-нуклеотидов и приближается к E_0 водородного электрода; такая величина E_0, вероятно, достаточна для биохимического восстановления углекислоты.

Весьма важно установить природу фотовосстановленных форм пигментов, образующихся при действии света. При ведении реакции в пиридине или в присутствии других органических оснований из хлорофилла образуется восстановленная форма красного цвета с характерным максимумом поглощения при 525 мμ; в других растворителях удавалось наблюдать обратимое понижение красного максимума поглощения пигментов при реакции фотовосстановления.

В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова (1953), продолжая в нашей лаборатории исследование реакции фотовосстановления, показали посредством потенциометрического метода, что при обратной реакции в темноте величина E_0 изменяется гораздо быстрее, чем количество красной восстановленной формы; можно было ожидать, что электродно-активной является первичная восстановленная форма, предшествующая красному соединению. Действительно, в опытах, проведенных при низкой температуре (с тем чтобы затормозить вторичные темновые процессы), В. Б. Евстигнееву и В. А. Гавриловой (1954) удалось показать различными методами образование при фотореакции первичных электродно-активных восстановленных форм феофитина и хлорофилла, менее устойчивых и более реакционноспособных, чем «красные» формы. Образованные при низкой температуре первичные восстановленные формы при повышении температуры могут перейти в «красное» соединение. Проводя фотореакцию хлорофилла с аскорбиновой кислотой, у которой водород замещен на дейтерий, мы с Г. П. Брин (1954б) наблюдали значительное замедление фотопроцесса. Наконец, тот факт, что обе восстановленные формы обладают близкой величиной E_0, указывает на одинаковый уровень восстановления обоих соединений. Работы нашей лаборатории указывают на то, что «первичная» восстановленная форма образуется в результате восприятия электрона возбужденной молекулой пигмента, тогда как вторичная «красная» форма, вероятно, образуется в результате присоединения протона к первичной форме. Образование свободных радикалов при фотовосстановлении хлорофилла подтверждают наблюдения над тем, что эта реакция инициирует процессы цепной полимеризации (Ури, 1952). Таким образом, работы нашей лаборатории указывают на следующее чередование элементарных процессов при реакции фотовосстановления хлорофилла:

1. Возбуждение молекулы хлорофилла при поглощении кванта света с ее переходом в длительно живущее, бирадикальное, состояние:

$$X + h\nu \rightarrow X^* \rightarrow \cdot X \cdot$$

2. Восприятие возбужденной молекулой хлорофилла электрона от его донора *HA*, с образованием пары ион-радикалов:

$$\cdot X \cdot + HA \rightarrow \cdot X^- + {}^+HA \cdot$$

3. Восприятие протона с образованием пары радикалов в неионной форме:

$$\cdot X^- + {}^+HA \cdot \rightarrow \cdot XH + \cdot A$$

4. Реакции диспропорционирования образованных радикалов:

$$2XH \rightleftarrows XH_2 + X \text{ и т. д.}$$

5. Перенос электрона (водорода) от фотовосстановленной формы хлорофилла к акцептору B, в результате чего осуществляется сенсибилизированная реакция:

$$\cdot X^- + B \rightarrow X + B^-; \quad \cdot B^- + H^+ \rightarrow \cdot BH; \quad 2 \cdot BH \rightarrow B + BH_2$$

$$\cdot XH + B \rightarrow X + \cdot BH; \quad 2 \cdot BH \rightarrow B + BH_2$$

Состояние и превращения хлорофилла в организмах

Выше мы описали результаты опытов, проведенных с хлорофиллом, выделенным из ткани растения. Естественно возникает вопрос: нельзя ли исследовать превращения хлорофилла непосредственно в хлоропластах и живых листьях растений?

Еще в исходных работах К. А. Тимирязева, М. С. Цвета, Д. И. Ивановского, В. И. Любименко было показано, что пигменты в растениях находятся в особом состоянии, сильно отличающемся от их состояния в растворе. Таким образом, для того чтобы изучить превращения пигментов в организмах, следует выяснить природу их состояния и связи с белками, липоидами и структурами клетки.

В нашей лаборатории исследовалось состояние пигментов в фотосинтезирующих организмах преимущественно при помощи спектральных и фотохимических методов. Состояние хлорофилла мы исследовали в процессе его образования и накопления в листьях высших растений; были также сделаны попытки изучить состояние хлорофилла в различных организмах в филогенетическом аспекте. Наконец, мы исследовали состояние в организмах пигментов, аналогов хлорофилла — протохлорофилла этиолированных листьев и оболочек семян тыквенных, а также и бактериохлорофилла фотосинтезирующих бактерий.

Прежде всего в наших работах с Л. М. Кособуцкой (1952, 1953, 1954), удалось установить, что состояние хлорофилла изменяется в процессе его образования: в начале зеленения этиолированного растения из протохлорофилла образуется фотохимически неустойчивая форма хлорофилла с максимумом поглощения при 670 мμ; его свойства соответствуют мономерному состоянию. По мере накопления хлорофилла в процессе зеленения его максимум поглощения в ткани растения постепенно перемещается до 677—678 мμ; при этом растет фотохимическая устойчивость пигмента. Состояние хлорофилла во взрослых листьях большинства растений характеризуется максимумом поглощения при 676—678 мμ. Это состояние весьма устойчиво и, как показали наши опыты, определяется агрегацией хлорофилла, находящегося в гранулах в высококонцентрированном состоя-

нии (Красновский и Кособуцкая, 1953, 1954; Красновский и Брин, 1948; Красновский, Кособуцкая, Войновская, 1953). Подобно хлорофиллу, своеобразные спектральные свойства бактериохлорофилла в фотосинтезирующих бактериях определяются агрегацией, взаимодействием между близко расположенными молекулами пигмента. Этот пигмент в бактериальной клетке обладает тремя характерными максимумами поглощения в близкой инфракрасной области спектра — при 800, 850 и 890 мμ, тогда как бактериохлорофилл в растворе, выделенный из клетки, обладает в этой области одним максимумом, обычно при 770 ± 10 мμ. Агрегированные формы этого пигмента — твердые пленки, коллоидные растворы обладают спектрами поглощения, сходными с пигментом в живых бактериальных клетках (Красновский, Войновская, Кособуцкая, 1952). Агрегация защищает лабильные молекулы пигмента от фотохимических и окислительных разрушающих воздействий; пигменты в агрегированных формах гораздо более устойчивы, чем пигменты в «мономерном» состоянии. Агрегация приводит к созданию буферного резерва, запаса пигмента, обеспечивающего к тому же более полное поглощение света.

Имеются данные, указывающие, что в хлоропластах растений существует равновесие между агрегированными и дезагрегированными формами хлорофилла, связанного с белками и липоидами, зависящее от внешних условий — температуры, интенсивности света. Так, нагревание ведет к дезагрегации, сдвигу равновесия в сторону мономерных форм пигментов, а также благоприятствует диссоциации непрочных соединений хлорофилла с белками и липоидами (Красновский и Кособуцкая, 1953; Кособуцкая и Красновский, 1954). Связь хлорофилла с белками вообще слаба; практически весь хлорофилл извлекается из клетки при действии органических растворителей, например, ацетона. Однако и вид связи хлорофилла с белками и липоидами не является постоянным; так, в опытах Т. Н. Годнева с сотрудниками (1947, 1948, 1949) и О. П. Осиповой (1947, 1953) было показано, что извлекаемость хлорофилла водным ацетоном различна у разных видов растений и зависит от их возраста.

Вероятно, наряду со связью хлорофилла в «мономерном» белково-липоидном соединении существует связывание тяжелых агрегированных частиц пигмента с белковой структурой гранул; наконец, лабильность связи хлорофилла с белком определяет его фотовосстановление и окисление на разных типах специфического белка, подобно, например, действию пиридин-нуклеотидов в дегидразных системах. Действительно, до сих пор не удалось обнаружить устойчивых белковых соединений хлорофилла постоянного состава, подобных, например, гемоглобину. В нашей работе с Г. П. Брин (1954а) не удалось подтвердить выводов Такашима (1952), описавшего выделение кристаллического хлорофилл-липопротеина; по нашим данным, эти кристаллы являются образованиями хлорофилла, не связанного с белками.

Данные, указывающие на фотохимическую активность «мономерных» форм хлорофилла в растениях, свидетельствуют, что именно эти формы непосредственно, химически, участвуют в фотореакциях фотосинтеза, тогда как главная масса хлорофилла гранул находится в устойчивой, резервной форме. По мере расходования и разрушения мономерных форм за счет побочных окислительных реакций, идущих особенно сильно в условиях интенсивного освещения и высокой температуры, активный хлорофилл поступает в систему реакций из «резерва»; потеря постепенно компенсируется путем непрерывно идущего новообразования, синтеза хлорофилла. Возможно и то, что «мономерным» является хлорофилл, находящийся на поверхности фазовой границе гранул,— мы знаем еще очень мало об их субмикроскопической структуре.

Представления об участии в реакциях именно мономерных форм пигментов пока нельзя считать полностью доказанными. Прежде всего возникают трудности при согласовании этой концепции с известными фактами

высокого квантового выхода фотосинтеза, близкого в оптимальных условиях к теоретическому пределу, когда практически весь свет используется для фотосинтеза, а ведь поглощает свет вся масса хлорофилла гранул, находящегося, главным образом в агрегированных формах. Из этого затруднения, однако, можно выйти, предположив, что энергия квантов света, поглощенных агрегированными формами, может передаваться мономерным формам пигмента.

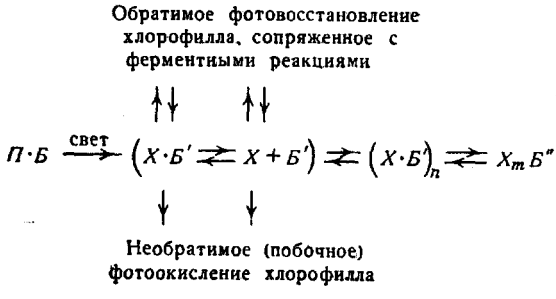


Рис. 1. Схема состояний хлорофилла;
П-протохлорофилл; *Б*-белок

Механизм такого рода «миграции энергии» может быть различным,— в известных работах С. И. Вавилова и его школы была показана «резонансная» передача энергии между возбужденными и невозбужденными молекулами красителя и растворах. Недавно А. Н. Теренин и В. К. Ермолаев (1952) показали возможность передачи энергии с переходом воспринимающей энергию молекулы в длительно-живущее бирадикальное (триплетное) состояние. Наконец, работы последних лет (Дюйсенс, 1951; Френч, 1952 и др.) показали существование в некоторых организмах — красных и сине-зеленых водорослях, пурпурных бактериях, — миграции энергии от фикобилинов и некоторых каротиноидных к хлорофиллу. Весьма вероятно, что и в этом случае мы имеем дело с передачей энергии квантов света от агрегированных форм упомянутых выше пигментов к мономерным формам хлорофилла.

Уместно указать здесь и то, что представления о передаче энергии внутри гранулы можно было бы обойти предположением, что свет поглощается преимущественно периферийной частью гранулы, где, вероятно, сосредоточены мономерные формы пигментов.

Итак, мы видим из изложенного выше, что задача обнаружения фотохимических превращений хлорофилла непосредственно в живых растениях — весьма трудная, превращения хлорофилла связаны со взаимопереходом его состояний; с трудностями такого рода мы не сталкивались при изучении свободного хлорофилла. Тесное сопряжение фотохимических и ферментных реакций также препятствует прямому обнаружению превращений хлорофилла в гранулах. Поэтому мы не смогли еще «увидеть» в прямых опытах элементарных процессов превращения хлорофилла в гранулах, подобно нашим опытам в растворах, хотя мы располагаем целым рядом косвенных свидетельств в пользу этого (Красновский, 1950; Красновский и Кособуцкая, 1952).

Для того чтобы следить за превращением хлорофилла непосредственно в хлоропластах живого растения, нужно располагать методами, которые не ведут к нарушению нормально функционирующего организма. В этом случае наиболее пригодны спектральные и изотопные методы исследования.

В литературе описаны попытки обнаружения меченого водорода в молекуле хлорофилла при фотосинтезе водорослей в среде, содержащей окиси трития и дейтерия. Эти опыты ставились, исходя из того предполо-

жения, что хлорофилл может испытывать обратимое фотохимическое окисление — дегидрирование, в результате которого лабильный атом водорода в его молекуле будет замещен меченым водородом. Однако в опытах с фотосинтезом водорослей в присутствии трития (Норрис, Рубен, Аллен, 1942) так же, как и в случае простых сенсибилизированных реакций, идущих с использованием дейтерированных доноров водорода (Вейгл и Ливингстон, 1952), не удалось констатировать включение меченого водорода в молекулах хлорофилла. Результаты этих опытов свидетельствуют в пользу наших представлений о том, что хлорофилл испытывает обратимое фотовосстановление, не удерживая в своей молекуле водородного атома донора. (Правда, те же результаты были получены и в случае обратимого окисления хлорофилла, идущего путем отдачи и приема электрона без вовлечения протона в систему этих реакций). При рассмотрении результатов подобных опытов следует учесть, что при длительном фотосинтезе организмов в среде, содержащей меченый водород, неизбежно включение его в хлорофилл вследствие непрерывно идущего новообразования этого пигмента.

Более перспективно изучать превращение хлорофилла в живых листьях, наблюдая изменение его спектров поглощения и флуоресценции в результате действия света. К сожалению, точное и быстрое измерение спектров поглощения и флуоресценция живых фотосинтезирующих организмов встречает пока ряд методических трудностей. Более простое измерение общей интенсивности флуоресценции хлорофилла в листьях растений при различных режимах фотосинтеза привлекло внимание многочисленных исследователей, например, лабораторий: Е. Вассинка (Голландия), Дж. Франка (США), Г. Каутского (Германия). Эти опыты описаны в обзоре Б. Я. Свешникова (1944) и в книге Е. Рабиновича (1951).

Обширный экспериментальный материал, полученный в этих лабораториях, интерпретируется главным образом в аспекте энергетики молекулы хлорофилла, без учета возможности биохимических превращений — изменения состояния и обратимых реакций флуоресцирующей мономерной формы хлорофилла. Ряд полученных этим методом результатов находит объяснение с точки зрения представлений о превращениях хлорофилла, полученных в наших работах. Приведем лишь два примера.

Типичная картина изменения флуоресценции хлорофилла в листьях растений после периода темноты, полученная в работах ряда авторов, объясняется, с точки зрения наших представлений о превращении хлорофилла, таким образом: усиление флуоресценции при перемещении листа из темноты на свет сопровождается переходом части хлорофилла из агрегированного в «рабочее» мономерное состояние; последующий период падения флуоресценции соответствует превращению части хлорофилла при фотореакции.

Вассинк с сотрудниками (1942) при действии восстановителей — доноров водорода на культуру фотосинтезирующих бактерий наблюдал уменьшение интенсивности флуоресценции бактериохлорофилла, что следует объяснить в соответствии с нашими работами фотовосстановлением пигмента в процессе фотосинтеза и, следовательно, уменьшением стационарной концентрации флуоресцирующей формы пигмента.

Наиболее вероятно то, что флуоресценция пластид определяется преимущественно мономерными формами пигментов, идентичными хлорофиллу (с максимумом поглощения при 670 мμ), свежеобразованному из протохлорофилла. Кроме наших работ, на это указывают измерения спектров флуоресценции у молодых, едва зазеленевших и «взрослых» листьев (Френч и Юнг, 1952). Положение главного максимума флуоресценции у «взрослых» листьев сдвинуто в сторону длинных волн (685 мμ) по сравнению с «молодыми» листьями (678 мμ) вследствие внутреннего поглощения коротковолновой части спектра флуоресценции при высокой концентрации хлорофилла в листьях. Однако второй максимум флуо-

ресценции, на положение которого гораздо меньше оказывается эффект внутреннего поглощения, лежит в обоих случаях при 730 мμ, что указывает на идентичность флуоресцирующей формы хлорофилла к разрушению фотолабильной мономерной формы и потере большей части флуоресценции листьев.

Нет сомнения в том, что исследование не только общей интенсивности флуоресценции, но и ее спектров приведет к получению данных, которые в сильной степени помогут при изучении превращения пигментов непосредственно в живых организмах.

Фикобилины и каротиноиды

Пигментная система всех растений обязательно содержит хлорофилл; фотосинтезирующие бактерии содержат бактериохлорофилл. Наряду с этими «главными» пигментами все фотосинтезирующие организмы содержат разнообразные каротиноиды. Сине-зеленые и красные водоросли содержат фикобилины: синий — фикоциан и красный — фикоэритрин. Исследования «спектров действия» фотосинтеза у различных организмов показали, что свет, поглощаемый фикобилинами и некоторыми каротиноидами, также используется для фотосинтеза.

Участвуют ли эти пигменты непосредственно, химически в цепи окислительно-восстановительных реакций фотосинтеза или энергия квантов света, ими поглощенного, передается хлорофиллу?

Известный экспериментальный материал говорит в пользу последнего предположения. Здесь прежде всего должны быть указаны опыты, в которых различные исследователи наблюдали явление сенсибилизированной флуоресценции хлорофилла под действием света, поглощенного фикобилинами и каротиноидами, что говорит о передаче энергии от этих пигментов хлорофиллу; обширная литература по этому вопросу рассматривается в обзоре А. Н. Теренина (1951).

Мы пытались обнаружить обратимые фотохимические превращения фикоэритрина красных водорослей, но столкнулись с чрезвычайно большой фотохимической устойчивостью и неактивностью этого пигмента, обладающего в водном растворе исключительно яркой флуоресценцией (Красновский, Евстигнеев, Брин, Гаврилова, 1952). Подобным образом нам не удалось обнаружить обратимых фотореакций каротиноидов и их участия в процессах переноса водорода.

Вероятно, именно мономерная форма хлорофилл-белково-липоидного соединения, непосредственно участвующая в системе реакций переноса водорода (электрона), воспринимает энергию квантов света, поглощенных «вспомогательными» пигментами растения.

О природе биохимических систем, непосредственно сопряженных с хлорофиллом

Опыты, которые мы описали выше, свидетельствуют о том, что активированная светом молекула хлорофилла способна участвовать в переносе электрона (водорода) «против» условий темнового равновесия, играя роль своеобразного фотокофермента.

Возникает вопрос, от каких соединений или биохимических систем хлорофилл «берет» этот водород (электрон) и каким соединением или системам передает его. Нет сомнения в том, что при фотосинтезе растений исходным донором водорода является вода, а конечным его восприемником, акцептором — углекислота. Однако далеко не так ясен вопрос о промежуточных системах, непосредственно реагирующих с хлорофиллом.

Так, например, и в процессе дыхания давно известны доноры водорода — сахара и конечный его акцептор — кислород. Однако ферменты,

переносящие водород, обычно непосредственно реагируют с промежуточными продуктами или системами в сложной многоступенчатой последовательности реакций. Так же и в случае фотосинтеза следует считать доказанным, что хлорофилл не взаимодействует с углекислотой; многочисленные опыты, в которых применяли углекислоту, меченную с радиоактивным изотопом углерода C^{14}, показали, что реакции фиксации и восстановления углекислоты при фотосинтезе являются ферментативными (темновыми) процессами, использующими фотохимически мобилизованный водород воды, поступающий в цикл реакции восстановления углекислоты в форме активных фотовосстановленных соединений (Красновский, 1950; Рабинович, 1951; Ничипорович, 1952).

Что это за восстановленные соединения, и как они связаны с хлорофиллом? Наши опыты с Г. П. Брин (1949) показали, что хлорофилл при освещении может переносить водород к окисленным формам простетических групп дегидразных ферментов — фосфопиридин-нуклеотидам и флавинам, приводя к их восстановлению; известно, что восстановленная форма пиридин-нуклеотидов может участвовать в системе реакций биохимического восстановления углекислоты. В ряде зарубежных лабораторий после наших опытов было показано, что хлорофилл в гранулах пластид способен к фотохимическому восстановлению пиридин-нуклеотидов, сопряженному с ферментативным восстановлением CO_2 (напр., Вишняк и Охоа, 1952).

В работах Н. М. Сисакяна с сотрудниками было показано, что в хлоропластах в числе многих ферментов сосредоточены различные дегидразы (Сисакян, 1951) Е. А. Бойченко обнаружила гидрогеназную активность хлоропластов.

Возможность участия ферментов в реакциях фотосинтеза исследовалась методом конкурентного торможения активности пиридин-нуклеотидных дегидраз никотинамидом; полученные результаты могут служить указанием на возможное участие дегидраз в реакциях фотосинтеза, хотя для достоверного решения этого вопроса нужна дальнейшая работа. (Сисакян, Красновский, Михайлова, Брин, 1953).

Какой же донор водорода непосредственно реагирует с хлорофиллом? Вступает ли молекула воды в фотохимическое взаимодействие с хлорофиллом или с ним взаимодействуют промежуточные доноры электрона (водорода), предварительно реагирующие с водой ферментативным, темновым, путем? Тот же вопрос возникает и в случае бактериального фотосинтеза, когда исходными донорами водорода являются соединения более активные (как восстановители), чем вода: сероводород, тиосульфат, многие органические соединения.

Мы не располагаем в настоящее время достоверным опытным материалом, указывающим на возможность прямого фотовзаимодействия хлорофилла с молекулой воды, тогда как в ряде опытов осуществлена реакция фотовосстановления хлорофилла более активным донорами водорода. Мы полагаем более вероятным, что вода сопряжена с хлорофиллом посредством промежуточных биохимических систем.

Если связь хлорофилла с системой реакций восстановления углекислоты осуществляется при помощи систем, обладающих высоким восстановительным потенциалом (пиридиннуклеотиды), то можно предполагать, что в «окислительной» части реакций фотосинтеза, ведущей к выделению кислорода воды, должны принимать участие ферменты и биохимические системы с высоким окислительным потенциалом — оксидазы, цитохромы, хинон — полифенольные системы. В связи с этим нужно указать, что в хлоропластах растений обнаружена цитохромоксидаза (Сисакян и Филиппович, 1949), а также ряд цитохромов (Давенпорт и Хилл, 1952; Хилл, 1954); в фотосинтезирующих бактериях (Элсден, Камен, Вернон, 1953) обнаружены в значительном количестве новые цитохромы. Широкий интервал величины E_0 цитохромных систем открывает возможность их непосредственного взаимодействия с хлорофиллом; например, величина E_0

цитохрома «в» ($E_0 = -0{,}05$ в) близка к величине E_0 аскорбиновой кислоты, ($E'_0 = +0{,}05$ в) легко реагирующей с хлорофиллом при освещении.

В наших работах с К. К. Войновской (1951, 1952) было показано, что некоторые исходные доноры водорода бактериального фотосинтеза, могут при освещении непосредственно взаимодействовать с бактериохлорофиллом; однако и здесь более вероятна предварительная «ферментная» переработка исходных доноров с возможным участием дегидразных и цитохромных систем.

Схема, изображенная на рис. 2, показывает включение хлорофилла в систему окислительно-восстановительных реакций фотосинтеза, где пиг-

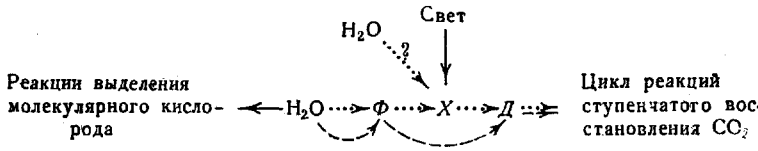


Рис. 2. Схема переноса водорода при фотосинтезе. *X* — хлорофилл; Ф, Д — сопряженные с ним ферментные системы; точки — путь электронов; тире — путь протонов.

менты «перекачивают» электроны за счет энергии квантов света, «против» условий темнового равновесия от воды к углекислоте, от более низкого к более высокому уровню, тогда как линия «транспорта» протонов, вероятно, может идти, минуя пигментные системы.

Заключение

В статье дано краткое изложение состояния вопроса о биохимической природе участия пигментов в реакциях фотосинтеза, основанного главным образом на работах лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР. Полученный экспериментальный материал дает возможность построить обоснованную фактами рабочую гипотезу об участии хлорофилла и бактериохлорофилла в реакциях фотохимического переноса электрона (водорода) при фотосинтезе и о включении пигментов в систему ферментативных окислительно-восстановительных реакций фотосинтеза.

Приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за обсуждение всего круга вопросов, затронутых в статье.

ЛИТЕРАТУРА

Бойченко Е. А. 1951. Вестник АН СССР, № 10, стр. 55.
Брин Г. П., Красновский А. А. 1951. Биохимия, **16**, 453
Годнев Т. Н., Осипова О. П. 1948. Изв. АН БССР, № 1, 17; 1947, ДАН **57**, 161.
Годнев Т. Н., Терентьев В., Пармон Н. 1949. Изв. АН БССР, № 1, 93
Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А. 1950, ДАН 74, 781; 1953, ДАН **91**, 899; 92, 381; 1954, ДАН, 95, 841.
Ивановский Д. И. 1913. О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях. Варшава.
Качан А. А., Даин Б. Я. 1951, ДАН **80**, 519.
Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. 1950, ДАН **74**, 103, 1953. Биохимия 18, 340; 1954, Биохимия 19, 37.
Красновский А. А. 1947, ДАН 58, 617, 835.— 1948а, ДАН 60, 421; 1948б, ДАН **61**, 91.— 1950. Успехи биол. химии, т. 1, стр. 473—505, изд. АМН.
Красновский А. А., Брин Г. П. 1948, ДАН, **63**, 163; 1949, ДАН 67, 325, 1950, ДАН **73**, 1239, ДАН 89, 527; 1954, ДАН **94**, 1025; 1954б, ДАН 95, 611.
Красновский А. А., Брин Г. П., Войновская К. К. 1949, ДАН, **69**, 393.
Красновский А. А., Войновская К. К. 1949, ДАН **64**, 663; 1951, ДАН 81, 879; 1952, ДАН 87, 109; 1954, ДАН 94, 1209.
Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М. 1952, ДАН **85**, 389.
Красновский А. А., Гаврилова В. А. 1951, ДАН, 81, 1105

Красновский А. А., Евстигнеев В. Б., Брин Г. П., Гаврилова В. А., 1952, ДАН 82, 947
Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. 1952, ДАН 82, 761; 95, 177, 1953, ДАН 91, 343.
Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К. 1953, ДАН 92, 1201
Ничипорович А. А. 1952. Природа, № 4, 37;— 1953. Тр. ин-та физиол. раст. АН СССР, т. 8, № 1.
Осипова О. П. 1947, ДАН, 57, 799; 1953, Тр. Ин-та физиол. раст. 8, 57.
Рабинович Е. И. 1951. Фотосинтез, т. 1, 11, ИЛ.
Сисакян Н. М. 1951 Ферментативная активность протоплазменных структур, Изд. АН.
Сисакян Н. М., Красновский А. А., Михайлова Е. С., Брин Г. П., 1953, Биохимия, 18, 725.
Сисакян Н. М., Филиппович И. И., 1949. ДАН 67, 337.
Теренин А. Н. 1947 Фотохимия красителей, Изд. АН; Изв. АН, Сер. биол., № 3, 369.
Теренин А. Н. 1950. Баховское чтение «Фотохимия хлорофилла и фотосинтез».
Теренин А. Н. 1951. Усп. физ. наук, 43, 347.
Теренин А. Н., Ермолаев В. Л., 1952, ДАН, 85, 547.
Тимирязев К. А. 1895. Nature, 32, 342; 1886, Nature, 52. Соч., т. 11, стр. 268, 270. Сельхозгиз (1947).
Davenport H., Hill R. 1952. Proc. Roy. Soc., 139, 326.
Duysens L. 1951. Nature, 168, 548.
Elsden S., Kamen M. D., Vernon L. 1953. J. Am. Chem. Soc., 75, 6347.
French C., Young V., 1952. J. Gen. Physiol. 35, 873.
Hill R. 1954. Nature, 174, 501.
Livingston R., Ryan V. I. 1953. Am. Chem. Soc. 75, 2176.
Norris T., Ruben S., Allen M., 1942. J. Am. Chem. Soc., 64, 3037.
Takashima S. 1952. Nature, 169, 182.
Uri N. 1952. J. Am. Chem. Soc., 74, 5808.
Vishniak W., Ochoa S. 1952. Symp. Phosporous Metabolism. v. 11.
Wassink E., Katz E., Dorrenstein R. 1942. Enzymologia 10, 285.
Weigl, I., Livingston R. 1952. J. Am. Chem. Soc., 74, 4160, 4211.

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

Статья поступила в редакцию
10 X 1954

Доклады Академии наук СССР
1955. Том 103, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

О ФОТОХИМИЧЕСКОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ХЛОРОФИЛЛА С ЦИТОХРОМАМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 22 III 1955)

В работах нашей лаборатории была показана способность хлорофилла и его аналогов к реакции обратимого фотохимического восстановления, идущей с «запасанием» энергии квантов света в нестойких фотопродуктах (1). Эта реакция может быть сопряжена с переносом водорода (электрона) от молекул-доноров (обычно аскорбиновой кислоты) к пиридин-нуклеотидам, рибофлавину, ряду красителей (2).

Таким образом, в модельных условиях удалось осуществить систему реакций фотохимического переноса водорода (электрона), следующих «против» условий темнового равновесия, с образованием восстановленных форм соединений, потенциально способных участвовать в ступенчатых реакциях ферментативного восстановления углекислоты. Эти опыты дали возможность обосновать вероятную модель сопряжения фотохимических реакций хлорофилла с темновыми реакциями восстановления углекислоты через посредство пиридин-нуклеотидов (2, 3), нашедшую подтверждение в ряде последующих работ с хлоропластами и гомогенатами листьев (4).

Однако остается неясным вопрос о пути вхождения воды в систему фотохимических реакций. Если реакции хлорофилла сопряжены с восстановлением углекислоты посредством систем с высоким восстановительным потенциалом ($E_0' = -0{,}32$ в), то можно ожидать, что реакции окисления исходных доноров водорода (воды) идут с участием железо-порфириновых соединений, обычно обладающих положительной величиной E_0' (3, 6, 14). Здесь наиболее вероятно участие цитохромов, являющихся универсальными переносчиками электронов при биохимических процессах. В хлоропластах обнаружены цитохромоксидаза (5) и ряд цитохромов (6). В клетках фотосинтезирующих бактерий также обнаружены цитохромы (7); показана возможность их фотоокисления в гомогенатах бактерий (8), а также в живых клетках бактерий и водорослей (9)* и при освещении зеленых листьев (10). Наблюдалось возрастание количества окисленных форм железа в хлоропластах после фотосинтеза (11). С другой стороны, описаны опыты, в которых наблюдалось фотохимическое восстановление цитохрома *c* при реакции Хилла; в темноте хлоропласты катализировали окисление цитохрома (12). На основании этих работ пока трудно решить, является ли окисление цитохромов на свету стадией фотосинтеза или вторичной реакцией, следствием образования при фотосинтезе кислорода или иных окислителей.

* В заметке Дюйвенса (9) описано обратимое появление максимума при 515 мμ после освещения суспензии хлореллы; обращает на себя внимание близость этой величины к максимуму поглощения фотовосстановленной формы хлорофилла (1), промежуточное образование которой вероятно и в живых организмах.

В связи с работами нашей лаборатории возникает вопрос о возможных путях сопряжения окислительно-восстановительных превращений цитохромов с реакцией фотовосстановления хлорофилла. Значения окислительно-восстановительных потенциалов указывают на то, что окисленный цитохром способен легко воспринять электрон фотовосстановленной формы хлорофилла (ХН). В работах нашей лаборатории было показано окисление ХН гематином и многими другими соединениями ([13]). Существенно также выяснить возможность использования восстановленного цитохрома (цит. Fe^{++}) как донора электрона при фотовосстановлении хлорофилла. В этой реакции в качестве донора мы обычно используем аскорбиновую кислоту, обладающую $E_0' = +0{,}05$ в. В связи с этим важно, что в хлоропластах, наряду с цитохромом *f* ($E_0' = +0{,}26$ в), обнаружен цитохром *b* ($E_0' = -0{,}05$ в), превосходящий по своей восстанавливающей способности аскорбиновую кислоту ([6]). Таким образом, трудно сомневаться в возможности легкого фотохимического восстановления хлорофилла цитохромом *b*; нужно исследовать, однако, реакции хлорофилла со всеми цитохромами, в том числе с цитохромами *c* и *f*, обладающими близкими значениями окислительно-восстановительного потенциала.

В нашей работе взаимодействие между хлорофиллом и цитохромом исследовалось посредством спектрофотометрических измерений на фотоэлектрическом приборе Бекмана. Измерение превращений цитохрома в присутствии хлорофилла облегчается тем обстоятельством, что максимум поглощения цит. Fe^{++} лежит в минимуме поглощения хлорофилла.

В описанных ниже опытах использовались препараты цитохрома *c*, выделенные из сердечной мышцы быка по Кейлину и Хартри*. Опыты велись в вакуумных трубках с диаметром около 1,2 см, приспособленных для спектрофотометрических измерений. Хлорофилл a и b выделяли обычными методами из листьев крапивы.

Обычно к 5 мл исходного раствора цитохрома (главным образом цит. Fe^{+++}) в фосфатном буфере ($^1/_{15}$ *M*, pH 7,48) приливали 0,3 мл раствора хлорофила $a + b$ в этиловом спирте, концентрация которого подбиралась с таким расчетом, чтобы оптическая плотность *K* смеси при 670 мμ, т. е. в максимуме поглощения хлорофилла, лежала в пределах 0,8—1,0. При этом хлорофилл осаждается на белках цитохрома, обладая в этом состоянии максимумом поглощения при 670 мμ. Флуоресценцию раствора наблюдать не удается. Концентрация цитохрома в растворе соответствовала величине *K* при 550 мμ около 1,2 в условиях полного восстановления гидросульфитом. Описанные ниже фотореакции происходили несколько быстрее при добавлении к раствору пиридина, оказывающего, согласно нашим наблюдениям, активирующее действие на реакции хлорофилла ([1, 2]). Однако введение уже 20% пиридина приводит к медленному темновому окислению цит. Fe^{++} на воздухе.

Из раствора удаляли воздух путем 3-минутного откачивания масляным насосом при взбалтывании содержимого трубки. За ходом дальнейших реакций следили путем измерений *K* при 670 мμ (хлорофилл) и 548 мμ (цит. Fe^{++}) (см. рис. 1 и 2). При стоянии 10 мин. в темноте не наблюдалось явных превращений компонентов. При освещении раствора на термостатируемой установке лампой накаливания 500 вт через красный светофильтр KG-2 (в фокусе конденсора, около 10^6 эрг/см^2·сек) наблюдалось повышение *K* при 548 мμ с появлением соответствующего максимума цит. Fe^{++}; таким образом, про-

* Часть препаратов была любезно предоставлена нам лабораториями Д. М. Михлина и Л. А. Блюменфельда.

исходило сенсибилизированное хлорофиллом восстановление цит. Fe^{+++} за счет имеющихся в среде доноров водорода (вероятно, белки, спирт, вода). При этом наблюдалось небольшое падение K при 670 мμ за счет необратимого фотохимического разрушения хлорофилла. Молярный коэффициент погашения цит. Fe^{++} при 550 мμ приблизительно втрое меньше, чем у хлорофилла при 670 мμ; поэтому количество изменившегося хлорофилла было гораздо меньше, чем количество образовавшегося цит. Fe^{++}. После пуска воздуха в трубку и освещения наблюдалось падение K при 548 мμ, свидетельствующее о сенсибилизированном окислении цит. Fe^{++}.

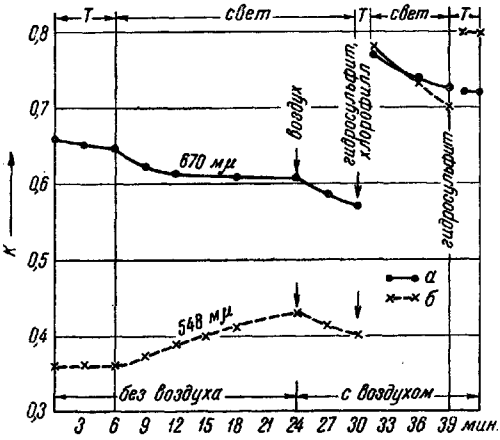


Рис. 1. Фотохимическое восстановление и окисление цитохрома, сенсибилизированное хлорофиллом. Температура 20°. 0,7 мл исходного раствора цитохрома; 4 мл фосфатного буфера ($^1/_{15}$ M, pH 7,48); 0,3 мл раствора хлорофилла в спирте. Удаление воздуха. Освещение красным светом (>620 мμ). $а$ — K в максимуме хлорофилла (670 мμ); $б$ — K цит. Fe^{++} при 548 мμ.

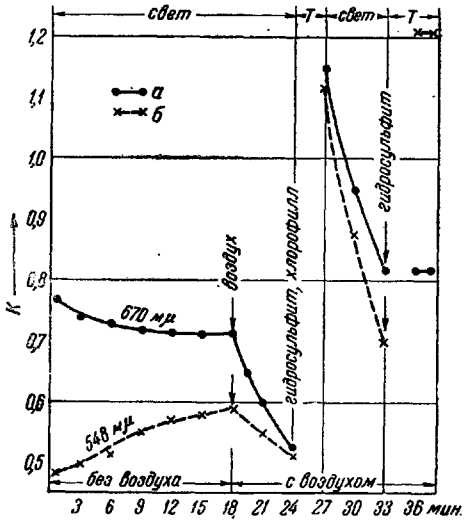


Рис. 2. Фотохимическое восстановление и окисление цитохрома, сенсибилизированное хлорофиллом в присутствии пиридина. Температура 20°. 1,0 мл исходного раствора цитохрома; 4 мл фосфатного буфера ($^1/_{15}$ M, pH 7,48); 0,3 мл раствора хлорофилла в спирте; 0,6 мл пиридина. Удаление воздуха. Освещение красным светом. $а$ — K в максимуме хлорофилла (670 мμ); $б$ — K цит. Fe^{++} при 548 мμ

Для того чтобы наблюдать эту реакцию фотоокисления цит. Fe^{++} кислородом воздуха в более явной форме, ее можно вести с предварительно восстановленным раствором цитохрома. Для этого к исходному раствору цитохрома добавляли по каплям раствор гидросульфита в буфере (pH 7,48), наблюдая при помощи спектрофотометра за ростом величины K при 548 мμ. «Спектрофотометрическое титрование» проводили, восстанавливая до 90% цитохрома, избегая, таким образом, избытка восстановителя. К раствору цитохрома добавляли спиртовый раствор хлорофилла и, в случае нужды, пиридин.

При освещении раствора через красный светофильтр в присутствии воздуха наблюдалось падение K при 548 мμ, свидетельствующее о сенсибилизированном окислении цит. Fe^{++}; введение гидросульфита после фотореакции приводило к повышению величины K при 548 мμ вследствие обратимого восстановления окисленного на свету цитохрома. Существенно, что при освещении падает также K при 670 мμ из-за сопутствующего реакции окисления хлорофилла. В тех же условиях хлорофилл без цитохрома окисляется медленнее. Следует отметить, что освещение раствора цит. Fe^{++} белым светом (без светофильтра) ведет к его медленному фотоокислению.

В работах нашей лаборатории было показано, что механизм сенсибилизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакций состоит из световой стадии — восприятия молекулой хлорофилла электрона (водорода) молекулы-донора и темновой стадии — передачи электрона (водорода) от фотовосстановленной формы хлорофилла к молекуле-акцептору ([2], [3], [15]). В соответствии с этим можно предположить следующий элементарный механизм исследованных реакций, при которых цит. Fe^{++} и цит. Fe^{+++} могут играть роль донора и акцептора электрона (обозначения: X — хлорофилл, AH — донор электрона).

1) Фотовосстановление цитохрома

$$X + AH \xrightarrow{h\nu} AH^+ + X^-;\ X^- + \text{цит. } Fe^{+++} \rightarrow X + \text{цит. } Fe^{++};\ AH^+ \rightleftarrows A + H^+ \text{ и т. д.}$$

2) Фотоокисление цитохрома

$$X + \text{цит. } Fe^{++} \xrightarrow{h\nu} X^- + \text{цит. } Fe^{+++};$$

$$X^- + O_2 \rightarrow NO_2^- \xrightarrow{+H^+} \begin{cases} \text{необратимое окисление X} \\ \text{регенерация X (например, } X + HO_2 \text{ и т. д.)} \end{cases}$$

Элементарным фотопроцессом при второй схеме является перенос электрона от цитохрома к хлорофиллу; мы пока не смогли обнаружить обратимой реакции цит. Fe^{++} и хлорофилла в анаэробных условиях при помощи спектрофотометрического метода, вероятно, из-за быстрого обращения реакции в темноте; однако в присутствии кислорода, сдвигающего равновесие путем быстрой реакции с фотовосстановленным хлорофиллом, образуется цит. Fe^{+++}.

Описанные выше опыты, наряду с известными литературными данными, позволяют высказать предположение, что и при фотосинтезе цитохромы могут включаться в систему реакций переноса электрона, сопряженных с реакциями фотохимического переноса электрона хлорофиллом.

Приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за внимание и помощь в работе.

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

Поступило
11 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952); В. Б. Евстигнеев, В. К. Гаврилова, ДАН, **95**, 841 (1954); **98**, 1017 (1954). [3] А. А. Красновский, Усп. биол. хим., **1**, 493 (1950); Изв. АН СССР, сер. биол., № 2 (1955). [4] W. Vishniac, S. Ochoa, Nature, **167**, 768 (1951); L. Tolmach, Arch. Biochem, **33**, 120 (1951); D. I. Arnon, Nature, **167**, 1008 (1951). [5] Н. М. Сисакян, И. И. Филиппович, ДАН, **67**, 517 (1949). [6] H. Davenport, R. Hill, Proc. Roy. Soc., **139**, 326 (1952); R. Hill, Nature, **174**, 501 (1954). [7] S. R. Elsden, M. D. Kamen, L. P. Vernon, J. Am. Chem. Soc., **75**, 6347 (1953). [8] L. P. Vernon, M. D. Kamen, Arch. Biochem. Biophys., **44**, 298 (1953). [9] L. N. M. Duysens, Science, **120**, 353 (1954). [10] H. Lundegardh, Physiol. Plantarum, **7**, 375 (1954). [11] Е. А. Бойченко, Физиол. растений, **1**, 57 (1954). [12] A. I. Rosenberg, G. Ducet, C. R., **229**, 391 (1949); **233**, 1674 (1951). [13] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950). [14] Е. Рабинович, Фотосинтез, 1, ИЛ., 1951. [15] Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности, Изд. АН СССР, 1955, стр. 92.

Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 3

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

АКТИВНАЯ ФОРМА ХЛОРОФИЛЛА В КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВА ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЕВ И ЕЕ ОБРАТИМЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 V 1955)

В наших работах (1) было установлено, что хлорофилл, свежеобразованный из протохлорофилла, находится в фотохимически активной форме, обладая в этом состоянии главным максимумом поглощения при 670 мμ; в процессе зеленения и накопления хлорофилла в гранулах его максимум поглощения постепенно перемещается к 678 мμ, что сопровождается ростом фотохимической устойчивости пигмента. Однако на всех стадиях образования и во «взрослых» растениях содержится фотохимически лабильная форма хлорофилла. Выцветание этой формы при сильном освещении приводит к значительному ослаблению флуоресценции листьев и к потере флуоресценции коллоидного раствора вещества зеленых листьев, теряющего при этом способность к реакции Хилла. Эти наблюдения привели нас к предположению, что именно активная флуоресцирующая форма хлорофилла в листьях растений непосредственно, химически участвует в реакциях фотосинтеза; равновесие между устойчивыми агрегированными и активными мономерными формами хлорофилла определяется физиологическими условиями, в которых находится растение. Опыты, в которых наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла при интенсивном освещении красных водорослей, свидетельствуют о наличии фотолабильной флуоресцирующей формы хлорофилла и у этих организмов (2).

В данной работе нам удалось найти условия, приводящие к увеличению количества активной формы хлорофилла в «зеленых» растворах» и показать ее способность к обратимым фотохимическим превращениям.

Работу мы вели преимущественно с листьями сахарной свеклы (сорта Уладовка и Верхнячка), выращенными из корней, в вазонах с почвой при двух вариантах освещения. Растения, росшие у окна, обладали темнозелеными листьями, с обычным состоянием хлорофилла (максимум поглощения 678 мμ); листья, выросшие на рассеянном свете в глубине комнаты, имели бледнозеленую окраску и большее количество мономерной формы, обладая максимумом поглощения при 672—673 мμ. Листья измельчали в ступке с фосфатными буферными растворами $^1/_{15}$ *M*, pH 4,8 и 8,5. Кашицу отжимали через полотно и центрифугировали 10 мин. при 3500 *g*. Полученный «зеленый раствор» смешивали с глицерином в отношении 4 : 6. Все эти операции вели при затемнении комнаты. Применение в качестве среды водного глицерина позволяет получить прозрачные и устойчивые (в коллоидном смысле) вязкие «растворы», допускающие точные спектрофотометрические измерения и работу при низких температурах. Добавление глицерина не влияет на положение красного максимума поглощения хлорофилла; водно-глицериновые растворы сохраняют способность к реакции Хилла (по фенолиндофенолу), что, в соответствии с нашими

предыдущими исследованиями ([3]), может служить указанием на сохранение естественного состояния хлорофилла. «Зеленый раствор» приводили к величине оптической плотности (K) 0,6—0,7 в красном максимуме поглощения при толщине слоя 1—1,2 см. Опыты вели в вакуумных трубках или круглых кюветах.

Трубку с «зеленым раствором» поочередно помещали в держатель спектрофотометра Бекмана и в стеклянный цилиндр, где циркулировала вода из термостата или, в опытах при —40°, в смесь ацетона с твердой углекислотой; трубку в цилиндре освещали 500-ваттной киноламповой через конденсор и красный светофильтр RG-2 (около 10^6 эрг/см^2 · сек).

В процессе выцветания наблюдали за кинетикой падения K в красном макимуме поглощения хлорофилла. Измерения вели по следующему графику времени (от начала освещения) : 5, 10, 15, 30, 60, 120, 300 сек. Интервал между окончанием освещения и измерением составлял обычно 10 сек.

Кинетика выцветания хлорофилла в водных и водно-глицериновых «зеленых растворах» указывает на то, что наряду с формами хлорофилла, устойчивыми к действию света, имеется лабильная форма хлорофилла, выцветающая в течение первых секунд освещения. Количество этой формы зависит от стадии развития растения, температуры и pH «раствора».

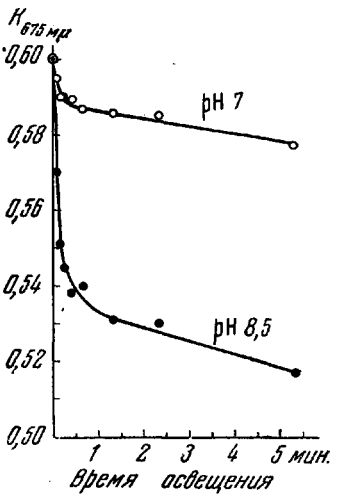


Рис. 1. Кинетика выцветания хлорофилла в «зеленых растворах» из листьев свеклы

У «зеленых растворов», приготовленных из светлозеленых листьев свеклы, количество быстро выцветающей формы мало зависит от pH в пределах pH 7—8,5, тогда как у «растворов» из темнозеленых листьев при pH 8,5 выцветает в 2—4 раза больше хлорофилла, чем при pH 7 (рис. 1). У молодых листьев тополя при pH 8,5 выцветает в 5 раз больше хлорофила, чем при pH 4,8. Количество выцветающей формы хлорофилла в ряде опытов достигало 20% от общего количества хлорофилла. При pH 8,5 наблюдается сдвиг красного максимума поглощения хлорофилла на 1—2 мμ в коротковолновую сторону, по сравнению с pH 7, что следует объяснить дезагрегацией белковолипоидного соединения хлорофилла.

Выцветание приводит к потере флуоресценции «зеленых растворов», наблюдаемой через светофильтр RG-5 при возбуждении линиями ртути 365 м. При выцветании наблюдается перемещение красного максимума поглощения на 1,5—2 мμ в длинноволновую сторону за счет разрушения «формы 670».

Скорость и глубина выцветания хлорофилла в «зеленых растворах» при 30° намного выше, чем при 20°, что может служить указанием на постоянный сдвиг равновесия между агрегированными и мономерными формами за счет быстрого выцветания последних. Нагревание выше 40—45°, увеличивая выцветание, приводит к необратимому изменению состояния хлорофилла.

Получение «зеленых растворов», содержащих большое количество активной формы хлорофилла, позволяет исследовать его фотохимические превращения теми методами, которые применялись в нашей лаборатории для исследования растворов хлорофилла в органических растворителях.

Освещение «зеленых растворов» в присутствии воздуха уже в первые секунды приводит к быстрому падению оптической плотности K в красном максимуме поглощения; после выключения света в темноте в течение не-

скольких секунд наблюдается некоторое обратное увеличение K; те же явления наблюдаются, если в среде присутствует аскорбиновая кислота, предварительно нейтрализованная Na_2HPO_4 (рис. 2). При —40° фотоокисление и обратная реакция также наблюдаются, но идут гораздо медленнее. Эти явления можно объяснить обратимым окислением хлорофилла кислородом воздуха, исследованным в работах нашей лаборатории. При фотоокислении ([4]), так же как и при темновом окислении перекисями ([5]), пигменты образуют наряду с продуктами деструктивного окисления лабильные окисленные соединения, из которых удается регенерировать пигменты в темноте при действии восстановителей.

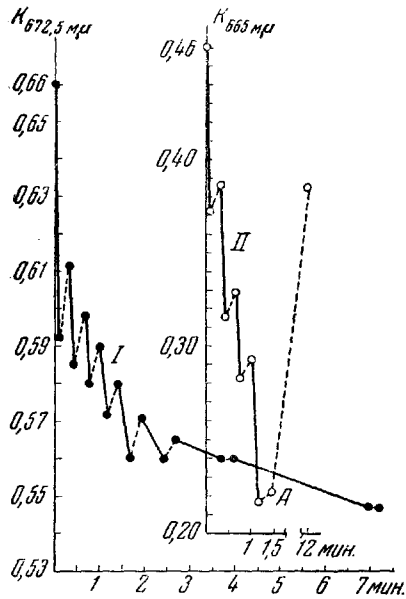


Рис. 2. Обратимое окисление хлорофилла. Сплошные линии — свет; пунктир — темнота. *I* — «зеленый раствор» листьев свеклы, pH 8,5; *II* — раствор хлорофилла a + b в смеси спирт — глицерин (3,5 : 6,5). В точке *A* введена аскорбиновая кислота

Те же явления, что и в «зеленых растворах», наблюдаются в случае применения спирто-глицериновых растворов хлорофилла a + b; повидимому, в этих опытах глицерин играет роль восстановителя, реагирующего с лабильными окисленными соединениями. Образование этих соединений сопровождается увеличением поглощения в области 520—550 мμ; их восстановление ведет к падению K в этой области спектра ([4, 5]).

В случае удаления воздуха при длительном откачивании водно-глицериновых «зеленых растворов» не удается наблюдать значительного необратимого выцветания хлорофилла. В результате кратковременного освещения наблюдается падение K в максимуме поглощения хлорофилла с возвращением K в темноте и после пуска воздуха (рис. 3). Потенциометрические измерения показывают изменение потенциала инертного электрода в «зеленом растворе» (без воздуха) в отрицательную сторону с быстрым возвращением в темноте.

Эти опыты указывают на то, что без воздуха происходит обратимое фотовосстановление хлорофилла присутствующими в среде донорами водорода. Введение аскорбиновой кислоты приводит к малому увеличению эффекта. При —40° не удается наблюдать обратимого выцветания. В спиртно-глицериновом растворе хлорофилла a+b наблюдаются те же явления (рис. 3). Изученная ранее в работах нашей лаборатории реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла при 20° сопровождается падением максимумов поглощения хлорофилла с образованием долгоживущих фотопродуктов ([6]); при температуре —40° не удается наблюдать этого явления вследствие быстрых обратных реакций первичных фотопродуктов ([7]), что соответствует нашим наблюдениям над «зеленым раствором».

Таким образом, наши опыты показывают, что фотоактивная флуоресцирующая мономерная форма хлорофилла (вероятно, связанного с липопротеинами гранул) в «зеленых растворах» способна к обратимым фотохимическим превращениям, подобным превращениям «мономерных» форм хлорофилла в истинных растворах.

В заключение следует указать, что наши наблюдения позволяют предложить единое объяснение обширного материала по изучению флуоресценции хлорофилла в листьях (см., напр. ([8])), интерпретируемого в рабо-

тах ряда авторов главным образом в аспекте энергетики молекулы хлорофилла без учета возможности его биохимических превращений — изменения состояния и обратимых реакций флуоресцирующей мономерной формы пигмента. Мы приходим к тому выводу, что описанные изменения флуоресценции обычно являются следствием изменения состояния и фотохимических превращений флуоресцирующей мономерной формы хлорофилла. Обычно наблюдавшееся в работах ряда авторов начальное возрастание флуоресценции листьев при их освещении после периода темноты следует объяснить образованием «рабочей» мономерной формы хлорофилла (вероятно, за счет фотодезагрегации или новообразования). Падение флуоресценции при дальнейшем освещении листьев следует объяснить превращениями мономерной формы — уменьшением ее фотостационарной концентрации при вовлечении хлорофилла в систему реакций фотосинтеза ([1,9]).

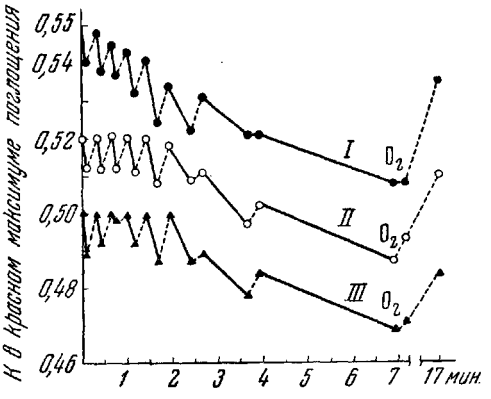


Рис. 3. Обратимое восстановление хлорофилла. Сплошные линии — свет, пунктир — темнота. *I* — «зеленый раствор» листьев свеклы, pH 8,5 ($K_{672,5}$ мμ); *II* — то же с добавкой 2,5 мг аскорбиновой кислоты; *III* — раствор хлорофилла а + b в смеси спирт — глицерин (3,5 : 6,5) (K_{665} мμ)

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за внимание и обсуждение работы.

Поступило
18 V 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177 (1952); 91, 343 (1953); Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 19, 37 (1954); А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, 92, 1201 (1953). [2] C. S. French, V. K. Young, J. Gen. Physiol., 35, 873 (1952). [3] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 340 (1953). [4] А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [5] А. А. Красновский, ДАН, 58, 835 (1947). [6] А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948). [7] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 92, 381 (1953); 95, 841 (1954); 98, 1017 (1954). [8] J. Franck, Symp. Soc. Exper. Biol., 5, 160 (1951); E. C. Wassink, Adv. Enzymol., 11, 91 (1951). [9] А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 122 (1955).

Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и А. В. УМРИХИНА

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ РЕАКЦИИ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 7 VII 1955)

Следовало ожидать, что элементарный процесс восприятия электрона молекулой хлорофилла (X) в длительно живущем бирадикальном состоянии ([1]) от молекулы-донора (AH), приведет к первичному образованию пары ион-радикалов, в соответствии со схемой, приведенной в нашей работе ([2] а):

$$\cdot X \cdot + AH \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH^+.$$

Недавно в нашей лаборатории было обнаружено увеличение электропроводности при реакции фотовосстановления ([3]), что, действительно, свидетельствует об образовании ионов в результате фотопроцесса. Однако желательно получить экспериментальные доказательства образования свободных радикалов при этой реакции.

В данной работе мы использовали метод инициирования цепной полимеризации, нашедший применение при исследовании фотохимического образования свободных радикалов в растворах.

В литературе имеются указания о том, что исследованная в наших работах система хлорофилл — аскорбиновая кислота приводит к сенсибилизированной фотополимеризации метилметакрилата ([4]). Было также показано, что ряд красителей в присутствии аскорбиновой кислоты и кислорода воздуха при освещении инициируют полимеризацию ([5]). Целью нашего исследования было установление связи между образованием радикалов и фотовосстановлением хлорофилла и его аналогов. Мы предполагали также исследовать ряд доноров электрона (водорода), не приводящих к заметному накоплению продуктов фотовосстановления, определяемых спектральными методами; можно было думать, что большой «коэффициент усиления» из-за цепного характера полимеризации дал бы возможность обнаружить образование радикалов в таких системах, где спектральные методы оказались недостаточными.

Подготовка реагентов. Хлорофилл, бактериохлорофилл и протохлорофилл выделяли из организмов обычными модификациями хроматографического метода, принятыми в нашей лаборатории.

Реактивный метилметакрилат многократно промывали 10%-м раствором соды (1 : 1) для удаления стабилизатора — гидрохинона, затем отмывали водой и сушили над хлористым кальцием. Завершающая стадия очистки проводилась перед опытом в вакуумной трубке Тунберга. В боковой отвод трубки вводили мономер, из трубки удаляли воздух и освещали светом ртутно-кварцевой лампы ПАРК-2 до начала полимеризации (обычно 10 мин. на расстоянии 15 см от лампы); затем, охлаждая нижнюю часть трубки до —30°, перегоняли в нее мономер из бокового отвода, в котором оставалась тонкая пленка полимера, связывающего примеси.

Фотосенсибилизированная полимеризация в растворе. Опыты проводились по следующей схеме: 2 мл эфирного раствора хлорофилла требуемой концентрации (обычно 10^{-5} мол/л) испаряли в вакууме в трубке Тунберга, затем вводили донор водорода (обычно 5 мг) и 2 мл смеси метилметакрилата с пиридином в отношении 3 : 1, которое, как показали наши опыты, является оптимальным.

Содержимое трубки откачивали вакуумным масляным насосом при энергичном взбалтывании и охлаждении, после чего раствор в трубке освещали красным светом (через фильтр Rg-2) с интенсивностью около 10^6 эрг/см^2 · сек. на установке, состоящей из киноламлы 500 в с конденсором и сосуда, в котором циркулировала вода из термостата с температурой 20°. После реакции 0,5 мл раствора вводили в 5 мл метилового спирта и о количестве выпавшего полимера судили путем нефелометрических измерений по сравнению с темновым контролем. Этот метод дает приближенные результаты и наиболее пригоден при неглубокой полимеризации; большое количество полимера выпадает в виде хлопьевидного осадка.

Опыты с различными концентрациями хлорофилла показали, что увеличение концентрации хлорофилла выше $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ мол/л приводит к торможению реакции.

Исследование длительности освещения показало, что значительная полимеризация достигается через 15—30 мин. Столь же эффективным оказалось кратковременное освещение (1 мин.) с последующей темновой выдержкой, при которой происходило развитие цепного процесса. В темноте без предварительного освещения реакция не идет, так же как и при освещении без пигмента.

Испытания ряда доноров водорода привели к следующим выводам. Наиболее активно полимеризация идет в присутствии аскорбиновой и диоксималеиновой кислот. Остальные испытанные соединения приводили к меньшим эффектам; по силе действия их можно расположить в следующий ряд: глютаминовая, щавелевая, яблочная, янтарная, уксусная, пировиноградная, лимонная кислота, глюкоза. В присутствии пирокатехина и фенилгидразина полимеризация вообще не шла, что следует объяснить вторичным ингибирующим действием этих соединений. Без донора водорода также наблюдалось образование небольшого количества полимера. Возможно, что в этом случае растворитель играет роль донора водорода, хотя нельзя считать исключенным возможность инициирования полимеризации бирадикальной формой хлорофилла. Вероятно, однако, что в присутствии активного (как донора электрона) растворителя стационарная концентрация первичной фотовосстановленной формы превосходит стационарную концентрацию пигмента в бирадикальном состоянии.

Чтобы установить связь между образованием радикалов, инициирующих полимеризацию и реакцией фотовосстановления пигмента, мы вводили в реакционную среду акцепторы водорода, быстро реагирующие с фотовосстановленной формой хлорофилла, но не реагирующие с исходными донорами водорода. Согласно работам нашей лаборатории, для этой цели использованы сафранин Т и рибофлавин ([6]).

Действительно, введение в систему хлорофилл — аскорбиновая кислота сафранина Т с коэффициентом погашения 1,0 при 540/мμ и рибофлавина с коэффициентом погашения 1,0 при 445 мμ приводило к подавлению сенсибилизированной полимеризации, возбуждаемой красным светом, который не поглощают сафранин и рибофлавин; вероятно, происходит быстрое диспропорционирование семихинонов — продуктов восприятия электрона и протона молекулами красителей, что приводит к снижению стационарной концентрации радикалов, генерируемых красным светом.

Опыты в эмульсиях. Для того чтобы иметь возможность исследовать ряд растворимых в воде доноров водорода, мы осуществили реакции в гетерогенных системах, где хлорофилл находился в растворенном

состоянии (в каплях метилметакрилата), а донор водорода — в водной эмульсионной среде. Чтобы избежать значительного светорассеяния, которым обладают мутные эмульсии обычного типа, мы разработали способ приготовления прозрачных эмульсий, в которых дисперсионной средой служил 46%-й водный раствор сахарозы, имеющий тот же показатель преломления, что и метилметакрилат. В качестве эмульгатора в большинстве опытов использовали 0,5%-й раствор яичного альбумина в 1/15 *М* Na_2HPO_4.

В вакуумную трубку вводили 2 мл эфирного раствора хлорофилла с коэффициентом погашения $2 \cdot 10^{-5}$ мол/л. После испарения в вакууме эфирного раствора добавляли 2 мл свежеперегнанного метилметакрилата.

В 2 мл раствора яичного альбумина растворяли 2 г сахарозы и 5 мг донора водорода. Полученный раствор приливали к раствору хлорофилла и взбалтывали, а затем «дотитровывали» водой до полной прозрачности. Получалась прозрачная зеленая эмульсия, обладающая характерной красной флуоресценцией хлорофилла. После эвакуирования с охлаждением до —10° в течение 3 мин. (при энергичном встряхивании) эмульсию освещали красным светом в течение 15 мин. в условиях, описанных выше. В случае активной фотополимеризации эмульсия загустевала в форме геля. При менее активной полимеризации эмульсию разрушали добавлением 1 мл ледяной уксусной кислоты с последующим центрифугированием в течение 10 мин. при 3000 *g* для разделения фаз. Прозрачный верхний слой метилметакрилата испытывали на присутствие полимера вышеописанным методом. В этих опытах аскорбиновая кислота и цистеин приводили к весьма энергичной фотополимеризации с гелеобразованием. Введение в систему ряда солей железа, многие из которых в условиях опыта образовывали взвесь основных фосфатов, привело к следующим результатам. Соединения двухвалентного железа — сульфат, соль Мора и калий-оксалат приводили к энергичной полимеризации, тогда как в присутствии соответствующих солей трехвалентного железа полимеризации в условиях опыта не наблюдалось, что свидетельствует о возможности восприятия электрона хлорофиллом от соединений двухвалентного железа.

Мы исследовали участие в реакции цитохрома С, выделенного из сердечной мышцы быка обычным методом Кейлина и Хартри. Раствор цитохрома служил также эмульгатором — в этих опытах не было необходимости добавлять яичный альбумин. В отличие от опытов с неорганическими солями железа, как окисленный, так и восстановленный цитохром приводили к неглубокой полимеризаци. Возможно, что это связано с фотохимическим взаимодействием хлорофилла с цитохромом по схеме, приведенной в нашей работе ([7]). Контрольные опыты в темноте не приводили к полимеризации. В эмульсиях в отсутствие вводимого извне донора наблюдалась незначительная фотополимеризация. Поведение хлорофилла, бактериохлорофилла и протохлорофилла было сходным в большинстве опытов. В опытах с бактериохлорофиллом освещение вели через светофильтр Rg-5.

Возможность использования белков для стабилизации эмульсии привела нас к опытам, при которых в качестве эмульсионной среды использовался зеленый коллоидный раствор вещества зеленых листьев, приготовленный обычным в нашей лаборатории методом (например, ([9])). При взбалтывании «зеленого раствора» с метилметакрилатом последний экстрагирует хлорофилл; освещение красным светом эвакуированного раствора приводило к полимеризации, что указывает на присутствие в «зеленом растворе» доноров водорода, способных к фотохимическому взаимодействию с хлорофиллом.

Об участии кислорода в реакции. На воздухе полимеризация не идет; однако введение около 1% кислорода в трубку после откачивания не препятствует полимеризации. В системе хлорофилл —

донор водорода — кислород происходит энергичное сенсибилизированное окисление донора с практически полным потреблением кислорода ([8]). При этом возможно образование промежуточных продуктов восстановления кислорода (HO_2, H_2O_2), которые могут инициировать полимеризацию.

Мы пытались особо тщательно удалять следы кислорода в системе путем длительного освещения мономера (в боковом отводе трубки) ультрафиолетом в вакууме перед опытом, проводимым в нижней части той же трубки. Однако и в этих условиях сенсибилизованная полимеризация шла столь же энергично. Если допустить все же, что в системе остаются следы кислорода, участвующего в реакции, то образование радикалов при действии красного света, вероятно, идет также через стадию промежуточного фотовосстановления хлорофилла (X), например:

$$X + AH \xrightarrow{h\nu} \cdot X^- + \cdot AH^+ \rightarrow \cdot XH + \cdot A,$$

$$\cdot XH + O_2 \rightarrow X + HO_2\cdot \text{ и т. д.},$$

на что указывают исследования нашей лаборатории над механизмом сенсибилизированных хлорофиллом реакций ([10]).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу тех схем фотосинтеза, согласно которым первичным химическим результатом действия света на хлорофилл является образование свободных радикалов; данные опытов могут быть поставлены в связь с недавно обнаруженным явлением красной хемилюминесценции в листьях и гомогенатах ([11]), являющейся, повидимому, следствием обратных реакций радикалов, образуемых при фотохимических стадиях фотосинтеза.

Заключение. В работе показано образование свободных радикалов при реакции фотовосстановления хлорофилла и его аналогов под действием красной и близкой инфракрасной области спектра. В качестве донора электрона при фотореакции с хлорофиллом может быть использован широкий круг биохимически важных соединений, в том числе соединения двухвалентного железа.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину и проф. Х. С. Багдасарьяну за советы и обсуждение работы.

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

Поступило
28 VI 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Терении, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 369 (1947); Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947. [2] а) А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); б) А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **96**, 1025 (1954). [3] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **103**, № 1 (1955). [4] N. Uri, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5808 (1952). [5] G. Oster, Nature, **173**, 300 (1954). [6] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952); В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **98**, 107 (1954). [7] А. А. Красновский, ДАН, **103**, № 2 (1955). [8] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947). [9] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **104**, № 3 (1955). [10] А. А. Красновский, Сборн. докл. Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности, Изд. АН СССР, 1955. [11] B. L. Strehler, W. A. Arnold, J. Gen. Physiol., **34**, 809 (1951); W. Arnold, T. Davidson, J. Gen. Physiol., **37**, 677 (1954).

ФОТОХИМИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ФОРМА ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ И ЕЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ

Л. М. ВОРОБЬЕВА и *А. А. КРАСНОВСКИЙ*

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

В наших предыдущих работах [1] было обнаружено, что хлорофилл, свежеобразованный из протохлорофилла, находится в фотохимически активной форме, чрезвычайно быстро разрушающейся при освещении красным светом высокой интенсивности. Главный красный максимум этой формы хлорофилла в естественном состоянии расположен при 670 mμ. В процессе зеленения этиолированных проростков и накоплении в них хлорофилла максимум поглощения постепенно перемещается в длинноволновую сторону до 678 mμ; одновременно с этим происходит постепенное возрастание светоустойчивости пигмента. Однако на всех стадиях накопления хлорофилла, а также во «взрослом» растении часть хлорофилла находится в фотохимической лабильной форме. Выцветание этой формы при освещении красным светом сопровождается значительным ослаблением флуоресценции листьев и «зеленых растворов»; при этом главная масса хлорофилла в листьях находится в агрегированном, фотохимически устойчивом состоянии [1; 2], в соответствии с исходными работами Д. И. Ивановского.

В указанных работах нами были найдены доводы в пользу того, что равновесие между агрегированными и мономерной формами определяется физиологическими условиями, в которых находится растение.

Наличие в листьях растений фотохимически неустойчивой, мономерной, флуоресцирующей формы хлорофилла, обнаруженной в наших работах, согласуется с экспериментальными результатами других авторов. Так, Френч и Янг [3] при измерении спектра флуоресценции красной водоросли Porphyra naiadum обнаружили резкое падение яркости красной флуоресценции при возбуждении ее светом высокой интенсивности. Дифференциальный спектр флуоресценции, выраженный в виде разности между спектрами, полученными при низкой и высокой интенсивности возбуждающего света, представляет собой кривую с максимумом при 677 mμ, соответствующим максимуму флуоресценции хлорофилла в «мономерной» форме. Авторы в своей статье не дают объяснения этому явлению, однако трудно сомневаться в том, что свет высокой интенсивности приводит к выцветанию флуоресцирующей формы хлорофилла. Действительно, измерение спектров флуоресценции молодого, частично позеленевшего, и «взрослого» листа в работе Френч и Янг показали различия в положении главных максимумов флуоресценции (у темнозеленого листа при 685 mμ и у светлозеленого, молодого, при 675 mμ). В соответствии с нашими данными, спектр флуоресценции листа определяется главным образом мономерной активной формой хлорофилла с максимумом поглощения при 670 mμ, у молодого листа ничтожны искажения в положении максимума флуоресценции из-за вторичного поглощения, тогда как большое количество хлорофилла в темнозеленом листе приводит к частичному поглощению коротковолновой ветви максимума флуоресценции мономерной формы, что приводит к наблюдаемому перемещению максимума в длинноволновую область (685 mμ). Существенно то, что положение второго максимума флуоресценции (при 720 mμ) не испытывает этого искажения и сохраняет свое положение у светлозеленых и темнозеленых листьев [3]. Иокум и Блинкс [4], исследуя квантовый выход фотосинтеза у красных водорослей, также пришли к заключению о наличии активной и неактивной формы хлорофилла в этих организмах. Уместно также указать на наблюдения Коски и Смит [5], получивших мутант кукурузы, в котором малое количество протохлорофилла превращалось при освещении в хлорофилл, быстро разрушающийся под действием света. На основе наших данных не подлежит сомнению, что в этих опытах авторы имели дело с образованием из протохлорофилла именно мономерной неустойчивой формы хлорофилла.

В данной статье описаны поиски условий, от которых зависит количество активной формы хлорофилла в растениях, и опыты, в которых удалось наблюдать обратимые окислительно-восстановительные превращения этой формы хлорофилла в естественном состоянии связи. Основные результаты работы кратко были описаны нами ранее [6]. Все свойства и превращения хлорофилла мы исследовали в коллоидных растворах вещества листьев — «зеленых растворах», приготовленных на водно-глицериновых средах. Максимум поглощения хлорофилла в этих «растворах» соответствует поглощению хлорофилла в листьях. Применение в качестве среды водного глицерина позволяет получить прозрачные устойчивые вязкие коллоидные «растворы», допускающие точные спектрофотометрические измерения и работу при низких температурах. Добавление глицерина не влияет на положение красного максимума поглощения хлорофилла по сравнению с водным «раствором». Водно-глицериновые растворы сохраняют способность к реакции Хилла (по фенолиндофенолу), что, в соответствии с нашими предыдущими исследованиями [7], может служить указанием на сохранение естественного состояния хлорофилла. Мы не производили морфологических исследований, однако есть основания полагать, что зеленые растворы содержат гранулы и структурные элементы гранул.

ОБЪЕКТ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу вели преимущественно с листьями сахарной свеклы (сорта «Уладовка» и «Верхнячка»). Летом опыты вели с растениями сахарной свеклы, выросшими в грунте в мае — августе (максимум поглощения 675—678 mμ при pH 8,5). В зимнее время опыты вели с листьями свеклы, выращенными из корней в вазонах с почвой при двух вариантах освещения. Растения, росшие у окна, обладали темнозелеными листьями с обычным состоянием хлорофилла (красный максимум поглощения 675—678 mμ при pH 8,5). Листья, выросшие на рассеянном свету в глубине комнаты, имели бледнозеленую окраску и обладали максимумом поглощения при 672—673 mμ (при pH 7 и 8,5).

Для приготовления зеленого раствора листья измельчали в ступке с $^1/_{15}$ *M* фосфатным буферным раствором, содержащим $^1/_{50}$ *M* KCl. Буферный раствор с pH 8,5 представлял собой $^1/_{15}$ *M* раствор Na_2HPO_4; растворы с более щелочными pH получали при добавлении к этому раствору NaOH. Кашицу отжимали через полотно и центрифугировали 10 мин. при 3500 *g*. Полученный зеленый раствор смешивали с глицерином в отношении 4 : 6. Все эти операции вели при затемнении комнаты.

Зеленый раствор разбавляли водно-глицериновым (4 : 6) буферным раствором того же pH до величины оптической плотности (*K*) 0,6 — 0,7 в красном максимуме поглощения при толщине слоя 1—1,2 см. Точность измерения положения максимума обычно $\pm$ 1 mμ. Опыты вели в вакуумных трубках или круглых кюветах. При определении количества выцветающей формы хлорофилла трубку с зеленым раствором поочередно помещали в держатель спектрофотометра Бекмана и в стеклянный сосуд, где циркулировала вода из термостата с температурой 20—22°; в опытах при — 40° — твердая углекислота в ацетоне. Трубку в цилиндре освещали 500 W киноламповой с конденсором через красный светофильтр RG-2 ($\sim 10^6$ эрг/см^2 · сек).

В процессе выцветания наблюдали за кинетикой падения *K* в красном максимуме поглощения. Измерения вели по следующему графику времени (от начала освещения): 5, 10, 15, 25, 40, 70, 130, 310 сек. Интервал между окончанием освещения и измерением $\sim$10 сек.

Фотохимическую активность (реакцию Хилла) зеленых растворов определяли по восстановлению фенолиндофенола и дихлорфенолиндофенола [8]. При работе с фенолиндофенолом зеленый раствор и раствор красителя готовили на буфере с pH 6,5 с добавлением 60% глицерина так, чтобы *K* в максимуме поглощения красителя при 550 mμ был равен 1,0. В случае дихлорфенолиндофенола растворы готовили на буфере с pH 7, 7,5 и 8, 5 (с $K = 1$ при 600 mμ). Определение фотохимической активности производили в вакуумных трубках с отводом, приливая краситель (2,5 мл) из отвода к зеленому раствору (2,5 мл) после эвакуации, чтобы избежать предварительного восстановления красителя зеленым раствором в темноте. Отсутствие воздуха необходимо также для предохранения хлорофилла от заметного разрушения при освещении. Освещение трубки красным светом производили на описанной выше установке по следующему графику времени (от начала освещения): 5, 10, 15, 20, 25 мин. К каждому опыту ставили «темновой контроль» — определение изменений концентрации красителя в эвакуированном растворе при стоянии в темноте.

Изменения концентрации красителя, характеризующие величину фотохимической активности, измеряли падением *K* в максимуме поглощения красителя в световом

опыте с учетом контрольного опыта в темноте. В присутствии глицерина несколько понижалась активность при измерении с фенолиндофенолом, тогда как с дихлорфенолиндофенолом активность в присутствии глицерина была несколько выше, чем в опыте без глицерина. Последнее может быть объяснено тем, что восстановление дихлорфенолиндофенола определяется не только реакцией Хилла, но и иными процессами, например сенсибилизированным хлорофиллом, восстановлением дихлорфенолиндофенола глицерином. Однако при освещении раствора дихлорфенолиндофенола в 60%-ном глицерине K в максимуме поглощения красителя при 600 mμ не изменялся, т. е. прямого фотовосстановления индофенола не наблюдалось.

Кинетика выцветания хлорофилла в зеленых растворах

При освещении зеленых растворов в присутствии кислорода воздуха происходит быстрое понижение K в максимуме поглощения хлорофилла (рис. 1). В отсутствие воздуха это явление не наблюдается. Таким образом, выцветание является следствием окислительного разрушения хлорофилла.

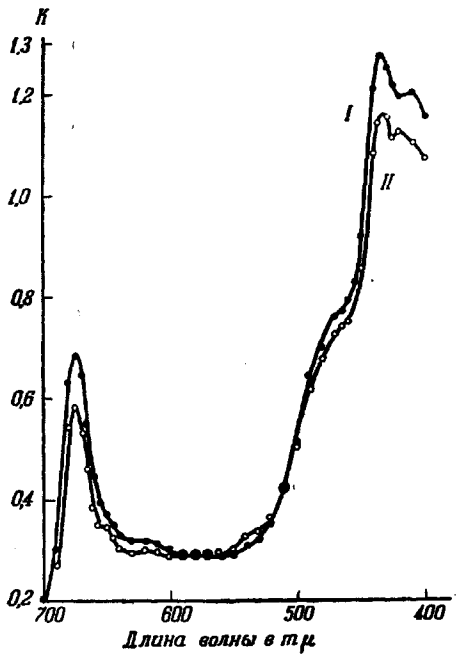


Рис. 1. Выцветание хлорофилла в зеленом растворе из листьев сахарной свеклы:
I — исходный зеленый раствор; *II* — после 20 мин. освещения в присутствии воздуха через красный светофильтр RG-2

Измерение зависимости K от времени освещения дает кинетическую кривую, на которой видно быстрое падение K за первые 5 сек. освещения; далее падение K идет гораздо медленнее (см. рис. 3, 5, 9) *. Так, например, в типичном опыте с зеленым раствором из листьев свеклы за первые 5 сек. выцветает 20%, в течение 40 сек.— 24%, в течение 310 сек.—29% от исходного количества хлорофилла в зеленом растворе. Вид кинетической кривой отличается у зеленых растворов, приготовленных из листьев растений, выросших в различных физиологических условиях.

В зеленых растворах из листьев свеклы, росшей в зимнее время на окне, выцветает значительно меньший процент хлорофилла, чем в «растворах» из листьев растений, выросших в грунте. После длительного периода холодных пасмурных дней хлорофилл в «растворах» из листьев зимних растений свеклы почти не выцветал ни при pH 7, ни при pH 8,5. Таким образом, кинетическая кривая свидетельствует о наличии в зеленом растворе разных форм хлорофилла, выцветающих с разной скоростью. Быстрое падение K в максимуме поглощения хлорофилла в начале освещения зеленого раствора объясняется разрушением лабильной мономерной формы, о чем свидетельствует также потеря флуоресценции зеленых растворов в результате освещения (наблюдаемой через светофильтр RG-5 при возбуждении флуоресценции линиями ртути 365 mμ).

Кроме того, при выцветании зеленых растворов наблюдалось перемещение красного максимума поглощения хлорофилла на 1,5—2 mμ в длинноволновую сторону, за счет разрушения формы пигмента, обладающей максимумом при 670 mμ.

* На всех рисунках начало кривой соответствует началу опыта.

Особенно отчетливо это явление наблюдается при работе с зелеными растворами из светлозеленых листьев свеклы и из обычных листьев на буфере со щелочными значениями pH; в этих условиях при освещении красным светом в течение 5 мин. количество выцветающей формы достигало 30% от общего количества хлорофилла. Количество лабильной формы различно у разных растений: в зеленых растворах из листьев свеклы и тополя выцветает в течение опыта до 30% хлорофилла, в «растворах» из листьев фасоли выцветает лишь ~3%.

Уместно указать на то, что сравнительное исследование кинетики выцветания хлорофилла $a + b$ в спирто-глицериновых и спиртовых растворах показало обычный тип кинетических кривых, характерный для истинных растворов.

Влияние предварительного нагревания зеленых растворов и листьев на спектр поглощения, выцветание хлорофилла и фотохимическую активность

Давно известно, что при нагревании листьев до 100° происходит перемещение красного максимума поглощения хлорофилла в коротковолновую сторону. Хорошо известно также, что нагревание быстро приводит к потере способности суспензий хлоропластов и зеленых растворов к реакции Хилла.

Однако в случае применения водно-глицериновых сред можно было ожидать увеличения термостабильности ферментных систем. Поэтому мы провели опыты по определению фотохимической активности предварительным нагреванием зеленых растворов перед опытом и листьев перед приготовлением зеленого раствора.

Для этих опытов использовали зеленые растворы, приготовленные на буфере с pH 7 из листьев свеклы, росшей в зимнее время около окна. Хлорофилл в этих «растворах» обычно обладал максимумом поглощения при 676 mμ и был весьма светоустойчивым. За 6 мин. освещения красным светом при 20° выцветало лишь ~3% от общего количества пигмента.

а) Действие нагревания листьев и зеленых растворов на выцветание хлорофилла и положение его максимума поглощения.

Скорость и глубина выцветания хлорофилла в зеленых растворах в значительной степени зависят от температуры. Так, например, Сидорин [9] наблюдал разрушение хлорофилла под действием солнечного света в предварительно нагретых листьях сои. Действительно, длительное нагревание листьев и зеленых растворов приводило к увеличению быстро выцветающей формы хлорофилла и сопровождалось постепенным перемещением максимума поглощения пигмента в коротковолновую область.

Нагревание до 30° (в течение часа) листьев и зеленых растворов не вызывало заметного изменения спектра поглощения и количества выцветающих форм хлорофилла, хотя скорость выцветания хлорофилла в зеленом растворе при 30° значительно выше, чем при 20°, что может служить указанием на сдвиг равновесия между агрегированными и мономерными формами по мере выцветания.

При нагревании зеленого раствора до 40—43° в течение 30 мин. количество хлорофилла, выцветающего за 6 мин., увеличивалось в 2—4 раза. При нагревании «раствора» в течение 15 мин. до 45° максимум поглощения хлорофилла перемещался до 673 mμ, выцветание увеличивалось в 4 раза; 10-минутное нагревание до 50° вызывало перемещение максимума поглощения до 671 mμ; при этом выцветание увеличивалось в 6 раз по сравнению с исходным «раствором».

В листьях хлорофилл более устойчив. Нагревание листьев до 40—45° в течение 15 мин. не изменяет спектральных и фотохимических свойств хлорофилла в зеленых растворах по сравнению с контрольным опытом без нагревания листьев.

При нагревании до 50—52° красный максимум поглощения хлорофилла перемещался до 674 mμ, а выцветание увеличивалось в 5—7 раз. После нагревания листа в течение 15 мин. до 60° красный максимум поглощения лежал при 671 mμ, после 5 мин. нагревания до 100° — при 670 mμ. В последнем случае в течение опыта выцветало ~50% от общего количества хлорофилла в зеленом растворе.

б) Действие нагревания листьев и зеленых растворов на реакцию Хилла.

Водно-глицериновые зеленые растворы обладали высокой фотохимической активностью. Контрольные опыты, в которых испытывалось темновое восстановление акцепторов водорода, показали, что фенолиндофенол восстанавливался незначительно, тогда как дихлорфенолиндофенол восстанавливался быстро. Предварительное нагревание зеленых растворов (перед определением фотохимической активности) и листьев (перед приготовлением зеленого раствора) значительно увеличивало количество веществ, способных восстанавливать дихлорфенолиндофенол в темноте. Зеленый раствор, приготовленный из нагретых до 100° листьев, восстанавливал почти весь добавленный дихлорфенолиндофенол за 3 мин. в темноте и при освещении.

Предварительное нагревание зеленых растворов перед опытом снижало фотохимическую активность по дихлорфенолиндофенолу. Нагревание зеленого раствора до 40° в течение 10 мин. снижало активность на 40% по сравнению с активностью контрольного опыта, 30-минутное нагревание до этой же температуры — на 80%.

Нагревание листьев перед опытом также уменьшало фотохимическую активность зеленых растворов, но в меньшей степени, чем нагревание готового «раствора».

При определении фотохимической активности с фенолиндофенолом нагревание листьев снижало активность в гораздо большей степени. При работе с зеленым раствором без предварительного нагревания листьев восстанавливалось в опыте ~ 30% добавляемого красителя. После предварительного нагревания листа в течение 15 мин. до 45° полученный зеленый раствор восстанавливал 17—20% фенолиндофенола, при нагревании листа до 50°—5—6%.

Таким образом, нагревание листьев и зеленых растворов перед опытом выше 40—45° приводит к увеличению количества выцветающей формы хлорофилла, но, повидимому, сопровождается необратимыми изменениями его состояния.

Влияние температуры среды, окружающей растение, на состояние хлорофилла

Опыты, описанные в данном разделе, были проведены с зелеными растворами, полученными из листьев свеклы, росшей в грунте в мае — июне. Было обнаружено, что температура окружающей растение среды и температура помещения, где приготавливается коллоидный зеленый раствор, влияет на спектральные и фотохимические свойства хлорофилла. Понижение температуры вызывает перемещение красного максимума поглощения хлорофилла в длинноволновую сторону спектра и уменьшение количества выцветающей формы пигмента; более высокая температура способствует перемещению максимума в сторону коротких длин волн и увеличению количества хлорофилла, выцветающего в опыте.

Количество мономерной выцветающей формы пигмента увеличивалось по мере стояния растертого материала при температуре выше той, при которой находилось растение, что следует объяснить медленно идущей дезагрегацией. Изменения свойств хлорофилла в зеленых растворах под влиянием температуры указывают на возможность обратимых и необратимых превращений различных форм хлорофилла при изменении условий внешней среды.

На рис. 2 показана кинетика выцветания хлорофилла в зеленых растворах на буфере с pH 8,5, приготовленных при температуре 2° (*I а*, *II а*) и при 20° (*I*, *II*).

К «раствору», приготовленному при 2°, приливали глицерин комнатной температуры. Выцветание определяли при 20—21°. Опыт *I* был поставлен в солнечный день (температура воздуха утром 16—17°, днем 22°). Опыт *II* был проведен на следующий день, когда произошло резкое изменение погоды. День был холодный, облачный, температура утром 8—10°, днем 15°. Из сравнения кривых *I* и *II*, *I* и *I а*, *II* и *II а* хорошо видно уменьшение количества выцветающей формы хлорофилла при понижении температуры. «Растворы», приготовленные в первый и второй день, а также «растворы», приготовленные в один день, но при различной температуре, отличались различным положением красного максимума поглощения: *I* — 674 mμ; *I а*—675,5 mμ; *II*—676 mμ; *II а*—677 mμ.

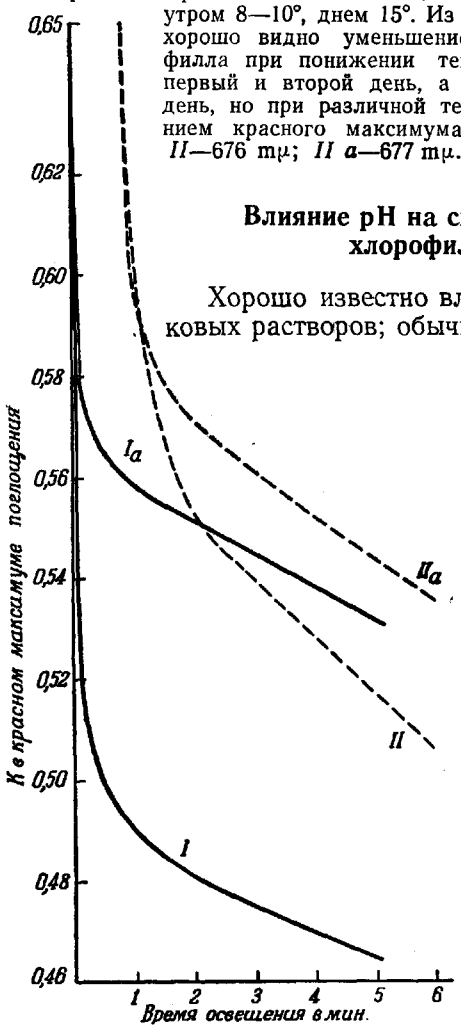


Рис. 2

Влияние pH на спектр поглощения и выцветания хлорофилла в зеленом растворе

Хорошо известно влияние величины pH на свойства белковых растворов; обычно щелочные среды благоприятствуют дезагрегации, увеличивая растворимость белков. Однако до сих пор отсутствовали систематические исследования влияния pH на спек-

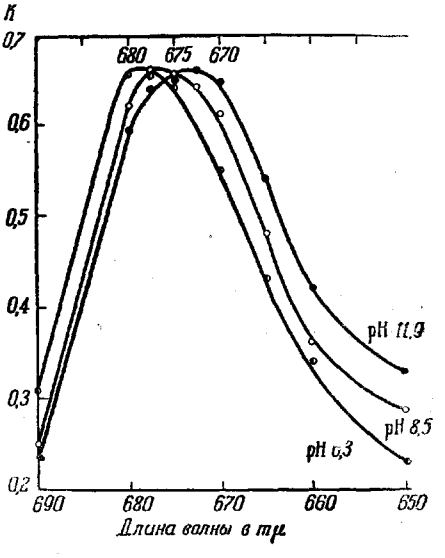


Рис. 3

Рис. 2. Влияние температуры приготовления зеленого раствора на кинетику выцветания хлорофилла:

I — зеленый раствор готовили при 20° из листьев, росших при 22°; *I а* — то же при 2°; *II* — зеленый раствор готовили при 20° из листьев, росших при 15°; *II а* — то же при 2°

Рис. 3. Влияние pH на положение красного максимума поглощения хлорофилла в зеленом растворе

тральные и фотохимические свойства хлорофилла в естественном состоянии связи.

Наши опыты показали, что свойства хлорофилла в зеленых растворах из листьев свеклы изменяются в зависимости от величины pH фосфатного буфера, на котором приготовлены «растворы». Изменение pH в щелочную сторону вызывает сдвиг красного максимума поглощения хлорофилла в коротковолновую область (рис. 3 и 4). В щелочных средах красная флуо-

ресценция хлорофилла в зеленых растворах гораздо более отчетлива, чем при более кислых pH. Мы уже указали на то, что при постоянной величине pH максимум поглощения может располагаться при различной длине волны в зависимости от внешних условий, в которых находится растение.

Изменения в положении максимума поглощения при различных pH сопровождаются изменением фотохимической устойчивости хлорофилла в зеленых растворах. Так, например, при pH 12 хлорофилла выцветает в 6 раз больше, чем при pH 4,8, при pH 8,5 — в 2—4 раза больше, чем при pH 7. У молодых листьев тополя при pH 8,5 выцветает в 5 раз больше хлорофилла, чем при pH 4,8 (рис. 4 и 5). Следует указать на то, что в «растворах», приготовленных из светлозеленых листьев свеклы, количество быстро выцетающей формы хлорофилла и положение красного максимума мало зависят от pH в пределах pH 7—8,5, а при pH 4,8 при центрифугировании оседает все зеленое вещество.

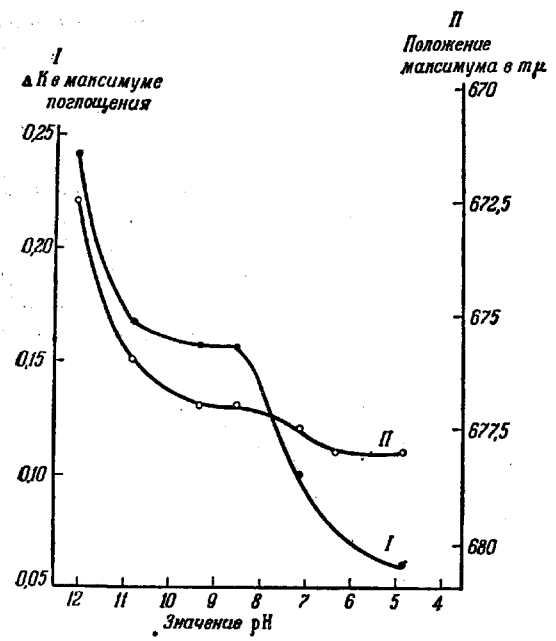


Рис. 4. Влияние pH на выцветание и положение максимума поглощения хлорофилла в зеленом растворе

Возникает вопрос, не происходит ли в исследованном пределе pH химических изменений хлорофилла. Изоэлектрическая точка зеленых растворов обычно лежит в пределах pH 4,5—5; в условиях кратковременных опытов трудно предположить возможность глубоко идущей феофитинизации, о чем свидетельствуют данные спектральных измерений.

Известно, что при действии оснований на хлорофилл образуется продукт с красным максимумом поглощения ~ 640 mμ[10]. Для того, чтобы проверить возможность образования такого рода продуктов в щелочных буферных растворах в условиях опыта, мы измерили спектр поглощения зеленых растворов в этой области, однако максимума при 640 mμ мы не обнаружили.

В свете полученных результатов представляло интерес исследовать влияние pH на положение максимумов поглощения коллоидных водно-глицериновых растворов хлорофилла. Для получения коллоидного раствора к 4 мл фосфатного буфера добавляли 0,2—0,4 мл спиртового раствора хлорофилла $a + b$, так, чтобы при добавлении 60%-ного глицерина K в красном максимуме поглощения был равен 0,6. Как и в зеленом растворе, уменьшение величины pH сопровождалось перемещением красного максимума в длинноволновую сторону спектра. Максимум поглощения хлорофилла в коллоидном растворе, приготовленном на буфере с pH 11,9, лежит при 671 mμ, при pH 4,8 — 677 mμ. Выцветание хлорофилла в коллоидных растворах также зависит от pH и уменьшается в более кислых средах.

Обратимые фотохимические превращения хлорофилла в зеленых растворах

Получение зеленых растворов с большим количеством активной формы хлорофилла определило возможность их исследования при помощи

методов, применявшихся в нашей лаборатории для изучения фотохимических свойств истинных растворов пигментов.

а) **Обратимое окисление.** В нашей лаборатории была установлена способность хлорофилла, бактериохлорофилла и фталоцианина магния к образованию при освещении в присутствии кислорода воздуха неустойчивых окисленных соединений, реагирующих в темноте с восстановителями, что ведет к частичной регенерации молекул исходного пигмента [11].

Поиски подобных превращений хлорофилла в зеленых растворах привели нас к положительным результатам.

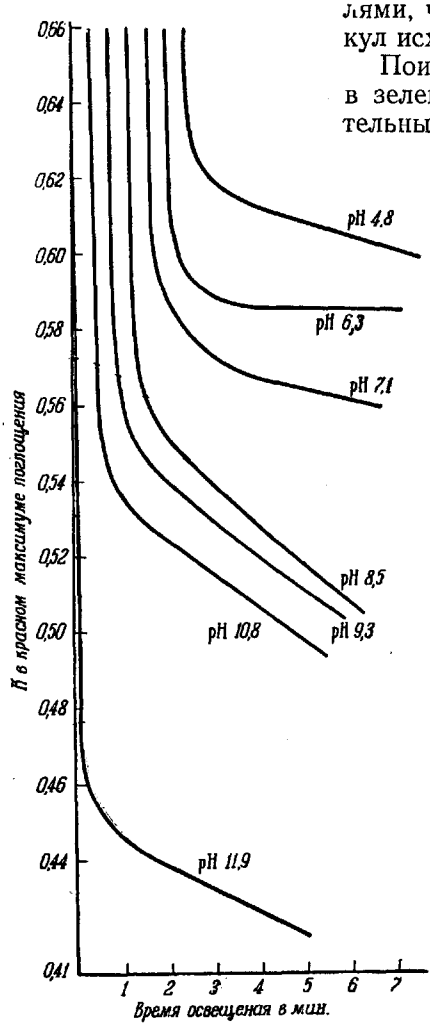


Рис. 5. Выцветание хлорофилла в зеленых растворах при различной величине pH

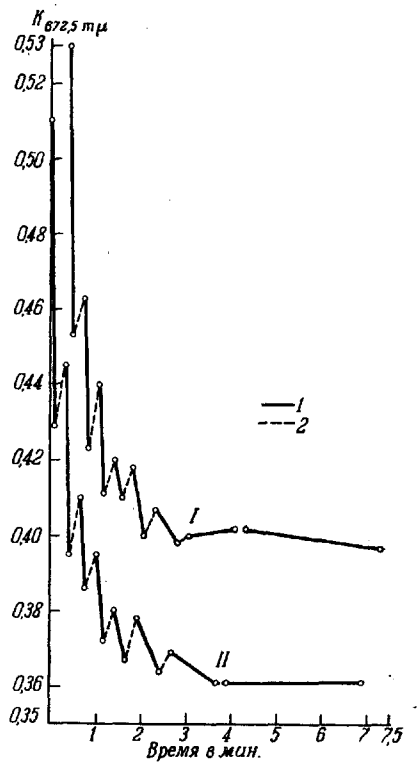


Рис. 6. Обратимое окисление хлорофилла:

1 — свет; *2* — темнота; *I* — зеленый раствор, pH 8,5; *II* — то же с добавкой 2,5 мг нейтрализованной аскорбиновой кислоты

Зеленые растворы, приготовленные на буфере с pH 8,5, освещали при 20° в присутствии воздуха и измеряли величину оптической плотности (K) в красном максимуме поглощения, следуя обычно применявшемуся графику времени (см. выше). В первые секунды освещения происходило быстрое падение K (рис. 6). После выключения света в темноте в течение нескольких секунд (обычно 10—15 сек.) коэффициент погашения хлорофилла в максимуме вновь увеличивался. Подобное явление происходило при дальнейших периодах света и темноты; величина эффекта постепенно затухала по мере освещения. Такая же картина обратимого окисления наблюдалась и в присутствии аскорбиновой кислоты (рис. 6).

Аскорбиновую кислоту (12,5 мг) перед опытом нейтрализовали 2 мл насыщенного раствора Na_2HPO_4; pH полученного раствора был равен 7,5. Раствор смешивали с глицерином в отношении 4 : 6. Для опыта готовили смесь 1 мл водно-глицеринового раствора аскорбиновой кислоты с 3 мл зеленого раствора.

Для сопоставления поведения хлорофилла в водно-глицериновых зеленых растворах с поведением хлорофилла, не связанного с белками, были поставлены опыты со спирто-глицериновыми растворами хлорофилла ($a + b$). Спиртовый раствор хлорофилла ($a + b$) смешивали с глицерином в отношении 3,5 : 6,5 с таким расчетом, чтобы коэффициент погашения хлорофилла при 665 mμ был равен 0,6—0,7.

В этих растворах наблюдается в еще более отчетливой форме явление частичной регенерации хлорофилла в темноте после освещения раствора в присутствии воздуха (рис. 7). Глицерин в этом случае, вероят-

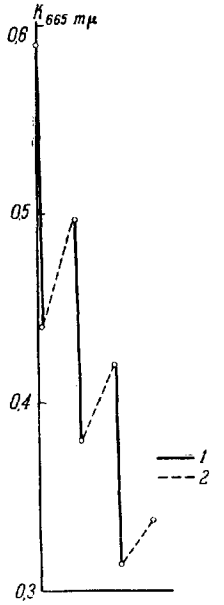


Рис. 7. Обратимое окисление хлорофилла $a + b$ в смеси спирта и глицерина:
1 — освещение 5 сек.; *2* — темнота 5 мин.

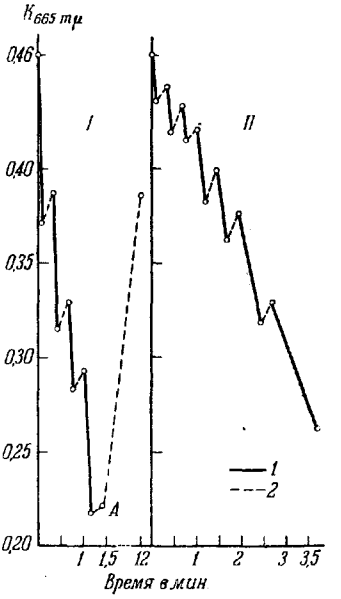


Рис. 8. Обратимое окисление хлорофилла:
1 — свет; *2* — темнота; *I* — раствор хлорофилла $a + b$ в смеси спирта и глицерина. В точке *A* введена аскорбиновая кислота, *II* — хлорофилл $a + b$ в спирте

но, является восстановителем, реагирующим с лабильными окисленными соединениями хлорофилла. При добавлении аскорбиновой кислоты к освещенным спирто-глицериновым растворам хлорофилла происходила значительная регенерация хлорофилла из продуктов его фотоокисления в соответствии с наблюдениями, сделанными в нашей лаборатории при исследовании фотоокисления спиртовых растворов хлорофилла (рис. 8).

Из-за быстро идущей прямой и обратной реакции мы не имели возможности измерить полный спектр продуктов, образующихся в результате освещения. Однако в результате фотоокисления происходит увеличение поглощения в области 510—560 mμ в соответствии с прежними наблюдениями [11]; присутствие аскорбиновой кислоты препятствует этому повышению.

В опытах, проведенных нами с зеленым раствором при —40°, также наблюдали обратимые изменения K хлорофилла в максимуме, но процесс шел гораздо медленнее, чем при 20°. При данном методе измерения вообще трудно изолировать течение элементарного фотохимического процесса переноса электрона.

б) **Обратимое фотовосстановление.** В работах нашей лаборатории была детально изучена реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла в органических растворителях (напр. [12;13]). Реакцию удается наблюдать при помощи спектрофотометрического метода при удалении воздуха, так как фотовосстановленная форма хлорофилла быстро реагирует с окислителями, в том числе с кислородом. Осуществляя эту реакцию при комнатной температуре, удается наблюдать глубокое падение красного максимума поглощения с образованием долгоживущих фотовосстановленных продуктов. При выключении света, в темноте, реакция сравнительно медленно идет обратно. Если осуществлять эту реакцию при температуре —40 — —70°, то не происходит накопления долгоживущих восстановленных продуктов, являющихся результатом вторичных темновых реакций, следующих за фотостадией; при низкой температуре удается наблюдать образование первичной фотовосстановленной формы хлорофилла, мгновенно реагирующей обратно при выключении света [13].

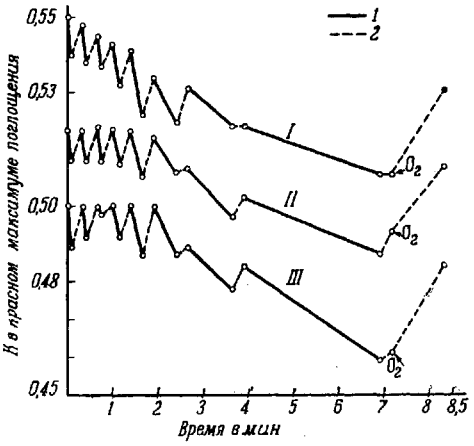


Рис. 9. Обратимое восстановление хлорофилла
1 — свет; *2* — темнота; *I* — зеленый раствор листьев свеклы, pH 8,5 (*K* 672 mμ); *II* — то же с добавкой 2,5 мг нейтрализованной аскорбиновой кислоты; *III* — раствор хлорофилла *a* + *b* в смеси спирта и глицерина (*K* 665 mμ)

Поиски подобных превращений хлорофилла мы произвели и в зеленых растворах. В качестве восстановителя использовали имеющийся в среде глицерин и иные донаторы водорода или вводимую дополнительно аскорбиновую кислоту, также нейтрализованную Na_2HPO_4. Удаление воздуха в этих опытах осуществляли посредством длительного откачивания (7—8 мин.) вакуумным масляным насосом при энергичном взбалтывании. Так как среда является довольно вязкой, можно было думать, что удаление кислорода происходит в этом случае менее полно, чем в опытах с органическими растворителями. Однако в этом случае, как и во всех опытах с реакцией фотовосстановления, следовало ожидать полного удаления кислорода в результате сенсибилизированного хлорофиллом окисления донатора водорода [14]. Освещение эвакуированных зеленых растворов производили в условиях, описанных выше, по тому же графику времени. В этих опытах не происходило значительного необратимого выцветания хлорофилла; удавалось наблюдать обратимое понижение красного максимума, которое можно было повторять многократно при кратковременных интервалах освещения (рис. 9). В присутствии аскорбиновой кислоты можно отметить более полную обратимость. После пуска воздуха к освещенному в вакууме зеленому раствору *K* обычно увеличивался, что следует приписать окислению долгоживущих восстановленных соединений. При —40° обратимых изменений в зеленом растворе в отсутствие воздуха не удается наблюдать, что соответствует результатам опытов в растворах; первичная фотовосстановленная форма хлорофилла весьма реакционноспособна и успевает прореагировать обратно за 10 сек. В спирто-глицериновом растворе хлорофилла (*a* + *b*) наблюдаются те же явления, что и в зеленом растворе.

В работах нашей лаборатории было показано, что реакция фотовосстановления сопровождается изменением потенциала инертного электрода в отрицательную сторону вследствие образования электродно-активных отрицательно заряженных продуктов восстановления хлорофилла [13].

Мы произвели измерение фотопотенциала платинового электрода в зеленом растворе в отсутствие воздуха, согласно принятой в нашей лаборатории методики. Оказалось, что и в этом случае при освещении происходит изменение потенциала электрода в отрицательную сторону с быстрым возвращением в темноте. Все эти опыты указывают на то, что без воздуха происходит обратимое фотовосстановление хлорофилла присутствующими в среде донаторами водорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опыты показывают, что в зеленых растворах наряду с фотохимически устойчивыми формами присутствует фотохимически активная форма хлорофилла, количество которой зависит от вида растения, от условий, в которых находится растение, от температуры и pH буферного раствора.

Выбор условий, в которых наблюдается образование большого количества активной формы (объект — сахарная свекла, pH 8,5), позволил нам наблюдать обратимые фотохимические превращения хлорофилла в естественном состоянии связи.

Активная форма хлорофилла по своим свойствам подобна «мономерным» растворам хлорофилла в органических растворителях. Эта форма обладает флуоресценцией и способностью к обратимым окислительно-восстановительным превращениям при действии света. Какова природа связи хлорофилла в этом состоянии? По этому поводу пока нет достоверных опытных данных и следует лишь привести следующие соображения. Хлорофилл в водных коллоидных растворах не обладает флуоресценцией; для ее появления необходима связь с липоидами или детергентами, обеспечивающими дезагрегацию, поскольку взаимодействие между близко расположенными молекулами хлорофилла в коллоидной частице приводит к тушению флуоресценции и сдвигу поглощения в длинноволновую сторону спектра. Таким образом, обладающая флуоресценцией активная форма хлорофилла в зеленых растворах должна быть связана с липоидами или липопротеинами. Установление конкретной природы этой связи является задачей дальнейших исследований. Мы уже высказывали предположение, что наблюдаемые в листьях растений изменения флуоресценции при изменении светового режима следует приписать превращениям этой активной формы хлорофилла [1; 2; 15].

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение изложенного материала.

Поступила в редакцию
21.IX.1955

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН **85**, 177, 1952; **91**, 343, 1953; Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **19**, 37, 1954; Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. и Войниковская К. К., ДАН **92**, 1201, 1953.
2. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **63**, 163, 1948; Красновский А. А., Исследование фотохимических реакций при фотосинтезе, Дисс., М., 1948.
3. French C. S., Young V. K., J. Gen. Physiol. **35**, 873, 1952.
4. Yocum C. S., Blinks L. R., J. Gen. Physiol. **38**, 1, 1954.
5. Koski V. M., Smith J. H. C., Arch. Biochem. Biophys. **34**, 189, 1951.
6. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН **104**, 440, 1955.
7. Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
8. French C. S., Holt A. S., Am. J. Bot. **33**, 835, 1946.
9. Сидорин М. И., Труды Ин-та физиологии растений **7**, 115, 1950.
10. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **89**, 527, 1953.
11. Красновский А. А., ДАН **58**, 617, 1947; **58**, 835, 1947; Красновский А. А. и Войновская К. К., ДАН **81**, 879, 1951.
12. Красновсий А. А. ДАН **60**, 421, 1948; Вопросы химич. кинетики, М., 1955; Красновский А. А., Брин Г. П. и Войновская К. К., ДАН **69**, 393, 1949
13. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., ДАН **92**, 381, 1953; **95**, 841, 1954.
14. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **58**, 1087, 1947.
15. Красновский А. А., Изв. АН СССР, серия биол. № 2, 122, 1955.

ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

А. А. Красновский

В статье кратко изложены результаты работ, посвященных исследованию механизма участия хлорофилла и его аналогов в фотохимических реакциях, сопровождающихся «запасанием» энергии света. Эти работы проводились с 1946 г. в руководимой акад. А. Н. Терениным лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР.

Исследование этого вопроса тесно связано с выяснением условий, предотвращающих самопроизвольные обратные реакции активных фотопродуктов, образованных в результате поглощения кванта света; среди таких условий особую роль играет исследование сопряжения фотореакций пигментов с биокаталитическими процессами, при которых активные фотопродукты разделяются и перерабатываются в системе темновых, ферментативных реакций.

В работах лаборатории проведены сравнительные исследования пигментов фотосинтезирующих организмов, выделенных хроматографическими методами (хлорофилл *a* и *b*, бактериохлорофилл, протохлорофилл, фикоэритрин, порфирины, цитохром и др.), их производных (феофитины, гематопорфирин и др.) и синтетических аналогов этих пигментов — фталоцианинов.

ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ НА УРОВНЕ ДОЛГОЖИВУЩЕГО ВОЗБУЖДЕННОГО СОСТОЯНИЯ

Процесс начинается актом поглощения кванта света ($A \rightarrow A^*$) молекулой хлорофилла (рис. 1). Нормальное возбужденное состояние молекулы имеет длительность жизни 10^{-7}—10^{-8} сек.; потеря энергии возбуждения происходит путем внутри- и межмолекулярных процессов. Среди этих процессов вероятны флуоресценция ($A^* \rightarrow A$), квантовый выход которой для хлорофилла в растворе достигает 0,2, и переход молекулы, с потерей небольшого количества энергии, в длительноживущее метастабильное возбужденное состояние ($A^* \rightarrow A_т$). Возможность перехода молекул органических соединений в результате поглощения света в метастабильное состояние была обоснована первоначально общирным экспериментальным материалом из области фосфоресценции этих соединений (литературу по этому вопросу см. в [1]).

А. Н. Теренин в 1943 г. [2], а затем Льюис и Каша [3] выдвинули ныне общепринятое представление о том, что образование метастабильных возбужденных состояний органических молекул определяется обращением спина электрона; это состояние является, согласно спектроскопической терминологии, триплетным или, с точки зрения химика, бирадикальным, «двувалентным».

Бирадикальная природа метастабильного сотояния была подтверждена путем магнитных измерений [4].

Наличие двух неспаренных электронов в длительноживущих возбужденных молекулах определяет, как это подчеркнул в своих работах А. Н. Теренин [1, 2], высокую химическую реакционноспособность этих молекул. Таким образом превращение энергии кванта света в потенциальную

химическую энергию может произойти на первом этапе уже в самой молекуле хлорофилла; дальнейшая цепь превращений поведет к получению все более устойчивых, более долгоживущих промежуточных соединений. А. Н. Теренин указал на то, что бирадикальные возбужденные состояния могут играть роль в процессе фотосинтеза и при других фотобиологических процессах [5]. В работах А. Н. Теренина и В. А. Ермолаева [6] получены данные, указывающие на значение бирадикальных состояний при передаче (миграции) энергии между молекулами [7], которая может происходить на уровне бирадикального состояния. Имеющиеся ныне данные указывают на то, что хлорофилл, его аналоги и производные, так же как молекулы других органических соединений, в результате поглощения кванта света могут переходить в долгоживущие возбужденные состояния. Перечислим эти экспериментальные результаты.

1. Индикатором перехода молекулы после поглощения кванта света в длительноживущее состояние является послесвечение — фосфоресценция, обязанная маловероятному переходу $A_т \rightarrow A$. Малая вероятность перехода с испусканием кванта света из этого состояния в нижнее — синглетное (основное) состояние для всех циклических органических молекул, начиная с бензола, есть следствие квантового запрета комбинации синглет — триплет, т. е. запрет перехода $A_т \rightarrow A$. Недавно Каша [8] обнаружил у хлорофилла и его аналогов фосфоресценцию с максимумом около 860 mμ.

2. Молекула, перешедшая в триплетное состояние, обладает новым спектром поглощения, обязанным переходам $A_т \rightarrow A_т^*$ (рис. 1); Ливингстон [9], применяя мощные световые импульсы, получил такой спектр поглощения триплетного состояния хлорофилла, обладающего в растворе длительностью жизни 10^{-3}—10^{-4} сек.

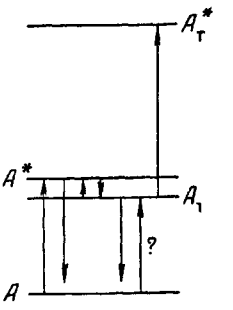


Рис. 1. Схема возбужденных уровней молекулы пигмента

3. Работы нашей лаборатории [10] показали отсутствие параллелизма между эффективностью тушения флуоресценции хлорофилла молекулами-восстановителями и фотореакцией с ними, что указывает на участие в реакции иных, чем возбужденные состояния, длительноживущих состояний молекулы. Подобный факт был установлен ранее в лаборатории Э. В. Шпольского для реакций окисления, сенсибилизированных эозином [11].

4. В поисках прямого перехода $A \rightarrow A_т$ мы обнаружили в концентрированных растворах хлорофилла и фталоцианинов слабые полосы поглощения в области 740—900 mμ. Так, в пиридиновых растворах фталоцианина меди, кроме обычных максимумов, в красной области спектра [12] наблюдается слабый максимум около 870 mμ, у фталоцианина магния — при 815 и 870 mμ.

Отчетливый максимум фотоэлектрической чувствительности и поглощения в близкой инфракрасной области спектра обнаружили в конденсированной пленке фталоцианина магния Е. К. Пуцейко и А. Н. Теренин [13] в определенных условиях.

Возможно, что эти полосы соответствуют прямому оптическому переходу в бирадикальное состояние; однако эти данные являются предварительными, и природа этого явления требует дальнейшего исследования. На очереди применение метода парамагнитного резонанса для исследования этой проблемы.

Следует указать также и на то, что образование метастабильных состояний является предпосылкой «суммирования» энергии двух квантов в молекуле пигмента; возможность подобных процессов при фотосинтезе пока нельзя считать ясной, хотя «второй» квант может действовать не только на метастабильную молекулу — бирадикал, но и на фотохимически измененную молекулу, например на ее фотовосстановленную форму.

Изображенная на рис. 1 схема соответствует представлению, что акт поглощения света и первичный акт фотохимического процесса разделены во времени; спектры поглощения хлорофилла и его аналогов нельзя интерпретировать как «спектры электронного переноса», наблюдающиеся в растворах сольватированных неорганических ионов [14]. Электронный перенос может произойти, вероятно, при взаимодействии пигмента в бирадикальном состоянии с координированными молекулами-партнерами.

Однако, в случае железо-порфириновых комплексов, образующих прочные координационные соединения с молекулами-донорами электронов, нельзя исключить возможность того, что некоторые полосы поглощения связаны с электронным переносом [15]. Вопрос о спектрах электронного переноса детально разобран в недавнем обзоре А. Н. Теренина [16].

ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ В ПРОДУКТАХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ХЛОРОФИЛЛА

При взаимодействии возбужденной (вероятно, метастабильной) молекулы хлорофилла с молекулами окружения возможен элементарный окислительно-восстановительный процесс, при котором молекула хлорофилла может воспринять или отдать электрон в результате светового акта; в последующем темновом акте произойдет обратная реакция активных продуктов, образованных в результате фотопроцесса. Главным затруднением при обнаружении этих процессов являются их быстрая обратимость и малая длительность жизни образованных активных продуктов. Нам удалось найти условия, при которых происходит стабилизация продуктов реакции и, благодаря этому, обнаружить в 1948 г. [17] способность хлорофилла и его аналогов к реакции обратимого фотовосстановления. Исследования показали, что реакция фотовосстановления является характерной для всего класса порфиринов, азапорфинов и их производных. Существенным является то, что реакция сопровождается «запасанием» энергии, чем определяется интерес ее исследования в связи с участием хлорофилла в фотосинтезе. Поиски обратимого фотовосстановления были предприняты нами, исходя из работ К. А. Тимирязева, открывшего способность хлорофилла к обратимому темновому восстановлению его металлическим цинком [18]. Мы также обнаружили способность хлорофилла к обратному фотохимическому взаимодействию с кислородом [19, 22], однако не ясно, происходит ли при этой реакции «запасание» энергии. Остановимся на первой обратимой реакции.

Обратимое фотовосстановление хлорофилла и его аналогов

При освещении освобожденных от кислорода растворов пигментов в присутствии молекул-доноров электрона (восстановителей) наблюдается быстрое фотохимическое превращение, сопровождающееся изменением цвета раствора; наиболее явно реакция идет в среде органических оснований (пиридин). При выключении света реакция идет обратно с регенерацией исходного пигмента; иногда, в случае быстрого течения обратной реакции, «скрытый» фотопроцесс удается обнаружить, применяя разнообразные приемы, описанные ниже.

Спектрофотометрические измерения. Хлорофилл и его аналоги обладают характерной структурой спектра поглощения; за превращениями пигмента легко наблюдать путем спектрофотометрических измерений. Опыты обычно проводились в вакуумных трубках, измерения — на фотоэлектрическом спектрофотометре.

Кратковременное (до 1 мин.) освещение красным светом пиридиновых растворов хлорофилла, его аналогов и производных в присутствии аскорбиновой кислоты или других доноров водорода приводит к быстрой фотореакции с образованием фотопродуктов, обычно обладающих главным

максимумом поглощения в более короткой области спектра, чем исходная молекула пигмента (рис. 2). Так, например, из зеленого хлорофилла и феофитина (максимум поглощения в пиридине при 669 mμ) образуется красный продукт восстановления с максимумом поглощения при 520 mμ [17,20], из протохлорофилла (625 mμ) — с максимумом при 470 mμ [21], из бактериофеофитина (755 mμ) — с максимумом при 640 mμ [22], из фталоцианина магния (673 mμ) — с максимумом (560 mμ) [27]. При выключении света, в темноте, реакция идет обратно с возвращением исходного спектра поглощения, более быстро — в присутствии окислителей (кислород, хинон и т. д.).

Фотореакция обычно сопровождается образованием некоторого количества продуктов необратимого восстановления, в особенности при длительном освещении и при избытке восстановителя.

А. Холт, воспроизводя наши опыты [23], показал, что цикл фотовосстановление — обратная реакция, можно повторить многократно.

В наших опытах с Г. П. Брин [24] было установлено, что скорость фотовосстановления и обратной темновой реакции уменьшается в случае применения в качестве восстановителя дейтероаскорбиновой кислоты (по сравнению с недейтерированным соединением). Это говорит о наличии темновой стадии переноса протона при этой реакции.

В отличие от пигментов, имеющих структуру хлорина и бактериохлорина, наши работы с К. К. Войновской показали, что при фотовосстановлении более просто построенных порфиринов (например, гематопорфирина, порфирина из фотосинтезирующих бактерий) наблюдается образование фотопродуктов, обладающих максимумом поглощения в более длинноволновой области спектра по сравнению с исходным соединением [25]; положение этих новых максимумов поглощения свидетельствует о фотовосстановлении «полуизолированных» двойных связей порфирина до хлорина и бактериохлорина; как известно [14], структура хлорина характеризуется интенсивным максимумом в области 680—650 mμ, тогда как бактериохлорины обладают интенсивным максимумом в близкой инфракрасной области спектра (740—780 mμ). Полученные фотопродукты также неустойчивы и обратимо реагируют в темноте с кислородом воздуха с регенерацией исходного порфирина (рис. 2). Некоторую размытость главного максимума поглощения образуемых фотопродуктов следует объяснить тем, что при реакции образуется смесь

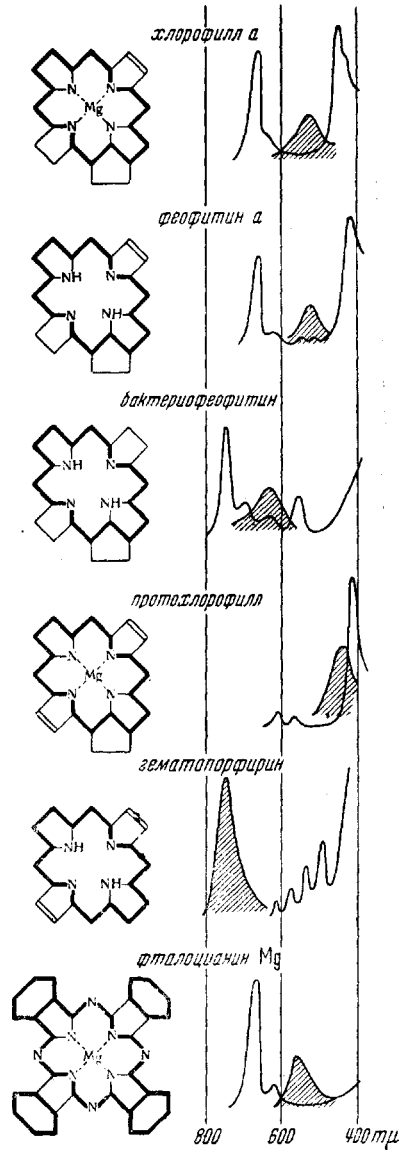


Рис. 2. Схематическое изображение структуры и спектра поглощения пигментов до и после реакции фотовосстановления в пиридине. Сплошные кривые показывают вид спектра поглощения пигмента до реакции и после обратной реакции в темноте; заштрихованы спектры фотовосстановленных форм пигментов после освещения (по данным лаборатории фотобиохимии)

изомерных продуктов с близкими спектрами поглощения, у которых гидрированы связи в разных положениях.

В работах В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой [26], продолживших в нашей лаборатории эти исследования, изучалось фотохимическое восстановление пигментов в пиридиновых и спиртовых растворах при температуре до —70°; в качестве доноров водорода применялись аскорбиновая кислота и фенилгидразин. В серии опытов было показано принципиально одинаковое поведение феофитинов, хлорофиллов и фталоцианинов; различия наблюдались в скорости обратных и вторичных реакций; для изучения механизма процесса оказался особенно удобным феофитин, дающий более устойчивые (медленнее реагирущие) продукты фотовосстановления. При освещении растворов феофитина наблюдается падение главного красного максимума и образование первичного продукта восстановления, обладающего поглощением в области 450—510 mμ. Этот продукт устойчив при низкой температуре и при повышении температуры постепенно переходит во вторичную «красную» восстановленную форму, описанную выше (наблюдаемую при комнатной температуре), и частично реагирует обратно с регенерацией феофитина.

В случае хлорофилла *a* и *b*, в пиридине при температуре —70° не удается измерить полного спектра первичных фотопродуктов; однако падение красного максимума сопровождается и в этом случае ростом поглощения в области 450—510 mμ. При этом не наблюдается образования красной формы, вероятно, из-за медленности вторичных темновых процессов при —70°. Фталоцианин магния в пиридине при —70° при освещении образует фотопродукт с максимумом поглощения при 560 mμ; нагревание или пуск кислорода приводит к быстрой обратной реакции. Эта форма, как показали дальнейшие исследования, является «вторичной» восстановленной формой [27].

Изменение флуоресценции при реакции фотовосстановления. При освещении в результате фотореакции быстро уменьшается количество хлорофилла в растворе; соответственно красная флуоресценция раствора при освещении быстро падает; в темноте при обратной реакции наблюдается возрастание красной флуоресценции раствора. Фотовосстановленная форма хлорофилла обладает оранжевой флуоресценцией. Так, хлорофилл в пиридиновом растворе при красном максимуме поглощения 669 mμ обладает максимумом флуоресценции около 678 mμ; восстановленная форма хлорофилла, а при максимуме поглощения около 520 mμ имеет полосу флуоресценции при 600—630 mμ. В. Б. Евстигнеев наблюдал, что при замораживании фотовосстановленного раствора жидким азотом флуоресценция продуктов восстановления становится яркой желтозеленой. Наблюдаются кроме оранжевой яркая зеленая полоса 525—540 mμ и более слабая 550—570 mμ. Ряд контрольных опытов показал, что эти полосы наблюдаются лишь при наличии фотовосстановленной формы хлорофилла с максимумом при 518 mμ. Таким образом за течением реакции можно наблюдать, измеряя флуоресценцию.

Изменение окислительно-восстановительного потенциала в результате фотореакции. Для того чтобы оценить увеличение восстановительного потенциала системы после фотореакции, в нашей работе с Г. П. Брин [28] был применен метод редокс-индикаторов. В вакуумной трубке, имеющей боковой отвод, проводили реакцию хлорофилла с аскорбиновой кислотой; к продуктам фотовосстановления приливали в темноте из бокового отвода трубки раствор редокс-индикатора и наблюдали за течением обратной реакции путем спектрофотометрических измерений взаимосвязанных величин — максимумов поглощения хлорофилла, соединения, воспринимающего электрон (водород) и продукта восстановления этого соединения. В большинстве опытов измеряли кинетику повышения красного максимума поглощения хлорофилла (рис. 3).

Если до освещения в темноте система хлорофилл—аскорбиновая кислота была способна восстановить соединения с величиной E_0' (при pH 7) до 0,05 V (метиленовый голубой), то после освещения наблюдалось восстановление соединений с E_0 до —0,35 V (сафранин, дифосфопиридин—нуклеотиды). Эти результаты были подтверждены прямыми электрометрическими измерениями. В наших работах с Г. П. Брин [28] было обнаружено резкое изменение потенциала инертного электрода при освещении системы хлорофилл — аскорбиновая кислота. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова [29] произвели детальные измерения потенциала инертного платинового электрода, находящегося в среде, где шла фотореакция (в отсутствие кислорода). Измерения проводились от +30° до —70° С. Хлорофилл, его аналоги и производные при освещении красным светом приводили к быстрому изменению потенциала в отрицательную сторону; максимальная величина фотопотенциала достигала —0,35 V (рис. 4). В особых опытах было показано, что это явление не связано с освещением электрода, а является результатом реакций, происходящих в толще раствора. При понижении температуры до —70° наблюдалось повышение фотопотенциала из-за замедления обратных и вторичных реакций электродноактивных продуктов. Было изучено влияние концентрации пигмента и донора водорода, природы среды, интенсивности освещения и температуры. Как показали В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, фотопотенциал определяется образованием именно первичной, фотовосстановленной формы, о которой речь была выше, о чем свидетельствует также полный параллелизм между образованием первичной формы, определяемой другими методами (спектральными и кондуктометрическими), и появлением фотопотенциала. В присутствии кислорода, быстро реагирующего с первичной формой, появления отрицательного фотопотенциала не наблюдалось.

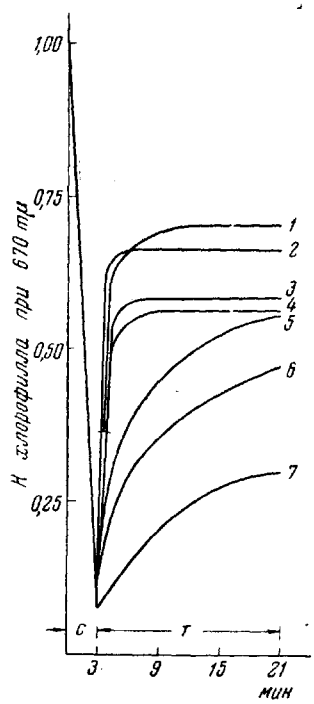


Рис. 3

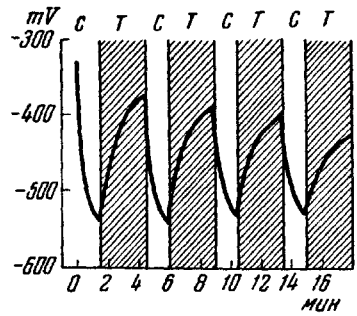


Рис. 4

Рис. 3. Реакция фотовосстановленной формы хлорофилла с молекулами-акцепторами водорода (электрона) [28]. К раствору в вакуумной трубке после световой реакции (*с*) прилиты растворы: *1* — хинона (10^{-2} *моль/л*); *2*— тионина $5 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*); *3* — сафранина *Т* ($5 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*); *4* — рибофлавина ($5 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*); *6* — дифосфопиридин-нуклеотида (10^{-3} *моль/л*); *5*—введен воздух; 7—контроль, введение растворителя

Рис. 4. Изменение потенциала платинового электрода в пиридиновом растворе хлорофилла (10^{-4} *моль/л*) с аскорбиновой кислотой (10^{-2} *моль/л*) при чередующихся периодах освещения красным светом (*с*) и темноты (*Т*) [29]

Измерения фотопроводимости. В дальнейших опытах В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой [30] была измерена электропроводность пиридиновых и спиртовых растворов хлорофилла и его аналогов, содержащих доноры водорода. При освещении в отсутствие воздуха в тех случаях, когда путем спектральных и потенциометрических методов было констатировано образование первичной восстановленной формы,

наблюдалось увеличение электропроводности при освещении, что свидетельствует об образовании фотопродуктов, имеющих ионную природу в соответствии со схемой восстановления, приведенной в нашей первой работе [17].

Эти опыты подтверждают выводы об относительной реакционной способности первичных и вторичных восстановленных форм различных пигментов. Так, например, при — 40° С при освещении быстро увеличивается фотопроводимость раствора хлорофилла с фенилгидразином; в темноте быстро возвращается исходная величина проводимости из-за быстрой обратной реакции первичного фотопродукта (рис. 5). В случае феофитина, где первичная форма более устойчива, после выключения света сохраняется электропроводность.

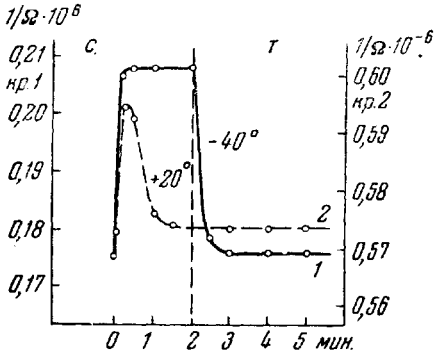


Рис. 5. Фотопроводимость хлорофилла $a + b$ ($0{,}5 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*) в пиридиновом растворе, содержащем фенилгидразин (0,05 моль) [30]

Образование свободных радикалов. В результате первичного фотоакта реакции — восприятия электрона фотоактивированной формой пигмента — следовало ожидать образования пары ион-радикалов [17]. Для установления образования свободных радикалов в реакционной среде ныне широко используются либо парамагнитные свойства свободных радикалов, либо их способность инициировать реакции полимеризации.

В нашей лаборатории метод сенсибилизированной полимеризации мономера под действием красного света, поглощенного хлорофиллом и другими пигментами, нашел применение для исследования фотореакций пигментов с различными донорами водорода; этот метод, наряду с потенциометрией, является наиболее чувствительным способом наблюдения за образованием короткоживущих продуктов фотореакции, вследствие развития цепного процесса в результате единичного фотоакта. «Коэффициент усиления» определяется длиной цепи, которая, вероятно, лежит в пределах 10^7—10^8 молекул мономера на пару радикалов. Исследуя этим методом фотореакции хлорофилла, протохлорофилла и бактериохлорофилла, в присутствии различных доноров водорода, в гомогенной и гетерогенной среде (при эмульсионной полимеризации) в нашей работе с А. В. Умрихиной [31] установлено явление сенсибилизированной полимеризации под действием красного света, поглощаемого хлорофиллом и протохлорофиллом и близкого инфракрасного излучения, поглощаемого бактериохлорофиллом. Реакцию тормозили соединения, быстро реагирующие с фотовосстановленной формой хлорофилла (сафранин и рибофлавин). Сравнительное исследование пигментов фотосинтезирующих организмов показало, что фикоэритрин, обладающий интенсивной флуоресценцией, не приводит к образованию радикалов, в соответствии с его неспособностью к реакции фотовосстановления и отсутствием фотосенсибилизирующего действия, что было обнаружено в нашей лаборатории [32]. Эти факты подтверждают образование свободных радикалов при фотореакции хлорофилла с рядом доноров водорода.

Восстановители — доноры водорода (электрона). Описанным выше путем спектрофотометрических измерений были исследованы фотореакции пигментов с аскорбиновой и диоксималеиновой кислотой*, цистеином, сероводородом, фенилгидразином.

Применяя метод фотосенсибилизированной полимеризации метакрилата, нам удалось наблюдать слабые эффекты без добавочно вводимых

* Вслед за нашими работами Сили и Кальвин [33] применили диэнольные соединения для фотовосстановления порфиринов.

доноров, а лишь в присутствии растворителя — пиридина; усиление наблюдалось при введении глютаминовой, яблочной кислот и других органических соединений, а также солей двухвалентного железа. Применяя потенциометрический метод, В. Б. Евстигнееву и В. А. Гавриловой удалось констатировать появление отрицательного фотопотенциала инертного электрода в среде, содержащей лишь растворитель (спирт или пиридин), играющий роль донора водорода (электрона); усиление эффекта наблюдалось в присутствии целого ряда соединений, с которыми не удается наблюдать реакции путем спектрофотометрических измерений, в том числе с гидрохиноном. Таким образом при реакции фотовосстановления может быть использован широкий круг доноров водорода (электрона).

Рассматривая восстановители с точки зрения величины их окислительно-восстановительного потенциала, мы приходим к заключению, что наиболее глубоко идет реакция с соединениями, обладающими E_0', при pH=7, +0,05 V, хотя констатирована возможность использования соединений с E_0' до +0,3 V. До сих пор остается неясной возможность использования воды как донора электрона, хотя путем измерения активации флуоресценции В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова и А. А. Красновский [34] показали координационное связывание молекул воды и других полярных молекул по центральному атому магния пигмента.

В работе В. Б. Евстигнеева и А. Н. Теренина [35] фотогальваническими измерениями было показано протекание окислительно-восстановительных фотопроцессов на границе: твердая пленка пигмента/раствор электролита.

Было установлено, что знак фотопотенциала электрода, несущего пленку, является критерием направления переноса электрона между молекулами пигмента пленки и молекулами раствора. Судя по измерению фотопотенциала в щелочных средах, можно предположить, что анионы гидроксила в щелочных растворах способны к фотовосстановительной реакции с пленками пигментов.

Фотовосстановление молекулами растворителя. Описанные выше потенциометрические измерения и сенсибилизированная полимеризация в среде растворителей — спирта, пиридина указывают на то, что поглотившая квант света молекула хлорофилла может воспринимать электрон (водород) от молекул растворителя; быстрая обратимость этой реакции не дает возможности ее наблюдать после светового импульса.

Эти наблюдения подсказывают возможное объяснение опытов Порре и Рабиновича [36] и Ливингстона с сотрудниками [37], наблюдавших малые обратимые изменения коэффициента поглощения растворов хлорофилла во время интенсивного освещения. В опытах этих авторов обратимые эффекты наблюдались в метаноле и других растворителях в отсутствие кислорода, который, согласно нашим опытам, быстро реагирует с восстановленной формой хлорофилла.

В работах Ливингстона и Райана [38] наблюдалось образование фотопродуктов с максимумом поглощения у 525 mμ, принадлежащим согласно нашим данным восстановленной форме хлорофилла: вероятно, в среде спирта более «кислого», чем пиридин, длительность жизни «водородной» восстановленной формы гораздо меньше, чем в пиридиновых растворах. Судя по этой работе, фотовосстановленные соединения образуются вслед за бирадикальной формой хлорофилла.

Влияние природы среды на фотовосстановление. Реакцию фотовосстановления нам удалось обнаружить в среде пиридина и в присутствии других органических оснований, где фотопродукты более устойчивы; реакция идет также и в других средах, но различны ее глубина и скорость обратного процесса. Влияние основности среды на устойчивость фотопродуктов может быть связано с условиями кислотно-основного равновесия. Еще в работах Михаэлиса [39] было показано

что устойчивость семихинонов в сильной степени зависит от pH среды, определяющей равновесие между семихинонами в форме ион-радикала и в неионной «водородной» форме. В связи с этим следует указать на то, что, изучая химическое восстановление хлорофилла и его аналогов цинком (по Тимирязеву), В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова [40] установили, что для образования устойчивых восстановленных форм пигментов, идентичных фотовосстановленным формам, требуется определенное количество кислоты, вводимое в пиридин. Так, например, для получения «красной» восстановленной формы хлорофилла, аналогичной продукту фотореакции хлорофилла, требуется ввести 0,03 *мл* уксусной кислоты на 5 *мл* пиридина, тогда как в случае более «основного» пигмента — фталоцианина магния для образования «красной» формы требуется уксусной кислоты в тридцать раз меньше.

В нашей лаборатории [20] была обнаружена в спектре хлорофилла, в пиридине новая полоса при 640 mμ. Появление этой полосы может быть связано с сольватацией молекулы хлорофилла пиридином; подобной полосы нет в спиртовом растворе хлорофилла, но она появляется в этом растворе при —180° [41], что может быть связано с упрочением при этой температуре водородной связи хлорофилла с растворителем. В сильных основаниях (пиперидин) происходит необратимое химическое изменение хлорофилла с разрывом циклопентанонового кольца [42, 43]; тогда как фталоцианин магния, не обладающий лабильными атомами водорода, имеет в пиперидине и спирте подобные спектры поглощения [42]. Спектральные эффекты сольватации хлорофилла основаниями не могут быть объяснены лишь координационным связыванием молекул основания по центральному атому магния молекулы хлорофилла [34], так как такое связывание не ведет к значительным изменениям спектра поглощения пигмента. Магний в хлорофилле является слабым комплексообразователем. Так, например, связь пигмента с молекулой воды в толуоловом растворе нарушается уже при отгонке части растворителя в вакууме [34]. Как показали А. Н. Сидоров и А. Н. Теренин [44], в инфракрасном спектре аналога хлорофилла — фталоцианина Mg при присоединении молекулы воды наступают отчетливые изменения связей во всем скелете пигмента. Сольватация, безусловно, связана с взаимодействием растворителя не только с центральным атомом магния, но и с различными группами молекулы хлорофилла. На ее спектральные проявления наиболее отчетливо влияют оттягивание протона потенциально-кислых групп в основных средах или присоединение протона к основным группам в кислых средах [12].

Структура пигментов и их способность к реакции фотовосстановления. Реакцию удалось наблюдать у всех испытанных порфиринов, обладающих центральными атомами магния, цинка или водорода; в том числе у хлорофилла *a* и *b*, феофитина *a* и *b*, Zn-феофитина, бактериохлорофилла и бактериофеофитина, протохлорофилла, протофеофитина, гематопорфирина, феофорбида, фталоцианина магния, цинка и без металла, бактериальных порфиринов.

Сравнивая структуру указанных соединений, мы приходим к следующим выводам.

На способность к фотовосстановлению не влияет степень восстановления «полуизолированных» двойных связей в молекуле пигмента. К реакции способны соединения, в основе которых лежат структуры порфина, хлорина и бактериохлорина.

Наличие «лабильного атома» водорода в молекуле не оказывает заметного действия на реакцию фотовосстановления, которая идет как с фталоцианином магния (молекула которого не обладает такими лабильными атомами водорода), так и с хлорофиллом. Вероятно, однако, что наличие лабильных атомов водорода в молекуле пигмента играет значительную роль в проявлении кислотно-основных свойств пигментов, определяя оптимальные условия среды, в которых идет реакция.

Наличие циклопентанонового кольца, повидимому, стимулирует присоединение электрона по главной системе сопряженных по кругу двойных связей, тогда как нарушение этого кольца ведет к восстановлению «полуизолированных» двойных связей. Это явление было обнаружено нами при исследовании протохлорофилла и его производных.

Влияние природы центрального атома металла. Реакцию удается наблюдать у соединений, не содержащих атома металла (феофитины, гематопорфирин и др.), а также у пигментов, обладающих атомами магния и цинка. Обычно наличие атома магния способствует большей реактивности фотовосстановленной формы, которая, например, у феофитина более устойчива, чем у хлорофилла.

В работах Б. Я. Даина с сотрудниками описано фотовосстановление Fe-комплексов феофитина и феофорбида [15]; в этих случаях, в отличие от магниевых и «водородных» соединений, реакция связана с обратимым окислением — восстановлением центрального атома железа молекулы пигмента. В нашей работе с К. К. Войновской удалось наблюдать фотовосстановление цитохрома *c* [45]; однако фотореакции железных комплексов идут гораздо медленнее и менее глубоко, чем реакции Mg-комплексов и порфиринов без центрального атома металла. Фотореакцию нам не удалось наблюдать у медных комплексов.

О механизме реакции фотовосстановления. В системе сопряженных по кругу двойных связей молекулы пигмента делокализованы π-электроны, и обращение спина электрона, ведущее к образованию метастабильного состояния, вряд ли приводит к локализации бирадикала в определенном месте этой системы связей. Воспринятый молекулой пигмента при элементарном акте фотовосстановления электрон также, вероятно, делокализован в системе сопряженных связей, однако последующее восприятие протона должно вести к фиксации места восстановления внутри молекулы. Это место у хлорофилла и его аналогов еще не установлено, тогда как у гематопорфирина конечное фотовосстановление происходит по месту «полуизолированных» двойных связей, о чем свидетельствуют спектральные данные.

Конечно, протон не существует в свободном состоянии в этих растворах, будучи сольватирован молекулами-основаниями; донор водорода (электрона) — аскорбиновая кислота вероятно связана водородной связью с пиридином.

Образованный в фотоакте ион-радикал

$$\cdot X\cdot + AH\cdots N< \rightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+\cdots N<$$

может воспринять протон лишь при соблюдении определенной величины сродства к протону основания и ион-радикала. Мы высказываем предположение, что устойчивость «красных» восстановленных форм определяется образованием сочлененных водородной связью соединений

$$\cdot X^-\cdots H^+\cdots N<,$$

когда протон находится «между» молекулами пигмента и среды-основания. Стабильность восстановленных форм пигментов различна в средах разной основности. В сильных основаниях доминирует образование ион-радикала, тогда как в более кислых средах образование «водородной» формы семихинона.

ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА ПРИ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ХЛОРОФИЛЛОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ РЕАКЦИЯХ [46,47]

Мы обнаружили [48], что за счет энергии квантов красного света, поглощаемых хлорофиллом и его аналогами, удается осуществить восстановление рибофлавина ($E_0' = -0{,}22$ V) и сафранина Т ($E_0' = -0{,}3$ V)

аскорбиновой кислотой ($E'_0 = +0{,}05$ V). Эти реакции идут в отсутствие воздуха в спиртовых или пиридиновых растворах. В нашей работе с Г. П. Брин [49] было осуществлено сенсибилизированное хлорофиллом восстановление дифосфопиридин-нуклеотида ($E'_0 = -0{,}32$V); в работе с К. К. Войновской [50] подобные реакции были осуществлены с феофитинами и бактериохлорофиллом, обладающим главным максимумом поглощения в близкой инфракрасной области спектра (рис. 6). Реакции с бактериохлорофиллом являются близкой моделью фотостадии бактериального фотосинтеза; здесь работают доноры водорода, которые используют бактерии (H_2S), и степень «запасания» энергии мало отличается от бактериального фотосинтеза, при котором нет выделения кислорода воды.

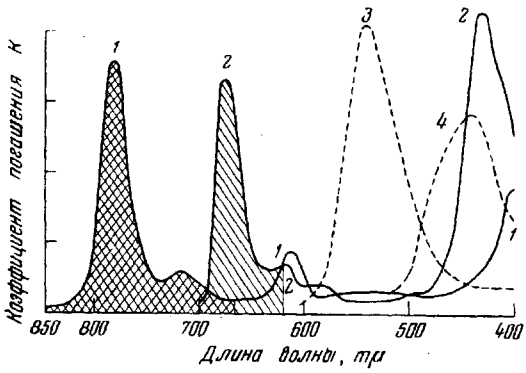


Рис. 6. Спектры поглощения пигментов-сенсибилизаторов: *1* — бактериохлорофилла; *2* — хлорофилла *a* и акцепторов водорода; *3* — сафранина Т; *4* — рибофлавина. Заштрихована спектральная область возбуждения сенсибилизаторов

Реакции эти обратимы в темноте; однако в ряде случаев обратная реакция идет достаточно медленно для того, чтобы дать возможности спектрофотометрических измерений в течение нескольких минут после светового периода. В случае интенсивного освещения (в наших опытах до 10^6 *эрг/см/сек*). скорость светового процесса намного превосходит скорость обратной реакции.

Сравнительная медленность обратных реакций в исследованных нами процессах следует объяснить быстроидущей дисмутацией первично-образуемых семихинонов до валентно-насыщенных лейкосоединений; повидимому, в условиях опыта скорость дисмутации значительно превышает скорость обратных реакций фотопродуктов.

Благоприятные условия кинетики этих реакций создают возможность «запасания» энергии в сравнительно устойчивых конечных продуктах реакции. Кинетические закономерности отдельных стадий реакции нуждаются в дальнейшем изучении.

Работы лаборатории показали, что в этих реакциях молекула пигмента претерпевает обратимое фотовосстановление, играя роль фотокатализатора, переносящего водород (электрон) от донора к акцептору водорода.

Резюмируем доказательства того, что исследованные реакции идут через стадию обратимого восстановления пигмента-сенсибилизатора.

Наиболее отчетливое сенсибилизированное восстановление акцепторов наблюдается с теми донорами водорода, которые способны к наиболее глубокому фотовосстановлению хлорофилла (аскорбиновая и диоксималеиновая кислоты, цистеин, фенилгидразин).

Освещение системы хлорофилл-восстановитель ведет к падению максимума поглощения хлорофилла (из-за фотовосстановления), тогда как в тройной системе восстановитель-хлорофилл — окислитель не наблюдается явного падения максимума поглощения хлорофилла, что свидетельствует о взаимодействии окислителя с промежуточно образуемой восстановленной формой хлорофилла.

Наконец, возможно провести раздельно стадию фотовосстановления и темновую стадию взаимодействия окислителя с фотовосстановленной формой хлорофилла. Наши опыты с Г. П. Брин показали, что все изучен-

ные акцепторы водорода реагируют в темноте с «красной» восстановленной формой хлорофилла [28].

В опытах В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой эти реакции проведены при низких температурах, когда тормозится образование «красной» формы; при этом удалось констатировать реакцию акцептора с первичной восстановленной формой, более активной, чем вторичная, «красная» форма [51]. Таким образом следует считать определенно установленным, что реакция идет через стадию фотовосстановления пигмента сенсибилизатора.

Трудно сомневаться в том, что этот механизм является универсальным для сенсибилизированных хлорофиллом реакций переноса водорода в растворах, не сопровождающихся запасанием энергии. Такова, например, реакция сенсибилизированного хлорофиллом восстановления метилового красного фенилгидразином, изученная в работе Гош и Сен-Гупта [52] и Ливингстона с сотрудниками [53], а также реакции сенсибилизированного хлорофиллом восстановления кислорода многими органическими соединениями.

На основании вышеизложенного, последовательность элементарных процессов при сенсибилизированной реакции такова (АН — донор водорода, В — акцептор):

Световая стадия

$$X + AH \rightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+.$$

Темновые стадии

Образование «протонной» восстановленной формы

$$\cdot X^- + \cdot AH^+ \rightleftarrows \cdot XH + \cdot A.$$

Взаимодействие с акцептором водорода В

$$\cdot X^- + B \rightarrow X + \cdot B^-; \quad \cdot B^- + H^+ \rightarrow \cdot BH; \quad \cdot XH + B \rightarrow \cdot BH + X.$$

Дисмутация ВН и А до валентно-насыщенных соединений.

Желательна хотя бы грубая оценка степени «запасания» энергии при исследованных реакциях. Перенос электрона (водорода) идет от аскорбиновой кислоты ($E'_0 = +0{,}05$ V) до пиридин-нуклеотидов ($E'_0 = -0{,}32$ V); ΔE составляет — 0,37 V «вверх»; эта величина подтверждается измерениями фотопотенциала, также дающими величину — 0,35, —0,4 V. Эти данные указывают на то, что величина ΔE приблизительно одинакова в водных спиртовых и пиридиновых растворах (конечно, величина E'_0 различается в разных средах). Полагая, что восстановление в конечном счете ведет к переносу двух электронов (образование лейкосоединения), получим увеличение свободной энергии:

$$\Delta F = 2 \cdot 23{,}06 \cdot 0{,}4 = 18{,}4 \text{ ккал},$$

что составляет около 40% энергии красного кванта. Величина квантового выхода этих реакций еще не измерялась.

Сенсибилизированное хлорофиллом восстановление кислорода. Давно известно (литературу по этому вопросу см. в [54]), что хлорофилл в растворе способен сенсибилизировать реакции окисления ряда органических соединений кислородом воздуха; эти реакции, повидимому, не сопровождаются «запасанием» энергии в устойчивых конечных продуктах.

В наших работах с Г. П. Брин было показано, что хлорофилл и его аналоги энергично сенсибилизируют окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. Эти реакции были изучены при помощи микроманометрического метода, по убыли парциального давления кислорода над реагирующей системой.

В первой работе было показано, что взвеси кристаллических фтало-

цианинов обладают сенсибилизирующим действием [55]; этот случай принадлежит к типу полупроводникового фотокатализа [56].

В последующих работах было изучено сенсибилизирующее действие хлорофилла и фталоцианина магния в спиртовом и пиридиновом растворах [57]; реакция окисления аскорбиновой кислоты при этом идет столь энергично, что может быть применена для аналитического определения малого количества кислорода в азоте или ином инертном газе. Дальнейшие опыты показали, что гомогенаты из листьев также обладают способностью к этой реакции [46,58].

Эти реакции вероятно, идут также через стадию обратимого восстановления хлорофилла; кислород быстро окисляет фотовосстановленные формы пигмента: особенно быстро идет реакция с первичной формой.

Мы рассматривали также возможность первичного окисления хлорофилла кислородом при этих реакциях [57]; однако детальный разбор механизма реакций этого типа выходит из рамок настоящей статьи.

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ С КИСЛОРОДОМ

Растворы пигментов в органических растворителях в присутствии кислорода воздуха при действии света выцветают; это явление было известно с давних пор, так же как и наблюдения над тем, что удаление воздуха препятствует выцветанию. Проводя сравнительное исследование скорости выцветания (деструктивного окисления) пигментов-аналогов, мы обнаружили, что в ряду протохлорофилл — хлорофилл — бактериохлорофилл наиболее устойчив к окислению протохлорофилл, являющийся наименее восстановленным соединением в этом ряду, тогда как наиболее восстановленный бактериохлорофилл чрезвычайно быстро выцветает на воздухе. Замена центрального атома магния на водород с образованием феофитина ведет к чрезвычайному упрочению молекул этих пигментов к окислению [59]; так, например, бактериофеофитин, производное крайне фотолабильного бактериохлорофилла, отличается весьма большой устойчивостью к окислению [22].

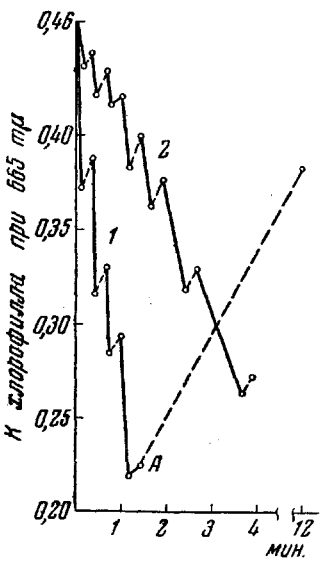


Рис. 7. Кинетика обратимого фотоокисления хлорофилла кислородом воздуха [61]. *1* — раствор хлорофилла *a* + *b* в смеси спирт — глицерин (3,5 : 6,5); в точке *A* введено 10 *мг* аскорбиновой кислоты; *2* — раствор хлорофилла *a* + *b* в этиловом спирте; сплошная линия — свет; штриховые — темнота

Для нас, однако, наиболее интересна возможность образования в процессе фотоокисления нестойких, промежуточных фотопродуктов, способных к обратимой регенерации исходного пигмента.

В наших работах было показано, что окисление перекисью бензоила растворов хлорофилла и фталоцианина магния ведет к образованию, наряду со стойкими продуктами деструктивного окисления, также лабильных соединений, обратимо регенерирующих при действии слабых восстановителей [60].

Лабильные окисленные соединения образуются и при фотореакции. В опытах фотоокисления [19] мы освещали интенсивным светом растворы пигментов, содержащих кислород воздуха, с последующим наблюдением обратной регенерации пигмента, наступающей в темноте в результате восстановления лабильного фотопродукта растворителем или вво-

димым извне восстановителем, в качестве которого чаще всего применялась аскорбиновая кислота. Мы наблюдали тогда, что при фотоокислении хлорофилла, так же как и при окислении перекисью бензоила, образуются соединения с поглощением в зеленой области спектра (500—550 mμ), реагирующие с восстановителем с соответствующим падением поглощения в этой области спектра. Бактериохлорофилл и фталоцианин магния образуют при фотоокислении больше лабильных соединений, чем хлорофилл.

Недавно в нашей работе с Л. М. Воробьевой [61] было показано, что обратимое окисление наблюдается особенно отчетливо в спирто-глицериновых средах; на свету идет быстрый фотопроцесс, сопровождающийся падением коэффициента погашения хлорофилла; в темноте, судя по обратимому увеличению величины K, происходит быстрая обратная реакция лабильных окисленных продуктов с растворителем (рис. 7). Вероятно, что при фотореакции образуются перекисные соединения пигментов согласно схеме [1, 2, 57]

$$\cdot X\cdot + O_2 \rightarrow \cdot XO_2\cdot \rightleftarrows XO_2.$$

Активные продукты — перекиси — бирадикалы ($\cdot XO_2\cdot$) могут превратиться в устойчивые циклические перекиси XO_2 и далее в продукты деструктивного окисления.

«Запасание» энергии в активной перекиси возможно, но мы не располагаем пока методами для оценки этой величины. После опубликования монографии А. Н. Теренина [1], в которой рассмотрены схемы окисления с участием бирадикальной формы красителей-сенсибилизаторов, подобные схемы окисления хлорофилла были предложены Шенком [62].

Структура пигмента и его способность к фотоокислению. Многие авторы приписывали способность к окислению молекулы хлорофилла наличию лабильного атома водорода у десятого углеродного атома. Однако наши опыты показали, что фталоцианин магния, не обладающий лабильными атомами водорода, тем не менее легко и обратимо окисляется [19, 60].

Степень восстановления «полуизолированных» двойных связей изменяется в ряду протохлорофилл — хлорофилл — бактериохлорофилл, устойчивость к окислению падает в том же порядке; бактериохлорофилл окисляется при освещении легко и быстро, тогда как протохлорофилл весьма устойчив.

Лишь в особых условиях окисление ведет к отнятию атомов водорода в положении 6 и 7 и 9 и 10. Так, при фотоокислении хлорофилла кислородом не наблюдается образования протохлорофилла. Однако при действии о-хинона на бактериохлорофилл наблюдается образование хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения при 675 mμ [22].

Спектральные свойства продуктов окисления кислородом указывают на то, что в этих случаях затрагивается система сопряженных двойных связей, откуда, вероятно, и происходит отрыв электрона с последующей локализацией химических изменений в наиболее «слабом» месте молекулы. Наши опыты показали, что продукты фотоокисления, так же как и продукты фотовосстановления, обладают поглощением в зеленой области спектра. Недавние работы Уэллера в лаборатории Р. Ливингстона [63] показали, что продукт фазовой пробы — анион хлорофилла, образующийся в результате действия сильных оснований, также обладает поглощением в зеленой области спектра; это соединение весьма склонно к окислению. Повидимому, появление заряда в атомных группах молекулы, связанных с разомкнутой системой сопряженных двойных связей, ведет к сходному возмущению электронной системы молекулы, определяющей сходный спектр поглощения у иона и ион-радикала.

Природа центрального атома металла. Заме-

щение магния на водород — образование феофитинов — весьма сильно уменьшает способность пигментов к окислению, не влияя и даже благоприятствуя фотовосстановлению. Замещение магния на атом меди также в сильной степени повышает стабильность молекулы. Вероятно, степень оттягивания электронного облака сопряженных связей к центральному атому влияет на способность к окислению всей молекулы.

Таким образом отдельные особенности структуры пигмента влияют на реакционноспособность, однако принципиальные свойства молекулы определяются главным скелетом — системой сопряженных по кругу двойных связей.

СОПРЯЖЕНИЕ ФОТОРЕАКЦИЙ ХЛОРОФИЛЛА С БИОКАТАЛИТИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ

Наши работы показали, что хлорофилл, в результате поглощения кванта света, приобретает свойства окислителя, воспринимая электрон от молекулы-донора. В результате фотохимической мобилизации электрона часть энергии кванта преобразуется в потенциальную энергию образованных продуктов — радикалов; однако для того, чтобы эти активные соединения могли быть использованы для биохимических процессов, фотореакции должны быть сопряжены с биокаталитическими процессами, определяющими специфичность дальнейших реакций. Наличие в хлоропластах разнообразных ферментных систем, исследованных в работах Н. М. Сисакяна с сотрудниками [64], указывает на возможность их сопряжения с действием хлорофилла.

Универсальными биокатализаторами, переносящими водород (электрон) в клетке, являются пиридин-нуклеотиды, флавины и цитохромы. Первые две группы соединений являются простетическими группами дегидразных ферментов; они сравнительно слабо связаны с белковой частью фермента; в молекуле цитохрома железопорфирин прочно химически связан с белковой частью молекулы.

В основе биокаталитического действия этих соединений лежит способность к обратимым окислительно-восстановительным превращениям; величина E'_0 пиридин-нуклеотидов, наиболее сильных восстановителей, достигает — 0,32 V, у рибофлавина — 0,22 V и у цитохромов от —0,05 V (цитохром *b*) до +0,26 V (цитохром *c*).

При окислительно-восстановительном взаимодействии этих систем с хлорофиллом должны быть рассмотрены две основные возможности: 1) возбужденный хлорофилл использует восстановленную систему как акцептор водорода (электрона); 2) фотовосстановленная форма хлорофилла реагирует с окисленной формой биокаталитической системы.

Для ступенчатого восстановления углекислоты при фотосинтезе, повидимому, достаточны ферментные системы с потенциалом пиридин-нуклеотидов (до —0,35 V). Поэтому возможная фотореакция хлорофилла с восстановленными формами пиридин-нуклеотидов и флавинов не интересна в аспекте «запасания» энергии. Цитохром *b* имеет величину E'_0, близкую к аскорбиновой кислоте [65]; трудно сомневаться в возможности взаимодействия восстановленной формы цитохрома *b* с хлорофиллом.

С другой стороны, фотовосстановленная форма хлорофилла легко передает свой электрон окисленным формам биокаталитических систем — пиридин-нуклеотидам и флавинам. Этот путь сопряжения хлорофилла с пиридин-нуклеотидами, обнаруженный в нашей работе с Г. П. Брин в 1949 г., был подтвержден в последующих работах с изолированными хлоропластами [66]. Недавно нам удалось обнаружить сенсибилизированные хлорофиллом восстановление и окисление цитохрома [45,67]; возможно, что подобная система реакций участвует в мобилизации электрона воды при фотосинтезе. Во всяком случае, конкретный путь включения воды в систему этих реакций нельзя считать ясным.

О ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОМ ЗНАЧЕНИИ ИССЛЕДОВАННЫХ РЕАКЦИЙ

Установленная в изложенных работах способность хлорофилла к обратимому восстановлению и сенсибилизации реакций переноса водорода свидетельствует в пользу гипотезы об осуществлении хлорофиллом «подъема» водорода (электрона) вверх (в энергетическом смысле) в процессе фотосинтеза. Мы не имеем возможности рассмотреть здесь биохимический аспект проблемы [46,68], тесно связанной в работах нашей лаборатории с исследованием состояния хлорофилла и его аналогов в живых фотосинтезирующих организмах [69]. Мы хотели бы здесь лишь перечислить недавно обнаруженные явления, соответствующие изложенным выше представлениям.

1. Прежде всего нужно указать на то, что в нашей работе с Л. М. Воробьевой [61] удалось обнаружить обратимые фотохимические окислительно-восстановительные превращения хлорофилла в естественном состоянии связи, в гранулах хлоропластов растений.

2. В работах ряда исследователей показано, что хлорофилл в хлоропластах и живых растениях способен сенсибилизировать фотовосстановление пиридин-нуклеотидов (например [66]).

3. Применяя методы импульсной фотохимии и дифференциальной спектроскопии, Дюйсенс, Витт и Белл [70] обнаружили в листьях растений после светового импульса обратимое появление максимума поглощения, соответствующего поглощению фотовосстановленной формы хлорофилла (около 520 mμ), обнаруженной в наших работах.

Пока нельзя считать ясным, в какой степени связано с фотосинтезом явление обратимого фотохимического взаимодействия хлорофилла с кислородом; быть может, это взаимодействие является стадией на пути выделения кислорода. Пока лишь ясно, что фотоокисление хлорофилла в хлоропластах является побочным процессом, наиболее отчетливым при интенсивном освещении листьев. Фотосенсибилизированное окисление в листьях и гомогенатах может «замыкать накоротко» [71] путь переноса водорода, приводя к окислению кислородом (или предшествующим ему соединением) активных восстановителей, образованных в результате фотопроцесса; эти реакции могут быть сопряжены с окислительным фосфорилированием.

Здесь уместно указать на то, что обратимые фотореакции пигментов могут быть связаны не только с фотосинтезом, но и с другими фотобиологическими процессами: образованием хлорофилла из протохлорофилла, действием света на прорастание семян, фотопериодическими реакциями растения, фотодинамическим действием порфиринов и т. д.

В заключение приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину, постоянный интерес, внимание и помощь которого определили возможность осуществления изложенного цикла исследований.

ВЫВОДЫ

В работе описаны обратимые фотореакции хлорофилла (главным образом обратимое фотовосстановление и сенсибилизированные им процессы, переноса водорода, сопровождающиеся «запасанием» световой энергии в продуктах реакции.

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

Поступила
21. II. 1956

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд-во АН СССР, 1947.
2. А. Н. Теренин, Acta Phys. chim. URSS, **18**, 210, 1943, Изв. АН СССР, сер. физ., 9, 312, 1945; Журн. физ. химии, **18**, 1, 1944; Биохимия, **17**, 123, 1952.
3. G. N. Lewis, M. Kasha, Journ. Amer. Chem. Soc., **66**, 2100, 1944.
4. G. N. Lewis, M. Calvin, M. Kasha, Journ. Chem. Phys., **17**, 904, 1949. D. F. Evans, Nature, **176**, 777, 1955.

5. А. Н. Теренин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 369, 1947; А. А. Красновский, Усп. совр. биол. 21, 123, 1946.
6. А. Н. Теренин и В. Л. Ермолаев, ДАН, **85**, 547, 1952.
7. А. Н. Теренин, Усп. физ. наук, **43**, 347, 1951.
8. M. Kasha, Journ. Amer. Chem. Soc., **77**, 3669, 1955.
9. R. Livingston, Journ. Amer. Chem. Soc., **77**, 2179, 1955.
10. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, **74**, 315, 1950.
11. Э. В. Шпольский и Е. Гришкун, Журн. физ. химии, **19**, 107, 1945.
12. В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, **58**, 2, 417, 1399, 1947.
13. Е. К. Пуцейко, А. Н. Теренин, Журн. физ. химии, **30**, 5, 1956.
14. Е. Рабинович, Фотосинтез, т. II, ИИЛ, 1953.
15. М. С. Ашкинази, Б. Я. Даин, ДАН, **80**, 385, 1951; М. С. Ашкинази, И. П. Герасимова, Б. Я. Даин, ДАН, **102**, 767, 1955; М. С. Ашкинази, В. Е. Карпитская, ДАН, **96**, 785, 1954; R. J. P. Williams, Biol. Rev., **28**, 381, 1953.
16. А. Н. Теренин, Усп. химии, **24**, 121, 1955.
17. А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421, 1948.
18. К. А. Тимирязев, Nature, **32**, 342; **34**, 52, 1886. Соч., т. II, стр. 268, 270, Сельхозгиз, 1937.
19. А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617, 1947.
20. А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393, 1949; А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **82**, 947 1952.
21. А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663, 1949.
22. А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879, 1951.
23. E. Rabinowitch, Ann. Rev. of Plant Physiol. **3**, 229, 1952. S. B. Hendricks, Science, **117**, 370, 1953.
24. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **96**, 1025, 1954.
25. А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **96**, 1209, 1954. К. К. Войновская и А. А. Красновский, Биохимия, **20**, 123, 1955.
26. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **96**, 1201, 1954.
27. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **98**, 1017, 1954.
28. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239, 1950.
29. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381, 1953; **95**, 841, 1954, **100**, 131, 1955.
30. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, **103**, 97, 1955.
31. А. А. Красновский и А. В. Умрихина, ДАН, **104**, 882, 1955.
32. А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин, В. А. Гаврилова, ДАН, **82**, 947, 1952.
33. G. R. Seely, M. Calvin, Journ. Chem. Phys. **23**, 1068, 1955.
34. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, **70**, 261, 1950.
35. В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин, ДАН, **81**, 223, 1951.
36. D. Porret, E. Rabinowitch, Nature, **140**, 321, 1937.
37. R. Livingston, Journ. Phys. Chem., **45**, 312, 1941; **52**, 622, 1948.
38. R. Livingston, V. Ryan, Journ. Amer. Chem. Soc., **75**, 2176, 1953.
39. L. Michaelis, Currents in Biochem., Research, N. Y., 1946.
40. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **108**, № 3, 1956; Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, ДАН, **74**, 103, 1950.
41. S. Freed, K. Sancier, Science, **114**, 275, 1951.
42. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527, 1953.
43. R. Livingston, A. Weller, Journ. Amer. Chem. Soc., **76**, 1575, 1954.
44. А. Н. Сидоров, А. Н. Теренин, ДАН, **104**, 575, 1955.
45. А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, **1**, 120 1956.
46. А. А. Красновский, Доктор. диссертация, Ин-т биохимии АН СССР 1948.
47. А. А. Красновский, Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности, Изд-во АН СССР, 1955, стр. 92.
48. А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91, 1948.
49. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325, 1949.
50. А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109, 1952.
51. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **98**, 1017, 1954.
52. J. C. Ghosh, C. B. Sen-Gupta, Journ. Ind. Chem. Soc., **11**, 65, 1934.
53. R. Livingston, R. Pariser, Journ. Amer. Chem. Soc., **70**, 1510, 1948.
54. Е. Рабинович, Фотосинтез, т. I, ИИЛ, М., 1951.
55. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447, 1946.
56. А. А. Красновский, Проблемы кинетики и катализа, 8, 40. Электронные явления в катализа и адсорбции» Изд-во АН СССР, 1955.
57. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087, 1947.
58. А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **63**, 163, 1948.
59. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781, 1950.

60. А. А. Красновский., ДАН, 58, 835, 1947.
61. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **104**, 440, 1955. Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **21**, 126, 1956.
62. G. O. Schenck, Zs. Electrochem., **55**, 505, 1951.
63. A. Weller, Journ. Amer. Chem. Soc., **76**, 5819, 1954. B. Dunitz. T. Thomas, M. van Pee, R. Livingston, Journ. Amer. Chem. Soc., **73**, 3388, 1951.
64. Н. М. Сисакян, Ферментативная активность протоплазменных структур, Изд-во АН СССР, 1951.
65. R. Hill, Nature, **174**, 501, 1954.
66. W. Vishniak, S. Ochoa, Nature, **167**, 768, 1951.
67. А. А. Красновский, ДАН, **103**, 283, 1955.
68. А. А. Красновский, ст. Фотосинтез растений в сборнике «Проблемы биохимии», т. I, 1950, Изд-во АМН; Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 122, 1955.
69. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177, 1952; **91**, 343, 1953; Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия № 1—2, 1956; А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К Войновская, ДАН, **92**, 1201, 1953.
70. L. N. Duysens, Science, **120**, 353, 1954; H. T. Witt, Naturwiss.,**42**, 72, 1955; Л. Н. Белл, ДАН, **107**, 329, 1956.
71. Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **16**, 463, 1951; N. Good, R. Hill, Arch. Biochem. a. Biophys., **57**, 355, 1955.

Том I, вып. 2 1956

ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЦИТОХРОМА И СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ЭТИХ РЕАКЦИЙ ХЛОРОФИЛЛОМ И БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОМ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОИНОВСКАЯ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В нашей лаборатории были обнаружены и исследованы фотохимические окислительно-восстановительные превращения хлорофилла и его аналогов, лежащие в основе фотосенсибилизирующего действия этих пигментов [1]. При исследовании сенсибилизированных хлорофиллом превращений цитохрома *с* мы обнаружили, что растворы этого соединения также способны к прямому фотохимическому восстановлению и окислению [2]. Однако эти реакции требуют интенсивного освещения и идут гораздо медленнее, чем фотореакции хлорофилла и его аналогов.

Исследованию этих реакций цитохрома *с* и сенсибилизации их к длинноволновой области спектра посредством хлорофилла и бактериохлорофилла посвящено настоящее сообщение.

Мы выделяли цитохром *с* из бычьих сердец по Кейлину и Хартри [3]. Полученный раствор цитохрома хранили в вакууме, в темноте при +3° С. В свежеприготовленном растворе цитохром находился в окисленной форме. При длительном хранении раствора в вакууме в темноте несколько увеличивалось количество восстановленной формы. Описанные ниже опыты мы вели со свежими растворами цитохрома обычным методом, принятым в нашей лаборатории, в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для измерений на фотоэлектрическом спектрофотометре Бекмана. О превращениях цитохрома *с* и хлорофилла мы судили по изменению характерных спектров поглощения этих соединений. Как известно, образование восстановленной формы цитохрома *с* ведет к появлению максимума поглощения при 500 $м\mu$. Изучение превращений цитохрома в присутствии хлорофилла облегчается тем обстоятельством, что максимум поглощения восстановленной формы цитохрома (цитохром Fe^{++}) лежит в минимуме поглощения хлорофилла.

Прямое фотовосстановление и фотоокисление цитохрома

Обычно опыты проводились по следующей схеме: 0,8 *мл* исходного раствора цитохрома смешивали с 4,2 *мл* $^1/_{15}$ *М* раствора Na_2HPO_4, KH_2PO_4 или буферной смесью этих растворов с pH 7,5 и эвакуировали масляным насосом в течение 3 мин. при энергичном взбалтывании трубки с раствором. В ряде опытов перед эвакуированием вводили 10 *мг* донора водорода (янтарной, яблочной или молочной кислот). Концентрация цитохрома в рабочем растворе обычно составляла около $3 \cdot 10^{-5}$ *М/л*, максимум поглощения восстановленной формы лежал при 549 $м\mu$ (± 1 $м\mu$).

После измерения спектра поглощения раствор оставляли в темноте на 20 мин. и затем освещали при 20° на термостатируемой установке киноламповой накаливания 500 *вт* в фокусе конденсора (интенсивность света — около 10^6 *эрг/см² сек*); освещение вели полным («белым») светом киноламповы или, в некоторых опытах, через красные светофильтры,

После этого в трубку пускали воздух и, выдержав раствор в темноте, вновь освещали для того, чтобы наблюдать фотоокисление образованной при освещении без воздуха восстановленной формы цитохрома. До и после освещения, а также после обратной реакции измеряли спектр поглощения в области 500—600 *мμ*, в процессе освещения каждые 3 мин. производились измерения коэффициента поглощения *K* при 549 *мμ*.

Во всех опытах освещение растворов приводило к появлению максимума поглощения при 549 *мμ* характерного для восстановленной формы цитохрома. Несмотря на интенсивное освещение, реакция обычно шла неглубоко (рис. 1).

Сравнение данных опытов, проведенных в пределах изменения pH от 4,5 до 9, показало, что при более щелочных pH фотовосстановление цитохрома идет быстрее и глубже. Введение доноров водорода — яблочной, янтарной или молочной кислот — обычно не приводило к ускорению фотовосстановления, что указывает на возможность внутрикомплексного восприятия электрона центральным атомом железа цитохрома от сопряженных с ним

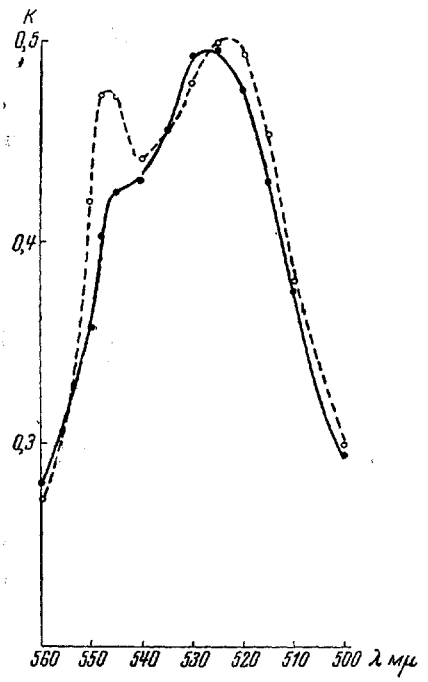


Рис. 1. Фотовосстановление окисленного цитохрома (без воздуха) в 1/15 *M* растворе Na_2HPO_4:

Сплошная линия — спектр поглощения исходного раствора, пунктирная линия — после 30 мин. освещения без воздуха

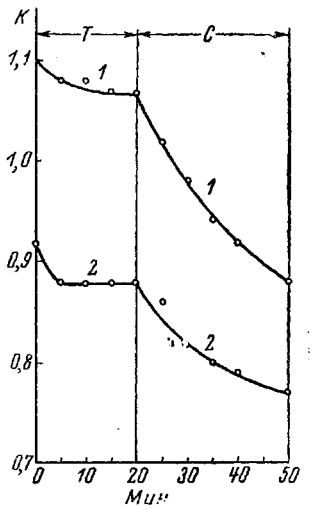


Рис. 2. Фотоокисление восстановленной формы цитохрома (кинетика изменения *K* при 549 *мμ*):

1 — при pH 7,4; *2* — при pH 4,7 (*T* — темнота, *C* — освещение)

группировок белка. Однако при освещении хранившихся около 2 мес. растворов цитохрома в некоторых опытах наблюдалось ускорение реакции в присутствии доноров водорода. В водно-глицериновом растворе, составленном из 0,8 *мл* раствора цитохрома, 1,6 *мл* $^1/_{15}$ *M* Na_2HPO_4 и 2,4 *мл* глицерина, наблюдалось восстановление цитохрома в темноте; освещение ускоряло эту реакцию.

Чтобы исследовать действие освещения на фотоокисление восстановленного цитохрома кислородом воздуха, опыты ставились следующим образом. Исходный раствор цитохрома восстанавливали свежеприготовленным раствором 10 *мг* гидросульфита натрия в 5 *мл* буфера. Раствор гидросульфита вводили в раствор цитохрома по каплям, наблюдая путем измерений величины *K* при 549 *мμ* за ходом восстановления. В специальном опыте была установлена величина *K* при 549 *мμ*, соответствую-

щая полному восстановлению цитохрома. Обычно в раствор цитохрома вводили несколько капель раствора гидросульфита, достигая восстановления 80—90% цитохрома с тем, чтобы избежать избытка гидросульфита в реакционной среде при фотохимических опытах.

При pH 8,6 наблюдалось довольно быстрое окисление цитохрома Fe^{++} в темноте; при pH 7,5 и 4,7 темновое окисление было незначительным, тогда как освещение приводило к быстрому фотоокислению (рис. 2).

В красном свете (пропущенном через светофильтр RG-2, обладающий границей поглощения при 620 *мμ*) реакция идет весьма медленно вследствие слабого поглощения цитохрома в этой области спектра; при освещении через темнокрасный светофильтр RG-5 с коротковолновой границей пропускания около 670 *мμ* реакция вообще не идет.

Сенсибилизация реакций к красному свету хлорофиллом

Хлорофилл (*a* + *b*) или хлорофилл *a*, выделенный хроматографически, вводили в водный раствор цитохрома в виде спиртового раствора, по каплям, с таким расчетом, чтобы величина *K* в максимуме поглощения

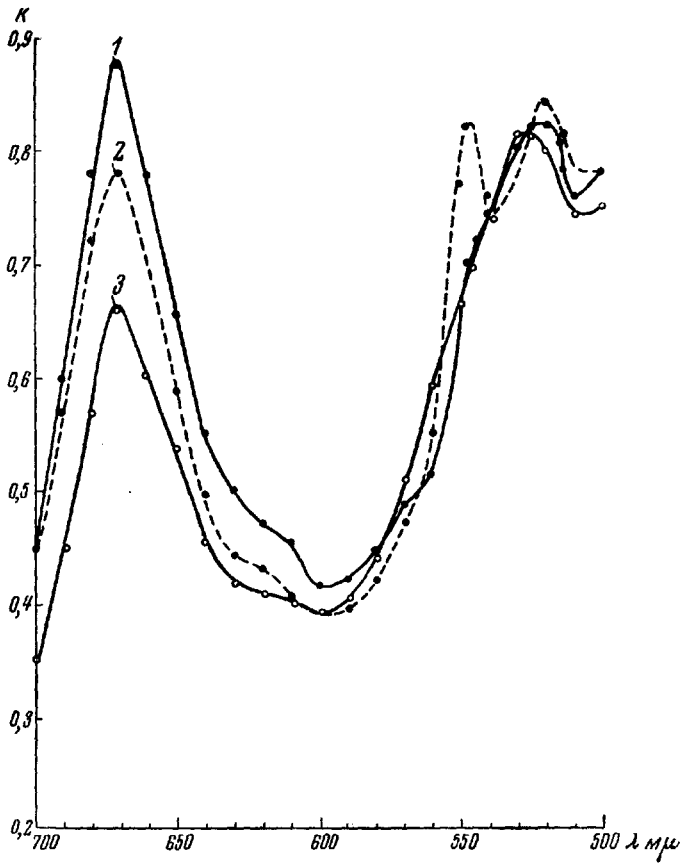


Рис. 3. Фотовосстановление и фотоокисление цитохрома, сенсибилизированное хлорофиллом (*a* + *b*) в 1/15 *M* растворе Na_2HPO_4:

1 — спектр поглощения исходного раствора, *2* — после 30 мин. освещения через красный светофильтр RG-2 без воздуха, *3* — после 30 мин. освещения с воздухом

хлорофилла (при 670 *мμ*) была около 1,0; обычно вводили около 0,1 *мл* спиртового раствора хлорофилла на 5 *мл* раствора цитохрома. Хлорофилл в растворе цитохрома имеет максимум поглощения при 670 *мμ* и

не обладает флуоресценцией, в отличие от истинных «молекулярных» растворов этого пигмента. То обстоятельство, что хлорофилл при осаждении на белке (цитохрома) не флуоресцирует, может быть связано с начальными стадиями агрегации; как известно, взаимодействие между близко расположенными молекулами хлорофилла в твердых пленках или коллоидных мицеллах ведет к полному тушению флуоресценции.

Схема опытов подобна описанной выше, но с тем отличием, что освещение вели через красный светофильтр RG-2, пропускающий область

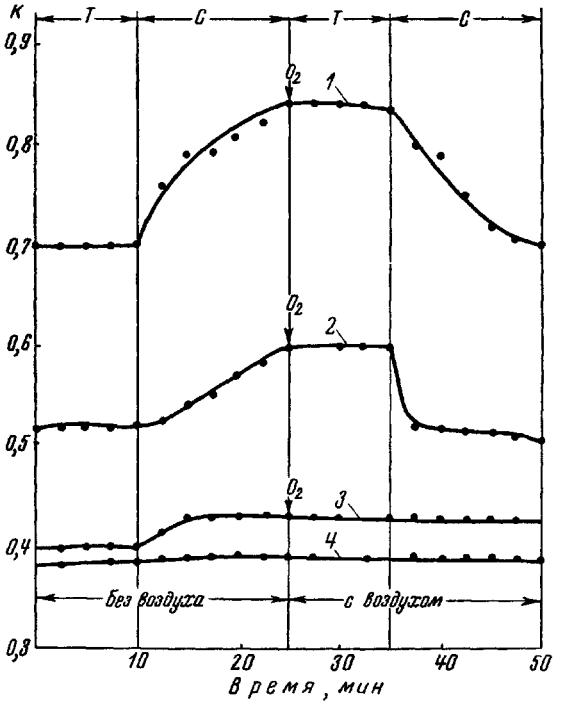


Рис. 4.

1 — кинетика фотовосстановления и фотоокисления цитохрома, сенсибилизированного хлорофиллом, и *2* — бактериохлорофиллом (изменение *K* при 549 *мμ*): опыты с хлорофиллом — освещение через фильтр RG-2, с бактериохлорофиллом — через RG-5; контрольные опыты: *3* — цитохром без пигмента, освещение через фильтр RG-2; *4*—цитохром без пигмента, освещение через фильтр RG-5 (*T*— темнота, *C* — освещение)

спектра лампы накаливания, соответствующую красному максимуму поглощения хлорофилла. Ставились также контрольные опыты без хлорофилла.

В растворах цитохрома, содержащих хлорофилл, в анаэробных условиях наблюдалось сенсибилизированное восстановление цитохрома Fe^{+++}; дальнейшее освещение после пуска воздуха приводило к сенсибилизированному окислению образовавшейся восстановленной формы цитохрома (рис. 3, 4). Введение янтарной кислоты не приводило к ускорению сенсибилизированной реакции.

Реакция сенсибилизированного хлорофиллом фотоокисления (раствор цитохрома предварительно восстановлен гидросульфитом) идет быстро и отчетливо; при этом наблюдается также деструктивное окисление части хлорофилла.

Сенсибилизация реакции бактериохлорофиллом к близкой инфракрасной области спектра

При введении в 4 *мл* раствора цитохрома 0,2 *мл* спиртового раствора выделенного нами чистого бактериохлорофилла [4] наблюдается образование агрегированных форм пигмента, обладающих максимумами поглощения при 800 и 850 *мμ*. Освещение в этой области спектра не приводило к явным превращениям цитохрома, что указывает на фотохимическую неактивность агрегированных форм бактериохлорофилла, полученных в данных опытах [5].

Мы стремились добиться осаждения бактериохлорофилла на цитохроме в дезагрегированной, фотохимически активной форме. В нашей лаборатории было установлено, что пиридин оказывает дезагрегирующее действие на хлорофилл и его аналоги, что объясняется координационным связыванием молекул оснований по центральному атому магния молекулы пигмента [6, 7].

Действительно, 0,2 *мл* раствора бактериохлорофилла в пиридине, влитого в 5 *мл* водного раствора цитохрома, приводят к образованию формы бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 790 *мμ*, соответствующим дезагрегированным или начально-агрегированным (может быть, димерным) формам бактериохлорофилла.

Освещение системы в близкой инфракрасной области спектра (через светофильтр RG-5, без воздуха) приводит к сенсибилизированному восстановлению цитохрома (рис. 4); освещение после пуска воздуха ведет к быстрому сенсибилизированному окислению цитохрома Fe^{++}, которое сопровождается деструктивным окислением бактериохлорофилла. В связи с этим следует указать, что Вернон и Камен [8] описали «цитохромфотооксидазное» действие гомогенатов фотосинтезирующих бактерий.

О механизме прямой фотореакции

Сравнительное исследование фотохимических превращений хлорофилла, его аналогов и производных, проведенное в нашей лаборатории, показало, что способность к реакции фотовосстановления определяется наличием в молекуле пигмента системы сопряженных по кругу двойных связей; эти реакции удалось наблюдать в нашей лаборатории у всех исследованных порфиринов и азапорфинов, а также у их магниевых и цинковых комплексов.

В работах Даина и сотрудников [9] было показано, что железные комплексы феофорбида также способны к реакции фотохимического восстановления, причем в результате восприятия электрона молекулой пигмента происходит изменение валентности центрального атома железа.

Для цитохрома химическим результатом поглощения света является восприятие от донорной группы электрона, который, не локализуясь в системе сопряженных связей, приводит к изменению валентности центрального атома железа; фотореакция ведет к появлению спектра поглощения, характерного для цитохрома Fe^{++}, тогда как фотоокисление, идущее с участием кислорода, ведет к понижению для цитохрома Fe^{++} максимума при 549 *мμ*.

Цитохром *c*, так же как и другие железные комплексы порфиринов, не обладает флуоресценцией в видимой области спектра, что указывает на быструю потерю энергии возбужденного состояния молекулы пигмента. Возможность перехода железных комплексов в длительное метастабильное возбужденное состояние требует исследования; в литературе нет данных о фосфоресценции железопорфиринов, являющейся индикатором перехода молекулы из метастабильного (триплетного) состояния на нижний (основной) уровень. Есть основания полагать, что в результате поглощения кванта света молекулой железопорфирина происходит вну-

трикомплексный перенос электрона, при котором его донорами, вероятно, могут быть группировки, координационно связанные с центральным атомом железа [9, 10]. На это указывает, как описано выше, также то обстоятельство, что введение в среду водородных доноров не ведет к ускорению фотопроцесса.

Недавно описаны окислительно-восстановительные превращения цитохрома, происходящие при действии ионизирующей радиации на водные растворы этого соединения [11]. Однако в этом случае превращения цитохрома являются следствием взаимодействия последнего с радикалами OH и H, которые образуются в воде, тогда как превращения цитохрома, идущие при действии видимого света, являются следствием возбуждения самой молекулы цитохрома.

О механизме сенсибилизированной реакции

В работах нашей лаборатории установлен механизм реакций переноса водорода, сенсибилизированных хлорофиллом и его аналогами в растворах [1].

Результатом светового акта реакции является восприятие электрона от молекулы-донора с образованием активной фотовосстановленной формы хлорофилла; равновесие между ионной и «водородной» формой радикалов, которые образуются при световом акте, зависит от кислотно-основных свойств среды и химической природы молекулы пигмента. Темновой стадией реакции является передача электрона (и протона) молекуле-акцептору. Такой «двухстадийный» механизм сенсибилизации наблюдался в нашей лаборатории в прямых опытах [1, 12]. В первом сообщении [2] мы предположили, что таков может быть механизм сенсибилизированных хлорофиллом превращений цитохромов. Однако заслуживает рассмотрения и другая возможность. Реакции цитохромов идут не в истинных растворах, где удается расчленить отдельные стадии процесса, а в коллоидных белковых растворах. Контакт между хлорофиллом и цитохромом является длительным. Реакция идет в мицелле хлорофилл — цитохром. В этом случае стадии восприятия и отдачи электрона могут быть «слиты» в акте, происходящем в сопряженной молекулярной системе.

В мицелле хлорофилл — цитохром поглощение квантов красного света локализуется в молекулах хлорофилла. Порфириновая часть молекулы цитохрома «вмонтирована» в белок, и непосредственный контакт между хлорофиллом и порфирином цитохрома мало вероятен; их взаимодействие может идти с участием белковой части молекулы, поэтому нельзя исключить возможность перемещения энергии возбуждения в коллоидной мицелле хлорофилл — цитохром от места поглощения кванта к месту фотохимического процесса. При этом, однако, следует учесть то обстоятельство, что хлорофилл и цитохром не образуют прочного соединения, о чем свидетельствует отсутствие значительных искажений в их спектрах поглощения при взаимодействии.

Во всяком случае, описанные опыты указывают на то, что свет, поглощенный магнийпорфирином (хлорофилл), может использоваться для превращений железопорфирина (цитохром).

О фотобиологической роли исследованных реакций

Известно фотобиологическое действие коротковолновой области видимого спектра, приводящее к различным эффектам в растительных и животных организмах. Эти эффекты определяются наличием в организмах пигментов, поглощающих свет в действующей области спектра, пигментов, претерпевающих первичные фотохимические превращения, сопряженные с цепью темновых биохимических процессов. В сине-фиолетовой

области спектра лежит поглощение каротиноидов, флавинов и свободных порфиринов, а также их магниевых комплексов; фотохимическая активность этих пигментов известна, однако следует также принять во внимание описанные выше наблюдения относительно действия света на цитохромы, обладающие интенсивным максимумом поглощения в фиолетовой области спектра.

За последние годы в работах ряда авторов, применивших методы дифференциальной спектроскопии, было показано изменение окислительно-восстановительного равновесия цитохромов при освещении фотосинтезирующих организмов и гомогенатов [13]. Описанная нами модель сопряженного действия магниевых и железных комплексов порфиринов позволяет представить возможный путь такого взаимодействия при фотосинтезе.

Мы уже указывали, что если путь сопряжения фотореакций хлорофилла с системой реакций восстановления углекислоты может идти через звено обратимо-восстанавливающихся пиридиннуклеотидов [14], то путь сопряжения реакций пигментной системы с реакциями окисления воды при фотосинтезе может осуществляться при участии железопорфириновых пигментов. При этом возможно также, что превращения цитохромов при фотосинтезе связаны не с «главным» путем переноса электрона (водорода) от воды к углекислоте, а с системой реакций окислительного фосфорилирования [15], при которых расходуется часть восстановленных соединений, образующихся в результате фотопроцесса.

Приносим глубокую благодарность академику А. Н. Теренину за внимание к работе и обсуждение ее результатов.

Выводы

В работе исследовано действие видимого света на окислительно-восстановительные превращения цитохрома *c* и показана возможность сенсибилизации этих реакций к длинноволновой области спектра хлорофиллом и бактериохлорофиллом.

Поступила в редакцию
12. I. 1956

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. Проблемы химической кинетики, катализа и реакционной способности. Сборник докладов. Изд. АН СССР, стр. 92, 1955, Изв. АН СССР, сер. биол., **2**, 122, 1955.
2. Красновский А. А., ДАН, **103**, 283, 1955.
3. Keilin D., Hartree E. F. Proc. Roy. Soc., ser. B, **122**, 298, 1937; Biochem. J., **39**, 289, 1945.
4. Войновская К. К. и Красновский А. А. Биохимия, **18**, 626, 1953.
5. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М. ДАН, **85**, 389, 1952.
6. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. Биохимия, **18**, 340, 1953.
7. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А. ДАН, **70**, 261, 1950.
8. Vernon L. P., Kamen M. D. Arch. Biochem. Biophys., **44**, 298, 1953.
9. Ашкинази М. С., Даин Б. Я. ДАН, **80**, 385, 1951; Ашкинази М. С., Даин Б. Я., Герасимова И. П. ДАН, **102**, 767, 1955.
10. Williams R. J. P. Biol. Rev., **28**, 381, 1953.
11. Laser H. Nature, **176**, 361, 1955.
12. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А. ДАН, **98**, 1017, 1954.
13. Chance B. Science, **120** 767, 1954; Duysens L. Science, **120**, 353, 1954; Lundegardh H. Physiol. Plantarum, **7**, 375, 1954; Hill R. Nature, **174**, 501, 1954.
14. Красновский А. А. в сб. «Успехи биологической химии», Изд. АМН, **1**, 1950; Красновский А. А., Бринн Г. П. ДАН, **67**, 325, 1949.
15. Arnon D. L. Science, **122**, 9, 1955.

Том I, вып. 4 1956

СПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ ФИЛЛОФОРА

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. А. НЕСТЕРОВСКАЯ, А. Б. ГОЛЬДЕНБЕРГ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва, Научно-исследовательский институт физики Одесского государственного университета им. И. И. Мечникова

Известный экспериментальный материал свидетельствует о том, что главная масса хлорофилла в гранулах хлоропластов растений находится в высококонцентрированном агрегированном состоянии.

Агрегация — взаимодействие между близко расположенными ориентированными молекулами пигмента — приводит к изменению спектральных свойств молекул в агрегатах по сравнению с молекулами-«мономерами», находящимися в растворе. В случае хлорофилла и его аналогов агрегация молекул в твердых пленках и коллоидных мицеллах ведет к сдвигу главных максимумов поглощения в длинноволновую сторону и потере флуоресценции. Эти свойства коллоидных растворов хлорофилла были обнаружены Ивановским [1, 2] и подтверждены в работах последующих исследователей.

В работах лаборатории фотобиохимии Института биохимии АН СССР наблюдалось, что спектральные свойства твердых пленок и коллоидных растворов хлорофилла зависят от природы растворителя, из которого они получены. Так, испарение в вакууме (на стекле) растворов хлорофилла $a + b$ в эфире приводит к получению пленок с максимумом поглощения при 675—676 *мμ*, а из диоксановых растворов получаются пленки с максимумом при 690 *мμ*; нагревание этих пленок ведет к перемещению максимума до 675—676 *мμ*, характеризующего, повидимому, наиболее устойчивую структуру [3, 4]. Следует указать, что этой «диоксановой» структурой обладают кристаллические образования хлорофилла, полученные в системе диоксан-пиридин, так же как и коллоидные растворы, полученные при вливании диоксановых растворов хлорофилла в воду [3, 4]. Джекобс, Ваттер и Холт [5, 6] показали, что «двухмерная агрегация» хлорофилла в монослоях приводит к сдвигу максимума поглощения в длинноволновую сторону; максимуму при 675 *мμ* авторы приписывают структуру «сжатого газа», тогда как образование упорядоченных кристаллических структур ведет к перемещению максимума до 750 *мμ*. Рабинович, Джекобс, Холт и Кромхаут [7] показали, что агрегация этилхлорофиллида ведет, в зависимости от величины образующихся кристаллических частиц, к сдвигу красного максимума поглощения до 750 *мμ*.

Работы лаборатории фотобиохимии показали, что бактериохлорофилл (обладающий в растворе главным максимумом около 770 *мμ*) может образовывать агрегированные структуры с максимумами поглощения, расположенными при 800, 850 и 890 ± 10 *мμ*, отличающиеся, вероятно, различными типами структурной упаковки [8]. Эти результаты были подтверждены в работе Джекобса, Ваттера и Холта [5, 6], обнаруживших подобные сдвиги максимума поглощения в кристаллах бактериохлорофилла. Работы лаборатории фотобиохимии показали, что максимумы поглощения бактериохлорофилла в живых фотосинтезирующих бактериях

соответствуют поглощению агрегированных форм бактериохлорофилла [8, 9].

До сих пор, однако, неясна структура пигментных агрегатов и способ ориентировки в них молекул пигментов; мы уже высказывали предположение о вероятном присутствии в таких структурах молекул растворителя, возможно, играющих роль «мостиков» между молекулами пигмента [8, 9].

В свете полученных результатов представлялось важным исследовать спектры поглощения хлорофилла в красных водорослях, обладающих своеобразной пигментной системой, в которой обнаружена передача энергии от красного пигмента фикоэритрина к хлорофиллу *а*.

Мы избрали для исследования водоросль филлофору, обитающую на глубине 20—25 *м*. На такой глубине весьма велико поглощение красной части солнечного спектра, и фотосинтез водорослей идет преимущественно за счет зеленой части солнечного спектра, поглощаемой фикоэритрином.

В этих условиях следовало ожидать своеобразного состояния хлорофилла по сравнению с наземными растениями. Эти предположения подтвердились результатами исследования.

Методика измерений и результаты

Пробы водоросли отбирались в море на глубине 20—25 *м* и хранились в темноте, в летнее время в холодильнике, в зимнее время — в бассейне с морской водой.

Спектр поглощения филлофоры в области от 650 до 780 *мμ* с интервалами между точками наблюдения в 5 *мμ* измерялся на спектрофотометрической установке Кириллова [10], состоящей из трех основных частей: 1) двойного монохроматора со стеклянной оптикой и осветителя, 2) приемной камеры для помещения препарата и серносеребряного фотоэлемента, 3) фотореле с серносеребряным фотоэлементом.

Источником света, проходящего через монохроматор, служила проекционная лампа (300 *вт*, 100 *в*), питающаяся от аккумуляторной батареи.

Монохроматический пучок света после выходной щели фокусировался на препарате листка филлофоры, зажатом между стеклами, которые помещались в камере непосредственно перед фотоэлементом. Посредством специальных салазок препарат можно перемещать в пазах камеры в строго фиксированные положения, таким образом, чтобы свет попеременно проходил через стекло и филлофору. Прошедший через препарат свет попадал на фотоэлемент, и фототок регистрировался зеркальным гальванометром с чувствительностью $3 \cdot 10^{-10} \frac{a}{мм}$ *м*.

Усиление фототока достигалось с помощью фотореле, представляющего собой систему из фотоэлемента, осветителя (лампа 6 *в*, питаемая от аккумуляторной батареи 6 *в*) и гальванометра. Установка обладала высокой устойчивостью показаний, и отношение интенсивностей монохроматического света, прошедшего попеременно через стекло (I_0) и препарат филлофоры (I), измерялось с точностью до 0,1%. Ряд препаратов был измерен на спектрофотометре СФ-4. Спектральное положение полос поглощения, полученное на обоих приборах, совпадало. Результаты измерений спектра поглощения представлены в таблице и на рис. 1, 2, 3, 4.

Из спектрофотометрических кривых и таблицы видно, что филлофора обладает в красной области спектра системой главных максимумов поглощения при 675—678 и 685—690 *мμ* и иногда неявно выраженным максимумом при 665—670 *мμ*.

Относительная интенсивность этих полос поглощения меняется в различных пробах водоросли и зависит от сезона лова и обработки. Обычно в пробах водоросли, взятых весной, наряду с доминирующим максимумом 675—678 *мμ* наблюдается отчетливый максимум при 690 *мμ*. В пробах,

взятых осенью (сентябрь — ноябрь), оба максимума имеют тенденцию к сдвигу в сторону коротких длин волн, располагаясь около 675 и 685 *мμ*.

Известно, что нагревание листьев растений ведет к сдвигу максимума поглощения хлорофилла в коротковолновую сторону, что объясняется дезагрегацией пигмента в гранулах. Подобные сдвиги в спектре поглощения

Таблица

Спектральные положения максимумов поглощения филлофоры в красной области спектра

№ препарата	Дата улова филлофоры	Спектральные положения максимумов в *мμ* I	II	III	№ препарата	Дата улова филлофоры	Спектральные положения максимумов в *мμ* I	II	III
3	25.V		678	690	27	26.IX	665	675	685
4	5.VI	665	679		28	26.IX	665	675	685
6	5.VI		678	690	29	26.IX	665	675	685
11	17.VI		675	685	30	2. X	665	675	685
12	17.VI	665	678	690	31	2. X	665	675	685
18	6.VII		675	685	32	2. X	660	677	685
19	6.VII	665	678	690	33	2. X		675	685
20	6.VII		675	690	34	17. X	665	680	
24	7.IX	660	678	695	35	17.X		675	685
25	7.IX	670	680						
26	7.IX	665	680	690					

филлофоры также свидетельствовали бы об относительной устойчивости различных форм хлорофилла. С этой целью препараты филлофоры нагревались в морской воде в течение 5—15 минут до температуры 40, 50, 60 и 80°. Результаты некоторых из этих опытов приведены на рис. 3 и 4.

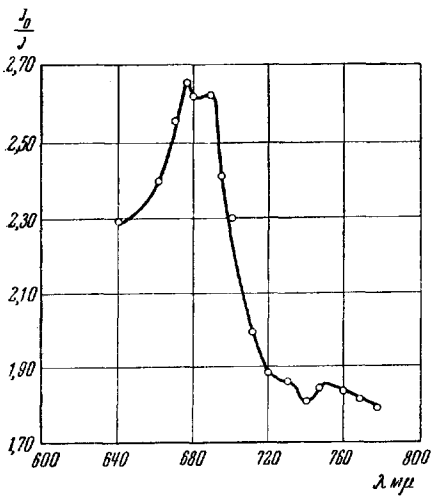


Рис. 1. Спектр поглощения филлофоры, снятый на установке Е. А. Кириллова

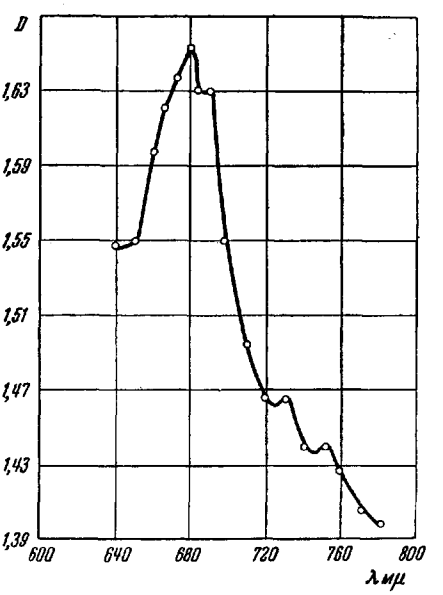


Рис. 2. Спектр поглощения филлофоры, снятый на фотоэлектрическом спектрофотометре СФ-4 (другая проба)

Обычно нагревание филлофоры в воде до 40° в течение 15 минут не приводит к заметным изменениям спектра поглощения. Нагревание до 50° и выше ведет к смещению максимумов поглощения в сторону коротких длин волн (рис. 3 и 4).

Обычно после нагревания вся полоса поглощения, расширяясь, смещается, приобретая колоколообразную форму с максимумом при 675 *мμ*. Дальнейшее нагревание водоросли до 80° ведет к сдвигу максимума поглощения до 671—672 *мμ* (рис. 4). Эти явления соответствуют поведению «диоксановой» структуры твердых пленок хлорофилла, у которых нагревание также ведет к перемещению максимума от 690 до 675 *мμ* (рис. 3).

Прежде всего следовало выяснить, чем определяется наличие трех максимумов в красной полосе поглощения филлофоры — отличиями в форме (состоянии) хлорофилла в гранулах пластид этого организма либо наличием производных и аналогов хлорофилла.

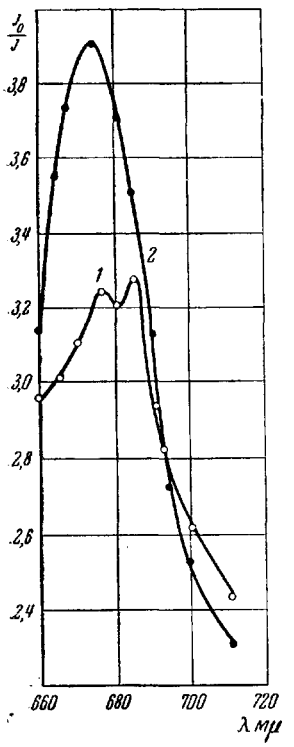


Рис. 3. Спектр поглощения филлофоры:

1 — до нагрева, *2* — после нагрева филлофоры до 60°

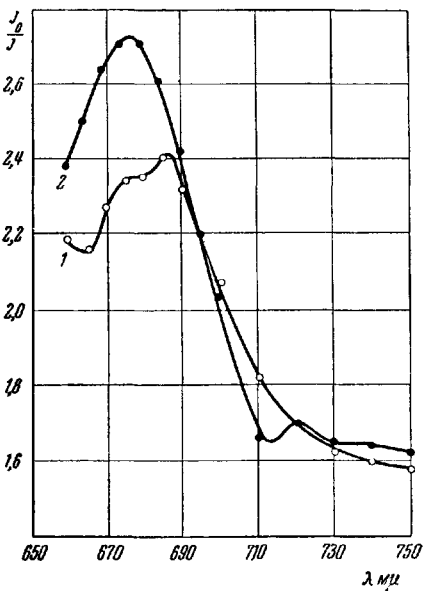


Рис. 4. Спектр поглощения филлофоры:

1 — до нагрева, *2* — после нагрева филлофоры до 80°

Если бы отдельные максимумы красной полосы определялись различными пигментами, то следовало бы ожидать, что в экстрактах хлорофилла, извлеченного органическими растворителями из водоросли, также будут наблюдаться отдельные максимумы, соответствующие разным типам пигментов.

При длительном растирании филлофоры с 80%-ным ацетоном извлекаются зеленые и желтые пигменты. В красной области наблюдается один максимум при 664 *мμ* (рис. 5), соответствующий хлорофиллу *а*. Уместно было предположить, однако, что ацетон может не извлекать всех пигментов гранул; поэтому мы провели также экстракцию водоросли горячим метанолом. В этом случае также наблюдался один отчетливый максимум около 660 *мμ*.

Чтобы исключить возможность предположения, будто и эта экстракция не ведет к извлечению всех зеленых пигментов, мы оставляли водоросль в ацетоне на двое суток. Без растирания пигмент не извлекается, но ацетон, проникая в хлоропласты, должен был вести к дезагрегации разных форм хлорофилла. Действительно, у таких «вымоченных» в ацетоне водорослей наблюдается один максимум около 670 *мμ*.

В цели данной работы не входит хроматографическое исследование пигментов водорослей. Важно было убедиться в том, что зеленые пигменты в предельно дезагрегированном состоянии — растворе — обладают одним главным максимумом в красной полосе поглощения, и, следовательно, три максимума красной полосы живых водорослей объясняются различиями в состоянии хлорофилла.

Какова же природа этих различных форм хлорофилла в филлофоре? Мы уже указали во введении, что агрегация может вести к наблюдаемым у живых водорослей положениям максимума поглощения хлорофилла. Так, максимум поглощения при 685—690 *мμ* соответствует «диоксановому» типу упаковки хлорофилла в агрегированных структурах, о чем свидетельствует также смещение этого максимума до 675 *мμ* при нагревании. Максимум поглощения при 675—678 *мμ* соответствует «обычному» типу агрегации хлорофилла, который наблюдается у большинства растений. Наконец, максимум при 665—670 *мμ* соответствует «мономерным» или начально агрегированным формам хлорофилла, которые, согласно работам нашей лаборатории, доминируют на начальных стадиях образования хлорофилла в растениях и существуют во «взрослых» организмах [11—15] в равновесии с агрегированными формами.

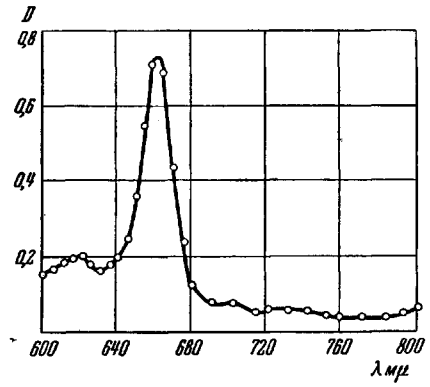


Рис. 5. Спектр поглощения пигментов филлофоры, извлекаемых 80% ацетоном

Полученные результаты и известный экспериментальный материал позволяют высказать соображения об участии разных форм хлорофилла в фотосинтезе красных водорослей.

Измерения квантового выхода фотосинтеза красных водорослей в зависимости от длины волны возбуждающего света показали, что свет, поглощаемый фикоэритрином (в зеленой области спектра), используется для фотосинтеза более эффективно, чем свет, поглощаемый хлорофиллом [16]. Квантовый выход фотосинтеза красных водорослей в области поглощения хлорофилла при 675 *мμ* оказался вдвое меньше (0,04), чем в области поглощения фикоэритрина (0,08), и приблизительно вдвое меньше квантового выхода в области поглощения хлорофилла у других организмов. Эти опыты привели к выводу, что часть хлорофилла в красных водорослях является «неактивной»; свет, поглощаемый ею, не используется для фотосинтеза [16].

Эти результаты соответствуют нашим исследованиям хлорофилла в зеленых растениях, показавшим, что только часть хлорофилла находится в фотохимической активной, флуоресцирующей мономерной форме [11—13], которая, вероятно, непосредственно, химически участвует в фотохимических реакциях фотосинтеза.

Красновский и Кособуцкая высказали предположение, что энергия квантов света, поглощенных агрегированными формами хлорофилла, может восприниматься мономерными формами, которые непосредственно участвуют в обратимых реакциях фотосинтеза [11 — 13]. Наиболее вероятно, что энергия квантов света, поглощенных фикоэритрином, воспринимается именно мономерной формой хлорофилла, участвующей в фотосинтезе, и фикобилины должны быть сопряжены именно с этой формой хлорофилла [17].

В свете этих соображений можно представить себе участие различных форм хлорофилла красных водорослей в фотосинтезе. Форма с максимумом 675—678 *мμ*, является «обычной» формой, имеющейся во всех расте-

ниях; свет, ею поглощаемый, используется, вероятно, через посредство активной формы с максимумом при 670 *мμ*, также обнаруженной в филлофоре, тогда как форму хлорофилла с максимумом 690 *мμ* следует считать неактивной. Свет, поглощаемый этой формой хлорофилла, повидимому, не используется для фотосинтеза; действительно, к осени, когда уменьшается интенсивность фотосинтеза, увеличивается количество этой формы хлорофилла. Конечно, это предположение желательно было бы подтвердить прямыми измерениями квантового выхода фотосинтеза в различных участках красной полосы поглощения хлорофилла в филлофоре.

Авторы выражают благодарность акад. А. Н. Теренину и проф. Е. А. Кириллову за обсуждение результатов и проф. С. И. Лебедеву за постоянное внимание и помощь в организации настоящей работы.

Выводы

В красной водоросли филлофора обнаружены три максимума поглощения хлорофилла в красной области спектра при 670, 675—678 и 685—690 *мμ*, которые, вероятно, соответствуют разным типам агрегации пигмента.

Поступила в редакцию
9. III. 1956

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивановский Д. И. Протоколы засед. Об-ва естествоиспыт. при Варшавск. ун-те. 1909.
2. Ивановский Д. И. О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях. Варшава. 1913.
3. Красновский А. А., Брин Г. П. ДАН, **95**, 3, 611. 1954.
4. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. Биохимия, **18**, 3, 340. 1953.
5. Jacobs E. E., Vatter A. E., Holt A. S. Arch. Biochem. a. Biophys., **53**, 1, 288. 1954.
6. Jacobs E. E., Holt A. S. J. Chem. Phys., **22**, 142. 1954.
7. Rabinowitch E., Jacobs E. E., Holt A. S., Kromhout R. Z. für Physik, **133**, 261. 1952.
8. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М. ДАН, **85**, 2, 389. 1952.
9. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К. ДАН, **92**, 6, 1201. 1953.
10. Кириллов Е. А. Тонкая структура в спектре поглощения фотохимически окрашенного галоидного серебра. Монография, М. 1954.
11. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. ДАН, **85**, 1, 177. 1952.
12. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. ДАН, **91**, 2, 343. 1953.
13. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. ДАН, **104**, 3, 440. 1955.
14. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. Биохимия, **19**, 1, 37. 1954.
15. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Биохимия, **21**, 1, 126. 1956.
16. Yocum C. S., Blinks L. R. J. Gen. Physiol., **38**, 1. 1954.
17. Красновский А. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 122. 1955.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТООКИСЛЕНИЯ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ХЛОРОФИЛЛОМ И ФЕОФИТИНОМ

Г. П. БРИН и *А. А. КРАСНОВСКИЙ*

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

Способность хлорофилла в растворах сенсибилизировать окисление ряда органических соединений молекулярным кислородом известна давно, но доныне не было единого мнения о механизме этого процесса.

В работах ряда авторов было показано, что хлорофилл способен сенсибилизировать окисление бензидина, жирных аминов, олеиновой кислоты, рубрена (литературу см. в сводках [1—3]). Нами была установлена в 1947 г. способность хлорофилла и его аналогов сенсибилизировать окисление аскорбиновой кислоты [4].

Так же, как и при исследовании механизма биохимического окисления, многие исследователи рассматривали вопрос о том, какой вид молекул активируется при фотосенсибилизированном окислении: молекулы кислорода или молекулы органического соединения — донора водорода.

Каутский с сотр. [5], основываясь на том, что флуоресценция многих красителей тушится кислородом, предположил, что активируется кислород, переходя в метастабильное состояние. Гаффрон [6], Франк и Леви [7] указали на большую вероятность активации субстрата окисления, основываясь на том, что флуоресценция красителей-сенсибилизаторов тушится окисляющимися акцепторами — бензидином, ионами йода. Однако последующие работы показали, что заключения об активации реагирующих молекул не могут быть связаны с эффектом тушения флуоресценции.

Так, Шпольский с сотр. [8; 9], изучая сенсибилизированные эозином реакции, установили отсутствие прямой связи между тушением флуоресценции красителя-сенсибилизатора и фотохимическим процессом. В работах нашей лаборатории [10] было качественно установлено отсутствие явной связи между фотореакциями хлорофилла и тушением флуоресценции реагирующих с ним молекул.

Вейсс [11], Франк и Ливингстон [12] предложили общие схемы процесса, применимые для красителей-сенсибилизаторов, образующих семихиноны и лейкосоединения в результате фотореакции возбужденной молекулы пигмента с молекулой донора водорода. Теренин [1] предложил схемы сенсибилизированного окисления, основанные как на активации кислорода, так и на элементарном окислении-восстановлении красителя-сенсибилизатора, находящегося в бирадикальном возбужденном состоянии. В нашей первой работе [4] мы предполагали, что в основе сенсибилизированного хлорофиллом окисления аскорбиновой и олеиновой кислот лежит реакция фотохимического образования перекиси при взаимодействии хлорофилла с молекулой кислорода. Возможность образования нестойких перекисей основывалась на наблюдениях, сделанных одним из нас, над обратимым фотоокислением хлорофилла кислородом и органическими перекисями [13]. В последующих работах Шенк [14] развивал подобные представления о механизме фотосенсибилизированного окисления. Однако после открытия одним из нас способности хлорофилла к обратимому восстановлению [15] получило экспериментальное обоснование предположение, что в основе реакции сенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты в пиридине лежит реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла [16].

В нашей лаборатории за последние годы детально изучался механизм сенсибилизированных хлорофиллом реакций переноса водорода, сопровождающихся «запасанием» энергии света в продуктах реакции. Эти исследования позволили установить механизм реакции такого типа, определяющийся в основных чертах двумя стадиями: 1) первичной реакцией фотовосстановления хлорофилла молекулой донора водорода и 2) последующей темновой стадией взаимодействия фотовосстановленной формы хлорофилла с конечным акцептором водорода [17; 19]. Евстигнеев и Гаврилова [18], продолжая исследования механизма фотовосстановления, установили образование при этой реакции промежуточной высокоактивной фотовосстановленной формы хлорофилла, быстро реагирующей с молекулами — акцепторами водорода, в том числе и с кислородом. В этих работах было показано наиболее вероятное участие в сенсибилизированной реакции именно этой высокоактивной фотовосстановленной формы хлорофилла.

Работы нашей лаборатории, в которых был установлен механизм фотосенсибилизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакций (см. сводки [17; 19]), дали основание для предположения, что при сенсибилизированных хлорофиллом реакциях окисления сохраняется тот же элементарный механизм процесса, с тем отличием, что фотовосстановленная форма хлорофилла реагирует с молекулой кислорода.

Исходя из этого предположения, мы предприняли настоящее исследование, в задачу которого входило: более детальное исследование сенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты хлорофиллом и феофитином в растворах; исследование фотоокисления различных доноров водорода, изученных в отношении их способности к реакции фотовосстановления; изучение фотосенсибилизирующей активности хлорофилла в коллоидных растворах, полученных различными методами.

МЕТОДИКА

Хлорофилл *a* и *b* получали из сухих листьев крапивы способом, принятым в нашей лаборатории, с последующим хроматографическим разделением на сахарозе. Феофитин *a* + *b* получали по Фишеру [20]. Хроматографическое разделение феофитинов производили в условиях, близких к хроматографическому разделению хлорофиллов, с тем отличием, что для получения феофитинов мы применяли смесь серного и петролейного эфиров в отношении 2 : 9. Феофитин *a* отделяется в нижней зоне первой колонки, а чистый феофитин *b* получается при трехкратном хроматографировании.

Поглощение кислорода при сенсибилизированном окислении органических молекул измеряли на приборе Варбурга, в сосудах особой формы, описанных в наших предыдущих работах [21]. Сосуды освещали со стороны дна через светофильтр RG-2 лампой накаливания в 200 *W*, установленной в ванне термостата. Интенсивность освещения сосудов через светофильтр в области поглощения хлорофилла составляла $2{,}5 \cdot 10^4$ *эрг/см²сек*. В ряде опытов были использованы нейтральные светофильтры, снижающие интенсивность освещения до $2{,}5 \cdot 10^2$ *эрг/см²сек*.

Обычно схема опытов была следующей: в центральную часть сосуда помещали раствор пигмента (5 или 9 *мл*), а в боковой отвод — раствор донора водорода (10 *мг*) в 1 *мл* растворителя. Сосуд термостатировали (опыты проводили при 20°), затем приливали раствор донора водорода к раствору пигмента и наблюдали поглощение кислорода в темноте в течение 20 мин., после чего сосуды освещали в течение 30 мин. и измеряли скорость процесса, производя измерения каждые 3—5 мин.

I. Исследование реакции сенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты

Мы исследовали влияние на реакцию сенсибилизированного окисления концентрации пигментов, концентрации аскорбиновой кислоты, количества воды в растворителе (спирте), pH и интенсивности освещения.

1. Влияние концентрации пигмента

Исследовали концентрации пигментов в пределах 10^{-6}—10^{-4} *M*. Во всех случаях реакции следуют нулевому порядку по кислороду в пределах 30-минутных опытов, то есть зависимость поглощения кислорода от времени прямолинейна.

Скорость реакции на рисунках выражена в *мл* поглощенного кислорода за 1 мин.

Из рис. 1 видно, что в данных условиях ведения опытов скорость сенсибилизированного окисления феофитином *a* выше, чем хлорофиллом *a* и *b*. В процессе опыта необратимо выцветает до 30—40% хлорофилла *a*, до 20% хлорофилла *b* и до 5% феофитина *a* (при начальном значении E = 1,0).

2. Влияние концентрации аскорбиновой кислоты

В опыт брали от 1 до 400 *мг* аскорбиновой кислоты, что соответствует концентрации в реакционной смеси от $6 \cdot 10^{-4}$ до 0,2 *М*. В этих опытах Е было равным 1 в максимуме поглощения.

Из рис. 1 видно, что феофитин *а* и хлорофилл *b* более активны, чем хлорофилл *а* при этой реакции. Повышение концентрации аскорбиновой кислоты влечет за собой увеличение скорости реакции. Контрольный опыт

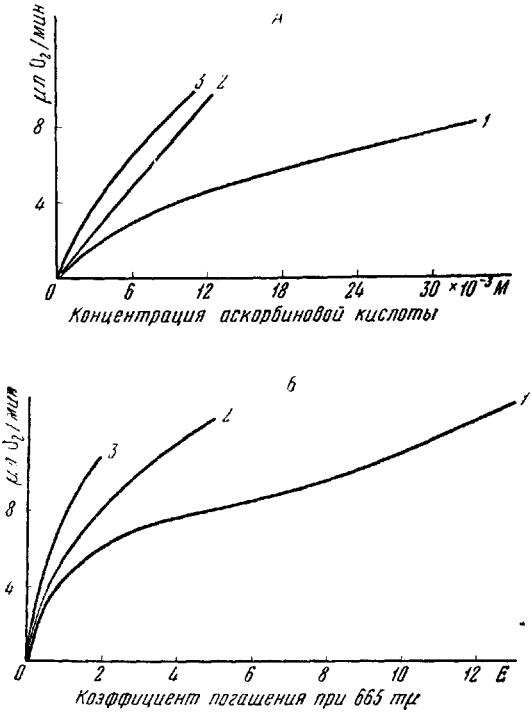


Рис. 1. Влияние концентрации аскорбиновой кислоты на скорость ее окисления (*А*) и влияние концентрации пигмента на скорость окисления аскорбиновой кислоты (*Б*):
1 — хлорофилл *а*, *2* — хлорофилл *b*, *3* — феофитин *а*

без аскорбиновой кислоты не показал окисления спирта. В этих опытах необратимо выцветало до 30% хлорофилла *а*, около 20% хлорофилла *b* и около 5% феофитина *а*, независимо от концентрации аскорбиновой кислоты.

3. Влияние количества воды в спирте на скорость реакции

В опытах использовали 96%-ный этиловый спирт, перегнанный перед опытом. Смеси содержали от 10 до 75% воды. Пигмент растворяли в спирте до смешения с водой. Количество пигмента во всех опытах одно и то же. Боковой отвод сосуда содержал раствор 10 *мг* аскорбиновой кислоты в 1 *мл* спирта с тем же содержанием воды, что и в центральной части сосуда.

При 20% воды в спирте скорость реакции достигает максимума для всех исследованных пигментов (рис. 2). При дальнейшем увеличении концентрации воды скорость реакции понижается. Вероятно, появление максимума активности при 20% воды связано со сложной закономерностью влияния воды на агрегационное равновесие хлорофилла, степень диссоциации аскорбиновой кислоты в растворе и растворимость кислорода воздуха в этих смесях. Оптимум при 20%, по-видимому, связан с достаточ-

ной диссоциацией аскорбиновой кислоты (легко окисляется ее анионная форма), а также с тем, что в 80%-ном спирте бо́льшая часть хлорофилла находится в мономерной дезагрегированной форме.

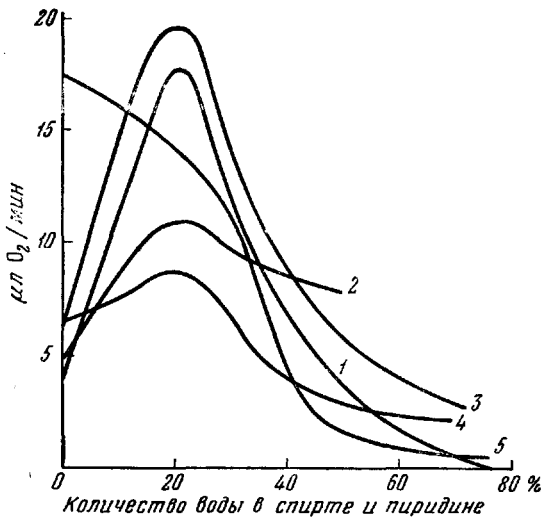


Рис. 2. Влияние концентрации воды в спирте и пиридине на скорость окисления аскорбиновой кислоты:

1 — хлорофилл *a* в спирте; *2* — хлорофилл *b* в спирте; *3* — феофитин *a* в спирте; *4* — феофитин *b* в спирте; *5* — хлорофилл *a* в пиридине

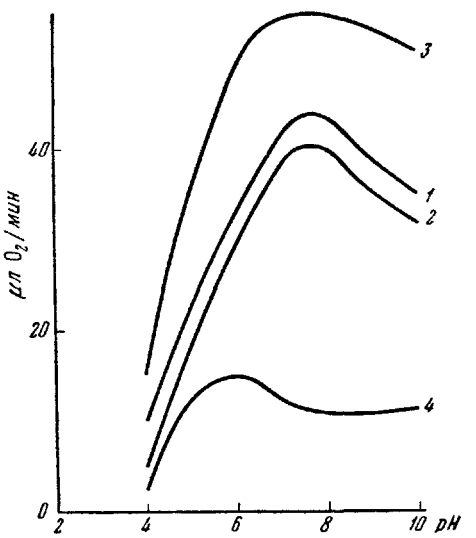


Рис. 3. Влияние pH на скорость окисления аскорбиновой кислоты:

1 — хлорофилл *a*; *2* — хлорофилл *b*; *3* — феофитин *a*; *4* — феофитин *b*

В растворе пиридина при увеличении концентрации воды активность падает. Резкое падение активности наблюдается при содержании от 40 до 60% воды в пиридине.

4. Влияние pH на скорость окисления

В этих опытах были использованы спиртовые растворы пигментов (80%-ный спирт; E=1,0 в максимуме поглощения пигмента). Раствор аскорбиновой кислоты в спирте титровали спиртовой щелочью (0,5%-ная KOH) до нужного pH при помощи потенциометра (ЛП-5) со стеклянным электродом. 1 *мл* титрованного раствора и 10 *мг* аскорбиновой кислоты помещали в боковой отвод сосуда и после термостатирования сливали к раствору пигмента в 80%-ном спирте в центральную часть сосуда. Были исследованы реакции при pH от 4 до 10.

Из представленных на рис. 3 кривых видно, что максимальная скорость этой реакции наблюдается при pH 6—8; в более кислой среде скорость реакции значительно снижается, по-видимому, из-за подавления диссоциации аскорбиновой кислоты.

Обращает на себя внимание большая активность феофитина *a*. В пиридине реакция окисления аскорбиновой кислоты идет во много раз быстрее, чем в спирте. Так, например, скорость одинакова, если интенсивность освещения пиридинового раствора вдвое меньше, чем спиртового.

II. Влияние состояния пигмента на скорость сенсибилизированного окисления

В этих опытах существенно было сравнить сенсибилизирующее действие коллоидных растворов хлорофилла $a + b$ и феофитина $a + b$, полученных в разных условиях.

В работах нашей лаборатории было показано, что при выливании растворов хлорофилла и бактериохлорофилла в спирте, пиридине, диоксане в воду получаются коллоидные растворы, спектральные свойства которых зависят от природы растворителя. Можно было ожидать и различия фотохимических свойств таких коллоидов.

Ранее мы обнаружили, что коллоидные растворы хлорофилла, полученные с помощью детергентов, обладают большой фотохимической активностью [22], сравнимой с активностью хлорофилла в истинных растворах. Следовало, однако, произвести более детальное исследование активности коллоидных растворов.

Коллоидные растворы хлорофилла и феофитина были получены следующим методом: 0,5 *мл* концентрированного раствора пигмента вливали в 8,5 *мл* воды (в центральной части сосуда) и после термостатирования из бокового отвода вводили 1 *мл* водного раствора аскорбиновой кислоты (10 *мг*). Величина E после разведения была близкой к единице. В опытах, проводимых при разных pH, раствор аскорбиновой кислоты в воде титровали 0,5%-ным раствором едкого натра до требуемого pH (на потенциометре со стеклянным электродом). В случае приготовления коллоидных растворов с поверхностно-активными веществами 0,5 *мл* концентрированного раствора пигмента приливали к 8,5 *мл* 0,5%-ного раствора детергента.

Использовали: нейтральный детергент эмульфор (продукт конденсации олеилового спирта с 20 молекулами окиси этилена), анионоактивные — лиссапол (сульфоэтерифицированный олеиловый спирт) и аэрозоль (натриевая соль диоктилсульфоянтарной кислоты).

Так как детергенты представляют собой органические соединения, в серии контрольных опытов была проверена возможность их сенсибилизированного окисления. Детергенты оказались вполне устойчивыми, их окисления не наблюдалось.

1. Коллоидные растворы, полученные без применения детергентов

Такие растворы обладают небольшой фотохимической активностью; при сдвиге pH среды в щелочную сторону активность этих коллоидных растворов увеличивается (рис. 4). Темновое потребление кислорода при pH 4,5 и 6,5 не наблюдается, при pH 9 наблюдается небольшое окисление. Коллоидные растворы, полученные из пиридина, обычно в 2—3 раза активнее коллоидных растворов, полученных из спирта и диоксана, что

следует поставить в связь с известным дезагрегирующим свойством пиридина [23]. Коллоидные растворы, полученные из феофитина, несколько активнее, чем коллоидные растворы из хлорофилла.

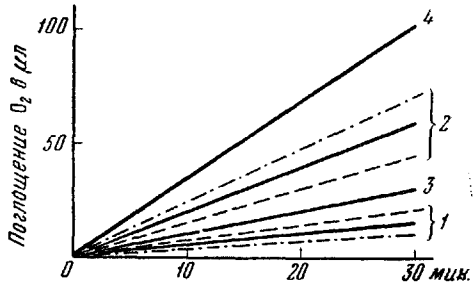


Рис. 4. Скорость окисления аскорбиновой кислоты в водных коллоидных растворах

Растворы получены из: *1* — спиртового раствора хлорофилла *a*+*b*; *2* — пиридинового раствора хлорофилла *a* + *b*; *3* — диоксанового раствора хлорофилла *a* + *b*; *4* — пиридинового раствора феофитина *a*+*b*; ——— pH 6,5; — — — pH 4,5; —.—.— pH 9,0

2. Коллоидные растворы, полученные при помощи детергентов

Аэрозоль. Коллоидные растворы, полученные из спирта и пиридина (при pH 4,5), обладают одинаковой активностью. При сдвиге pH в щелочную сторону наблюдается увеличение активности коллоидных растворов, полученных из спирта; при pH 9 коллоидные растворы из пиридина близки по своим свойствам к водным коллоидным растворам, полученным без детергента (рис. 5, *Б*). Таким образом, активные коллоидные растворы этого типа получаются из спиртового раствора пигмента.

Лиссапол. В коллоидных растворах, полученных из спирта, уменьшается активность при сдвиге pH в щелочную сторону. Независимо от pH, коллоидные растворы, полученные из пиридина, обладают гораздо большей активностью, чем коллоиды, полученные из спирта и диоксана (рис. 5, *А*).

Эмульфор. Растворы с этим детергентом являются наиболее активными. Коллоидные растворы, полученные из пиридина, намного активнее коллоидных растворов, полученных из спирта и диоксана (рис. 5, *В*). В щелочной среде активность обычно увеличивается. Поведение коллоидных растворов, полученных из феофитина, близко к хлорофилловым коллоидам.

Таким образом, наиболее активными оказались коллоидные растворы, полученные из пиридина, с применением эмульфора. Поэтому более детально было изучено влияние концентрации эмульфора на фотохимическую активность коллоида при pH 6,5 (без титрования щелочью). Из рис. 6 видно, что с увеличением концентрации детергента растет фотохимическая активность.

III. Окисление различных органических соединений — доноров водорода (электрона)

Целью этих опытов является нахождение корреляции между поведением доноров водорода при реакции сенсибилизированного окисления и их способностью к фотовосстановлению — реакции, изученной в предыдущих работах нашей лаборатории. Мы наблюдали изменение потенциала инертного электрода при освещении системы хлорофилл — аскорбиновая кислота [24]. Для суждения о прохождении фотовосстановления пигмента донорами водорода применим потенциометрический метод, позволяющий констатировать образование электродно-активной формы хлорофилла непосредственно во время освещения.

Такие систематические исследования были проведены Евстигнеевым и Гавриловой [18], которые показали, что фотопотенциал инертного электрода сильно изменяется в отрицательную сторону при освещении системы хлорофилл (феофитин) — донор водорода. Наиболее отчетливые результаты обычно получали с теми донорами водорода, которые дают возможность обнаружить изменение спектра поглощения хлорофилла

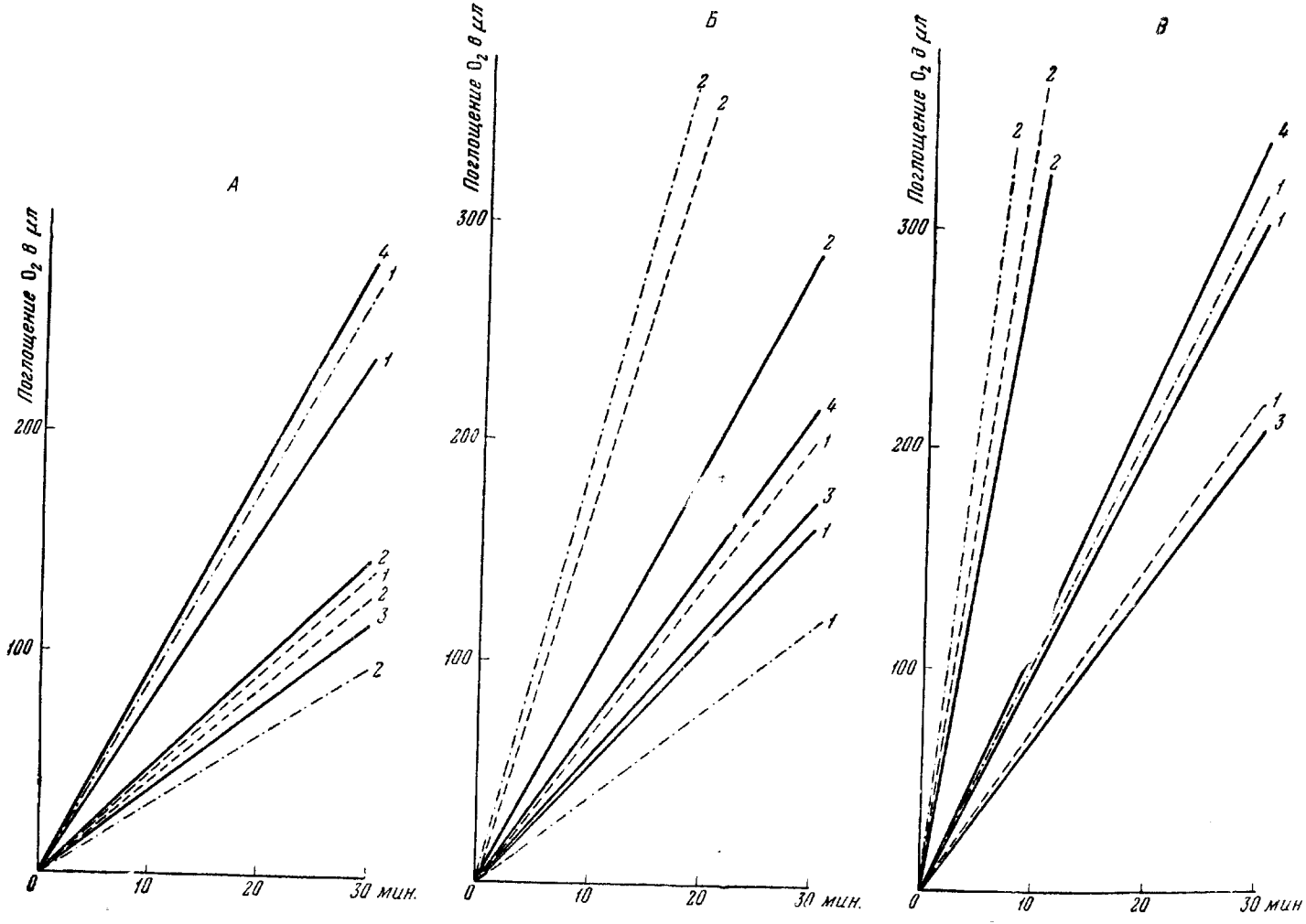


Рис. 5. Скорость окисления аскорбиновой кислоты в коллоидных растворах, полученных при помощи лиссапола (*А*), аэрозоля (*Б*) и эмульфора (*В*).

1 — из спиртового раствора хлорофилла *a+b*; *2* — пиридинового раствора хлорофилла *a+b*; *3* — диоксанового раствора хлорофилла *a+b*; *4* — пиридинового раствора феофитина *a+b*, ——— pH 6,5; — — — pH 4,5; —.—.— pH 9,0

Таблица 1

Сенсибилизированное хлорофиллом *a* и *b* окисление различных соединений

Доноры водорода	Скорость реакции в μl O_2 в мин.					
	pH	темнота	свет	pH	темнота	свет
	Хлорофилл *a*					
Аскорбиновая кислота	4,4	0,0	10,0	9,0	0,0	36,0
Олеиновая „	4,5	0,0	1,3	9,0	0,0	2,0
Диоксималеиновая „	2,0	0,0	0,0	9,0	0,2	8,0
Яблочная „	3,0	0,0	0,0	9,8	0,0	0,0
Янтарная „	4,0	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
Уксусная „	—	—	—	9,0	0,0	0,0
Щавелевая „	—	—	—	10,0	0,0	0,0
Глютаминовая „	4,5	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
Аспарагиновая „	5,5	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Цистеин „	3,0	0,0	0,0	9,0	0,0	38,0
Резорцин „	5,0	0,0	1,0	10,0	0,0	8,0
Пирокатехин	5,0	0,0	0,0	9,0	1,0	10,0
Гидрохинон	6,0	0,0	1,6	10,0	10,0	1,0*
Рибофлавин	6,0	0,0	0,0	—	—	—
Фенилгидразин	7,0	0,6	27,0	9,0	0,9	22,0
Танин	5,0	0,0	1,6	9,0	1,14	4,0
Анизидин	7,0	0,0	6,0	9,0	0,0	5,0
Тиозинамин	6,3	0,0	13,0	—	—	—
Сернистый натр	5,5	0,0	3,6	9,0	0,0	5,1
	Хлорофилл *b*					
Аскорбиновая кислота	4,0	0,0	5,0	9,0	0,0	40,0
Олеиновая	4,3	0,0	3,0	9,5	0,0	3,0
Цистеин	2,6	0,0	0,0	9,5	0,5	35,0
Гидрохинон	6,3	0,0	1,0	9,0	35,0	35,0
Фенилгидразин	7,1	1,0	25,0	10	0,0	17,0
Тиозинамин	6,8	0,0	24,0	9,0	—	11,0

* Малая скорость реакции при освещении объясняется быстрым окислением гидрохинона в темноте при pH 10.

Таблица 2

Сенсибилизированное феофитином *a* и *b* окисление различных соединений

Доноры водорода	Скорость реакции в μl O_2 мин.					
	pH	темнота	свет	pH	темнота	свет
	Феофитин *a*					
Аскорбиновая кислота	4,0	0,0	19,0	9,0	0,0	67,0
Пирокатехин	5,3	0,0	1,0	—	—	—
Цистеин	2,7	0,0	0,5	—	—	—
Резорцин	5,3	0,0	1,5	—	—	—
Гидрохинон	6,3	0,0	2,7	—	—	—
Тиозинамин	6,3	0,0	30,0	—	—	—
Глютаминовая кислота	4,5	0,0	0,0	—	—	—
	Феофитин *b*					
Аскорбиновая кислота	4,0	0,0	5,0	9,0	0,0	26,0
Цистеин	3,0	0,0	0,1	—	—	—
Тиозинамин	6,0	0,0	14,0	—	—	—
Гидрохинон	6,0	0,0	1,3	—	—	—

при спектрофотометрическом измерении. Однако не менее отчетливые результаты были получены с донорами водорода, которые не приводят к образованию устойчивых фотовосстановленных форм хлорофилла (гидрохинон, тиозинамин и др.), но, как показали упомянутые авторы, ведут к сильному изменению фотопотенциала электрода.

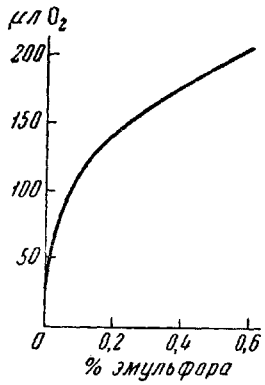


Рис. 6. Влияние концентрации эмульфора на скорость окисления аскорбиновой кислоты

Мы провели серию опытов в растворе пигментов в 80%-ном спирте. Донор водорода был добавлен после термостатирования; опыты проводили в двух вариантах: при pH, который устанавливается в растворе при введении донора водорода, и при pH 9—10 (полученного при титровании спиртовой щелочью).

Из табл. 1 видно, что отчетливое сенсибилизированное окисление наблюдается для тех доноров водорода, которые способны к фотовосстановлению хлорофилла и феофитина. При щелочных pH гораздо лучше происходит окисление цистеина, полифенолов, которые быстро окисляются и в темноте. «Первые места» в этой таблице при pH 9 занимают аскорбиновая кислота, фенилгидразин, цистеин и тиозинамин (исследованный в работе Гаффрона [6]).

Опыты с хлорофиллом *b* и феофитином *a* и *b* (табл. 1, 2) показали ту же закономерность.

Были также проведены опыты сенсибилизированного хлорофиллом *a* + *b* окисления различных доноров водорода в пиридине, содержащем 10% воды.

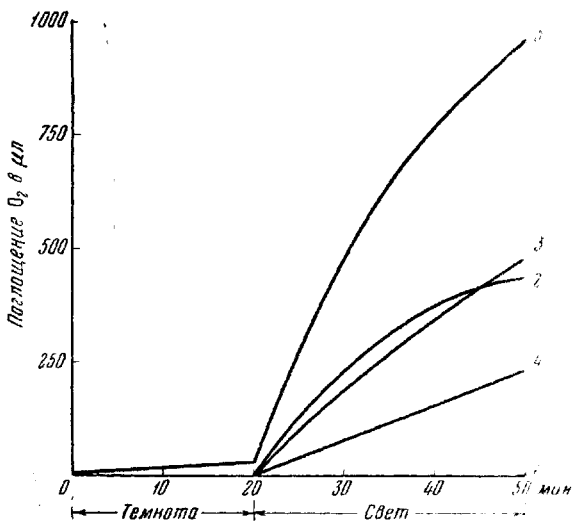


Рис. 7. Окисление различных доноров водорода в коллоидных растворах, полученных с помощью эмульфора из пиридинового раствора хлорофилла *a* + *b*:

1 — пировиноградная кислота; *2* — цистеин; *3* — пирокатехин; *4* — цитохром *c*; *5* — аскорбиновая кислота

Из табл. 3 видно, что в этих условиях реакция идет быстрее, чем в 80%-ном спирте.

Опыты были проведены при освещении через светофильтры RG-2 и НС-3. Интенсивность света — 5500 *эрг/см²сек*.

Приведенные в табл. 1, 2, 3 результаты опытов показывают, что к сенсибилизированному окислению способны те доноры, которые способны к реакции фотовосстановления хлорофилла и феофитина.

Таблица 3

Сенсибилизированное хлорофиллом *a*+*b* окисление различных соединений в пиридине

Доноры водорода	Скорость реакции в μl O_2 мин.		Доноры водорода	Скорость реакции в μl O_2 мин.	
	темнота	свет		темнота	свет
Аскорбиновая кислота	0,5	25,0	Гидрохинон	0,0	2,0
Яблочная „	0,0	1,5	Фенилгидразин	10,0	30,0
Щавелевая „	0,0	1,2	Тиозинамин	0,0	30,0
Глютаминовая „	0,0	1,8	Сернистый натр	2,0	2,0
Цистеин	0,4	12,0	$K_4Fe(CN)_6$	0,0	1,0
Пирокатехин	0,0	1,0	Контроль без донора	0,0	1,0

Фотоокисление доноров водорода в водной среде

В рассмотренных выше опытах исследование было проведено в спирто-водных и пиридиновых смесях. В следующей серии опытов мы исследовали окисление различных доноров водорода в водных коллоидных растворах хлорофилла *a* + *b*, приготовленных при помощи эмульфора. Течение реакции в водной среде позволило исследовать ряд биохимически важных доноров водорода, например цитохром *c*, окисление которого в спирте нельзя было провести.

Следует сделать некоторые замечания о подготовке реактивов. Пировиноградную кислоту перегоняли в вакууме перед опытом. Свежеперегнанная пировиноградная кислота не окислялась, тогда как продукты, образующиеся при ее стоянии, сенсибилизированно окисляются в присутствии хлорофилла. Цитохром *c* был получен методом Кейлина и Хартри [25] из бычьих сердец. Перед опытом цитохром *c* восстанавливали аскорбиновой кислотой. Для того, чтобы избежать избытка восстановителя, мы производили титрование раствора цитохрома раствором аскорбиновой кислоты при 40° (с целью ускорения реакции) с таким расчетом, чтобы восстановить лишь 70% всего присутствовавшего цитохрома. Концентрация цитохрома составляла 10^{-4} *M*.

Из опытов, приведенных на рис. 7, видно отчетливое окисление пирокатехина, цистеина, аскорбиновой кислоты и цитохрома *c*. Данные по окислению цитохрома *c* соответствуют работам нашей лаборатории, в которых была показана (спектрофотометрическим методом) способность хлорофилла и бактериохлорофилла фотосенсибилизировать окисление-восстановление цитохрома *c* [26; 27].

ОБСУЖДЕНИЕ

О механизме реакций

Изложенные опыты соответствуют схеме участия хлорофилла в сенсибилизированных им реакциях, в основе которой лежит реакция фотовосстановления пигмента. Основными аргументами в пользу такого механизма являются следующие факты.

1. Фотосенсибилизирующим действием обладают не только хлорофилл *a* и *b*, но и феофитин *a* и *b*, особенно активные при исследованных реакциях, что соответствует способности этих пигментов к реакции фотовосстановления.

2. К сенсибилизированному окислению способны те органические соединения, которые способны и к фотовосстановлению хлорофилла. К этим соединениям относятся аскорбиновая и диоксималеиновая кислоты, цистеин, полифенолы. Эти соединения приводят к фотовосстановлению хлорофилла и феофитина, измеренному спектрофотометрическим и фотогальваническим методами, констатирующими образование электродно активной, быстро реагирующей формы хлорофилла или феофитина.

Образованная фотовосстановленная форма хлорофилла быстро реагирует с кислородом, о чем свидетельствуют следующие факты.

В присутствии кислорода обычно не удается наблюдать реакцию фотовосстановления; красная фотовосстановленная форма хлорофилла и феофитина реагирует с кислородом (довольно медленно) с обратным образованием пигмента; первичная фотовосстановленная форма хлорофилла и феофитина, образованная при низкой температуре, чрезвычайно быстро реагирует с кислородом, приводя к обратному образованию пигмента [18].

Таким образом, общую схему процесса можно изобразить следующим образом: первичным актом является взаимодействие возбужденной молекулы хлорофилла или феофитина (вероятно, в бирадикальном состоянии [1]) с молекулой донора водорода. Работы лаборатории свидетельствуют о том, что первично образуется пара ион-радикалов:

$$\cdot X \cdot + AH \rightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+,$$

о чем свидетельствуют следующие данные: опыты по измерению фотогальванического эффекта, кондуктометрические измерения, спектральные измерения и наблюдение сенсибилизированной полимеризации метакрилата (сводку см. [19]).

Взаимодействие фотовосстановленной формы пигмента с кислородом можно выразить следующей схемой:

$$\cdot X^- + O_2 \rightarrow \cdot XO_2^- \rightarrow X + O_2^-;\ O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2$$

с последующей дисмутацией гипотетически образуемых радикалов HO_2.

Рассмотрим возможности альтернативного механизма, предполагающего первичное взаимодействие кислорода с бирадикальной формой хлорофилла. В этом случае, как мы уже указывали ранее [4], темновой стадией процесса должна явиться реакция «перекиси хлорофилла» с донором водорода. Недавно в нашей лаборатории было показано, что образование такого рода продуктов фотоокисления хлорофилла особенно отчетливо наблюдается в спиртовых и спирто-глицериновых растворах хлорофилла [28].

В этом случае обратимое восстановление окисленного хлорофилла достигается молекулами растворителя и следовало ожидать (если действительно соблюдается этот механизм процесса) сенсибилизированного окисления спирта или спирто-глицериновой смеси. Однако хлорофилл не сенсибилизирует окисления спирта (в пределах точности манометрического метода), что, по-видимому, связано с большой длительностью жизни и сравнительно малой активностью тех продуктов окисления хлорофилла, которые удается наблюдать. При этом нельзя исключить возможность образования активной перекиси хлорофилла $\cdot XO_2 \cdot$ Поиски такого рода соединений ведутся; их обнаружение приведет к возможным коррективам в «восстановительной» схеме фотоокисления.

В условиях наших опытов первичная реакция пигмента с восстановителем, по-видимому, идет гораздо быстрее, чем реакция с кислородом. Кроме того, существенно то, что феофитин, очень активный сенсибилизатор окисления, чрезвычайно устойчив к фотоокислению кислородом, и нам пока не удалось наблюдать образования активных перекисей этого пигмента.

О фотохимической активности хлорофилла в различных состояниях

Опыты показывают, в согласии с нашими предыдущими наблюдениями [22], высокую фотохимическую активность хлорофилла в мономерном состоянии, обладающего яркой флуоресценцией в истинных растворах и в коллоидных растворах, полученных с помощью детергентов.

Особого рассмотрения заслуживает вопрос о фотохимической активности водных коллоидных растворов хлорофилла. При выливании в воду раствора хлорофилла в спирте теряется флуоресценция и образуется агрегированная форма пигмента с максимумом поглощения при 670 *mμ*. В процессе дальнейшей агрегации происходит сдвиг максимума поглощения хлорофилла в длинноволновую сторону. При выливании в воду раствора в диоксане происходит образование коллоида с максимумом при 690 *mμ* [23; 29]. Наконец, из пиридина образуется крайне слабо флуоресцирующий коллоид с максимумом поглощения при 670 *mμ*.

Однако полученные из других растворителей коллоидные растворы, не флуоресцирующие, все же обладают небольшой фотохимической активностью, присущей, по-видимому, также агрегированным формам хлорофилла. На это указывают наши наблюдения фотосенсибилизирующего действия кристаллических фталоцианинов [30] и опыты Евстигнеева и Теренина [31] над фотогальваническим эффектом твердых пленок пигментов.

ВЫВОДЫ

Исследованы условия сенсибилизированного хлорофиллом и феофитином окисления аскорбиновой кислоты. Установлено, что сенсибилизированному хлорофиллом и феофитином окислению подвергаются, кроме аскорбиновой кислоты, цистеин, полифенолы, цитохром *c* и другие соединения.

Показано, что сенсибилизированное хлорофиллом и феофитином окисление происходит с теми донорами водорода, которые способны к реакции фотовосстановления с этими пигментами, что дает возможность, наряду с другими работами нашей лаборатории, обосновать механизм реакции, состоящей из световой стадии фотовосстановления пигмента и темновой стадии взаимодействия кислорода с фотовосстановленной формой пигмента.

Исследование влияния состояния пигмента на фотоокисление аскорбиновой кислоты показало, что наряду с растворами хлорофилла, большой активностью обладают коллоидные растворы, полученные при помощи детергентов, среди которых наиболее активным оказался эмульфор (продукт конденсации олеилового спирта с окисью этилена).

В заключение приносим глубокую благодарность академику А. Н. Теренину за обсуждение результатов и внимание к работе.

Поступила в редакцию
2. I. 1957

ЛИТЕРАТУРА

1. Теренин А. Н., Фотохимия красителей, М., 1947; Сб.: Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности, М., 1955, стр. 85.
2. Рабинович Е., Фотосинтез, т. I, М., 1951.
3. Красновский А. А., Исследование фотохимических реакций при фотосинтезе, Дисс., М., 1948.
4. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **58**, 1087, 1947.
5. Kautsky H., Hirsch A., Ber. Deutsch. chem. Ges. **64**, 2677, 1931.
6. Gaffron H., Ber. Deutsch. chem. Ges. **60**, 755, 2229, 1927; Biochem. Z. **264**, 251, 1937; Z. physiol. Chem. **37**, 437, 1937.
7. Franck J., Levi H., Z. physiol. Chem. **27**, 409, 1934.
8. Шпольский Э. В. и Шереметьев В. Н., Ж. физ. хим. 8, 640, 1936.
9. Шпольский Э. В. и Гришкун Е. В., Ж. физ. хим. **19**, 107, 1945.
10. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А. и Красновский А. А., ДАН **74**, 315, 1950.
11. Weiss J., Trans. Farad. Soc. **32**, 1331, 1936.
12. Franck J., Livingston R., J. Chem. Phys. **9**, 184, 1941.
13. Красновский А. А., ДАН **58**, 617, 835, 1947.
14. Schenck G. O., Naturwiss. **40**, 205, 229, 1953; Z. Electrochem. **56**, 885, 1952
15. Красновский А. А., ДАН **60**, 421, 1948.

16. Красновский А. А., Брин Г. П. и Войновская К. К., ДАН **69**, 393, 1949.
17. Красновский А. А., Сб.: Вопросы химической кинетики катализа и реакционной способности, М., 1955, стр. 92.
18. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., ДАН **92**, 381, 1953; ДАН **95**, 841, 1954.
19. Красновский А. А., Ж. физ. хим. **30**, 969, 1956; Красновский А. А. и Умрихина А. В., ДАН **104**, 882, 1955.
20. Fischer H., Stern A., Die Chemie des Pyrrols, B2, Leipzig, 1940.
21. Брин Г. П. и Красновский А. А., Биохимия **16**, 453, 1951.
22. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **63**, 163, 1948.
23. Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
24. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **73**, 1239, 1950.
25. Keilin D., Hartree E. F., Proc. Roy. Soc. **122**, 298, 1937.
26. Красновский А. А., ДАН **103**, 283, 1955.
27. Красновский А. А. и Войновская К. К., Биофизика **1**, 120, 1956.
28. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН **104**, 440, 1955.
29. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **95**, 611, 1954.
30. Красновский А. А. и Брин Г. П., ДАН **53**, 447, 1946.
31. Евстигнеев В. Б. и Теренин А. Н., ДАН **81**, 223, 1951.

В кн.: Возникновение жизни на Земле. Сборник докл. на Международном совещании (Москва, авг. 1957 г.). Изд-во АН СССР, 1957

А. А. КРАСНОВСКИЙ

О РАЗВИТИИ СПОСОБА ДЕЙСТВИЯ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМОВ

ОБРАЗОВАНИЕ ФОТОКАТАЛИЗАТОРОВ

В настоящее время наиболее обоснованы гипотезы, согласно которым жизнедеятельность первичных организмов была связана с потреблением органических веществ, возникших абиогенным путем [1]. Такие органические соединения в обычных условиях достаточно устойчивы, и активация их превращений в организмах могла бы достигаться каталитическим и фотохимическим путями. Однако выгода «световой» активации проявляется лишь при необходимости «запасания» энергии — преобразования энергии квантов света в потенциальную химическую энергию фотопродуктов.

Активация термодинамически самопроизвольных процессов успешно достигается каталитическим путем. Ныне существующие гетеротрофы широко используют каталитический путь активации субстратов. Следует полагать, что на пути ассимиляции богатых энергией абиогенных органических соединений первичные организмы должны были применять более простой каталитический путь активации, тем более, что связывание каталитически активных веществ среды организмами было неизбежно. По-видимому, первичными биокатализаторами были комплексные соединения аминокислот, белков и порфиринов с ионами или окислами металлов, которые хорошо адсорбируются и связываются этими соединениями. Комплексные соединения металлов с белками, аминокислотами, порфиринами могли обеспечить многообразные каталитические превращения органических веществ и без «помощи» света. Такой тип биокатализаторов и ныне доминирует в организмах — железо, медь, марганец, цинк, молибден, кобальт и многие другие металлы являются необходимыми компонентами ферментных систем.

Вероятно, при «выборе» или связывании неорганических соединений из окружающей среды имел значение, помимо концентрации элемента и его соединений в земной коре, целый ряд других причин: растворимость соединений этого элемента в условиях биосферы [2], каталитическое действие в различных комплексах, координационное число и т. д.

Хотелось бы проследить возможные этапы образования пигментов-фотокатализаторов и пути изменения механизма действия пигментной системы на пути к автотрофному существованию организмов. К сожалению, в этих рассуждениях мы не можем опираться на достоверный палеобота-

нический материал; древнейшие типы организмов — фотосинтетические бактерии и синезеленые водоросли — обладают полностью сформированной пигментной системой — хлорофиллом, фикобилинами, каратиноидами.

Среди биокатализаторов и пигментов широко распространены комплексные соединения порфиринов; в проявлении ряда свойств комплекса большое значение имеет природа центрального атома металла.

Наиболее распространенными элементами земной коры являются [2]: O (49,4%), Si (27,6%), Al (8,5%), Fe (5,0%), Ca (3,5%), K (2,5%), Na (2,6%), Mg (2%), Ti (0,6%).

Порфирины, содержащие в центре молекулы Si, Al, Ti, в организмах не обнаружены; одной из причин, вероятно, является малая растворимость соединений этих элементов в условиях биосферы и потому трудность их использования организмами.

Порфирины, содержащие калий, натрий, кальций в водных средах, гидролизуются с заменой атома металла атомом водорода [3]; из членов ряда остаются, таким образом, широко распространенные в организмах Fe- и Mg-комплексы порфиринов.

Железные комплексы обладают многообразными каталитическими свойствами, фотохимически мало активны, но обладают флуоресценцией; магний, водород или цинк в центре молекулы приводят к образованию комплексов каталитически не активных, но чрезвычайно активных фотохимически и обладающих яркой флуоресценцией. Однако существует ли, действительно, такое разграничение между каталитически и фотохимически активными комплексами? Можно было предполагать, что в процессе перехода от «темнового» к «световому» обмену могли существовать переходные типы; в связи с этим возникает вопрос — действует ли свет на работу биокатализаторов? Или, иначе говоря, обладают ли биокаталитически активные комплексы также фотосенсибилизирующим действием?

Многие биокатализаторы окрашены — обладают поглощением в видимой области спектра. Сюда относятся комплексы порфиринов и родственных им соединений, флавины и др. Количество биокатализаторов в организмах обычно невелико, и они поглощают лишь малую часть солнечного излучения, падающего на организм.

Существует обширная, но часто противоречивая литература о действии видимого света на активность ферментов. Наиболее отчетливо действие света на превращение свободных флавинов, обладающих яркой флуоресценцией и фотосенсибилизирующим действием, но действие света на их комплексы с белками в организмах требует дальнейшего исследования.

Недавно мы наблюдали ускоряющее действие видимого света на окислительно-восстановительные превращения цитохрома С [4]. Ранее было обнаружено действие света на реакции, катализированные кристаллическими аналогами порфиринов — фталоцианинами и их медными и магниевыми комплексами. Эти соединения катализируют окисление аскорбиновой кислоты и разложение перекиси водорода в растворе; освещение ведет к ускорению каталитической реакции [5]. Мы наблюдали также, что освещение ведет к ускорению катализированного двуокисью титана разложения перекиси водорода и окисления жирных кислот [6]. Известные биокатализаторы обычно (кроме флавинов) довольно плохие фотосенсибилизаторы; свет в ряде случаев может влиять на их действие, но без «запасания» энергии в конечных продуктах реакции.

Дальнейшее развитие фотокаталитических систем потребовало разделения функций — биокатализаторов (ферментов) и фотосенсибилизаторов (пигментов).

РАЗВИТИЕ ПИГМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ

В отличие от биокатализатора, количество которого может быть очень небольшим, количество пигмента у автотрофных организмов должно быть гораздо бóльшим, чтобы обеспечить достаточно полное поглощение потока солнечной радиации организмом и запасание энергии света в форме потенциальной химической энергии продуктов реакции.

Малым количеством пигмента-сенсибилизатора, сравнимым с количеством фермента, можно было бы обойтись лишь в том случае, если бы пигмент-сенсибилизатор инициировал термодинамический самопроизвольный цепной процесс, с многократным использованием энергии кванта света для преодоления потенциальных барьеров; однако нам не известны типы обмена веществ, использующие цепные процессы; в известных типах обмена доминируют многоступенчатые сопряженные реакции.

Возможная адсорбция организмами малого количества абиогенно образованных порфиринов не могла обеспечить сколько-нибудь значительного поглощения света организмом. Для перехода к автотрофному существованию организм должен был обладать способностью к синтезу пигментов в больших масштабах. Энергичный биосинтез порфиринов потребовал в свою очередь развитой системы обмена веществ. Эти соображения согласуются с представлениями А. И. Опарина о том, что фотоавтотрофия возникла на основе развитой гетеротрофной системы обмена веществ [1].

Первичными фотосенсибилизаторами могли быть порфирины, образуемые на пути биосинтеза железо-порфириновых биокатализаторов. Так, например, у наиболее древнего типа фотоавтотрофов — фотосинтезирующих бактерий — обнаружены наряду с бактериохлорофиллом и железопорфиринами [7] значительные количества свободных порфиринов [8].

Однако простые порфирины по своему спектру поглощения не обеспечивают достаточно полного использования всего видимого участка солнечного спектра. Длинноволновый максимум поглощения порфиринов лежит ок. 620 mμ, и величина молярного коэффициента поглощения ($K_м$) в этом максимуме, определяющая «красящую силу», вероятность поглощения квантов света, мала по сравнению с $K_м$ в полосе Соре, лежащей около 400 mμ. Первичные фотосинтетики — бактерии — существовали в восстановительной среде, где не было еще свободного кислорода; неудивительно поэтому, что эти организмы содержат наиболее восстановленную форму порфирина, у которого гидрированы обе «полуизолированные» двойные связи. У образованного таким путем бактериохлорофилла максимум поглощения лежит в близкой инфракрасной области спектра.

Возможный путь такого фотовосстановления порфирина показан нашими модельными опытами с К. К. Войновской. Оказалось, что порфирины бактерий [8] и гематопорфирин [9] при освещении без воздуха, в присутствии восстановителей, действительно, способны к образованию фотопродуктов, обладающих спектром поглощения бактериохлороина (максимум около 750 mμ).

Дальнейшая эволюция пигментов пошла по пути образования хлорофилла как «главного» пигмента, высокая концентрация которого в гранулах пластид нынешних организмов обеспечивает достаточно полное поглощение видимой области солнечного спектра.

Возникает вопрос, чем объясняется распространение магниевых комплексов (хлорофилл), если порфирины без металла также обладают фотосенсибилизирующим действием. По-видимому, здесь играли роль следующие обстоятельства. Наличие центрального атома магния, обладающего двумя «вакантными» координационными местами, позволяет пигменту связывать полярные молекулы, в том числе молекулы воды [10], и, возможно, определяет связь пигмента с основными группами (гистидин)

специфического белка [11]. Кроме того, атом магния влияет на фотохимические свойства всей молекулы, определяя более высокую активность пигмента в процессе его действия. Сравнительные исследования фотохимических свойств хлорофилла и его безмагниевого аналога — феофитина — показали, что активность фотовосстановленной формы хлорофилла гораздо выше, чем у феофитина [12].

Наиболее древние типы фотосинтетиков содержат наряду с порфириновыми пигментами набор каротиноидов и фикобилины. При распаде порфиринов образуются желчные пигменты; связываясь с белками, они могли вести к образованию флуоресцирующих фикобилинов.

Иным является путь синтеза каротиноидов; нельзя считать ясным вопрос о том, могли ли первичные организмы обладать этим типом пигментов. Исследование механизма действия скорее указывает на то, что порфирины были более древним типом сенсибилизатора, способным к фотохимическому переносу электрона. С другой стороны, у животных организмов в качестве фоторецепторов получили преимущественное распространение соединения каротиноидов с белками.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФОТОКАТАЛИЗАТОРОВ

Свет, поглощаемый пигментами в фотосинтезирующих организмах, используется для протекания окислительно-восстановительного процесса, идущего «против» градиента термодинамического потенциала, с «запасанием» энергии света в продуктах реакции. Механизм этих процессов в модельных системах удалось установить в работах нашей лаборатории [см. сводку 13], в которой изучалась фотохимия пигментов фотосинтезирующих организмов в филогенетическом и сравнительно химическом аспектах. Изучались хлорофиллы *а* и *в*, бактериохлорофилл, протохлорофилл, порфирины, фикобилины, феофитины и др., а также синтетические аналоги этих пигментов — фталоцианины.

Перенос электрона

При замене железа на магний порфирины, теряя способность катализировать в темноте перенос электрона, приобретают при освещении способность к фотокаталитическому действию — обратимому восприятию электрона (водорода) от молекулы донора. Эта способность хлорофилла к реакции обратимого фотовосстановления была открыта нами в 1948 г. [13, 14].

Существенной особенностью реакции является то, что образованные активные фотопродукты «запасают» часть энергии кванта света, поглощенного молекулой пигмента; после выключения света реакция идет обратно, с регенерацией исходной молекулы пигмента. Таким образом, хлорофилл и его аналоги могут играть роль фотокатализатора, поднимая электрон молекулы-донора «вверх», что отличает фотокаталитическое действие пигментов от «темнового» каталитического действия цитохромов, переносящих электрон в термодинамическом смысле «вниз».

Реакция фотовосстановления наблюдается у всех пигментов, в основе структуры которых лежит замкнутая по кругу порфириновая или азапорфинная система сопряженных двойных связей, а в центре молекулы — атомы водорода, магния или цинка. Железные комплексы мало активны в реакциях этого типа. Детальные исследования механизма реакции в работах нашей лаборатории показали, что первичным фотоактом является перенос электрона от молекулы-донора к молекуле пигмента с образованием пары ион-радикалов:

$$\cdot X\cdot + AH \rightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+$$

При этом, следуя А. Н. Теренину [15], наиболее вероятно, что молекула пигмента реагирует в бирадикальном состоянии. Свойства первичных фотовосстановленных форм хлорофилла и феофитина были детально исследованы в работах В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой [12].

В результате последующего присоединения протона

$$\cdot X^- + \cdot AH^+ \rightarrow \cdot XH + \cdot A$$

образуются более устойчивые восстановленные формы, спектры поглощения которых для разных пигментов показаны на рис. 1.

Исследования нашей лаборатории показали, что в основе сенсибилизирующего действия хлорофилла и его аналогов лежит реакция обратимого фотовосстановления; образованная при фотореакции активная восстановленная форма пигмента реагирует в темновом акте реакции с конечным акцептором электрона [см. сводки 13, 16]. В результате обратимых превращений молекулы пигмента происходит перенос электрона от молекулы-донора к молекуле-акцептору с регенерацией в конечном счете молекулы пигмента-сенсибилизатора, что показано на упрощенной схеме (рис. 2).

Исследования нашей лаборатории показали, что в реакциях этого типа в качестве донора водорода могут использоваться аскорбиновая и диоксималеиновая кислоты, цистеин, сероводород, гидрохинон, пирокатехин, вероятно, цитохром (Fe^{++}); в качестве акцепторов, воспринимающих электрон (водород) от фотовосстановленной формы хлорофилла, могут быть использованы кислород, хиноны, цитохром (Fe^{+++}), рибофлавин, пиридин-нуклеотиды, ряд красителей — тионин, сафранин, фенолиндофенол и т. д. [13].

Порфириновые пигменты, таким образом, способны переносить электроны от молекулы-донора к молекуле-акцептору как с «запасанием» энергии ($^+\Delta F$), так и термодинамически «вниз» ($^-\Delta F$) в тех случаях, когда конечным акцептором является кислород воздуха, а результатом процесса — сенсибилизированное окисление донора водорода.

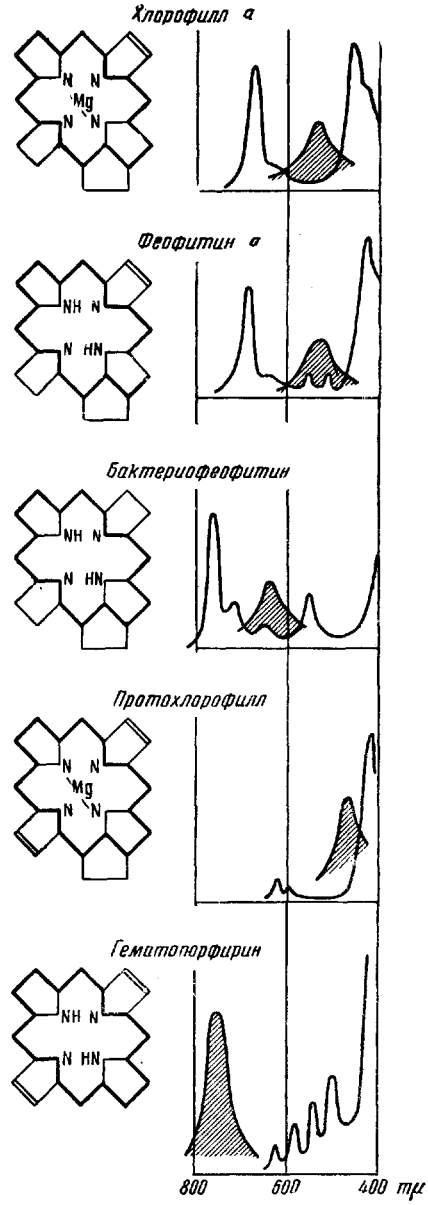


Рис. 1. Схематическое изображение структуры и спектров поглощения пигментов до реакции фотовосстановления и после обратной реакции в темноте.

Заштрихованы спектры фотовосстановленных форм пигментов, образующихся после освещения (в пиридине с аскорбиновой кислотой, без воздуха).

Следует указать на то, что в недавних работах по спектроскопии живых организмов удалось обнаружить появление промежуточных фото-

продуктов с максимумом поглощения, соответствующим фотовосстановленной форме хлорофилла [17].

Итак, пигменты-фотокатализаторы, в отличие от биокатализаторов, приобрели способность к «фотохимическому» переносу электрона; эта способность проявилась у организмов, уже обладающих достаточно сложной системой обмена веществ. Чтобы реализовать результат фотохимиче-

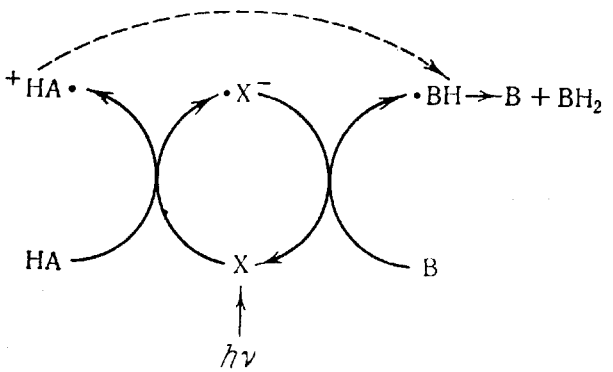


Рис. 2. — перенос электрона; --- перенос протона

ского процесса, потребовалось его «включение» в систему энзиматических реакций; нужно было предотвратить бесполезные для организмов обратные реакции активных фотопродуктов.

Перенос энергии

Поглотив квант света, молекула пигмента переходит в возбужденное состояние. Условием эффективного «резонансного» перехода энергии от возбужденной молекулы-донора к молекуле-акцептору является «перекрывание» спектра флуоресценции молекулы-донора спектром поглощения молекулы-акцептора [18, 19].

Так как максимум флуоресценции порфириновых пигментов лежит в красной области спектра, то эффективной могла бы быть передача энергии к соединению, обладающему полосой поглощения в далекой красной области; однако в организмах нам не известны промежуточные системы, удовлетворяющие этим требованиям. В процессе развития пигментной системы организмов могли образоваться пигменты, спектр флуоресценции которых мог «перекрывать» область поглощения порфиринового пигмента. Этим требованиям удовлетворяют фикобилины — фикоциан и фикоэритрин, — обладающие максимумами поглощения соответственно при 620 и 560—490 mμ. В работах ряда исследователей над синезелеными и красными водорослями установлено явление сенсибилизированной флуоресценции хлорофилла при возбуждении в области максимума поглощения фикобилинов [20]. Свет, поглощенный этими пигментами, также используется для фотосинтеза. Подобные явления наблюдались и для каротиноидов диатомовых водорослей [21].

Таким образом, возможна «передача» энергии от фикобилинов и каротиноидов к хлорофиллу *a*, являющемуся конечным акцептором энергии, использующим ее «химическим» путем, участвуя в процессах фотохимического переноса электрона.

Этим выводам соответствуют работы нашей лаборатории, в которых исследовались фотохимические свойства фикоэритрина, выделенного из

красных водорослей *Callithamnion* [22]. Оказалось, что фикоэритрин, в отличие от хлорофилла, обладает большой фотохимической устойчивостью, не способен к обратимому фотовосстановлению и не обладает фотосенсибилизирующим действием при окислительно-восстановительных реакциях.

А. Н. Теренин и В. Л. Ермолаев [22] открыли явление сенсибилизированной фосфоресценции, указывающее на передачу энергии от бирадикального состояния молекулы-донора с переходом молекулы-акцептора также в длительно живущее бирадикальное состояние. Такой механизм передачи энергии возможен и в фотосинтезирующих организмах. Однако передача энергии между молекулами на уровне триплетного состояния по существу является переносом непарного электрона и относится скорее к предыдущему разделу изложения.

Итак, вероятно, первичным было участие порфириновых пигментов в фотопереносе электрона; в процессе развития образовались пигменты (фикобилины), передающие энергию квантов света первичным порфиринам-сенсибилизаторам (или биокаталитическим системам?).

РАЗВИТИЕ СОПРЯЖЕНИЯ ПИГМЕНТНЫХ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Возбужденная молекула пигмента может перейти в метастабильное состояние; при отсутствии химического взаимодействия энергия возбуждения молекулы быстро деградирует в конечном счете в тепло. Если произошел элементарный окислительно-восстановительный процесс, то образованные фотопродукты (пара ион-радикалов) также могут претерпевать обратную реакцию с потерей энергии. Существенно использование в системе обмена веществ этих активных фотопродуктов до того, как они потеряют свою энергию тем или иным путем. Таким образом, не достаточно иметь в организме пигмент-сенсибилизатор, участвующий в переносе электрона «вверх»; нужны сопряженные биохимические системы, использующие богатые энергией активные фотопродукты. Это положение можно иллюстрировать следующим примером. Введение порфиринов в организмы ведет к проявлению фотодинамического действия, беспорядочному сенсибилизированному окислению важных доноров водорода — продуктов обмена веществ — и к поражению в конечном счете жизнедеятельности организма. Наоборот, пигмент-сенсибилизатор в организованной живой системе, где координированы фотохимические и энзиматические процессы, ведет не к нарушению, а к поддержанию нормального обмена веществ (хлорофилл в растениях). В работах Н. М. Сисакяна [24] было показано, что протоплазматические структуры, содержащие пигменты (хлоропласты), обладают многообразными биокаталитическими функциями. Так же, как и при рассмотрении сенсибилизированных реакций, возможны механизмы сопряжения, в основе которых лежат перенос электрона и передача энергии от возбужденной молекулы пигмента-сенсибилизатора.

Включение пигмента-сенсибилизатора в систему биохимического переноса электрона (водорода)

В процессе обратимого фотохимического восстановления возбужденная молекула пигмента воспринимает электрон от молекулы-донора и в темновом акте процесса передает этот электрон «вверх», с образованием системы, обладающей большей величиной восстановительного потенциала. В модельных опытах нашей лаборатории было показано, что молекулы порфириновых пигментов при освещении способны восприни-

мать электрон (водород) от таких биохимически важных соединений, как аскорбиновая кислота, цистеин, полифенолы и, вероятно, от цитохромов.

Серусодержащими аминокислотами и железо-порфиринами обладали наиболее древние типы организмов, и взаимодействие этих соединений с пигментными системами было поэтому вероятным. «Запасание» энергии света возможно в том случае, если фотохимически мобилизованный электрон будет воспринят системами с более высоким отрицательным редокспотенциалом по сравнению с исходным донором электрона (до $E'_0 = -0{,}35$ в). В 1948—1949 гг. в работе с Г. П. Брин нами было показано, что в качестве таких систем могут быть использованы флавины и пиридиннуклеотиды [25], восстановленные формы которых, как показали другие исследователи, могут использоваться в системе биосинтетических реакций восстановления углекислоты [26].

Близкий к описанному путь переноса электрона мы встречаем у фотосинтезирующих бактерий, у которых однако более вероятна предварительная «энзиматическая подготовка» исходных доноров водорода до взаимодействия с молекулами пигмента.

Обратные реакции фотопродуктов — хемосинтетический путь сопряжения

После периода освещения фотосинтезирующих организмов Стрелер и Арнольд наблюдали слабое послесвечение, спектр которого близок к спектру флуоресценции хлорофилла [27]. Эта хемилюминесценция, вероятно, является следствием обратных реакций активных фотопродуктов. С другой стороны, ступенчатые обратные реакции активных фотопродуктов, идущие с участием биокаталитических систем, могут вести к образованию биохимически важных, богатых энергией соединений, используемых при синтетической деятельности организмов. Представления о «хемосинтетическом пути» использования активных фотопродуктов развиваются в последних работах Варбурга. «Хемосинтетическое» образование богатых энергией фосфорных эфиров, вероятно, происходит в результате биохимического окисления активных восстановленных соединений.

Потребление при освещении неорганических фосфатов и образование аденозинтрифосфата наблюдались у фотосинтезирующих организмов — бактерий [28] и высших растений [29].

Недавно было установлено, что изолированные хлоропласты также способны к такому «фотосинтетическому» фосфорилированию [30]. Механизм этого процесса, по-видимому, заключается в следующем. Исходным донором электронов (водорода) являются образуемые фотохимические, восстановленные формы пиридин-нуклеотидов или флавинов; конечным акцептором электрона является не кислород (как при обычном окислительном фосфорилировании), а фотохимически образованный окислитель, природа которого еще не установлена; в качестве промежуточных систем участвуют аскорбиновая кислота, хиноны, цитохромы [30].

По-видимому, анаэробный тип окислительного фосфорилирования является более древним типом обмена; по мере развития фотосинтеза и аэробного способа жизни в качестве «конечного» акцептора электронов (водорода) стал использоваться молекулярный кислород. Таким образом, подъем электрона «вверх» в результате фотопроцесса обеспечивает возможность образования богатых энергией фосфорных эфиров.

Кальвин с сотрудниками [31] показали, что работа цикла реакций фиксации и восстановления углекислоты возможна при подводе энергии в систему в виде активных соединений двух типов — «активного водорода» в форме восстановленных пиридин-нуклеотидов, обеспечивающих стадию

восстановления (фосфоглицериновая кислота—фосфоглицериновый альдегид), и богатых энергией фосфорных эфиров, нужных для фосфорилирования промежуточных продуктов цикла. Система гетеротрофного обмена древних организмов, не умевших еще использовать свет, по-видимому, включала в себя звенья каталитического переноса электрона и «анаэробного» окислительного фосфорилирования. Развитие пигментной системы привело к тому, что активные продукты фотопроцесса включились в работу существовавших биокаталитических систем; дальнейшее развитие пигментных и каталитических систем привело к более рациональному использованию энергии света.

Перенос энергии

В докладе нет возможности детально остановиться на предполагаемых механизмах переноса энергии в биологических системах [18, 19, 32]. Здесь хотелось бы лишь отметить следующее: «резонансная» передача энергии от возбужденной молекулы хлорофилла к ферментным системам требует соблюдения определенных условий, рассмотренных выше. Такая передача энергии к энзиматическим системам мало вероятна в свете имеющихся данных, так как биокаталитические системы, участие которых вероятно в фотосинтезе, обычно не обладают выраженными максимумами поглощения в красной области спектра (кроме железо-порфиринов). Более вероятна передача энергии на уровне триплетного состояния, если есть условия для такого перехода по А. Н. Теренину и В. Л. Ермолаеву [23]. Передача энергии на уровне триплетного состояния по существу может рассматриваться как перенос непарного электрона в сопряженной системе. Представляется вероятным, что у древних организмов сопряжение могло осуществляться путем передачи энергии (электрона) от магний-порфиринов к железо-порфиринам. В наших модельных опытах были показаны превращения цитохрома *c* под действием света, поглощенного хлорофиллом [33, 34].

РАЗВИТИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДОНОРОВ ВОДОРОДА (ЭЛЕКТРОНА)

Фотосинтезирующие бактерии еще «не умеют» выделять кислород воды в молекулярной форме и осуществляют более дешевый в энергетическом отношении тип фотосинтеза. Ван Нил [34] предположил, что у всех аутотрофных организмов, в том числе у фотосинтезирующих бактерий, происходит элементарный фотолиз воды ($HOH \rightarrow H + OH$), причем исходный донор водорода реагирует с OH радикалами, а H используется для восстановления CO_2. В согласии с этой точкой зрения, было показано [35], что независимо от ΔF балансовой реакции (при различных водородных донорах) квантовый выход бактериального фотосинтеза является постоянным (около $8h\nu$ на молекулу CO_2). Эти результаты свидетельствуют об одном и том же типе элементарных фотопроцессов (независимо от природы исходного донора электрона) при фотосинтезе бактерий.

В работах нашей лаборатории было обнаружено, что бактериохлорофилл в растворе способен к фотосенсибилизированному переносу электрона от сероводорода, аскорбиновой кислоты к флавинам и другим акцепторам водорода [36]. Участие воды в фотопроцессе, по нашему мнению, требует дальнейших доказательств. Более вероятно, что фотосинтезирующие бактерии «используют» электрон молекулы-донора (например SH', S_2O_3'', органические кислоты) и протоны (водородные ионы) воды; способность «вырывать» электрон воды или OH'-ионов возникла лишь в процессе дальнейшего развития автотрофных организмов. Можно пред-

положить, что развитие способности к выделению кислорода воды потребовало использования двух квантов света для переноса одного электрона, т. е. сопряжения двух элементарных фотопроцессов для преодоления высокого энергетического барьера на пути переноса одного электрона (водорода) от воды к углекислоте, тогда как при бактериальном фотосинтезе достаточно одного элементарного фотопроцесса (использования одного кванта света) для переноса одного атома водорода от молекулы донора к CO_2.

Двухступенчатый перенос электрона потребовал усложнения сопряжения с энзиматическими системами и образования «резерва» промежуточных доноров водорода. Можно себе представить развитие следующих ступеней: 1) перенос электрона от воды к промежуточному акцептору электрона (например, цитохром, полифенолы, дегидроаскорбиновая кислота, дисульфиды) — реакция Хилла; 2) перенос электрона от восстановленных форм этих соединений к пиридин-нуклеотидам, участвующим в реакциях восстановления CO_2 (например, в звене фосфоглицериновая кислота→триозофосфат, согласно схеме Кальвина). Замыкание «накоротко» второй ступени переноса водорода — путем сопряжения с окислительным фосфорилированием — рассмотрено выше. Условный характер этих предположений связан с тем, что до сих пор не решен с полной определенностью вопрос об «одноквантовом» или «двухквантовом» процессе переноса одного электрона (водорода) при фотосинтезе.

О СОСТОЯНИИ ПИГМЕНТОВ-ФОТОКАТАЛИЗАТОРОВ

Мы уже указывали выше, что использование солнечной энергии организмами потребовало больших масштабов синтеза пигментов, поглощающих значительную долю фотохимически активной части солнечного спектра. Ныне существующие организмы, как правило, содержат много пигментов (хлорелла — до 5% хлорофилла).

В процессе накопления хлорофилла при зеленении этиолированных проростков мы с Л. М. Кособуцкой наблюдали следующую картину изменения его состояния [37]. Из протохлорофилла при действии света образуется первичная, «мономерная» форма хлорофилла, связанного с белками и липоидами, обладающая максимумом поглощения при 670 мμ, и малой светопрочностью. В процессе дальнейшего образования и накопления хлорофилла в гранулах максимум поглощения постепенно передвигается до 678 мμ, характеризующих высококонцентрированные, упорядоченные, светоустойчивые формы хлорофилла. Эти наблюдения согласуются с данными, полученными Т. Н. Годневым с сотрудниками [38].

Мы исследовали с помощью спектральных методов состояние хлорофилла и бактериохлорофилла у различных организмов в филогенетическом аспекте и пришли к следующим выводам.

Своеобразный спектр поглощения бактериохлорофилла в клетках фотосинтезирующих бактерий объясняется агрегацией, упорядоченной упаковкой бактериохлорофилла в гранулах; спектры поглощения этого пигмента в твердых и коллоидных растворах соответствуют спектрам живых бактерий [39].

Хлорофилл в красных, синезеленых водорослях и зеленых растениях находится в главной массе в высококонцентрированной агрегированной форме; в равновесии с этими формами находится «мономерный» хлорофилл, связанный с белками и липоидами. В глубоководной красной водоросли филлофора нам удалось [40] обнаружить три разных типа упаковки хлорофилла в гранулах (судя по спектрам поглощения) с максимумами при 690, 678 и 670 мμ.

Нельзя считать ясным конкретный механизм участия разных форм пигментов в элементарном фотопроцессе. Наличие упорядоченных форм пигментов может привести к миграции электрона на уровне триплетного состояния, по А. Н. Теренину [41], к мономерным формам, которые непосредственно участвуют в фотореакции.

Вероятно, дальнейшее развитие автотрофов идет по пути накопления большого количества пигментов, поглощающих практически всю видимую часть солнечного спектра.

Описанные наблюдения дают основание для предположений, что пигменты первичных организмов находились в «мономерной», активной форме, адсорбированной на липопротеинах; по мере развития способности организмов к биосинтезу и накоплению пигментов стали доминировать упорядоченные высококонцентрированные формы состояния пигментов в гранулах. «Совместная работа» пигментов и ферментов в структурах хлоропластов потребовала развития сложной организации, некоторые черты которой иллюстрируются современными электронно-микроскопическими картинами ультратонких срезов.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР.
Москва

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Опарин. Возникновение жизни на Земле. Изд. АН СССР, М.—Л., 1941.
2. А. П. Виноградов. Статья «Биогеохимия», БСЭ, т. 5.
3. R. Lemberg, J. W. Legge. Hematin Compounds and bile Pigments. Interscience Publ., 1949.
4. А. А. Красновский, К. К. Войновская. Биофизика, **1**, 120, 1956.
5. А. А. Красновский, Г. П. Брин. ДАН СССР, **53**, 447, 1946.
6. А. А. Красновский. Статья в сб. «Электронные явления в катализе и адсорбции». Изд. АН СССР, 1955.
7. L. P. Vernon, M. D. Kamen. J. Biol. Chem., **211**, 644, 1954.
8. J. Lascelles. Biochem. J., **55**, 4, 1953;
   К. К. Войновская и А. А. Красновский. Биохимия, **20**, 123, 1955.
9. А. А. Красновский и К. К. Войновская. ДАН СССР, **96**, 1209, 1954.
10. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский. ДАН СССР, **70**, 261, 1950.
11. А. А. Красновский и Г. П. Брин. ДАН СССР, **89**, 527, 1953.
12. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. ДАН СССР, **95**, 841, 1954; **96**, 1201, 1954; **103**, 97, 1955.
13. А. А. Красновский. ЖФХ, **30**, 968, 1956.
14. А. А. Красновский. ДАН СССР, **60**, 421, 1948.
15. А. Н. Теренин. Фотохимия красителей. Изд. АН СССР, 1947; Изв. АН СССР, сер. биол., **3**, 369, 1947.
16. А. А. Красновский. Статья в сб. «Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности». Изд. АН СССР, 1955.
17. L. M. N. Duysens. Science, **120**, 353, 1954:
   Л. Н. Белл. ДАН СССР, **107**, 329, 1956;
   B. L. Strehler, V. H. Lynch. Science, **123**, 462, 1956;
   J. V. Coleman, A. S. Holt, E. Rabinowitch. Science, **123**, 795, 1956.
18. А. Н. Теренин. Усп. физ. наук, **43**, 347, 1951.
19. E. Rabinowitch. Photosynthesis, v. II. Interscience Publ., 1956.
20. R. Van Norman, C. S. French, F. Mcdowall. Plant Physiol., **23**, 455, 1948.
21. H. Dutton, W. Manning, R. Duggar. J. Phys., **47**, 308, 1943.
22. А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин, В. А. Гаврилова. ДАН СССР, **82**, 947, 1952.
23. А. Н. Теренин, В. Л. Ермолаев. ДАН СССР, **85**, 547, 1952; Trans. Farad. Soc., **52**, 1042, 1956.
24. Н. М. Сисакян. Ферментативная активность протоплазменных структур. Изд. АН СССР, 1951; Изв. АН СССР, сер. биол., **5**, 32, **6**, 3, 1956.
25. А. А. Красновский. ДАН СССР, **61**, 91, 1948;
   А. А. Красновский и Г. П. Брин. ДАН СССР, **67**, 325, 1949; **87**, 109, 1952.

26. S. Ochoa. Статья в сб. «Проблемы биохимии», ИЛ, 1948.
27. B. L. Strehler, W. A. Arnold. J. Gen. Physiol., **34**, 908, 1951.
28. A. Frenkel. J. Am. Chem. Soc., **76**, 5568, 1954.
29. R. Emerson, J. Stauffer, W. Umbreit. Am. J. Bot., **31**, 107, 1944; B. Strehler. In «Phosphate Metabolism», v. 11, 1952.
30. D. Arnon. Science, **122**, 9, 1955.
31. M. Calvin. Conferences et rapports. 3-eme Congres International de biochimie, p. 211, Liege, 1956.
32. А. Н. Теренин, А. А. Красновский. Усп. физ. наук, **37**, 65, 1949.
33. А. А. Красновский. ДАН СССР, **103**, 283, 1955.
34. K. Van Niel. Photosynthesis in Plants. Yowa. State College press, 437, 1949.
35. H. Larsen, C. S. Yocum, C. B. Van Niel. J. Gen. Physiol., **36**, 161, 1952.
36. А. А. Красновский и К. К. Войновская. ДАН СССР, **81**, 879, 1951; **87**, 109, 1952.
37. А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая. ДАН СССР, **85**, 177, 1952; **91**, 343, 1953;
Л. М. Воробьева, А. А. Красновский. Биохимия, **21**, 126, 1956.
38. Т. Н. Годнев. Изв. АН СССР, сер. физ., **20**, 557, 1956;
Т. Н. Годнев, Н. С. Судник. Физиол. раст., **3**, 352, 1956.
39. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская. ДАН СССР, **85**, 389, 1952; **92**, 1201, 1953.
40. А. А. Красновский, Е. А. Нестеровская, А. Б. Гольденберг Биофизика, **1**, 328, 1956.
41. А. Н. Теренин. Радиотехника и электроника, **1**, 1127, 1956.

Доклады Академии наук СССР
1957. Том 112, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

ОБРАТИМОЕ ПОЯВЛЕНИЕ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ В КРАСНОЙ И БЛИЗКОЙ ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТЯХ СПЕКТРА ПРИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА, ПРОТОХЛОРОФИЛЛА И ИХ АНАЛОГОВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 23 X 1956)

Исследованная в нашей лаборатории реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла и его аналогов обычно приводит к образованию промежуточных фотопродуктов, обладающих максимумами поглощения света в области более короткой по сравнению с длинноволновым максимумом поглощения пигмента (сводку см. [1]), однако при фотовосстановлении гематопорфирина и других порфиринов [2,3] мы обнаружили поглощение у продуктов реакции в близкой инфракрасной области спектра (максимум при 745 мμ), что указывает на возможное восстановление при этих реакциях «полуизолированных» двойных связей молекулы пигмента.

За последние годы накопился большой материал, указывающий на специфическое действие освещения в красной и близкой инфракрасной областях спектра на ряд фотобиологических реакций растения. Так, например, освещение семян ряда растений красным светом (максимум спектра действия около 650 мμ) стимулирует прорастание; последующее освещение инфракрасным светом (максимум спектра действия 745 мμ) приводит к снятию стимулирующего действия красного света [4].

Желая исследовать возможную связь между реакцией обратимого фотовосстановления порфириновых пигментов с их возможным участием в указанных фотобиологических процессах, мы предприняли поиски фотопродуктов, обладающих поглощением в длинноволновой области спектра и исследовали влияние освещения на скорость обратимых превращений этих промежуточных соединений.

Опыты обычно ставили по следующей схеме: 5 мл раствора пигмента в смеси спирта с пиридином (7 : 3) с коэффициентом поглощения (K) в красном максимуме от 2,0 до 5,0) и 50 мг аскорбиновой кислоты вводили в трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений на приборе Бекмана (модель DU). Из трубки удаляли воздух, откачивая при взбалтывании масляным насосом, снимали первый спектр поглощения от 900 мμ «против» стеклянной кюветы с водой, после чего освещали трубку в фокусе конденсора кинолампой 300 вт через синий светофильтр СЗС-5, срезающий крайнюю красную область спектра. Во время освещения трубка находилась в водяной рубашке с температурой 15°. В процессе освещения измеряли K в максимуме образующихся фотопродуктов через каждые 30 сек. освещения; обычно через 3—5 мин. освещения накопление продуктов достигало максимума; тогда снова снимали спектр поглощения и наблюдали за скоростью обратной реакции без воздуха или пуская в трубку воздух. Обратную реакцию вели либо в темноте, либо освещая трубку через темно-красный светофильтр КС-19, пропускающий близкую инфракрасную область. После окончания обратной реакции снимали спектр поглощения. Дифференциальный спектр поглощения фотопродуктов соответствует разности между вторым и первым измерениями; разность между третьим и вторым измерениями дает спектр обратимо-реагирующего продукта.

Фотореакция ведет к более быстрому падению оптической плотности на «склоне» кривой главного максимума поглощения пигмента по срав-

нению с обычно малым ее увеличением за счет образования промежуточного продукта. Поэтому быстрое понижение дифференциального спектра может соответствовать фиктивному «спектру» промежуточного продукта. Значение максимума дифференциального спектра будет истинным лишь в тех случаях, когда поглощение промежуточного продукта лежит вне области главного максимума поглощения пигмента. Это относится к продуктам фотовосстановления гематопорфирина и протохлорофилла. В случае же хлорофилла и пигмента семян мятлика дифференциальный спектр дает лишь длинноволновую ветвь полосы поглощения фотопродукта в близкой инфракрасной области спектра.

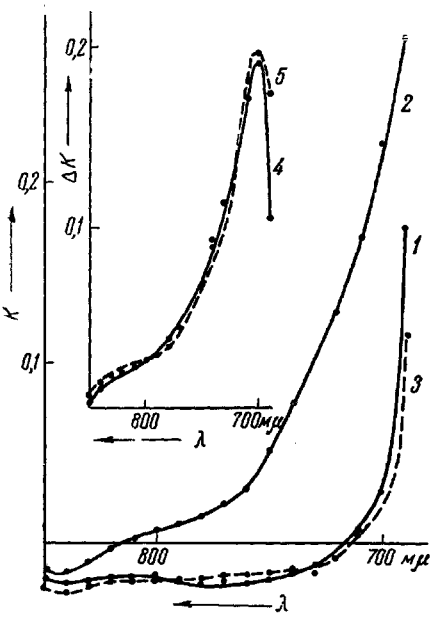


Рис. 1. Фотовосстановление хлорофилла а. 5 мл раствора в смеси спирта и пиридина (7 : 3), 50 мг аскорбиновой кислоты, K хлорофилла при 665 мμ = 4,0: *1* — исходный спектр поглощения раствора в вакуумной трубке, измеренный против кюветы с водой; *2* — после 5 мин. освещения через светофильтр СЗС-5; *3* — после 2 час. обратной реакции с воздухом, *4* —разность спектров *2—1*; *5* — разность спектров *2—3*

Хлорофилл а. При ведении опытов в пиридине, где отчетливо образуется «красная» восстановленная форма, наблюдается лишь некоторое увеличение поглощения в области 700—800 мμ; однако при ведении опытов в спиртопиридиновой среде наблюдается отчетливое появление полосы поглощения 850—700 мμ, обратимо падающей в темноте (рис. 1). Аналог хлорофилла—фталоцианин магния — в этих условиях дает менее явное поглощение в области 700—800 мμ.

Линшитц и Реннерт [5], освещая растворы хлорофилла в смеси эфир—изопентан — спирт при —170° наблюдали наряду с появлением полосы фотопродукта в области 480—560 мμ, некоторое увеличение поглощения при 700—730 мμ; эффекты усиливались при введении хинона. Исходя из наших опытов, можно предполагать, что эти явления, которые авторы работы [5] приписывают фотоокислению, объясняются фотовосстановлением хлорофилла молекулами растворителя; усиление эффекта от введения хинона можно объяснить образованием промежуточной системы хинон — растворитель (спирт), облегчающей фотоперенос водорода к хлорофиллу.

Протохлорофилл. Еще в 1949 г. мы наблюдали [6], что протохлорофилл, выделенный хроматографически из оболочек семян тыквы, при фотовосстановлении дает лабильный фотопродукт, обладающий максимумом поглощения при 470 мμ. Ныне мы нашли, что фотовосстановление в спиртопиридиновой среде ведет также и к образованию продукта с максимумом поглощения в красной области спектра при 670 мμ (рис. 2). Спектр поглощения этого пигмента, однако, не совпадает со спектром хлорофилла в отличие от последнего устойчивого соединения, фотопродукт в темноте обратимо реагирует с образованием исходного протохлорофилла. Можно предположить, что фотопродукт имеет форму хлорин-радикала.

Бактериохлорофилл. Выделенный хроматографически из культуры Rhodopseudomonas [7] при фотовосстановлении в описанных условиях не образует продуктов, поглощающих свет в области 730—900 мμ.

Пигмент семян мятлика лугового (Poapratensis). Тодд и Галстон [8] выделили из семян мятлика, прорастание которых уско-

ряется красным светом, пигмент, оказавшийся пирофеофорбидом а. Наши опыты подтвердили результаты этих авторов в отношении спектра поглощения выделенного пигмента.

Мы использовали для фотовосстановления неразделенные хроматографически пигменты семян. Для этого воздушно-сухие семена извлекали ацетоном, пигменты переводили в эфир (отмывая водой ацетон), эфирный слой сушили над Na_2SO_4, эфир испаряли, и остаток растворяли в смеси спирта с пиридином. Из рис. 3. видно, что при фотовосстановлении образуются продукты, обладающие в близкой инфракрасной области спектра максимумом в области 700—750 мμ.

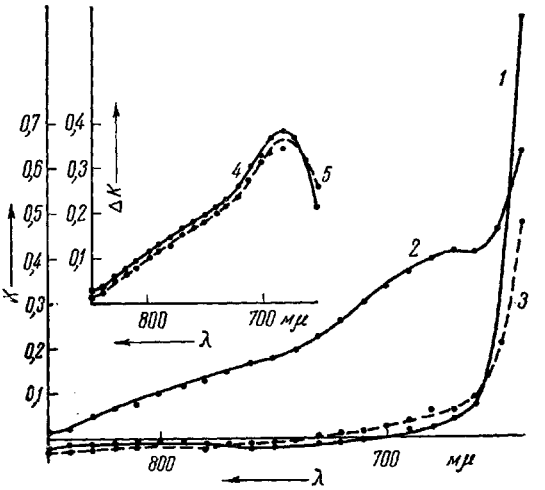


Рис. 2. Фотовосстановление протохлорофилла. Те же условия, что и на рис. 1. Исходная величина K при 625 мμ = 2,0: *1* — начальный спектр поглощения; *2* — после 1,5 мин. освещения через светофильтр СЗС-5; *3* — после обратной реакции с воздухом; *4* — разность спектров *2—1*; *5* — разность спектров *2—3*

Действие инфракрасного света на обратную реакцию фотопродукта (рис. 4). В этих опытах мы исследовали скорость обратной реакции «бактериохлорина», образуемого при фотовосстановлении гематопорфирина (*2*) и фотопродуктов, образуемых из хлорофилла, протохлорофилла и пигментов семян мятлика. Ясно видно ускоряющее действие инфракрасного света на обратную реакцию, которая в присутствии воздуха идет и в темноте.

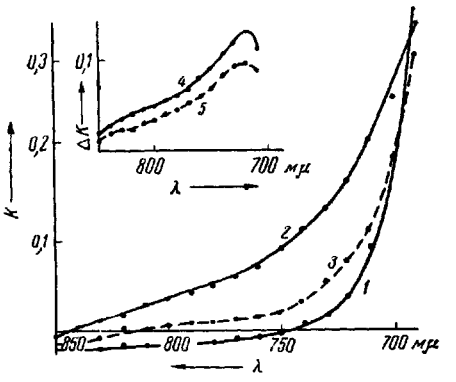


Рис. 3. Фотовосстановление пигмента семян мятлика. Те же условия, K при 665 мμ = 4,5; *1* — начальный спектр поглощения, *2* — после освещения 5 мин. через светофильтр СЗС-5, *3* — после обратной реакции с воздухом; *4* — разность спектров *2—1*; *5* — разность спектров *2—3*

О механизме фотореакции. Первичный акт фотовосстановления связан с восприятием электрона молекулой пигмента от молекулы донора. По-видимому, электрон, воспринимаемый молекулой пигмента, делокализован в системе сопряженных связей; последующее восприятие протона должно локализовать разрыв в определенном месте молекулы. В зависимости от природы среды изменяется кислотно-основное равновесие кислых или основных группировок молекулы пигмента, что ведет к многообразию спектральных свойств промежуточных фотопродуктов. Мы уже высказывали предположение, что при образовании красной фотовосстановленной формы происходит раскрытие системы сопряженных связей ([10]), тогда как в случае образования продуктов, поглощающих в инфракрасной и красной областях спектра, раскрываются «полуизолированные» связи с возможным образованием хлорин- или бактериохлорин-радикалов.

Обращает на себя внимание «размытость» спектров полученных фотопродуктов, что, по-видимому, связано с образованием ион-радикалов. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова наблюдали чрезвычайно размытый

спектр поглощения первичной фотовосстановленной формы феофитина [9], являющейся такого рода ион-радикалом; «вторичная» восстановленная форма, у которой, по-видимому, локализовано место присоединения протона, обладает более дискретным видом спектра.

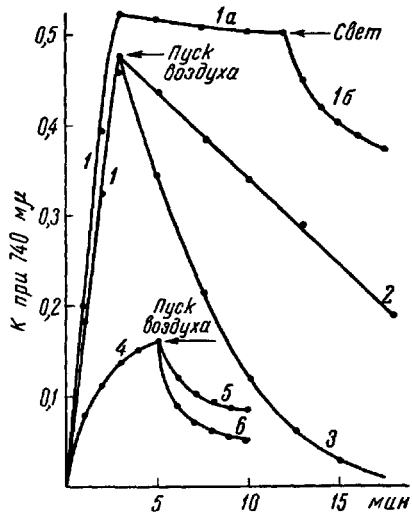


Рис. 4. Действие света на скорость обратной реакции продуктов фотовосстановления. Температура 15°, 5 мл раствора гематопорфирина в смеси спирт — пиридин (9 : 1), 10 мг аскорбиновой кислоты, без воздуха, K при 495 мμ = 0,6. *1*—прямая фотохимическая реакция; обратные реакции: *1а* — без воздуха, в темноте, *1б* — без воздуха, освещение через темно-красный светофильтр RG-5; *2* — с воздухом, в темноте; *3* — с воздухом, освещение через RG-5; фотовосстановление семян мятлика, 5 мл раствора в смеси спирт — пиридин (7 : 3), 50 мг аскорбиновой кислоты, без воздуха, K при 665 мμ 2,0; *4* — прямая фотореакция; *5* — обратная реакция в темноте; *6* — обратная реакция, освещение через темно-красный светофильтр КС-19

О фотобиологической роли реакций этого типа. Изучение малых изменений спектра поглощения пигментов при действии света на живые организмы привело ряд авторов [11] к обнаружению спектральных изменений, сходных с теми, которые возникают при фотовосстановлении хлорофилла (обратимое появление максимума около 520 мμ). В нашей лаборатории наблюдались обратимые фотохимические превращения хлорофилла в естественном состоянии связи, в зеленых растворах [12]. В работе Стрелера и Линч [13] изменения величины поглощения света при 520 мμ в живых организмах связаны с явлением «фотосинтетической» хемилюминесценции; Коулман, Холт и Рабинович [14] показали, что появление максимума при 520 мμ в суспензии хлореллы соответствует падению «красного» максимума поглощения хлорофилла; в той же работе констатированы изменения поглощения хлореллы в близкой инфракрасной области спектра.

Наблюдения, описанные в настоящей работе, позволяют высказать предположение о возможной связи реакции фотовосстановления, кроме фотосинтеза также и с другими фотобиологическими процессами, при которых наблюдаются взаимосвязанные максимумы спектра действия в красной и близкой инфракрасной области.

Приносим глубокую благодарность академику А. Н. Терешину за внимание к работе.

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

Поступило
12 X 1956

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ЖФХ, **30**, 968 (1956). [2] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **96**, 1209 (1954). [3] К. К. Войновская, А. А. Красновский, Биохимия, **20**, 123 (1955). [4] H. A. Borthwick, S. B. Hendricks et al., Proc. Nat. Acad. Sci Wash., **38**, 662 (1952). [5] H. Linshitz, J. Rennert, Nature, **169**, 193 (1952). [6] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949). [7] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951); К. К. Войновская, А. А. Красновский, Биохимия, **18**, 626 (1953). [8] G. W. Todd, A. W. Galston, Plant Physiol., **29**, 311 (1954). [9] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **96**, 1201 (1954). [10] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [11] L. M. N. Duysens, Science, **120**, 353 (1954); H. T. Witt, Naturwiss., **42**, 72 (1955); Л. Н. Белл, ДАН, **107**, 329 (1956). [13] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **104**, 440 (1955); Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **21**, 126 (1956). [13] B. L. Strehler, V. H. Lynch, Science, **123**, 462 (1956). [14] J. W. Coleman, A. S. Holt, E. Rabinowitch, Science, **123**, 795 (1956).

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 4, вып. 2 1957 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА У РАСТЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Л. М. ВОРОБЬЕВА и Е. В. ПАКШИНА

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

Исследование спектров поглощения, флуоресценции и кинетики выцветания хлорофилла в естественном состоянии связи привело нас к тому выводу, что состояние хлорофилла в растениях изменяется в процессе образования и накопления пигментов, зависит от температуры и ряда других физиологических факторов [1, 2].

Наряду с устойчивыми агрегированными формами хлорофилла, обычно определяющими положение главного максимума поглощения пигмента в гранулах хлоропластов (677—678 *mμ*), существует фотохимически неустойчивая, быстро выцветающая форма хлорофилла, обладающая яркой флуоресценцией и максимумом поглощения, расположенным около 670 *mμ*. Свойства этой формы хлорофилла близки свойствам хлорофилла в растворах, поэтому в отличие от агрегированных форм пигмента эту форму мы называем «мономерной».

О количестве мономерной формы можно судить по кинетической кривой выцветания хлорофилла в коллоидных растворах (гомогенатах) вещества зеленых листьев — «зеленых растворах»; в течение первых секунд освещения происходит быстрое выцветание части хлорофилла, обычно сопровождающееся уменьшением флуоресценции и небольшим смещением максимума поглощения хлорофилла в длинноволновую область спектра [2].

Наши опыты показали, что активная форма хлорофилла в зеленых растворах из листьев сахарной свеклы способна к обратимым фотохимическим окислительно-восстановительным превращениям [2], которые, вероятно, лежат в основе действия хлорофилла при фотосинтезе. Этим наблюдениям соответствует ряд работ последнего времени (Дюйсенс, Витт, Белл [3]), в которых с помощью методов дифференциальной спектрофотометрии были обнаружены в живых фотосинтезирующих организмах активные продукты, максимум поглощения которых (ок. 520 *mμ*) соответствует максимуму поглощения фотовосстановленной формы хлорофилла, обнаруженной одним из нас и исследованной в работах нашей лаборатории [4]. Стрелер и Линч [5] показали, что в живых фотосинтезирующих организмах обратная реакция фотопродуктов с поглощением при 520 *mμ* коррелирует с хемилюминесценцией хлорофилла в этих организмах. В последней работе Колемана, Холта и Рабиновича [6] было показано в суспензиях хлореллы, что появлению максимума при 520 *mμ* соответствует обратимое падение красного максимума поглощения хлорофилла.

Мы высказали предположение [1, 2], что изменения состояния хлорофилла и превращения фотохимически активной ярко флуоресцирующей формы хлорофилла в листьях растений определяют давно известные эффекты изменения флуоресценции хлорофилла в листьях растений в зави-

симости от различных физиологических факторов и после периодов света и темноты [7]. Так, например, типичная картина изменения флуоресценции хлорофилла в листьях растений после периода темноты, полученная в работах ряда авторов, объясняется, с точки зрения наших представлений о превращении хлорофилла, таким образом: усиление флуоресценции при перемещениях листа из темноты на свет сопровождается переходом части хлорофилла из агрегированного в «рабочее» мономерное состояние; последующий период падения флуоресценции соответствует превращению части хлорофилла при фотореакции.

Вассинк с сотрудниками [8] при действии восстановителей — доноров водорода — на культуру фотосинтезирующих бактерий наблюдал уменьшение интенсивности флуоресценции бактериохлорофилла, что следует объяснить, в соответствии с нашими работами, фотовосстановлением пигмента в процессе фотосинтеза и, следовательно, уменьшением стационарной концентрации флуоресцирующей формы пигмента.

Таким образом, изучение фотохимически активной формы хлорофилла в растениях представляет непосредственный интерес в связи с проблемой участия хлорофилла в процессе фотосинтеза. Уже первые наши наблюдения показали, что кривые выцветания отличаются у зеленых растворов, полученных из листьев разных растений.

В данной работе исследованы спектры поглощения в красной области и кинетика выцветания хлорофилла у растений различных систематических групп. У сахарной свеклы, фасоли и кукурузы эти исследования вели систематически в течение вегетационного периода с тем, чтобы уловить различия в количестве выцветающей формы в процессе индивидуального развития растения. Обнаружив объект, обладающий наиболее значительным количеством мономерной формы, мы предполагали поставить опыты по ее выделению.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения и кинетику выцветания хлорофилла мы исследовали в коллоидных растворах вещества листьев — «зеленых растворах», приготовленных на водно-глицериновых средах. Добавление глицерина не влияет на положение красного максимума поглощения хлорофилла по сравнению с водным «раствором». Максимум поглощения хлорофилла в живых листьях и в зеленом растворе при pH 7 совпадает. Водно-глицериновые зеленые растворы сохраняют способность к реакции Хилла (по фенолиндофенолу) [2]. Все это указывает на то, что в водно-глицериновых зеленых растворах сохраняется естественное состояние хлорофилла.

Не менее важно и то, что добавление глицерина позволяет получить прозрачные, устойчивые, вязкие коллоидные «растворы», удобные для проведения точных спектрофотометрических измерений.

Для получения зеленых растворов, с которыми вели опыты, навеску листьев без средней жилки (обычно 0,5 *г*) растирали с $^1/_{15}$ *М* раствором Na_2HPO_4 (pH 8,5). Полученную кашицу отжимали через полотно и центрифугировали при 3500 *g* в течение 10 мин. Полученный зеленый раствор смешивали с глицерином в отношении 4 : 6. Все эти операции вели в затемненной комнате. В некоторых случаях при таком режиме центрифугирования быстро оседало все зеленое вещество листьев; для предотвращения этого сокращали время центрифугирования до 1 мин.; в некоторых отдельных случаях материал растирали непосредственно в водно-глицериновом растворе. Зеленый раствор разбавляли водно-глицериновым раствором (в соотношении 4 : 6) того же pH до величины оптической плотности 0,6—0,7 в красном максимуме поглощения при толщине слоя 1—1,1 *см*. Точность измерения положения максимума обычно составляла ± 1 *mμ*. Для определения кинетики выцветания хлорофилла трубку с зеленым раствором поочередно помещали в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана и в стеклянный цилиндрический сосуд, в котором циркулировала вода из термостата с температурой 20°. Трубку с зеленым раствором в цилиндре освещали 500 *вт* киноламой с конденсором через красный светофильтр. RG-2 ($\sim 10^6$ *эрг/см²сек*).

В процессе выцветания измеряли кинетику уменьшения оптической плотности в красном максимуме поглощения. Измерение вели по следующему графику времени от начала освещения: 5, 10, 25, 40, 70, 130, 310 сек. Интервал между окончанием освещения и измерением около 30 сек. До и после освещения измеряли спектр поглощения в области 700—600 *mμ*.

КИНЕТИКА ВЫЦВЕТАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕНЫХ РАСТВОРАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ФАСОЛИ И КУКУРУЗЫ

В этих опытах были взяты сахарная свекла сорта Верхнячка, фасоль сорта Латвия и кукуруза, выращенные в открытом грунте в июне—сентябре 1955 г. В течение лета, через 4—5 дней, брали листья этих растений, готовили из них коллоидные зеленые растворы, как уже было описано выше, и определяли в них выцветание хлорофилла.

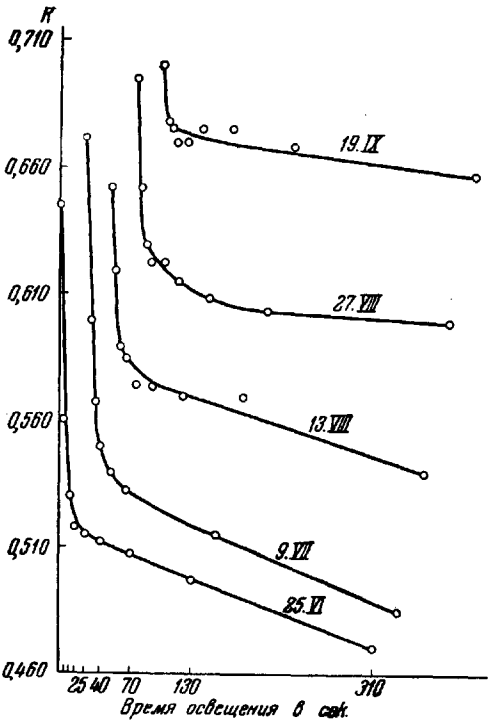


Рис. 1. Кинетика выцветания хлорофилла в зеленых растворах из листьев сахарной свеклы в процессе вегетации

Из табл. 1 видно, что хлорофилл в листьях кукурузы и фасоли выцветает очень мало (3—6%), и трудно вообще говорить об изменении выцветания при вегетации. В большинстве случаев максимум поглощения хлорофилла у этих растений был расположен при 677,5 $m\mu$.

В коллоидных растворах листьев свеклы в июне и июле выцветало в течение опыта 20—30% хлорофилла (рис. 1). С начала августа процент выцветающего хлорофилла в зеленых растворах листьев свеклы стал постепенно понижаться. В конце сентября — начале октября в коллоидных растворах свеклы выцветало 6—3% хлорофилла. Характерно,

Таблица 1

Выцветание хлорофилла в «зеленых растворах» из листьев сахарной свеклы, фасоли и кукурузы в процессе вегетации

Дата	Температура		Свекла		Фасоль		Кукуруза	
	ночью	в 12 час. дня	положение максимума поглощения в $m\mu$ (до освещения)	% выцветания хлорофилла (в максимуме)	положение максимума поглощения в $m\mu$ (до освещения)	% выцветания хлорофилла (в максимуме)	положение максимума поглощения в $m\mu$ (до освещения)	% выцветания хлорофилла (в максимуме)
17.VI	10	21	676	23	—	—	—	—
25.VI	13	25	676	27	677,5	6	677,5	5
29.VI	11	19	675	23	677,5	4	677,5	6
5.VII	14	19	675	25	677,5	3	677,5	6
6.VII	15	19	676	26	—	—	—	—
9.VII	17	25	676	28	677,5	6	678	4
14.VII	14	24	675	31	677,5	5	677,5	4
22.VII	9	16	674	34	676	3	677,5	3
26.VII	11	21	675	20	677,5	3	676	3
30.VII	14	25	676	22	677,5	4	678	5
4.VIII	—	—	675	24	678	3	678	5
9.VIII	11	22	676	17	677,5	2	677,5	3
13.VIII	13	21	676	17	677,5	2	677,5	4
27.VIII	12	23	676	14	678	2	678	3
3.IX	9	22	676	11	—	—	—	—
19.IX	11	20	676	6	—	—	—	—
5.X	3	15	676	3	—	—	—	—

что у свеклы (растения, содержащего большое количество выцветающей формы) красный максимум поглощения хлорофилла в зеленых растворах расположен при 675—676 *mμ*, т. е. сдвинут по сравнению с максимумом поглощения у фасоли и кукурузы (растений, дающих небольшой процент выцветаниях хлорофилла) в коротковолновую сторону на 2*mμ*. Выцветание хлорофилла в зеленых растворах из листьев свеклы сопровождается часто сдвигом максимума на 1—1,5 *mμ* в длинноволновую сторону, что можно объяснить выцветанием мономерной формы; соответственно у фасоли и кукурузы это явление не наблюдается. Следует отметить, что различия в количестве выцветающей формы определяются в данных опытах именно фазой развития, но не температурой; из табл. 1 видно, что 29 июня и 19 сентября при одинаковой температуре днем и ночью выцветало соответственно 23 и 6% хлорофилла.

ВЫЦВЕТАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕНЫХ РАСТВОРАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

Из данных табл. 2 и рис. 2 видно, что выцветание хлорофилла в зеленых растворах за 5 мин. освещения колеблется у разных растений от 1 до 30%. У большинства исследуемых объектов выцветание составляет

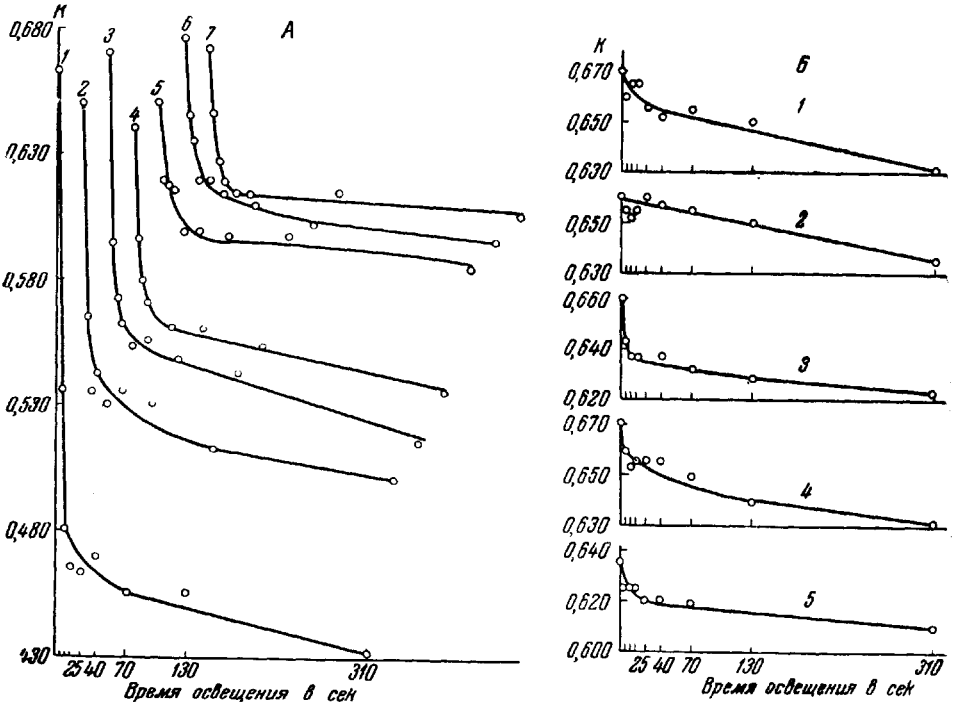


Рис. 2. Кинетика выцветания хлорофилла в зеленых растворах:

А. *1* — тополь (675 *mμ*); *2* — лебеда (676 *mμ*); *3* — сахарная свекла (675 *mμ*); *4* — маршанция (675 *mμ*); *5* — хвощ (676 *mμ*); *6* — ива (676 *mμ*); *7* — спирогира (676 *mμ*) Б. *1* — фасоль (677,5 *mμ*); *2* — кукуруза (677,5 *mμ*); *3* — кукушкин лен (676 *mμ*); *4* — ряска (678 *mμ*); *5* — яблоня (675 *mμ*); В скобках дано положение максимума поглощения хлорофилла перед освещением зеленого раствора.

5—7%. Анализируя данные, сведенные в табл. 2, следует отметить отсутствие корреляции между выцветанием и систематическим положением растения.

Объектами, дающими относительно большой процент выцветания, оказались: сахарная свекла, лебеда, тополь, маршанция, хвощ, папоротник-щитовник, ива (в порядке уменьшения). Существенно то, что у этих растений максимум поглощения хлорофилла в зеленых растворах находится при 675—676 *mμ*. После интенсивного освещения красный максимум по-

Таблица 2

Выцветание хлорофилла в „зеленых растворах" растений различных систематических групп

№ пп.	Систематическое положение	Дата измерения	Положение красного максимума поглощения в *mμ* (до освещения)	% выцветания хлорофилла в красном максимуме за 5 минут освещения
	Кл. Зеленые водоросли			
1	Спирогира (Spirogira)	15/VII	676	9
2	Водяная сеточка (Hydrodictyon)	20/VII	660	41
	Кл. Сине-зеленые водоросли			
3	Осциллатория (Oscillatoria)	8/VIII	677,5	0
	Тип. Мохообразные			
	Кл. Печеночники			
4	Маршанция (Marchantia polymorpha)	12/VII	675	16
	Кл. Мхи			
5	Сфагнум (Sphagnum)	15/VII	676	6
6	Кукушкин лен (Polytrichum)	15/VII	676	4
	Тип. Папоротникообразные			
	Кл. Папоротниковые			
7	Папоротник-щитовник (Dryopteris)	18/VIII	676	14
8	Папоротник-орляк (Pteridium)	10/VIII	676	2
9	Папоротник sp.	10/VIII	676	4
	Кл. Хвощевые			
10	Хвощ болотный (Equisetum palustre)	10/VIII	676	10
	Тип. Голосемянные			
	Сем. Сосновые			
11	Лиственница (Larix europaca)	8/VII	676	7
	Тип. Покрытосеменные			
	Кл. Однодольные			
	Сем. Лилейные			
12	Лук репчатый «Чернушка» (Allium cepa)	17/VI	677,5	7
	Сем. Ароидные			
13	Белокрыльник (Calla palustris)	13/VII	677,5	4
	Сем. Водокрасовые			
14	Элодея (Helodea canadensis)	13/VII	677,5	2,5
	Сем. Рясковые			
15	Ряска (Lemna minor)	12/VII	678	6
	Сем. Злаки			
16	Ежа сборная (Dactylis glomerata)	7/VII	677	7
17	Тимофеевка (Phleum pratense)	11/VII	677,5	5
18	Пшеница озимая 599 (Triticum vulgare)	28/VII	677,5	2
19	Пшеница яровая «Московка» (Triticum vulgare)	28/VII	677,5	2
20	Овес кормовой (Avena vulgare)	28/VII	676	3
21	Ячмень (Hordeum vulgare)	28/VII	677	1
22	Кукуруза (Zea mays)	28/VII	677,5	3—5
	Сем. Маревые			
23	Лебеда (Chenopodium album)	27/VI	676	23
24	Сахарная свекла (Beta vulgaris)	—	675—676	20—30
25	Шпинат (Spinacia oleracea)	6/VII	677,5	4
	Сем. Бобовые			
26	Клевер ползучий (Trifolium repens)	28/VI	677,5	10

Таблица 1 *(продолжение)*

№ пп.	Систематическое положение	Дата измерения	Положение красного максимума поглощения в $m\mu$ (до освещения)	% выцветания хлорофилла в красном максимуме за 5 минут освещения
27	Желтая акация (Caragana arborescens)	11/VII	677,5	7
28	Фасоль „Латвия" (Phaseolus vulgaris)	—	677,5	2—6
	Сем. Губоцветные			
29	Черноголовка (Prunella vulgaris)	5/VIII	677,5	2
30	Глухая крапива (Lamium album)	5/VIII	678	3
	Сем. Вьюнковые			
31	Калистегия (Calystegia)	5/VIII	677,5	3
	Сем. Подорожниковые			
32	Подорожник (Plantago major)	28/VI	677,5	4
	Сем. Маслинные			
33	Ясень (Fraxinus excelsior)	2/VII	672,5	10
34	Сирень (Syringa vulgaris)	7/VII	676	7
	Сем. Ивовые			
35	Ива белая (Salix alba)	3/VIII	676	12
36	Тополь душистый (Populus suaveolens)	4/VII	676	35
	Сем. Кленовые			
37	Клен американский (Acer Negundo)	4/VII	677,5	7
38	Клен остролистный (Acer platanoides)	7/VII	677,5	6
	Сем. Розоцветные			
39	Гусиная лапчатка (Potentilla anserina)	9/VII	677,5	8
40	Яблоня (Malus domestica)	25/VII	675	5
41	Земляника (Fragaria vesca)	27/VII	676	3
42	Вишня (Cerasus vulgaris)	25/VII	677,5	0
	Сем. Березовые			
43	Береза (Betula verrucosa)	23/VII	675	12
	Сем. Сложноцветные			
44	Полынь обыкновенная (Artemisia vulgaris)	25/VII	676	3
45	Мать и мачеха (Tussilago farfara)	27/VII	676	5
	Сем. Крестоцветные			
46	Редис (Raphanus sativus var. radicula)	1/VIII	677,5	3
47	Гулявник (Sisymbrium)	1/VIII	677,5	0
	Сем. Гречишные			
48	Ревень (Rheum arvense)	21/VII	676	2
49	Ревень (Rheum sp.)	21/VII	676	6
	Сем. Бальзаминовые			
50	Недотрога (Impatiens noli tangere)	6/VII	677,5	7
	Сем. Пасленовые			
51	Белена (Hyoscyamus niger)	21/VII	677,5	1
52	Табак (Nicotiana tabacum)	7/X	677,5	4
	Сем. Роголистные			
53	Роголистник (Ceratophyllum sp.)	19/VII	677,5	0
	Сем. Липовые			
54	Липа (Tilia cordata)	4/VII	676	7

Примечания:

1. Выцветание № 23, 25 и 29 измеряли в течение всего лета.
2. При приготовлении зеленых растворов из растений №№ 1, 2, 5 центрифугирование длилось 1 мин., в случае № 34, 41, 43—5 мин.; зеленые растворы из растений № 3, 12,55 готовили без центрифугирования путем растирания в водно-глицериновой среде.
3. № 19, 20, 21, 22, 23—молодые 14-ти дневные растения, одновременно посеянные на грядке; листья № 53 взяты из оранжереи.

глощения сдвигался во многих опытах на 1—1,5 $m\mu$ в длинноволновую сторону спектра, что следует объяснить выцветанием мономерной формы хлорофилла с максимумом поглощения около 670 $m\mu$. У растений, зеленые растворы которых мало выцветали, максимум поглощения хлорофилла чаще всего был расположен при 677,5—678 $m\mu$, что может быть связано с меньшим количеством дезагрегированных форм хлорофилла в этих растениях.

Характерным является не только «итоговый» процент выцветания хлорофилла, но и вид кинетической кривой выцветания. У растений, обладающих большим количеством лабильной формы хлорофилла, выцветание совершается в основном за первые 15 сек. Быстрое выцветание хлорофилла за первые 15 сек., очевидно, является следствием разрушения мономерной несветопрочной формы, тогда как следующий за этим постепенный уклон, часто наблюдающийся на кривых выцветания, очевидно, следует отнести за счет постепенной дезагрегации агрегированных форм хлорофилла. Поэтому постепенное понижение коэффициента погашения в максимуме поглощения при освещении в течение всего опыта (например, у белого клевера, американского клена) менее показательно для характеристики «наличной» мономерной формы.

У ряда растений выцветание так мало, что снижение коэффициента погашения лишь немногим превышает ошибку измерений на спектрофотометре. Отличный от других растений спектр поглощения хлорофилла и характер выцветания наблюдался у водяной сеточки (Hydrodictyon). Красный максимум поглощения хлорофилла в зеленом растворе из этой водоросли был расположен при 660 $m\mu$, в области 680—675 $m\mu$ наблюдался лишь небольшой подъем. После выцветания спектр поглощения резко изменялся; появлялось два ясно выраженных максимума, при 674 $m\mu$ и 650 $m\mu$. При 660 $m\mu$ выцветание составляло 64%, а при 675 $m\mu$ 9% хлорофилла.

Это явление можно было бы объяснить наличием у Hydrodictyon необычно большого количества хлорофилла «в». Однако в ацетоновой вытяжке из высушенной водоросли наблюдается обычный максимум, характерный для хлорофилла «а»; большого увеличения оптической плотности в области максимума поглощения хлорофилла «в» не наблюдалось. Обнаруженное явление требует дальнейшего исследования.

Рассматривая результаты табл. 2, следует учесть, то, что пробы растений были «случайны» в экологическом отношении. Роль местообитания растений, различия ярусности листьев и т. д. нуждаются в особом исследовании.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕНЫХ РАСТВОРАХ

Нахождение объекта, обладающего значительным количеством мономерной формы хлорофилла, определило возможность постановки опытов по фракционированию различных форм. Для этой цели были взяты листья сахарной свеклы, обладающей большим количеством выцветающей формы хлорофилла. В большинстве опытов использовали свеклу, пересаженную в октябре 1955 г. из грунта в вазоны, которые освещали люминесцентными лампами дневного света. Попытки фракционирования зеленых растворов и выделения фракции, обогащенной мономерной формой, проводили методом центрифугирования и методом адсорбционной хроматографии.

Попытки хроматографического разделения хлорофилла в водных зеленых растворах на колонках $Ca_3(PO_4)_2$, $MgCO_3$, $MgHPO_4$, $Mg_3(PO_4)_2$, $ZnCO_3$, $Ba(CH)_2$ не привели к положительному результату.

Более удачным оказалось применение скоростного центрифугирования. В этих опытах мы использовали центрифугу с охлаждением типа «MSE» с насадкой, дающей ускорение до 25 000 g. Предполагалось выде-

лить фракцию, обогащенную мономерной формой за счет оседания более агрегированных, более тяжелых частиц. Следовало ожидать поэтому после центрифугирования смещения в коротковолновую сторону максимума поглощения хлорофилла в зеленом растворе, так как максимум поглощения более «легкой» формы хлорофилла лежит при 670 *mμ*. Обычно опыты проводили по следующей схеме. Листья сахарной свеклы без средних жилок растирали с $^1/_{15}$ М Na_2HPO_4 (на 1 *г* листьев *мл* буферного раствора) и отжимали через полотно. Часть полученной суспензии центрифугировали при 3000 *g* в течение 20 мин., другую часть центрифугировали при 25000 *g* в центрифуге «MSE» от 30 мин. до 2 час. «Контрольный» зеленый раствор (центрифугированный при 3000 *g*) все время стоял на дне скоростной центрифуги. Таким образом, во время центрифугирования оба раствора находились при одинаковой температуре (обычно ок. +5°). После центрифугирования снимали спектр поглощения хлорофилла в красной области на регистрирующем спектрофотометре СФ-2 и сравнивали положение максимума поглощения хлорофилла в обоих растворах, предварительно разбавляя их $^1/_{15}$ *М* Na_2HPO_4 до оптической плотности 0,5—0,7 в красном максимуме поглощения. Обычно контрольный зеленый раствор приходилось разбавлять в 5—10 раз больше центрифугированного при 25 000 *g*.

В опытах с центрифугированием зеленых растворов из листьев свеклы было обнаружено смещение красного максимума поглощения в коротковолновую область на 2—4—6 *mμ* по сравнению с контрольным раствором (от 678—676 до 674—672 *mμ* (рис. 3). Предварительное нагревание зеленых растворов свеклы в течение 15 мин. до 45° не приводило к увеличению эффекта сдвига максимума при центрифугировании.

В ряде подобных опытов зеленые растворы свеклы готовили на холоду при 0°. Результаты были такими же, как и в случае растирания листьев при комнатной температуре. Эти опыты позволяют исключить возможное предположение о том, что сдвиг максимума при скоростном центрифугировании вызван воздействием комнатной температуры на зеленые растворы при их приготовлении.

Характерно, что именно у свеклы, хорошо выцветающего объекта, наблюдается смещение красного максимума поглощения до 672 *mμ*. Очевидно, в результате центрифугирования остается «раствор», обогащенный мономерной формой. Кукуруза и пшеница не обнаруживают столь явного эффекта, в соответствии с малым выцветанием зеленых растворов из этих растений. У фасоли (молодые растения, выращенные в ящике с землей) наблюдался лишь небольшой сдвиг максимума поглощения от 680 *mμ* до 678 *mμ*. Это тоже согласуется с тем, что зеленые растворы фасоли дают небольшой процент выцветания.

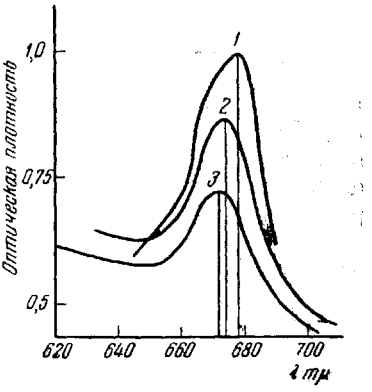


Рис. 3. Изменение спектра поглощения зеленого раствора из листьев сахарной свеклы при скоростном центрифугировании:

1 — контрольный зеленый раствор, полученный центрифугированием при 3000 *g* в течение 20 мин., разабавленный буфером в 10 раз; *2* — зеленый раствор после центрифугирования при 25 000 *g* в течение 50 мин. (разбавление 1 : 3); *3* — зеленый раствор после центрифугирования при 25 000 *g* в течение 100 мин. (разбавление 1 : 3).

У маршанции и примулы в результате центрифугирования их зеленых растворов оседало много зеленого вещества, и красный максимум поглощения был очень размытым, так что трудно было определить точно его положение. Но во всяком случае очевидно, что после центрифугирования зеленых растворов этих растений при 25 000 *g* красный максимум поглощения перемещается в коротковолновую сторону. У маршанции относи-

тельно большой процент выцветания тоже согласуется со сдвигом максимума при центрифугировании (выцветание у зеленых растворов, примулы не определяли).

* * *

Мы до сих пор располагаем малым количеством методов, позволяющих обнаружить различные состояния хлорофилла. Так, Годнев и Осипова с сотрудниками [9] наблюдали различия в экстрагируемости хлорофилла органическими растворителями у разных видов растений и в зависимости от возраста. До сих пор, однако, неясно, возможно ли уловить различия в экстрагируемости быстро выцветающих и агрегированных форм хлорофилла.

Примененное в наших работах измерение кинетики выцветания дает возможность определить различные формы хлорофилла по их фотохимическому поведению. Экспериментальный материал, полученный в данной работе, свидетельствует о том, что во всех исследованных растениях имеются, наряду с устойчивыми, быстро выцветающие формы хлорофилла.

Нельзя исключить возможность того, что, вероятно, происходящий распад гранул — дезагрегация, ведущая к появлению мономерной формы при нарушении структуры, может определяться наличием поверхностно активных веществ в цитоплазме.

Требует исследования вопрос о кинетике выцветания хлорофилла непосредственно в живых листьях с целью диагностики состояния в них хлорофилла.

ВЫВОДЫ

1. Выцветание хлорофилла в «зеленых растворах» после освещения интенсивным красным светом колеблется у разных растений от 1 до 30% и у большинства растений составляет 5—7%. Наибольшим количеством выцветающей формы хлорофилла обладали «зеленые растворы» из листьев сахарной свеклы, лебеды, тополя, маршанции, папоротника, ивы (в порядке уменьшения).

2. Количество выцветающей формы хлорофилла в «зеленых растворах» из листьев сахарной свеклы изменяется в процессе развития растения и уменьшается от 20—30% до 3—6% к концу вегетации.

3. Длительное центрифугирование «зеленых растворов» из листьев сахарной свеклы и ряда других растений при 25 000 g (+5°) приводит к перемещению красного максимума поглощения хлорофилла на 2—6 $m\mu$ в коротковолновую сторону спектра, что объясняется обогащением «раствора» мономерной формой хлорофилла за счет оседания более тяжелых агрегированных частиц.

Поступила в редакцию
17. X. 1956

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН, **85**, 177, 1952; ДАН, **91**, 343, 1953; Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. и Войновская К. К., ДАН, **92**, 1201, 1953; Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия, **19**, 37, 1954.
2. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН, **104**, 440; 1955; Воробьева Л. М. и Красновский А. А., Биохимия, **21**, 126, 1956.
3. Duysens L. N. M., Science, **120**, 353, 1954; Science, **121**, 210, 1955; Witt H. T. Naturwissenschaften, **3**, 72, 1955; Белл Л. Н., ДАН, **107**, 329, 1956.
4. Красновский А. А., ДАН, **60**, 421, 1948; сводка работ, Ж. физ. хим., **30**, 968, 1956.
5. Strehler B. L., Linch V. H., Science, **123**, 462, 1956.
6. Coleman J. W., Holt A. S., Rabinowitch E., Science, **123**, 795, 1956.
7. Обзоры: Franck J., Symp. Soc. Exper. Biol., **5**, 160, 1951; Wassink E. C., Adv. Enzymol., **11**, 91, 1951; Рабинович Е., Фотосинтез, т. 2, ИИЛ, 1954.

8. Wassink E., Katz E., Dorrenstein R., Enzymologia, **10**, 285, 1942.
9. Годнев Т. Н., Осипова О. П., Изв. АН БССР, № 1. 17, 1948: Осипова О. П., ДАН, **57**, 799, 1947; Годнев Т. Н., Терентьева М. В., Пармон К. П., Тр. Ин-та биологии АН БССР, вып. 2 и 3, 1950.

INVESTIGATION OF THE PHOTOCHEMICALLY ACTIVE FORM OF CHLOROPHYLL IN PLANTS OF DIFFERENT SYSTEMATIC GROUPS

A. A. KRASNOVSKY, L. M. VOROBYOV, E. V. PAKSHINA

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

Bleaching of chlorophyll in «green solutions» produced by intense illumination with red light varies from 1 to 30% in various plants and is about 5—7% in most plants. The largest amounts of the bleaching form of chlorophyll were found in «green solutions» prepared from the leaves of sugar beet, salt bush, poplar, fern and willow (in descending order).

The amount of bleaching form of chorophyll in «green solutions» from sugar beet changes during the development of the plant and decreases from 20—30% to 3—6% at the end of vegetation.

Prolonged centrifugation at 25000 g (+ 5°C) of «green solutions» from leaves of sugar beet and some other plants leads to a shift of the red absorption band of chlorophyll by 2—6% $m\mu$ towards the short wave region. This can be explained by assuming that the «solution» becomes enriched in the monomer form of chlorophyll due to precipitation of heavier aggregated particles.

Доклады Академии наук СССР
1957. Том 117, № 1

БИОХИМИЯ

Ф. Ф. ЛИТВИН и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СТАДИЙ ОБРАЗОВАНИЯ ХЛРООФИЛЛА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ ПО СПЕКТРАМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 1 VII 1957)

Исследования пигментной системы в живых листьях без нарушения их целостности существенны для выяснения природы естественного состояния пигментов, их взаимопревращений путем биосинтеза. В этой работе исследовались процессы образования хлорофилла по спектрам флуоресценции этиолированных и зеленеющих листьев.

А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая нашли, что процесс образования хлорофилла из протохлорофилла может осуществляться в коллоидных буферных растворах вещества этиолированных листьев под действием света. Они обнаружили при этом образование из протохлорофилла формы хлорофилла с максимумом поглощения при 670 мμ [1]. Смит с сотрудниками получил подобные же результаты с глицериновыми коллоидными растворами [2], Френч и сотрудники изучали спектры флуоресценции водорослей и листьев при различном содержании пигментов [3,4]. Для исследования процесса образования хлорофилла Виргин измерял спектры флуоресценции зеленеющих листьев фиксированных нагреванием до 100° [5]. Однако в этом случае нарушалось нативное состояние пигментов.

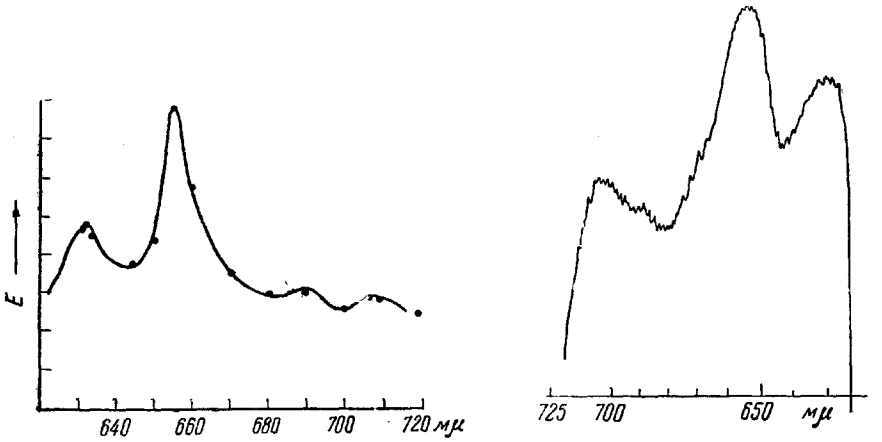
При комнатной температуре трудно уловить промежуточные стадии превращения пигментов, так как эти реакции протекают очень быстро. Поэтому для остановки процессов биосинтеза мы применили быстрое замораживание этиолированных листьев до —150° и снятие спектра флуоресценции при этой температуре. Глубокое охлаждение не нарушает естественного состояния пигментов; после оттаивания листья сохраняют способность зеленения на свету (начальные стадии).

Флуоресценция листьев возбуждалась светом ртутно-кварцевой лампы СВДШ-250; фильтрами СЗС-8 и СЗС-9 выделялась коротковолновая часть спектра (от 365 до 580 мμ). Спектры фотографировались с помощью спектрографа ИСП-73 на пластинках типа «панинфра» и «инфрахром» при ширине щели 0,05—0,1 мм и экспозициях от 2 до 40 мин. Снимки спектров фотометрировались на регистрирующем микрофотометре МФ-4. Исходя из кривых почернения пластинок, обычным способом рассчитывали распределение энергии в спектре.

Спектры флуоресценции этиолированных листьев. Использовались листья фасоли 10—12-дневных растений, выросших в темноте при температуре 20—25°. В спектрах флуоресценции различаются три отчетливых максимума при 633, 655 и 705—707 мμ и слабый максимум при 690 мμ. Наиболее интенсивна флуоресценция при 655 мμ. Наблюдаются изменения соотношения интенсивностей флуоресценции в максимумах у разных листьев (в частности, максимум при 690 мμ).

Подобные же спектры флуоресценции характерны для этиолированных листьев кукурузы.

В первые же секунды пребывания этиолированных листьев на рассеянном дневном свету наблюдаются характерные изменения спектров флуоресценции. Максимум при 655 мμ резко ослабляется и быстро исчезает,



а *б*

Рис. 1. Спектр флуоресценции этиолированного листа фасоли. Фотографирование с экспозицией 15 мин., щель 0,1 мм. *а* — распределение энергии, *б* — спектрограмма

максимум при 633 мμ также ослабляется, но более медленно; исчезает флуоресценция при 705—707 мμ.

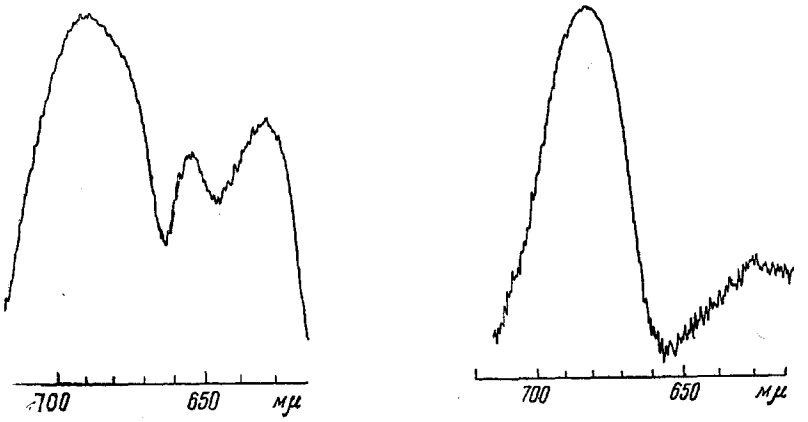


Рис. 2 Рис. 3

Рис. 2. Спектрограмма флуоресценции этиолированного листа фасоли после освещения его в течение 2 мин. Фотографирование с экспозицией 10 мин., щель 0,05 мм

Рис. 3. Спектрограмма флуоресценции этиолированного листа фасоли после освещения его в течение 2 час. Фотографирование с экспозицией 5 мин.,щель 0,1 мм

При дальнейшем освещении листьев (1—10 мин.) максимум при 690 мμ значительно усиливается и несколько смещается в длинноволновую сторону до 694—695 мμ (рис. 2). Максимум при 633 мμ постепенно исчезает. Однако его можно заметить даже спустя сутки, в светло-зеленых листьях. Через 2—3 часа освещения листьев в спектрах флуоресценции преобладает максимум при 680 мμ (рис. 3). Затем величина его уменьшается, а сам максимум смещается в длинноволновую сторону до 685—686 мμ, изменяя свою форму (значительно суживается). В то же время постепенно нарастает по величине новый максимум при 730 мμ, и появляется максимум при 812—815 мμ. В зеленых листьях положение максимумов остается постоянным и не изменяется при освещении (табл. 1, рис. 4).

тохлорофилла, связанного с белком, сходная с «хлорофиллогеном» В. Н. Любименко ([10]). Эта форма очень лабильна, о чем свидетельствует исчезновение максимума 655 мμ при нагревании и экстрагировании, нарушающих нативное состояние пигментов. Поэтому активная форма протохлорофилла не была обнаружена ни в нагретых листьях, ни в экстрактах при исследованиях кинетики процесса образования хлорофилла.

Изменения спектров флуоресценции при зеленении этиолированных листьев отражают различные этапы процесса образования и накопления хлорофилла. Первоначальное положение максимума флуоресценции хлорофилла соответствует, по-видимому, 675—676 мμ, а затем он смещается до 680 мμ. Дальнейшее смещение максимума до 685—686 мμ и изменение его величины и формы обусловлено реабсорбцией света флуоресценции самим хлорофиллом, накапливающимся в значительных концентрациях. Эти наблюдения согласуются с данными Френча ([3], [4]). Однако в первые минуты освещения листьев нами замечена интенсивная флуоресценция в области 690—694 мμ. Этот максимум, вероятно, соответствует иному хлорофиллоподобному промежуточному продукту биосинтеза, образующемуся ранее хлорофилла, с максимумом при 680 мμ. Очень слабую, но отчетливую флуоресценцию при 694 мμ можно отметить и у темно-зеленых «взрослых» листьев.

Наличие различных форм хлорофилла в листьях растений было показано в работах А. А. Красновского и Л. М. Воробьевой ([11]); эти формы различаются по своим спектральным и фотохимическим свойствам. В работе с Е. В. Пакшиной этим авторам удалось путем скоростного центрифугирования при 25 000 g разделить формы хлорофилла с максимумами поглощения при 671—673 и 677—678 мμ в гомогенатах из листьев сахарной свеклы ([11]). В работах Т. Н. Годнева с сотрудниками ([12]) наблюдалось первичное образование экстрагируемого раствором щелочи пигмента, вероятно, хлорофиллида а, при освещении этиолированных листьев; эти наблюдения привели к предположению, что первично образуемый в листьях хлорофилл является этим соединением. Но максимумы флуоресценции хлорофиллида и «первичного» хлорофилла (при 690 и 680 мμ) не соответствуют друг другу.

Итак, исследование спектров флуоресценции листьев при низкой температуре позволило выявить новые промежуточные стадии биосинтеза хлорофилла. Активная форма протохлорофилла с максимумом флуоресценции при 655 мμ превращается, по-видимому, в хлорофиллоподобный продукт с максимумом флуоресценции при 694 мμ, являющийся непосредственным предшественником хлорофилла. Первоначально образующаяся форма хлорофилла имеет максимум флуоресценции при 675 мμ, который сдвигается затем до 680 мμ. Вопрос о природе промежуточных продуктов нуждается в дальнейшем исследовании.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова,
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
20 VI 1957

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177 (1952); Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 19, 37, 1954. [2] J. H. C. Smith, A. Benitez, Carn. Inst. Wash. Year Book, № 52, 151 (1953). [3] C. S. French, V. K. Young, J. Gen. Physiol., 35, 873 (1952). [4] Luminescence of Biological Systems, Washington, 1955, п. 51. [5] H. T. Virgin, Physiol. Plantarum, 8, 389 (1955). [6] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, 92, 1201, (1953). [7] J. H. C. Smith, Carn. Inst. Wash. Year Book, № 52, 145 (1953). [8] V. M. Koski, C. S. French, I. H. Smith, Arch. Biochem. and Biophys., 31, 1 (1951). [9] V. M. Koski, Arch. Biochem., 29, 339 (1950). [10] В. Н. Любименко, Изв. Главн. бот. сада, 20, в. 2 (1921). [11] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 91, 343 (1953); Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, 21, 126 (1956); А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина, Физиол. раст., 4, 124 (1957). [12] Т. Н. Годнев, Р. В. Ефремова, А. А Кравцов, ДАН, 113, 646 (1957).

International Symposium on Enzyme Chemistry, 1957

Tokyo and Kyoto, Japan

16th—23rd October 1957

209 Participation of Chlorophyll in Photochemical Hydrogen (Electron) Transfer

A. A. Kransnovsky

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of USSR

The Reactions of Reversible Photochemical Reduction of Chlorophyll, its Analogs and Derivatives.

In the course of photosynthesis carbon dioxide is reduced by the hydrogen of water; this process requires energy of light which is absorbed by plant pigments, primarily by chlorophyll. If chlorophyll is really involved in the chain of reactions of hydrogen (electrons and protons) transfer from water to carbon dioxide, we may expect participation of this pigment in photochemical oxydo-reductive transformations associated with "storage" of light energy in the reaction products.

In 1948 we revealed the ability of chlorophyll, its analogs and derivatives to undergo reversible photochemical reduction (1) with formation of unstable photoproducts (which "store" the energy of light quanta) reacting back in darkness with restitution of the original pigment. For example, when a chlorophyll solution in pyridine is illuminated in the presence of ascorbic acid, a red photoproduct is formed; in darkness there takes place a back-reaction with regeneration of chlorophyll (2); under the same conditions protochlorophyll formed a yellow-brown product of photoreduction (3), and bacteriopheophytine form a green one (4). Similar spectral changes take place when chlorophyll is reduced by the Timiriazev method (5).

The photoreduction of chlorophyll in different media may be measured with the aid of a number of methods: by observing the change in absorption spectral, by measuring the potential of an inert electrode in the reaction medium, the electric conductivity of the reacting system, etc. We carried out a comparative study of the properties of chlorophyll and of other pigments - its derivatives and analogs - which allowed to reveal the significance of different groups of the molecule for this reaction.

The further study of the mechanism of photoreduction by Evstigneyev and Gavrilova in our laboratory (6-10) showed that this reaction consists of two stages: rapid accepting of an electron by the pigment molecule in a long-lived triplet state (according to Terenin (11), Lewis and Kasha), and a slower dark stage of proton transfer to a primarily formed ion-radical. This mechanism was experimentally shown with the aid of a number of methods. Thus, when the reacting system is cooled to -40°C, in the case of pheophitin the primary "brown" ion-radical form arises which is transformed, when the temperature is increased to +20°C,

into a more stable red reduced compound. Measurement of the photopotential at low and room temperatures shows the primary formation of electrode-active negatively charged photoproducts (9). A measurement of the electric conductivity upon illumination of the reacting system points to the formation of ions in the process of the photoreaction (10). Finally, the chlorophyll-reductant system, when illuminated, is capable of initiating polymerization of methylmetacrylate, which testifies to the formation of free radicals in the process of the reaction (12).

The stepwise formation of an active primary reduced form (whose absorption spectrum could be measured only in pheophitins at low temperatures) and of more stable secondary reduced forms found with all chlorophyll analogs and derivatives. It is important that the values of oxidation-reduction potential of the primary and secondary reduced forms are nearly the same, viz., between -0.35 and -0.40 volts (9,13). The fact that the formation of secondary reduced forms from the primarily formed ion-radical is connected with the "dark" act of proton transfer is confirmed by the results of experiments on the kinetics of photoreduction performed with the use of "ordinary" and deuterated hydrogen donors (14).

A comparative study of pigments of different chemical nature showed that acceptance of the electron by pigment excited molecule takes place in the system of conjugated double bonds; to the reaction are liable all porphyrin pigments with a porphin, chlorine and bacteriochlorine structure, possessing central atoms of magnesium, zinc or hydrogen, and also the corresponding phthalocyanines.

A general diagram of the reaction is written as follows:
X - chlorophyll molecule; AH - molecule of the hydrogen donor

$$X + h\nu \longrightarrow X^* \longrightarrow \cdot X\cdot$$
$$\cdot X\cdot + AH \longrightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+$$
$$\cdot X^- + \cdot AH^+ \longrightarrow \cdot XH + \cdot A$$

Chlorophyll-Photosensitized Hydrogen (Electron) Transfer from Donor Molecule to Acceptor Molecule.

In 1948 we found that chlorophyll in solution is capable to photosensitize reactions of hygrogen transfer from ascorbic acid to safranine or riboflavine (15); in 1949 we showed in collaboration with Brin (16) the possibility of similar photoreduction of pyridine-nucleotides, and later, of oxydo-reductive transformations of cytochrome C (17).

These sensitized reactions are based on the capacity of chlorophyll for reversible photoreduction. In these reaction takes place "storage" of light energy, which may be characterized by the difference in redox potentials (E_o) measure of the increase in free energy of the system; the E_o value of the donor molecule (ascorbic acid) is +0.05 v, while E_o of the acceptor systems may be as low as -0.35 v (flavins, pyridine-nucleotides). The course of the sensitized reaction can most conveniently be observed by means of spectrophotometric measurements. That these reactions actually involve the stage of reversible

photoreduction of chlorophyll is confirmed by the following facts: 1) the sensitized reaction is observed with those hydrogen donors which are liable to the reaction of reversible photoreduction of chlorophyll as revealed by electrometric, spectral or other methods; 2) in the ternary pigment-donor-H acceptor system the formation of photoreduced forms of the pigment usually cannot be observed because of their rapid reaction with acceptor molecules; these effects are clearly observed with more active primary photoreduced form; 3) it is possible to effectuate separately the photoreduction stage and the subsequent dark reaction of an acceptor molecule with photoreduced pigment.

The general scheme of reaction is the following. As a result of the "light" stage the excited chlorophyll molecule (probably in the triplet state) accepts an electron from a donor molecule and in the subsequent stage it transfers the electron to an acceptor molecule; the uptake of protons bound with the molecules of base in the medium proceeds in accordance with the conditions of acid-base equilibrium. Under special ambient conditions the rate of the direct photoreactions is higher than the rate of back reactions, and it is possible to observe accumulation of reduction products of the acceptor. Most pronounced results were obtained when ascorbic acid was used as the hydrogen donor and riboflavin, **pyridine-nucleotides** or oxygen as final acceptors. According to the above-stated considerations, the terminal stages of the sensitized reaction stated above can be formulated as follows:

$$\cdot X^- + B \longrightarrow X + \cdot B^- \; ; \quad \cdot B^- + H^+ \longrightarrow \cdot BH \text{ etc.}$$
$$\cdot XH + B \longrightarrow X + \cdot BH$$

Possible Ways of Photoreaction Linkage with Enzymatic Processes of Hydrogen (Electron) Transfer.

Thus, we see that under the influence of light, chlorophyll is capable to participate in processes of electron transfer. It may therefore be expected that linkage of these processes is possible with the action of oxydo-reductive enzyme systems donating electrons to chlorophyll or accepting electrons from a reduced form of the pigment so as to feed this electron into the reaction system of stepwise carbon dioxide reduction. Various biocatalytic systems of the chloroplasts have been revealed and investigated by N.M.Sissakian (18).

Involvement of biochemical systems as electron donors in the reaction of reversible chlorophyll photoreduction can be studied with the aid of the methods described above. It appeared that the following compounds can act as donors in this reaction: dienols (ascorbic and dioxymaleic acids), thiol compounds, reduced cytochrome, polyphenols. Electron can be accepted from a photoreduced form of chlorophyll by: oxygen (13), quinones, flavins, **pyridine-nucleotides, cytochromes (15-17), a wide range of compounds with values of redox** potential E ranging from +0.8 to -0.4 v. These results are in agree with the data published later by Vishniak and Ochoa, Tolmach and Gaffron, and Arnon, who showed that photoreduction of pyridine nucleotides can occur upon illumination of chloroplasts. The application of competitive inhibitors gives some indications as to the possible participation of dehydrogenases in the photosynthetic processes (20).

Up till now it is not clear whether a water molecule can play the role of an electron donor in reactions of this type. According to the investigations of Hill several cytochromes found in the chloroplasts can participate in processes of photosynthetic utilization of a water molecule. It is also not clear as yet whether the products of reversible photooxidation of chlorophyll by oxygen (4,21) can participate in this process.

It has thus been possible to elucidate, in the investigations considered above, the mechanism of participation of chlorophyll in processes of photochemical hydrogen transfer, occuring in solution, in model systems. A further is to investigate the mode of action of chlorophyll directly in living photosynthesizing organisms. For this purpose it is important to elucidate the structural organization and enzymatic properties of chloroplasts and the actual state of pigments in plastide granules. We have detected in collaboration with Vorobyeva (22) reversible photochemical transformations of chlorophyll in homogenates of green leaves containing natural chlorophyll-lipoprotein complexes. In a number of investigations carried out in recent years (Duysens and others) using the method of differential precision spectroscopy, there was established the appearance. after illumination of green leaves, of an absorption maximum about 520 mμ which is close to absorption maxima of a photoreduced form of chlorophyll. It is important that in the studies of Coleman, Holt and Rabinovitch was a simultaneous decrease of the maximum of chlorophyll absorption in the red was shown to take place, while Strehler and Linch reported that back reaction of photoproducts with an absorption maximum at 520 mμ is associated with the phenomenon of photosynthetic chemoluminescence. But the final establishment of the nature of these spectral changes requires further investigation. Using the method of paramagnetic resonance, Commoner and other authors obtained evidence pointing to the formation of free radicals upon illumination of chloroplasts. These radicals are probably formed as a result of photochemical transformations of chlorophyll and coupled reactions of electron transfer.

The State of Pigments in Photosynthetic Organisms.

The study of pigment transformations in living organisms is intimately related to investigation of the structural organization of chloroplasts and of the state of pigments in the granules.

We made a comparative investigation of spectral and photochemical properties of chlorophyll, protochlorophyll and bacteriochlorophyll in various organisms in the phylogenetic aspect and in relation to the process of pigment formation in plants. The experiments showed that pigments can occur in plants in different states and differently bonded (23,24). The bulk of chlorophyll and bacteriochlorophyll is present in granules in highly concentrated aggregated structures probably possessing different degree of orderliness. This is most clearly evident in the instance of bacteriochlorophyll which, in solid films and in colloidal solution possesses an absorption spectrum (with maxima at 800, 850 and 890 mμ) closely similar to the spectrum of bacteriochlorophyll in living cells of photosynthetic bacteria (25). Yet, in the homogenates from plant leaves some of the chlorophyll is present in a photochemically unstable form rapidly bleached in air upon intense illumination. The amount of this rapidly

bleaching form depends on physiological conditions; it is different in homogenates from the leaves of different plant species (26) and is especially abundant during the process of chlorophyll formation in etiolated leaves. This cycle of investigations from our laboratory cannot be considered here in detail. We shall point only to the fact that chlorophyll freshly formed from protochlorophyll is rapidly bleached when illuminated. In the process of greening and chlorophyll accumulation the absorption maximum is gradually shifted to 678 mμ and this shift is accompanied by an increase in light-stability of the pigment. Similar conclusions were made by J.H.C.Smith. Different forms of chlorophyll in homogenates from sugar beet leaves were successfully separated with the aid of high-speed centrifuging at 25.000 g (26). which led to a gradual shift of the absorption maximum of the "green solution" from 676-678 mμ to 671-673 mμ. Centrifuging of homogenates from leaves containing small quantities of the rapidly bleaching form of chlorophyll did not result in such changes. Interesting attempts to prepare the chlorophyll-lipoprotein complex in a crystalline form were made by Takashima. In collaboration with Brin (27) we could show that similar crystals can be obtained from "pure" chlorophyll not containing proteins or lipids.

It is plausible that there exist in leaves an equilibrium between monomeric and aggregated forms of pigment bound with proteins and lipids; the change in intensity of chlorophyll fluorescence in living leaves which was observed in the studies of Frank, Kautsky and Wassink is probably connected with a change of the state of chlorophyll (equilibrium between the aggregated and monomeric forms) as well as with changes in the photostationary concentration of the fluorescent form of chlorophyll.

The problem of absorption of light quanta in the pigment granules is closely connected with that of energy migration between the molecules of chlorophyll and other pigments. The photochemical inertness of phycoerithrin revealed in our work is in agreement with this suggestion (28). In recent time theories of energy migration are being favoured which are based on the transfer of a lone electron on the level of a triplet state. The possibility of such a mechanism of energy migration was shown by Terenin and Ermolayev who discovered the phenomenon of sensitized phosphorescence (29,30).

A "single" chlorophyll molecule in solution is capable to participate in processes of electron transfer; this capacity is preserved in "collective" of pigment molecules arranged structures which are considered by many authors as semiconductors with possible migration of electrons and of electron vacancies, or "holes". The experiments of Evstigneyev and Terenin, establishing the appearance of a potential when aggregated layers of chlorophyll or its analogs are illuminated (31) show that electron migration is possible in a layer of solid chlorophyll and that the surface molecules of this aggregate retain the oxydo-reduction properties of pigment molecules present in the "dissolved" state.

Participation of Chlorophyll in the Process of Hydrogen (Electron) Transfer in Photosynthesis.

The establishment of the mechanism of chlorophyll-photosensitized reactions in solution-capacity for reversible acceptance of hydrogen (electron) from a donor molecule with "storage"

of light energy, served as a basis for the working hypothesis that in photosynthesis chlorophyll likewise might participate in "uphill" transfer of an electron with it possible raising to the level of reduced pyridine-nucleotides. This hypothesis is in accord with Calvin's results showing that the carbon dioxide reduction cycle operates when "active hydrogen" is fed into the system on the level of reduced pyridine nucleotides and of energy-rich phosphate esters the formation of which according to Arnon, can proceed by way of oxido-reductive (photosynthetic) phosphorylation at the expense of the same photochemically reduced compounds and of oxidants formed in the course of photoreaction.

References.

1. A.A.Krasnovsky, Doklady Akad. Nauk SSSR, 60, 421 (1948); review in Zhurn. Fiz. Khim. 30, 968 (1956).
2. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin and K.K.Voinovskaya, Doklady Akad. Nauk SSSR, 69, 393 (1949); 89, 527 (1953).
   A.A.Krasnovsky, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 81, 1105 (1951).
3. A.A.Krasnovsky, K.K.Voinovskaya, Doklady Akad. Nauk, 64, 663 (1949).
4. A.A.Krasnovsky, K.K.Voinovskaya, Doklady Akad. Nauk SSSR, 81, 879 (1951).
5. L.M.Kosobutskaya, A.A.Krasnovsky, Doklady Akad. Nauk SSSR, 74, 103 (1950).
6. V.B.Evstigneyev, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 91, 899 (1953).
7. V.B.Evstigneyev, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 100, 131 (1955).
8. V.B.Evstigneyev, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 95, 841 (1954); 96, 1201 (1954).
9. V.B.Evstigneyev, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 92, 981 (1953).
10. V.B.Evstigneyev, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 103, 97 (1955).
11. A.N.Terenin, Acta Phycochim. URSS 18, 210 (1943).
    A.N.Terenin, Izvestia Akad. Nauk SSR. ser.Biol., N3, 369 (1947).
12. A.A.Krasnovsky and Umrikhina, Doklady Akad. Nauk SSSR, 104, 882 (1955).
13. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Doklady Akad. Nauk SSSR, 73, 1239, (1950).
    V.B.Evstigneyev, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 98, 1017 (1954).
14. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Doklady Akad. Nauk SSSR, 96, 1025 (1954).
15. A.A.Krasnovsky, Doklady Akad. Nauk SSSR, 61, 91 (1948).
16. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Doklady Akad. Nauk SSSR, 325 (1949).
    A.A.Krasnovsky and K.K.Voinovskaya, Doklady Akad. Nauk SSSR, 87, 109 (1952).
17. A.A.Krasnovsky, Doklady Akad. Nauk SSSR, 103, 283 (1955).
    A.A.Krasnovsky, K.K.Voinovskaya, Biofizika 1, 120 (1956).
18. N.M.Sisakyan, "Fermentativnaya aktivnost protoplazmennikh struktur". Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol., N5-6 (1956).
19. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Doklady Akad. Nauk SSSR 58, 1087 (1947); Biokhimia, N4 (1957).
20. N.M.Sisakyan, A.A.Krasnovsky, E.S.Mikhailova, G.P.Brin, Biokhimia, 18, 725 (1953).
21. A.A.Krasnovsky, Doklady Akad. Nauk SSSR, 58, 617, 835 (1947).

22. A.A.Krasnovsky and L.M.Vorobyeva, Doklady Akad. Nauk SSSR, 104, 440 (1955).
L.M.Vorobyeva and A.A.Krasnovsky, Biokhimia, 21, 125 (1956).
23. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Doklady Akad. Nauk SSSR, 69 (1948); 95, 611 (1954).
24. A.A.Krasnovsky, L.M.Kosobutskaya, Doklady Akad. Nauk SSSR, 85, 177 (1952).
A.A.Krasnovsky, L.M.Kosobutskaya, Doklady Akad. Nauk SSSR, 91, 343 (1953).
A.A.Krasnovsky, L.M.Kosobutskaya, K.K.Voinovskaya, Doklady Akad. Nauk, 92, 1201 (1953).
L.M.Kosobutskaya, A.A.Krasnovsky. Biokhimia, 19, 37 (1954).
L.M.Vorobyeva, A.A.Krasnovsky, Biokhimia, 21, 126 (1956).
A.A.Krasnovsky, E.A.Nesterovskaya, A.B.Goldenberg, Biofizika, 1, 328 (1956).
25. A.A.Krasnovsky, K.K.Voinovskaya and L.M.Kosobutskaya, Doklady Akad. Nauk SSSR, 85, 389 (1952).
26. A.A.Krasnovsky, L.M.Vorobyeva and Pakshina, Fisiologia rastenii, 4, 124 (1957).
27. A.A.Krasnovsky and G.P.Brin, Doklady Akad. Nauk SSSR, 95, 611 (1954).
28. A.A.Krasnovsky, V.B.Evstigneyev, G.P.Brin, V.A.Gavrilova, Doklady Akad. Nauk SSSR, 82, 947 (1952).
29. A.N.Terenin, V.A.Ermolayev, Doklady Akad. Nauk SSSR, 85, 547 (1952), Trans. Farad. Soc., 52, 1042 (1956).
30. A.N.Terenin, Radiotekhnika i elektronika 1, 1127 (1956).
31. V.B.Evstigneyev, A.N.Terenin, Doklady Akad. Nauk SSSR, 81, 223 (1951).

Intern. Symp. on the Origin of Life on the Earth

Ed. Acad. Sci. USSR, Moscow 1957

A. A. KRASNOVSKY

DEVELOPMENT OF THE MODE OF ACTION OF THE PHOTOCATALYTIC SYSTEM IN ORGANISMS

FORMATION OF PHOTOCATALYSTS

At present most plausible are those hypotheses which attribute the metabolism of primary organisms to the assimilation of organic substances of abiogenic origin [1]. Such organic compounds are sufficiently stable in usual conditions; the activation of their transformation in living organisms could, in general, have been achieved catalytically or photochemically. However, «light» activation is of advantage when there is need for energy «storage», by conversion of the energy of light quanta into the potential chemical energy of photoproducts.

Processes thermodynamically spontaneous are efficiently activated catalytically; present-day heterotrophic organisms extensively activate substrates by catalysis. We may suppose that in utilizing energy-rich abiogenic organic compounds, primary organisms employed a simple catalytic mode of activation, the more so since they inevitably must have absorbed catalytically active substances from the environment. Probably the primary biocatalysts were complexes of amino-acids, proteins, and porphyrins with metal ions or oxides, which are readily adsorbed and bound by these substances. Complexes of metals with proteins, amino acids, and porphyrins could have ensured manifold «dark» catalytic transformations of organic substances, without the aid of «light» activation. This type of biocatalysts is still predominant in organisms: iron, copper, manganese, zinc, molibdenum, cobalt, and many other metals are essential components of enzymatic systems.

Apart from the concentration of the elements and their compounds in the Earth's crust, several other factors were probably important in the «selection» and absorption of inorganic compounds from the surrounding medium. Among these factors were: the solubility of an element's compounds in the biosphere [2] its catalytic action in different complexes, the coordination number of bound metal atoms, etc.

It would be interesting to trace the possible stages in the formation of photocatalytically active pigments, and the changes in the mechanism of action of the pigment system in the course of evolution from primary heterotrophs to the autotrophic mode of life. But, unfortunately, in such an enquiry we cannot draw upon reliable paleobotanic data; the most ancient known types of organisms, photosynthetic bacteria and the blue-green algae, pos-

sess a fully developed pigment system containing chlorophylls, phycobilins and carotenoids.

Complex compounds of porphyrins are widespread among biocatalysts and pigments; the nature of the central metal atom is of great importance determining many properties of the complex.

The most abundant elements in the Earth's crust [2] are: O (49.4%), Si (27.8%), Al (8.5%), Fe (5,0%), Ca (3.5%), K (2.5%), Na (2.6%), Mg (2%), and Ti (0.6%).

Porphyrins with Si, Al, or Ti in the centre of the molecule have not been found in organisms. One of the reasons for this is probably the low solubility of the compounds of these elements in the biosphere and, hence, the difficulty of their utilisation by organisms.

Porphyrins containig potassium, sodium, or calcium undergo hydrolysis in aqueous media, the metal atom being replaced by atoms of hydrogen [3]; of the metals listed above, there remain, therefore, only Fe and Mg, porphyrin complexes of which are widespread in organisms.

The iron complexes possess diverse catalytic properties and a low photochemical activity; they do not exhibit fluorescence. Magnesium, hydrogen or zinc in the centre of the molecule give rise to complexes that are inactive catalytically, but extremely active photochemically, and exhibit bright fluorescence. Is there, however, really such a sharp distinction between the catalytically and photochemically active complexes? Probably there could have been transition types in the process of evolution from «dark» to «light» metabolism; this lead us to the question whether the activity of biocatalysts is affected by light. In other words, do biocatalytically active complexes, also have a photosensitizing action?

Many biocatalysts are coloured compounds, i. e. they absorb light in the visible region of the spectrum. This applies to the porphyrin complexes, to flavins, and other compounds. The amount of biocatalysts in organisms is usually small, and they absorb only a small portion of the solar radiation falling upon the organism.

There is a vast but often contradictory literature about the effects of visible light on enzyme activity. Light has a particularly pronounced effect on the transformations of free flavins, which possess a bright fluorescence and photosensitizing action; however, the action of light on flavin-protein complexes in organisms requires further elucidation.

We have recently reported on the accelerating effect of visible light on the oxidation-reduction changes of cytochrome [4]. Earlier we found that light exerted an influence on reactions catalyzed by cristalline analogues of the porphyrins, the phthalocyanines and their copper or magnesium complexes. These compounds have a catalytic effect on the oxidation of ascorbic acid and the decomposition of hydrogen peroxide in solution; illumination accelerates the catalytic reaction [5]. Illumination also accelerates the decomposition of hydrogen peroxide and the oxidation of fatty acids catalyzed by TiO_2 [6]. The known biocatalysts are usually (with the exception of the flavins) rather poor photosensitizers; in a number of cases light can have an influence on their action, but there is no energy storage in the end products of the reaction.

The further development of photocatalytic systems made a specialization of functions necessary between biocatalysts (enzymes) and photosensitizers (pigments).

DEVELOPMENT OF THE PIGMENT SYSTEM

Unlike the biocatalysts, which act in very small amounts, pigments, must be present in autotrophic organisms in much greater quantities so as to ensure

sufficiently complete absorption of solar radiation by the organism, and the storage of light energy in the form of potential chemical energy of the reaction products.

A small amount of sensitizing pigment, comparable to the amount of enzymes, would suffice only if the sensitizing pigment initiated a thermodynamically spontaneous chain process, with the multiple utilization of light quantum energy to overcome potential barriers; however, we know of no types of metabolism utilizing chain processes: in all known types of metabolism multistage conjugated reactions are predominant.

The possible absorption of small quantities of porphyrins of abiogenic origin would not ensure any appreciable absorption of light by the organism. For the transition to autotrophy the organism would have to be able to synthesize pigments on a big scale. The vigorous biosynthesis of porphyrins, in turn, calls for an elaborate system of metabolism. These considerations are in accord with A. I. Oparin's ideas about photoautotrophy having arisen on the basis of a fully developed heterotrophic system of metabolism [1].

The primary photosensitizers could have been porphyrins formed in the line of biosynthesis of the iron-porphyrin biocatalysts. For instance, the most ancient type of photoautotrophs, the photosynthesizing bacteria have been found to contain considerable amounts of free porphyrins [8] in addition to bacteriochlorophyll and iron porphyrins [7].

However, the simple porphyrins have an absorption spectrum which does not ensure sufficiently full utilization of the entire visible region of solar radiation. The long-wave absorption maximum of the porphyrines is at about 620 mμ; the value of the molar extinction coefficient (K_m) in this maximum, which determines the «dyeing power», i. e., the probability of absorption of light quanta is low as compared with the K_m in the Soret band, situated at about 400 mμ. In the reducing medium of the ancient biosphere still devoid of free oxygen, there existed primordial photosynthetic bacteria. It is not surprising, therefore, that these organisms contain the most reduced form of porphyrin pigment, bacteriochlorophyll, with both the «semi-isolated» double bonds hydrogenated. The absorption maximum of the bacteriochlorophyll thus formed lies in the near infra-red region of the spectrum.

The possibility of such photoreduction of porphyrin is demonstrated by our model experiments in collaboration with K. K. Voynovskaya. It has been found that the porphyrins of bacteria [8] and hematoporphyrin [9] , upon illumination without air in the presence of reducing agents, are indeed capable of forming photoproducts possessing the absorption spectrum of bacteriochlorin (with a maximum at about 750 mμ).

The subsequent evolution of pigments took the course of formation of chlorophyll as the «main» pigment. The high concentration of chlorophyll in the granules of the plastides of present-day organisms ensures sufficiently complete absorption in the visible region of the solar spectrum.

The question arises as to what accounts for the widespread occurrence of magnesium complexes (chlorophyll), considering that metal-free porphyrins also have a photosensitizing action? Evidently we must take account of the following circumstances. The presence of a central magnesium atom possessing two coordination «vacancies» enables the pigment to bind polar molecules, including molecules of water [10], and possibly accounts for the linking of the pigment with basic groups (histidine?) of a specific protein [11]. Apart from this, the magnesium atom influences the photochemical properties of the entire molecule, determining the higher activity of the pigment. Comparative investigation of the photochemical properties of chlorophyll and pheophytin, has shown that the photoreduced form of chlorophyll is more active than the corresponding form of pheophytin [12].

The most ancient forms of photosynthetic organisms possess not only porphyrin pigments, but also a set of carotenoids and phycobilins. Degradation of porphyrins results in the formation of bile pigments; these, on combining with proteins, could have given rise to fluorescent phycobilins.

The route of carotenoid synthesis is quite different. The question as to whether the primary organisms could have possessed this type of pigment is still rather obscure. The study of the mechanism of its action seems to indicate that the porphyrins were an older type of sensitizers, moreover, capable of photochemical electron transfer. In animal organisms, on the other hand, compounds of carotenoids with proteins became the prevailing photoreceptors.

MECHANISM OF PHOTOCATALYTIC ACTION

The light absorbed by pigments in photosynthetic organisms is used for an oxidation-reduction process opposing the thermodynamic potential gradient with «storage» of energy in the reaction products. Studies from our laboratory (see Ref. [13]) revealed the mechanism of such processes in model systems; the photochemistry of pigments of photosynthetic organisms was studied in these experiments in its phylogenetic and comparative chemical aspects. Chlorophylls *a* and *b*, bacteriochlorphyll, protochlorophyll, porphyrins, phycobilins, pheophytins, etc., as well as the synthetic analogues of these pigments, pthalocyanines, were studied.

Electron transfer

When iron is replaced by magnesium, the porphyrins lose the ability to catalyze a dark electron transfer, but, upon illumination, acquire photocatalytic activity — the capacity for reversible photochemical acceptance of hydrogen (electrons) from donor molecules. This ability of chlorophyll and its analogues to undergo a reaction of reversible photoreduction was discovered by the author of the present paper in 1948 [13—14].

It is an essential feature of this reaction that part of the light quantum energy absorbed by the pigment molecule is stored in the active photoproducts thus formed; when the light is switched off, the reaction proceeds in the backward direction, yielding the original pigment molecule. In this manner chlorophyll and its analogues can play the part of a photocatalyst, thermodynamically raising the electron of the donor molecule «uphill», which distinguishes the photocatalytic action of the pigments from the «dark» catalytic action of cytochromes which transfer electrons (in the thermodynamic sense) «downhill».

The reaction of photoreduction is observed in all pigments with a structure based upon a porphyrin or azaporphin-ring system of conjugated double bonds with atoms of hydrogen, magnesium, or zinc in the centre of the molecule. Iron complexes display little activity in reactions of this type. Detailed investigation of the mechanism of the reaction, carried out in our laboratory revealed that the primary photo-act is an electron transfer from the donor molecule to the pigment molecule with the formation of a pair of ion radicals: $\cdot X \cdot + AH \rightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+$. According to A. N. Terenin, [15] it is most probable that the pigment molecule reacts in the biradical state. The properties of the primarily arising photoreduced form of chlorophyll and pheophytin where extensively studied by V. B. Evstigneev and B. A. Gavrilova [12]

The subsequent uptake of a proton $\cdot X^- + \cdot AH^+ \rightarrow \cdot XH + \cdot A$ results in formation of more stable reduced types, the absorption spectra of which are shown for different pigments, in fig. I.

Investigations carried out at our laboratory have demonstrated that the

sensitizing action of chlorophyll and its analogues is based on the reaction of reversible photoreduction; the reduced form of pigment arising in the photo-act reacts in the dark stage of the reaction with the ultimate

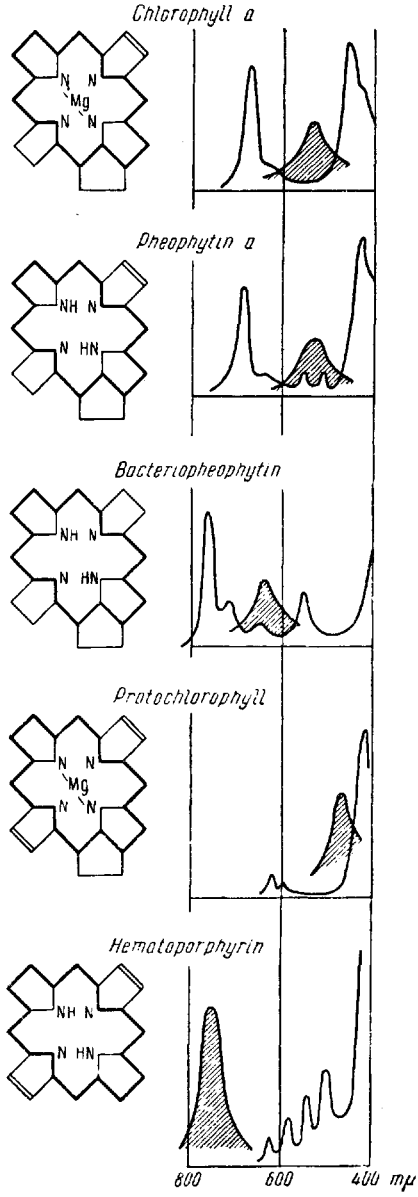


Fig. 1. Structure and absorbtion spectra of pigments prior to photoreduction and after the back - reaction in the dark

electron acceptor. (See ref. [16 and 13]). The reversible transformations of the pigment molecule result in an electron transfer from the donor molecule to the acceptor molecule, with eventual regeneration of the molecule of the sensitizing pigment, as shown in simplified form in Fig. 2.

Work done at our laboratory has revealed that ascorbic acid, dihydroxy-maleic acid, cysteine, hydrogen sulphide, hydroquinone, pyrocatechol and probably cytochrome (Fe^{++}) can act as hydrogen donors in reactions

of this type; oxygen, quinones, cytochrome (Fe^{+++}), riboflavin, pyridine-nucleotides, and several dyes (thionine, safranine, phenol-indophenol, a. o. [13])can be used as acceptors of the electron (hydrogen) from the photo-reduced form of chlorophyll.

Porphyrin pigments are thus capable of transferring an electron from the donor molecule to the acceptor molecule either with energy storage (+ ΔF), or thermodynamically «downhill» (— ΔF). In those cases where the final acceptor is atmospheric oxygen, the process results in sensitized oxidation of the hydrogen donor.

It should be pointed out that in recent spectroscopic investigations of living organisms it proved possible to detect the appearance of intermediate photoproducts with an absorption maximum corresponding to the photo-reduced form of chlorophyll [17].

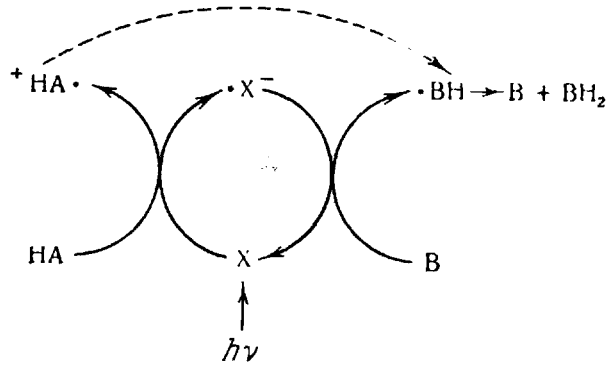


Fig. 2.—electron transfer; —proton transfer

Unlike of biocatalysts or enzymes, the chlorophyll pigments thus became able to effectuate a «photochemical» electron transfer. This property appeared in organisms already endowed with a rather elaborate metabolic system. For the result of the photochemical process to be metabolically utilized it was necessary that this process be incorporated into the system of enzymatic reactions; in this way could the wastage of light quantum energy by ineffective backreactions of the active photoproducts be prevented.

Energy transfer

On absorbing a quantum of light, the pigment molecule passes into an excited state. A necessary condition for effective «resonance» transfer of energy from an excited energy-donating molecule to an energy-acceptor molecule is an «overlapping» of the fluorescence spectrum of the donor molecule with the absoption spectrum of the acceptor molecule [18-19].

Since the fluorescence maximum of porphyrine pigments is situated in the red region of the spectrum, effective transfer of energy should be possible to a compound possessing an absorption band in the far-red region; in organisms, however, we know of no intermediate systems satisfying these requirements. In the course of evolution of the pigment system of organisms there could have arisen pigments whose fluorescence spectrum might have «overlapped» the absorption region of porphyrine pigments. These requirements are satisfied by the phycobilins, — phycocyanin and phycoerythrin, which have absorption peaks at 620 and 560—490 mμ, respectively. The work of several investigators on blue-green and red algae revealed the phenomen of sensitized fluorescence of chlorophyll upon excitation in the region of

the absorption maximum of the phycobilins [20]. The light absorbed by these pigments is also used for photosynthesis. Similar phenomena were likewise observed with respect to the carotenoids of diatomaceous algae [21].

Energy can thus be transfered from the phycobilins and carotenoids to chlorophyll, which is the final acceptor of energy and uses it «chemically» by participating in processes of photochemical electron transfer.

These conclusions are in accordance with the findings of our laboratory [22] concerning the photochemical properties of phycoerythrin isolated from the red algae *Callithamnion*. It was found that phycoerythrin, as distinct from chlorophyll, has a high photochemical stability, is incapable of reversible photoreduction, and does not have a photosensitizing effect in oxidation-reduction reactions.

A. N. Terenin and V. L. Ermolayev [23] discovered the phenomenon of sensitized phosphorescence, which indicates transfer of energy from the biradical state of the donor molecule, with concomitant transition of the acceptor molecule as well into a long-lived biradical state. Such a mechanism of energy transfer is also possible in photosynthetic organisms.

It is thus probable that phorphyrin pigments were the primary participants in the phototransfer of electrons; subsequent evolution gave rise to the phycobilin pigments transferring the energy of light quanta to the primarily formed sensitizing porphyrins (or possibly to biocatalytic systems).

DEVELOPMENT OF PIGMENT AND ENZYMATIC SYSTEM CONJUGATION

The excited pigment molecule can pass into the metastable state; in the absence of chemical interaction, the excitation energy of the molecule is rapidly degraded, finally — to heat. If an elementary oxidation-reduction act is involved, the photoproducts thus formed (a pair of ion-radicals) can also undergo a back-reaction, with wastage of energy. It is important that the active photoproducts can be utilized in the metabolic system before they become deprived of their energy in one way or another. It is therefore not enough for the organism to be endowed with a sensitizing pigment participating in the «uphill» transfer of electrons; in addition to this conjugated biochemical systems must be available which utilize the active high-energy photoproducts. This is made clear by the following example. The introduction of porphyrins into organisms results in a photodynamic effect: it causes sensitized random oxidation of important metabolic hydrogen donors and finally causes severe disturbance of the vital functions. On the other hand, a sensitizing pigment in an organized living system with coordinated photochemical and enzymatic processes has the opposite effect of maintaining normal metabolism (chlorophyll in the plants).

N. M. Sissakian [24] has demonstrated that protoplasmatic structures containing pigments (chloroplasts) are the site of a variety of biocatalytic functions.

Just as in the case of sensitized reactions, here too there may be mechanisms of coupling based on the transfer of an electron and the transfer of energy from the excited sensitizer-pigment molecule.

Incorporation of sensitizing pigments into systems of biochemical electron (hydrogen) transfer

In the course of reversible photochemical reduction the excited pigment molecule accepts an electron from the donor molecule and, in the dark act of the process, transfers this electron «uphill», with the formation of a system possessing a higher reduction potential. Model experiments in our la-

boratory revealed that the molecules of porphyrin pigments upon illumination are capable taking up electrons (hydrogen) from biochemically important compounds such as ascorbic acid, cysteine, polyphenols, and probably cytochromes.

Even the most ancient types of organisms probably possessed sulphur-containing amino-acids and iron porphyrins, and it is therefore likely that these compounds interacted with pigment systems. Light energy «storage» is possible if the photochemically mobilized electron is accepted by systems with a higher negative redox potential than that of the initial electron donor (up to $E_0 = -0{,}35$ v). We have demonstrated in 1948—1949 in collaboration with G. P. Brin, that flavins and pyridine-nucleotides can be used as such systems [25]; other investigators have shown that the reduced pyridine-nucleotides can be utilized in the system of biosynthetic reactions involved in carbon dioxide reduction [26]

Similar path of electron transfer is encountered in photosynthetic bacteria; here, however, an «enzymatic pretreatment» of the original hydrogen donors probably occurs before their interaction with the pigment molecules.

Back-reactions of photoproducts: the chemosynthetic path of coupling

After illuminating photosynthetic organisms for a certain period, Strehler and Arnold observed a faint afterglow, with a spectrum close to that of the fluorescence of chlorophyll. [27] This chemiluminescence is probably due to back-reactions of the active photoproducts. On the other hand, multistage reverse reactions of active photoproducts, proceeding with the participation of biocatalytic systems, can give rise to biochemically important high-energy compounds utilized in the constructive metabolism of the organisms. The concept of a «chemosynthetic path» of the utilization of active photoproducts is set forth in the latest reports of O. Warburg. «Chemosynthetic» formation of high-energy phosphate compounds probably takes place as a result of the biochemical oxidation of active reduced compounds generated photochemically.

Uptake of inorganic phosphates upon illumination and the formation of adenosinetriphosphate has been observed in photosynthetic bacteria [28] and higher plants [29].

It has recently been established that isolated chloroplasts are also capable of such «photosynthetic» phosphorylation [30]. The mechanism of this process evidently consists in the following. The initial electron (hydrogen) donors are photochemically generated reduced forms of pyridine-nucleotides or flavins; the final electron acceptor is not oxygen (as in ordinary oxydative phosphorylation) but rather a photochemically formed oxidizing agent, the nature of which has not yet been established; ascorbic acid, quinones, and cytochromes [30] take part in this process as intermediate systems.

The anaerobic type of oxidoreductive coupled phosphorylation apparently, is the older metabolic pattern; with the development of photosynthesis and of the aerobic mode of life, molecular oxygen came to be used as the ultimate electron (hydrogen) acceptor. The «uphill» electron transfer due to the photochemical process thus ensures the generation of high-energy phosphate bonds.

Calvin and coworkers [31] have pointed out that the reaction cycle of carbon dioxide fixation and reduction is rendered possible by feeding energy into the system in the form of two types of active compounds «active hydrogen», probably, in the form of reduced pyridine-nucleotides which ensure the reduction stage (phosphoglyceric acid → phosphoglyceric al-

dehyde), and the high energy phosphate compounds required for the phosphorylation of intermediary products of the cycle.

The system of heterotrophic metabolism in ancient organisms which were not yet capable of light utilization apparently included the steps of catalytic electron transfer and «anaerobic» oxidoreductive phosphorylation. The development of the pigment system had the result that the active products of the photoprocess were linked to formerly existing biocatalytic systems. The further development of catalytic pigment and systems led to the more rational utilization of light energy.

Energy transfer

Within the frame of the present report it is impossible to dwell at-length on the presumptive mechanisms of energy transfer in biological systems (See reviews [18, 19, and 32]. The following point, however, should be made. «Resonance» transmission of energy from the chlorophyll excited molecule to enzyme systems requires definite conditions, discussed above. This mode of energy transfer to enzymatic systems is not very plausible in the light of existing data, since the biocatalytic systems which probably take part in photosynthesis usually do not exhibit pronounced absorption maxima in the red region of the spectrum (with the exception of iron porphyrins). It is more probable that there is an energy transfer at the triplet state level ,provided the conditions defined by Terenin and Ermolayev [23] are fulfilled. Such an energy transfer at the triplet state level may, in fact, be interpreted as the transfer of an unpaired electron in a conjugated system [41].

It seems probable that in ancient organisms conjugation was effected by the transfer of energy (electron) from magnesium porphyrins to iron porphyrins. In our model experiments we demonstrated the transformations of cytochrome *C* under the action of light absorbed by chlorophyll [33, 4]

DEVELOPMENT OF HYDROGEN (ELECTRON) DONOR UTILIZATION

Photosynthetic bacteria have not yet «learned the trick» of liberating molecular oxygen from water, and utilize an energetically less expensive type of photosynthesis. Van Niel [34] has assumed that in all authotrophic organisms, including photosynthetic bacteria, there takes place photolysis of water ($HOH \rightarrow H + OH$), The initial hydrogen donor reacts with the OH radicals, while the (H) is used to reduce the carbon dioxide. In line with this view, it has been shown [35] that, regardless of the ΔF of the overall reaction (with different hydrogen donors), the quantum efficiency of bacterial photosynthesis is constant (roughly 8 $h\nu$ per CO_2 molecule). These results suggest that a uniform type of elementary photoprocesses is involved in bacterial photosynthesis, irrespective of the nature of the initial electron donor.

The work of our laboratory revealed that bacteriochlorophyll in solution can effect the photosensitized transfer of electrons from hydrogen sulphide or ascorbic acid to flavins and other hydrogen acceptors [36] The participation of water in the photoprocess, in our opinion, stands in need of further substantiation. It appears more probable that photosynthetic bacteria utilize the electron of a donor molecule (e g., SH', S_2O_3'', organic acids) and the protons (hydrogen ions) of water. The ability to «take hold» of the electrons of water or OH'-ions only arose in the process of further evolution of the autotrophic organisms. It is reasonable to assume that the

development of the ability to produce oxygen from water required the utilisation of two quanta of light for the transfer of a single electron, i. e., the conjugation of two elementary photoprocesses to overcome the high energy barrier in the path of the transfer of a single electron (hydrogen) from water to carbon dioxide, whereas in bacterial photosynthesis one elementary photoprocess (using a single quantum of light) is sufficient for the transfer of a hydrogen atom from the hydrogen donor AH_2 to CO_2.

The twó-stage electron transfer necessitated a more elaborate coupling with enzymatic systems and the formation of a «stock» of intermediate hydrogen donors.

One can envision the development of the following stages: 1) transfer of an electron from water to an intermediate electron acceptor (e. g., cytochrome, polyphenols, dehydroascorbic acid, or disulphides), that is, — the Hill reaction; 2) transfer of the electron from the reduced forms of these compounds to pyridine-nucleotides taking part in the reactions of carbon dioxyde reduction (e. g., in the step phosphoglyceric acid → triosophosphate, according to the Calvin scheme). Above we have considered the «short circuiting» of the second stage of hydrogen transfer by coupling with oxidative phosphorylation. The tentative nature of these suggestions is due to the fact that there is as yet no definite answer to the question as to whether the transfer of a single electron (hydrogen) in photosynthesis requires one or two quanta (19).

THE STATE OF PHOTOCATALYTIC PIGMENTS

As stated above, the utilization of solar energy by organisms necessitated the large-scale synthesis of pigments so as to absorb a considerable portion of the photochemically active part of the solar spectrum. Present-day organisms as a rule contain substantial amounts of pigments. *Chlorella*, for example, contains up to 5% of chlorophyll.

In a study of the process of accumulation of chlorophyll when etiolated seedlings become green we observed in collaboration with L. M. Kosobutskaya the following picture of changes in the state of the chlorophyll [37]. Under the action of light, protochlorophyll is converted to the primary «monomeric» form of chlorophyll, combined with proteins and lipids, which exhibits an absorption maximum at 670 mμ and has a low light stability. In the process of further formation and accumulation of chlorophyll in the granules, the absorption maximum gradually shifts to 678 mμ, which is characteristic of highly concentrated, oriented and light stable forms of chlorophyll. These observations are in keeping with the data obtained by T. N. Godnev [38]

By means of spectral methods we have studied the state of chlorophyll and bacteriochlorophyll in various organisms from the phylogenetic viewpoint, and arrived at the following conclusions. The peculiar absorption spectrum of bacteriochlorophyll in the cells of photosynthetic bacteria is due to aggregation, to the orderly packing of bacteriochlorophyll in the granules; the absorption spectrum of this pigment in solid films and colloid solutions corresponds to the spectra of living bacteria [39].

The chlorophyll in red and blue-green algae, and in green plants, is mainly in a highly concentrated, closely packed aggregated form. The «monomeric» chlorophyll, associated with proteins and lipids, is in equilibrium with these forms. In the deep-sea red algae, *Phyllophora*, we were able to detect [40] three different types of chlorophyll packing in the granules (on the evidence of absorption spectra), with maxima at 690, 678 and 670 mμ.

The precise mechanism of participation of the different forms of pigment in the elementary photoprocess is not yet clear. The presence of orderly

arranged forms of the pigments can result in electron migration at the triplet level state (according to Terenin [41]) to monomer forms, which may take a direct participation in the photochemical reaction.

The further development of autotrophic organisms evidently proceeds along the lines of accumulation of large amounts of pigments absorbing practically the entire visible part of the solar spectrum.

The observations described above give support to the idea that the pigments of primitive organisms were in the «monomeric» active state adsorbed on lipoproteins. With the development of the capacity of organisms for the biosynthesis and accumulation of pigments, orderly packing of the latter in highly concentrated state in granules began to predominate. The cooperation of pigments and enzymes in chloroplast structures necessitated the development of an elaborate organization, some of the features of which are visualized in modern electron-microscopic pictures of ultra-thin sections.

A. N. Bach Institute of Biochemistry,
USSR Academy of Sciences,
Moscow

REFERENCES

1. A. I. Oparin. The Origin of Life on the Earth, Izd. AN SSSR, M.— L., 1941.
2. A. P. Vinogradov. Article «Biogeokhimija» in Bol'shaya Sovetskaya Entsiklopediya, v. 5.
3. R. Lemberg, I. W. Legge. Hematin Compounds and bile Pigments. Interscience publ., 1949.
4. A. A. Krasnovsky, K. K. Voynovskaya. Biofizika, **1**, 120, 1956.
5. A. A. Krasnovsky, G. P. Brin. Doklady Akad. Nauk SSSR, **53**, 447, 1946.
6. A. A. Krasnovsky. Article in the collection «Electronic Phenomena in Catalysis and Adsorption», p. 40, Izd. AN SSSR, Moscow, 1955.
7. L. P. Vernon, M. D. Kamen. J. Biol. Chem., **211**, 644, 1954.
8. T. Lascelles. Biochem. J., 55, 4, 1953.
K. K. Voynovskaya, A. A. Krasnovsky. Biokhimija, **20**, 123, 1955.
9. A. A. Krasnovsky, K. K. Voynovskaya. Doklady Akad. Nauk SSSR, **96**, 1209, 1954.
10. V. B. Evstigneev, V. A. Gavrilova. A. A. Krasnovsky. Doklady Akad. Nauk SSSR, **70**, 261, 1950.
11. A. A. Krasnovsky, G. P. Brin. Doklady Akad. Nauk SSSR, **89**, 527, 1953.
12. V. B. Evstigneev, V. A. Gavrilova. Doklady Akad. Nauk SSSR **95**, 841, 1954; **96**, 1201, 1954; **103**, 97, 1955.
13. A. A. Krasnovsky. Zhur. fiz. Khim., **30**, 968, 1956.
14. A. A. Krasnovsky. Doklady Akad. Nauk SSSR, **60**, 421, 1948.
15. A. N. Terenin. The Photochemistry of dyes. Izd. AN SSSR, 1947; Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol., **3**, 369, 1947.
16. A. A. Krasnovsky. Article in the collection «Problems of chemical kinetics, catalysis and reaction capasity». Izd. AN SSSR, p. 92, 1955.
17. L. M. N. Duysens. Science, **120**, 353, 1954.
L. N. Bell. Doklady Akad. Nauk SSSR, **107**, 329, 1956.
B. L. Strehler, V. H. Lynch. Science, **123**, 462, 1956.
J. V. Coleman, A. S. Holt, E. Rabinowitch. Science, **123**, 795 1956.
18. A. N. Terenin. Uspekhi fiz. nauk, **43**, 347, 1951.
19. E. Rabinowitch. «Photosynthesis», v. II, p. 2, 1956. Interscience publ.
20. R. Van Norman, C. S. French, F. McDowall. Plant Physiol., **23**, 455. 1948.
21. H. Dutton, W. Manning, R. Duggar. J. Phys. **47**, 308, 1943.
22. A. A. Krasnovsky, V. B. Evstigneev, G. P. Brin, V. A. Gavrilova. Doklady Akad. Nauk SSSR, **82**, 947, 1952.
23. A. N. Terenin, V. L. Ermolajew. Doklady Acad. Nauk SSSR, **85**, 547, 1952; Trans. Farad. Soc., **52**, 1042, 1956.
24. N. M. Sissakian. Enzymatic activity of protoplasmic structures, Izd. AN SSSR, Moscow, 1951; Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol., **5**, 32, **6**, 3, 1956.

25. A. A. Krasnovsky, G. P. Brin. Doklady Akad. Nauk SSSR, **67**, 325, 1949; **87**, 109, 1952.
A. A. Krasnovsky. Doklady Akad. Nauk SSSR, **61**, 91, 1948.
26. S. Ochoa. In «Currents in biochemical Research», Ed. D. Green. Intersc. publ. N. Y., 1946.
27. B. L. Strehler. W. A. Arnold. J. Gen. Physiol., **34**, 809, 1951.
28. A. Frenkel. J. Am. Chem. Soc., **76**, 5568, 1954.
29. R. Emerson, J. Stauffer, W. Umbreit. Am. J. Bot., **31**, 107, 1944.
B. Strehler. Phosphate Metabolism, v. II, 1952.
30. D. Arnon. Science, **122**, 9, 1955.
31. M. Calvin. Conferences et rapports; 3-eme Congress International de biochimie, p. 211, Liège, 1956.
32. A. N. Terenin, A. A. Krasnovsky. Uspekhi fiz. nauk, **37**, 65, 1949.
33. A. A. Krasnovsky. Doklady Akad. Nauk SSSR, **103**, 283, 1955.
34. C. B. Van Niel. Photosynthesis in Plants, Yowa State College press, p. 437, 1949.
35. H. Larsen, C. S. Yocum, C. B. Van Niel. J. Gen. Physiol., **36**, 161, 1952.
36. A. A. Krasnovsky, K. K. Voynovskaya. Doklady Akad. Nauk SSSR, **81**, 879, 1951; **87**, 109, 1952.
37. A. A. Krasnovsky, L. M. Kosobutskaya. Doklady Akad. Nauk SSSR, **85**, 177, 1952; **91**, 343, 1953.
L. M. Vorobjova, A. A. Krasnovsky. Biokhimia, **21**, 126, 1956.
38. T. N. Godnev. Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. fiz., **20**, 557, 1956.
T. N. Godnev, N. S. Sudnik. Fiziologija restenii **3**, 352, 1956.
39. A. A. Krasnovsky, L. M. Kosobutskaja, K. K. Voynovskaya. Doklady Akad. Nauk SSSR, **85**, 389, 1952; **92**, 1201, 1953.
40. A. A. Krasnovsky, E. A. Nesterovskaya, A. B. Goldenberg. Biofizika, **1**, 328, 1956.
41. A. N. Terenin. Radiotekhnika i electronika, **1**, 1127, 1956.

ОБРАТИМОЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА И СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ РЕАКЦИИ В ГОМОГЕНАТАХ ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Л. М. ВОРОБЬЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

В работах нашей лаборатории был экспериментально установлен механизм фотосенсибилизирующего действия хлорофилла в процессах переноса водорода (электрона), идущих с «запасанием» энергии света в продуктах реакции, и было показано, что в основе фотосенсибилизирующего действия хлорофилла лежит реакция обратимого фотовосстановления [1]. Эти работы были проведены с растворами хлорофилла и его аналогов в органических растворителях. Следовало выяснить способность хлорофилла, связанного в естественном состоянии с белками и липоидами, к такого рода превращениям.

Исследуя состояние хлорофилла в гомогенатах из листьев [2; 3], мы обнаружили, что у ряда растений часть хлорофилла находится в фотохимически неустойчивом состоянии; эта форма хлорофилла быстро выцветает при освещении и по своим свойствам близка хлорофиллу в органических растворителях. Количество этого хлорофилла особенно велико в гомогенатах из листьев сахарной свеклы, лебеды, тополя и т. д. [3]. В гомогенатах из листьев этих растений нам удалось обнаружить обратимые фотохимические превращения хлорофилла [2].

Участие хлорофилла в процессах фотохимического переноса водорода в растворах особенно отчетливо проявляется в восстановительной среде в присутствии аскорбиновой кислоты; следовало попытаться создать подобные восстановительные условия и в гомогенатах из листьев. Мы применили для этого растирание листьев с аскорбинатом натрия с последующим центрифугированием. Электронномикроскопическая картина полученного гомогената, называемого нами «зеленым раствором», показала наличие в нем осколков хлоропластов, целых и распавшихся гранул. В качестве акцепторов водорода (электрона) мы применили те же соединения, которые были исследованы нами в растворах: обратимо восстанавливающийся сафранин T(E'_0=—0,3 *V*), рибофлавин (E'_0=—0,22 *V*) и необратимо восстанавливающийся азо-краситель — метиловый красный.

Свойства хлорофилла в зеленых растворах были сопоставлены со свойствами хлорофилла в коллоидных растворах.

ОБЪЕКТ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили главным образом с листьями сахарной свеклы (сорт «Верхнячка», которую выращивали в открытом грунте) в сентябре — октябре и в зимнее время в оранжерее под люминесцентными лампами.

Зеленый раствор в большинстве опытов готовили следующим образом: 1,5 *г* листьев без средних жилок растирали при охлаждении с 4 *г* аскорбината натрия, растворенного в 10 *мл* $^1/_{15}$ *M* Na_2HPO_4. Полученную кашицу отжимали через полотно и центрифугировали при 3500 *g* в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливали и разводили глицерином в отношении 4 : 6. Полученный раствор разбавляли до величины коэффициента погашения в красном максимуме поглощения хлорофилла $K = 0{,}6—0{,}7$ (при толщине слоя 1—1,2 *см*) водно-глицериновым раствором аскорбината натрия (в 100 *мл* раствора 60 *мл* глицерина, 40 *мл* раствора $^1/_{15}$ *M* Na_2HPO_4 и 4 *г* аскорбината натрия). Полученные растворы хранили в холодильнике.

Зеленые растворы без аскорбината готовили ранее описанным способом [2; 3].

Для получения коллоидного раствора хлорофилла *a* + *b* готовили концентрированный раствор пигмента в ацетоне и разбавляли его водой в отношении 1 : 3. 0,03—0,1 *мл* полученного концентрированного коллоидного раствора добавляли к 10 *мл* водно-гли-

церинового раствора аскорбината натрия до величины $K = 0{,}5$—$0{,}7$ в красном максимуме поглощения хлорофилла. В 100 *мл* водно-глицеринового раствора содержалось 60 *мл* глицерина, 40 *мл* 1/15 *М* раствора Na_2HPO_4 и 1,6 *г* аскорбината натрия. Ацетон, присутствующий в коллоидном растворе, удаляли под вакуумом.

Условия проведения опытов, освещения и спектрофотометрических измерений в этой работе такие же, как в предыдущих работах [2; 3]. Освещение вели также красным светом (через светофильтр RG-2) с интенсивностью 10^6 *эрг/см²сек*.

Аскорбинат натрия получали следующим образом. Аскорбиновую кислоту растворяли в дистиллированной воде, нейтрализовали сухим бикарбонатом натрия (из расчета 1 *моль* Na_2HCO_3 на 1 *моль* аскорбиновой кислоты), после чего аскорбинат высаживали избытком этилового спирта и оставляли на ночь в холодильнике. Затем осадок фильтровали, промывали спиртом и сушили в вакууме. pH водного раствора аскорбината ~ 7.

ОБРАТИМОЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА

В наших работах было показано, что при освещении в вакууме водно-глицериновых зеленых растворов, обладающих большим содержанием фотохимически лабильной формы хлорофилла, можно наблюдать обратимое понижение красного максимума поглощения хлорофилла, обусловленное обратимым восстановлением небольшой части пигмента [2]. При кратковременных интервалах освещения этот эффект можно было наблюдать многократно. Добавление к зеленому раствору нейтрализованной аскорбиновой кислоты ($3{,}5 \cdot 10^{-3}$ *М*) приводило к более полной обратимости процесса. В ранее описанных опытах нам удавалось после освещения наблюдать падение поглощения пигмента в красном максимуме до 3%.

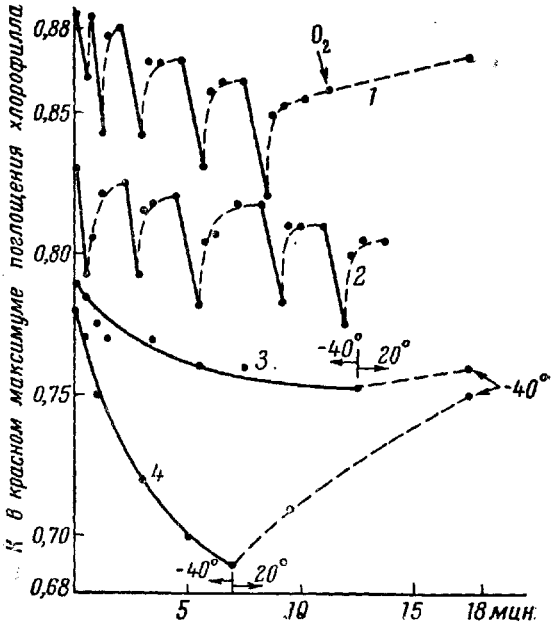


Рис. 1. Обратимое фотовосстановление хлорофилла в зеленых растворах из листьев сахарной свеклы, содержащих аскорбинат натрия:

1 — без воздуха (676 *mμ*); *2* — с воздухом (676 *mμ*); *3* — без воздуха при —40° (676 *mμ*); *4* — с 5% пиридина при —40° (673 *mμ*). На этом и последующих рисунках обозначены: сплошной линией — световой интервал, штриховой — темновой; стрелкой — пуск воздуха. В скобках приведено положение красного максимума поглощения хлорофилла

Приготовление зеленых растворов, обладающих большим избытком аскорбината натрия, позволило нам наблюдать явление обратимого восстановления хлорофилла в этих «растворах» в более отчетливой форме. Дифференциальный спектр, представляющий собой разность спектров после и до освещения, показывает максимум при 670 *mμ*, то есть выцветание обязано именно «мономерной» форме (рис. 10). При освещении таких «растворов» в отсутствие воздуха наблюдалось заметное понижение *K* в красном максимуме поглощения хлорофилла, частично обратимое в темноте и после пуска воздуха (рис. 1). Большое количество аскорбината в данных опытах тормозило окислительные реакции в зеленом растворе, что позволяет приписать наблюдаемые обратимые изменения *K* в присутствии воздуха также обратимому восстановлению (рис. 1). При введении аскорбината в зеленый раствор, приготовленный на водно-глицериновой среде, непосредственно перед опытом картина была такой же.

Для сравнения свойств хлорофилла в естественном состоянии и выде-

ленного из растения мы освещали коллоидный раствор хлорофилла $a+b$, содержащий аскорбинат натрия, в отсутствие воздуха. При этом также происходило небольшое (до 1—2%), частично обратимое понижение K в максимуме поглощения хлорофилла.

Влияние различных факторов на обратимые изменения хлорофилла

Температура. Обратимые изменения K хлорофилла в максимуме значительно тормозятся при понижении температуры. При освещении зеленого раствора с аскорбинатом натрия в отсутствие воздуха при температуре —40° наблюдалось небольшое понижение K в красном максимуме поглощения хлорофилла. При стоянии «раствора» в условиях комнатной температуры с последующим измерением при —40° наблюдалась частичная регенерация хлорофилла из промежуточных продуктов восстановления. Если освещали зеленый раствор, содержащий 5% пиридина при —40°, то происходило значительное понижение K в максимуме поглощения хлорофилла со значительной регенерацией при комнатной температуре (рис. 1). Увеличение эффекта при низкой температуре, вероятно, объясняется торможением обратных реакций. **Концентрация аскорбината натрия.** Мы исследовали влияние количества аскорбината натрия, добавляемого к зеленому раствору (приготовленному без аскорбината) на обратимые изменения хлорофилла при освещении. Оказалось, что аскорбинат в концентрации $7 \cdot 10^{-3}$ M заметно увеличивал обратимое фотовосстановление по сравнению с исходным раствором. Наряду с этим, по мере увеличения концентрации аскорбината до 0,35 M происходило постепенное увеличение необратимого падения K в красном максимуме хлорофилла. При увеличении времени стояния в темноте количество регенерированного продукта возрастало. Можно сделать предположение, что большое количество аскорбината способствует более глубокому восстановлению пигмента, требующему для обратного перехода в исходное состояние ряда темновых реакций. Максимальная величина эффекта достигалась при концентрации аскорбината $7 \cdot 10^{-2}$ M (50 *мг* аскорбината в 4 *мл* раствора).

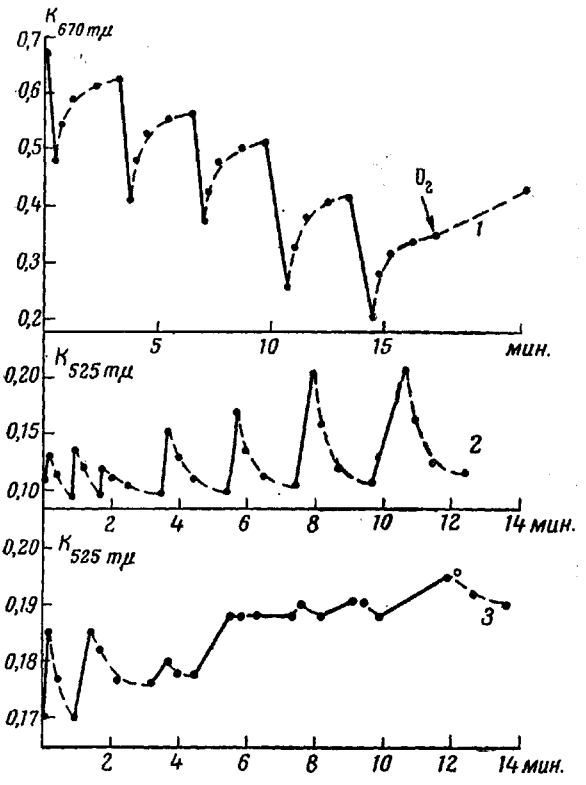


Рис. 2. Фотовосстановление хлорофилла в зеленом растворе из листьев свеклы, содержащем аскорбинат натрия в присутствии пиридина в вакууме:

1 и *2* — 50% пиридина; *3* — 20% пиридина

Добавление пиридина. Как было ранее установлено, пиридин оказывает на хлорофилл в естественном состоянии сильное дезагрегирующее воздействие и уже в небольших концентрациях нарушает естественное его состояние [4]. Поэтому было интересно проследить влияние различных концентраций пиридина на обратимое фотовосстановление хлорофилла в зеленых растворах, содержащих аскорбинат натрия.

Линч и Френч [5] исследовали влияние небольших добавок пиридина на фотохимические свойства суспензии хлоропластов, содержащей аскорбиновую кислоту, и пришли к выводу, что освещение таких растворов в отсутствие воздуха не вызывает спектральных изменений при 672 и 525 *mμ* до 50% пиридина в суспензии.

Мы добавляли пиридин к зеленому раствору из листьев сахарной свеклы, приготовленному с аскорбинатом натрия, в количестве 1, 5, 20, 50% и следили за изменениями K в красном максимуме поглощения хлорофилла при освещении «раствора» в вакууме. Максимум поглощения в таких суспензиях был расположен $\sim$ 677 *mμ*. 1% пиридина не оказывал заметного влияния на изменения K в максимуме поглощения

хлорофилла при освещении и на положение его максимума поглощения (~676 *mμ*). Добавление 5% пиридина приводило к перемещению максимума до 675 *mμ* и вызывало заметное увеличение фотохимического восстановления. При 20% пиридина в растворе максимум поглощения хлорофилла расположен при 671 *mμ*. Обратимое понижение *K* в результате освещения при этом еще больше возрастало. При добавлении 50% пиридина связь пигмента с белком нарушается и образуется водно-пиридиновый раствор хлорофилла с максимумом поглощения при 669 *mμ*. При освещении этого раствора в вакууме происходит глубокое падение поглощения в красной области спектра и значительное увеличение поглощения при 525 *mμ*, то есть происходит фотовосстановление с образованием красной восстановленной формы (рис. 2). После выключения света в темноте процесс быстро идет обратно, что, вероятно, определяется большим содержанием воды в растворе, вызывающей ускорение обратной реакции.

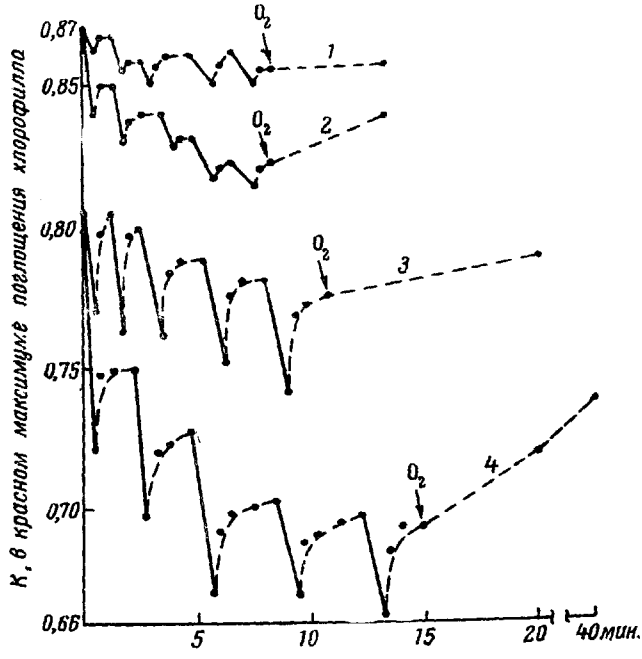


Рис. 3. Фотовосстановление хлорофилла в зеленом растворе из листьев свеклы, содержащем аскорбинат натрия, в разные сезоны года:

1 — 16. XII. 1957 г. (677 *mμ*); *2* — то же в присутствии 5% пиридина (673 *mμ*); *3* — 30. IX 1957 г. (676 *mμ*); *4* — то же в присутствии 5% пиридина (673 *mμ*)

Физиологические условия. Как уже было показано ранее [2], физиологические условия, в которых выращиваются растения, влияют на спектральные и фотохимические свойства хлорофилла в гомогенатах. Это наблюдалось и в данной работе. Зеленые растворы из растений сахарной свеклы, росших в сентябре — октябре в открытом грунте, содержали хлорофилл в более активном состоянии, чем зеленые растворы из растений, росших в декабре в оранжерее (рис. 3). Небольшие добавки пиридина к зеленому раствору листьев свеклы, росшей в октябре, вызывали более глубокое нарушение состояния связи пигмента, чем это описано в опытах предыдущего раздела, проведенных в декабре. 5% пиридина в этом случае сдвигают красный максимум поглощения хлорофилла до 673 *mμ*, 10% — до 671 *mμ*. Из рис. 3 видна разница в фотохимических свойствах хлорофилла в зеленых растворах с 5% пиридина из листьев свеклы, росшей в октябре и декабре.

Вид растения. Нами было показано, что в гомогенатах из разных видов растений содержится разное количество фотохимически лабильной формы [3]. В данной работе мы исследовали способность хлорофилла к обратимым фотохимическим превращениям в зеленых растворах из нескольких видов растений. В качестве растений, обладающих небольшим содержанием лабильной формы, были взяты пшеница и фасоль [3].

В зеленых растворах фасоли и пшеницы наблюдалось обратимое восстановление хлорофилла аскорбинатом, но в меньшем размере, чем в «растворах» из листьев свеклы. Пиридин, даже в концентрации 20%, сдвигая максимум поглощения до 671 *mμ*, не увеличивал эффекта. При 50% пиридина нарушается естественное состояние хлорофилла и при освещении идет обычное фотовосстановление, характерное для истинных растворов пигмента.

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ

В работах нашей лаборатории было детально изучено фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление красителей — сафранина, рибофлавина, метилового красного, а также дифосфопиридиннуклеотида [1]. В этих опытах при освещении красным светом раствора хлорофилла, содержащего аскорбиновую кислоту и краситель (в вакууме), происходит быстрое падение коэффициента погашения в максимуме поглощения красителя; поглощение в максимуме поглощения хлорофилла при этом не изменяется до полного восстановления красителя — акцептора электрона.

Получение нами зеленых растворов, содержащих хлорофилл в фотохимически активном состоянии, способный на свету обратимо восстанавливаться, определило возможность поисков сенсибилизированного восстановления красителей хлорофиллом в естественном состоянии.

Зеленые растворы для этих опытов готовили с аскорбинатом натрия описанным выше способом. Растворы красителей — сафранина Т, рибофлавина и метилового красного — готовили на растворе 1/15 *М* Na_2HPO_4 такой концентрации, чтобы при добавлении 0,02—0,04 *мл* этого раствора к 4 *мл* зеленого раствора коэффициент погашения при измеряемой длине волны лежал в пределах 0,6—1,0. Восстановление сафранина Т определяли по понижению его максимума поглощения при 530 *mμ*. При работе с метиловым красным измерения проводили вблизи изобестической точки при 460 *mμ* [6]. В опытах с рибофлавином измерения проводили также при 460 *mμ*, так как в его максимуме поглощения при 445 *mμ* велико поглощение хлорофилла.

Проведенные опыты показали обратимое восстановление сафранина Т и необратимое восстановление метилового красного. Восстановление рибофлавина удавалось наблюдать только в присутствии 5% пиридина при температуре от —10 до —40°, что следует объяснить торможением обратных реакций. При комнатной температуре удалось наблюдать лишь подавление присутствующим рибофлавином обратимого понижения *К* в максимуме поглощения хлорофилла (рис. 4).

Восстановление красителей происходило и в присутствии воздуха, что следует объяснить торможением окислительных процессов большой концентрацией аскорбината натрия. Контрольными опытами было показано, что эти красители не восстанавливаются в зеленом растворе без аскорбината натрия и в водно-глицериновом растворе без хлорофилла при освещении красным светом.

В случае сенсибилизированного хлорофиллом восстановления красителей аскорбиновой кислотой в пиридине на начальных стадиях освещения не наблюдалось изменений поглощения пигмента в максимуме, хотя процесс идет через стадию его фотовосстановления [1]. Это объясняется тем, что в процессе сенсибилизации восстановленная форма хлорофилла быстро обратимо реагирует с молекулами — акцепторами электрона. При проведении реакции сенсибилизированного восстановления красителей в зеленых растворах, содержащих большие количества аскорбината натрия, изменения в максимуме поглощения хлорофилла полностью не подавлялись. В случае метилового красного они уменьшались примерно наполовину (рис. 4). Это уменьшение наблюдалось при проведении реакции в вакууме и в присутствии воздуха. Добавление к зеленому раствору 50% пиридина не приводило к большому подавлению изменений хлорофилла в максимуме, хотя очевидно, что в этом случае мы имеем дело с водно-глицериновым раствором хлорофилла. Подобные эффекты наблюдались с сафранином Т и рибофлавином при добавлении 5% пиридина (рис. 4).

Сафранин. При освещении в вакууме зеленого раствора из листьев свеклы с аскорбинатом натрия в присутствии сафранина Т наблюдалось понижение *К* в максимуме поглощения красителя при 530 *mμ*. В темноте шел обратный процесс (рис. 5). Восстановление сафранина в этих условиях было полностью обратимым. Темновая обратная реакция окисления лейко-сафранина обычно протекала за 1,5—2 мин. Добавление 5% пири-

дина ускоряло обратную реакцию. Восстановление сафранина можно было наблюдать и в присутствии воздуха, но величина эффекта в этом случае была меньшей.

При проведении опытов в присутствии кислорода воздуха при —40° измеримых изменений при 530 $m\mu$ не происходило. Осуществление реакции в вакууме при —40° приводило к постепенному медленному восстановлению сафранина, обратимому при подогревании раствора (рис. 5).

Мы исследовали восстановление сафранина водно-глицериновым зеленым раствором с аскорбинатом натрия, предварительно нагретым на водяной бане в течение 30 мин. до 70 и 90° (такое нагревание не ведет к образованию хлопьев коагулированного белка). В этом случае в вакууме наблюдалось только частично обратимое восстановление краси-

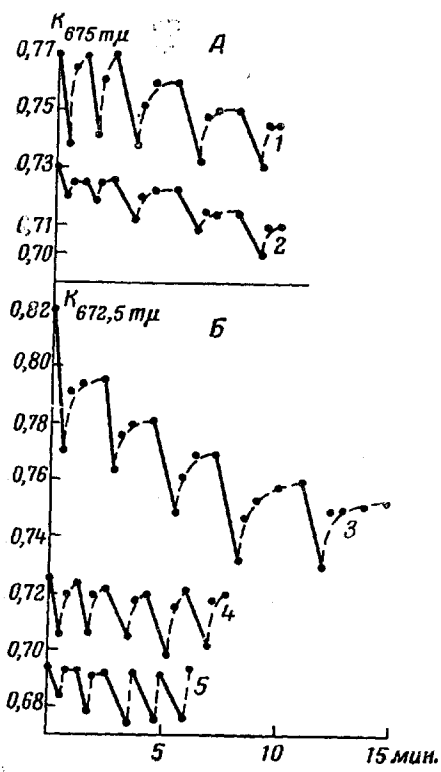


Рис. 4

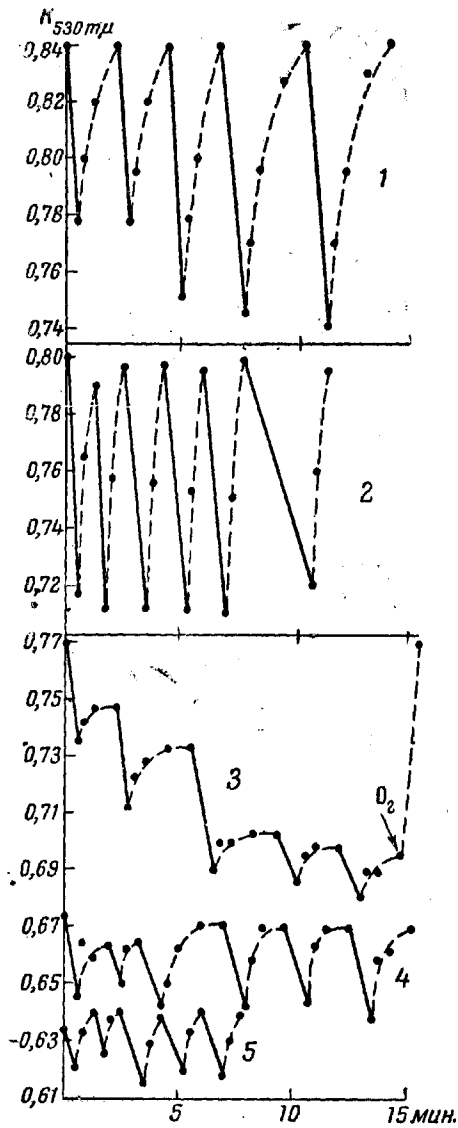


Рис. 5

Рис. 4. Изменения в красном максимуме поглощения хлорофилла при освещении зеленых растворов, содержащих аскорбинат натрия, в вакууме в присутствии акцепторов водорода.

А: *1* — зеленый раствор без добавок; *2* — с метиловым красным ($K_{460m\mu}$ = 3). *Б*: *3* — зеленый раствор с 5% пиридина; *4* — то же с сафранином ($K_{530m\mu}$ = 3,5); *5* — то же с рибофлавином ($K_{445m\mu}$ = 2)

Рис. 5. Фотосенсибилизированное восстановление сафранина (с аскорбинатом натрия в вакууме):

1 — зеленый раствор из листьев свеклы; *2* — зеленый раствор из листьев свеклы с 5% пиридина; *3* — зеленый раствор из листьев свеклы, предварительно нагретый до 70°; *4* — коллоидный раствор хлорофилла *а* + *b*; *5* — зеленый раствор листьев фасоли. Освещение красным светом

ля, в общей сложности более глубоко идущее, чем у ненагретого раствора (рис. 5). Пуск кислорода ускорял обратную реакцию; после взбалтывания раствора с воздухом коэффициент погашения в максимуме поглощения красителя увеличивался до исходной величины.

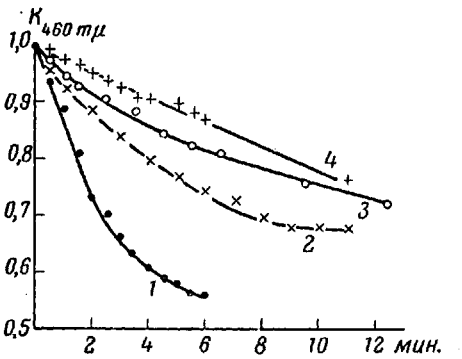


Рис. 6. Фотосенсибилизированное восстановление метилового красного (в вакууме с аскорбинатом натрия):

1 — зеленый раствор из листьев свеклы; *2* — коллоидный раствор хлорофилла *a* + *b*; *3* — зеленый раствор из листьев пшеницы; *4* — зеленый раствор из листьев свеклы, освещенный красным светом перед добавлением аскорбината натрия

Восстановление сафранина наблюдалось в зеленом растворе из листьев фасоли, а также в водно-глицериновом растворе хлорофилла *a*+*b*, содержащих аскорбинат натрия. Как видно из рис. 5, в этих случаях количество восстановленного красителя гораздо меньше, чем в опытах с зелеными растворами из листьев свеклы.

Метиловый красный восстанавливался в зеленых растворах сахарной свеклы, в которые вводили аскорбинат натрия перед приготовлением или перед приливанием красителя (рис. 6). Основная часть красителя в случае проведения реакции с воздухом и в вакууме восстанавливалась обычно за 2—3 мин. При понижении температуры до —40° скорость восстановления красителя сильно замедлялась (рис. 7).

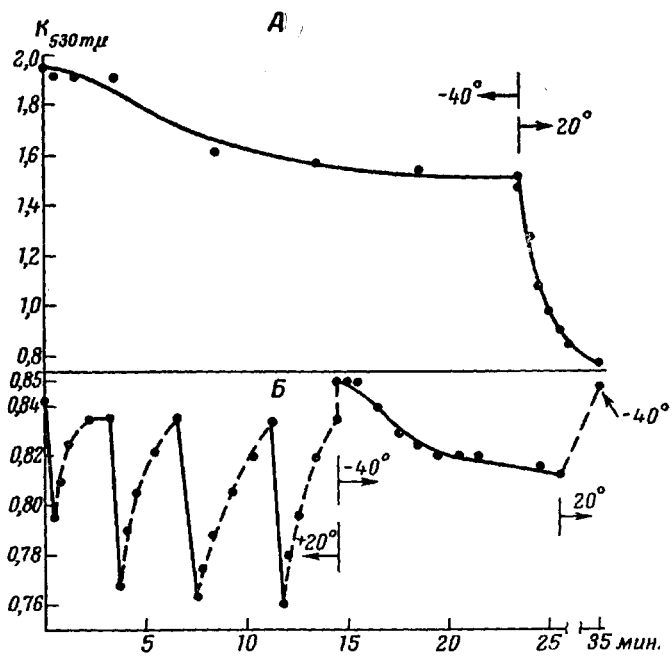


Рис. 7. Фотосенсибилизированное восстановление красителей в зеленых растворах из листьев свеклы, содержащих аскорбинат натрия, при низкой температуре:

А — метиловый красный; *Б* — сафранин

Мы исследовали скорость восстановления метилового красного при добавлении к водно-глицериновому зеленому раствору разных количеств

аскорбината натрия и обнаружили между этими величинами прямую зависимость (рис. 8).

Небольшие добавки пиридина, не переводящие хлорофилл в раствор, в наших опытах сильно увеличивали эффект обратимого фотохимического восстановления хлорофилла в зеленых растворах из листьев свеклы, содержащих аскорбинат натрия. Можно было ожидать, что добавление пиридина к этим растворам ускорит и восстановление метилового красного. Однако при добавлении пиридина от 1 до 50% к зеленым растворам из листьев свеклы не происходило больших изменений скорости восстановления метилового красного (рис. 9). Если перед добавлением аскорбината водно-глицериновый зеленый раствор освещали красным светом высокой интенсивности ($1 \cdot 10^6$ *эрг/см² сек.*) в течение 10 мин. в присутствии воздуха, то в результате такого освещения, судя по падению K в красном максимуме поглощения, разрушалось около 15% хлорофилла. Такой раствор в значительной степени утрачивал способность сенсибилизировать восстановление метилового красного по сравнению с исходным неосвещенным раствором (рис. 6). Это явление напоминает подавление фотохимической активности зеленых растворов, определяемой по фенолиндофенолу, после предварительного освещения в присутствии воздуха красным светом высокой интенсивности, кратко описанное нами ранее [7]. Подавление фотохимической активности объяснялось нами разрушением при освещении лабильной мономерной формы

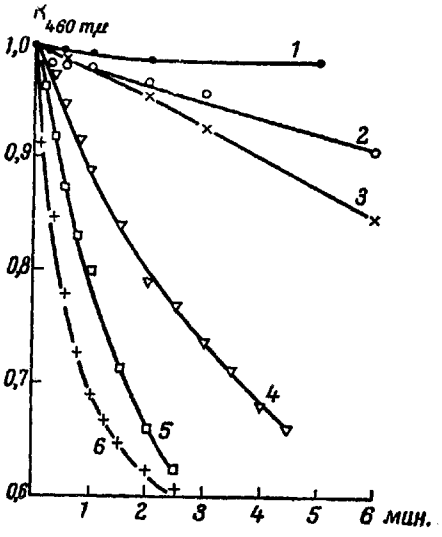


Рис. 8. Фотосенсибилизированное восстановление метилового красного в зеленых растворах из листьев свеклы, содержащих различные количества аскорбината натрия:

1 — без аскорбината; *2* — $7 \cdot 10^{-3}$ *M*; *3* — $1{,}4 \cdot 10^{-2}$ *M*; *4* — $7 \cdot 10^{-2}$ *M*; *5* — $1{,}4 \cdot 10^{-1}$ *M*; *6* — $3{,}5 \cdot 10^{-1}$ *M*

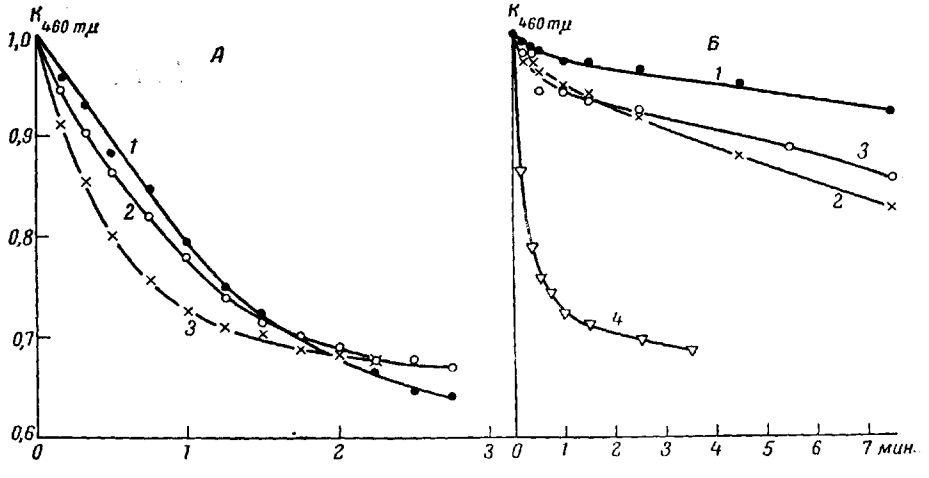


Рис. 9. Влияние добавления пиридина на фотовосстановление метилового красного в зеленых растворах с аскорбинатом натрия в вакууме.

А — зеленый раствор из листьев свеклы: *1* — без пиридина; *2* — 1% пиридина; *3* — 50% пиридина. *Б* — зеленый раствор из листьев фасоли: *1* — без пиридина; *2* — 5% пиридина; *3* — 20% пиридина; *4* — 50% пиридина

пигмента, вероятно, необходимой для фотохимической стадии процесса выделения кислорода. Это же объяснение может быть справедливым и в

случае опытов по подавлению восстановления метилового красного предварительным освещением зеленого раствора.

Восстановление метилового красного можно было наблюдать в зеленых растворах с аскорбинатом натрия, приготовленных из листьев фасоли и пшеницы, но в этих случаях скорость восстановления красителя была очень низкой (рис. 6). Добавление пиридина к зеленому раствору из листьев фасоли приводило к ускорению этого процесса. В предельном случае при 50% пиридина в растворе скорость восстановления метилового красного становилась сравнимой со скоростью его восстановления в зеленом растворе из листьев свеклы (рис. 9).

Восстановление метилового красного происходило также в коллоидном растворе хлорофилла $a+b$, содержащем аскорбинат натрия. Скорость восстановления красителя в этом случае была сравнимой с реакцией, идущей в зеленых растворах из листьев фасоли и пшеницы.

ИЗМЕНЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ПОГАШЕНИЯ В ЗЕЛЕНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

За последние годы большое число работ было посвящено изучению обратимых спектральных изменений в зеленой области спектра при освещении зеленых листьев и суспензий водорослей [8—12]. Многими исследователями было показано возрастание поглощения в области 510—540 $m\mu$ в результате освещения. В опытах наблюдались

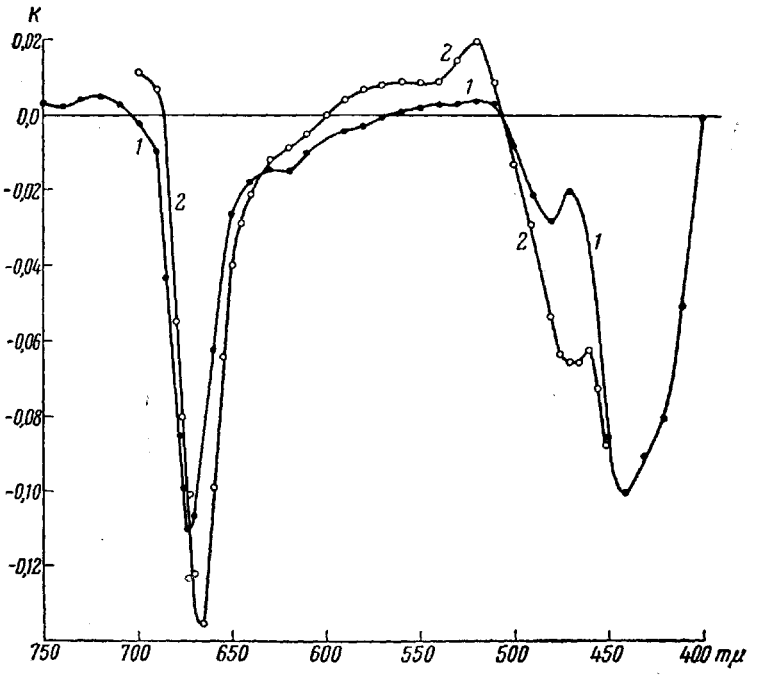


Рис. 10. Дифференциальные спектры поглощения.
1 — без пиридина; *2* — 5% пиридина

корреляция между возрастанием поглощения в этой области спектра и падением красного максимума поглощения хлорофилла [11], а также с уменьшением его флуоресценции [12]. Однако до сих пор нельзя считать ясным природу веществ, ответственных за изменения поглощения в зеленой области спектра. Возможно, что эти изменения определяются не одним, а несколькими соединениями [10; 11].

В наших опытах при освещении в вакууме зеленых растворов из листьев свеклы с аскорбинатом натрия значительных изменений в зеленой области не наблюдалось. Следует отметить, что при измерении растворов на спектрофотометре Бекмана можно с достоверностью судить об изменениях коэффициента погашения в результате освещения свыше 1%, то есть наблюдать эффекты, превышающие эффекты Дюйзенса [8] в 10 раз.

В наших опытах наблюдалось некоторое повышение K в области 510—540 $m\mu$, но эти эффекты лишь немного превышали ошибку измерения, хотя падение K в красном максимуме поглощения при этом достигало 15%. Таким образом, нам удалось наблю-

дать обратимое фотовосстановление хлорофилла, не сопровождающееся явными спектральными изменениями в зеленой области спектра.

При добавлении к зеленому раствору 5% пиридина можно было наблюдать небольшое повышение поглощения при 525 $m\mu$ (рис. 10). Добавление 20% пиридина приводило к повышению K при 525 $m\mu$, обратимому в первые интервалы освещения (рис. 2). На дифференциальном спектре, представляющем собой разность спектров после и до освещения «растворов» в вакууме, в этом случае наблюдаются два максимума — один ясно выраженный при 540 $m\mu$ и второй в области 515—520 $m\mu$. После пуска воздуха максимумы не исчезали, то есть мы здесь имеем дело с необратимыми спектральными изменениями. При освещении зеленого раствора, содержащего 50% пиридина, наблюдалось появление резкого максимума при 525 $m\mu$, почти полностью исчезающего примерно через 1 мин. после выключения света (рис. 2). Такое ускорение реакции по сравнению с растворами хлорофилла, вероятно, объясняется большим содержанием воды в зеленом растворе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из описания опытов явствует, что при освещении в присутствии избытка аскорбината натрия зеленых растворов из листьев сахарной свеклы наблюдаются обратимые изменения оптической плотности до 5—6% в красном максимуме поглощения хлорофилла. Обратный ход реакции наблюдался в течение 1—1,5 мин., что отличает наблюдаемые нами эффекты от многочисленных измерений дифференциальных спектров в живых листьях растений и в суспензиях водорослей [8—12].

В работах Колемана, Холта и Рабиновича [9], а также Стрелера и Линч [11] наблюдались обратимые изменения оптической плотности суспензий хлореллы в красной области спектра. Витт наблюдал падение флуоресценции хлорофилла в суспензии хлореллы с одновременным увеличением поглощения при 530 $m\mu$ [12], обнаруженным в работах Дюйзенса [8].

В упомянутых работах изменения оптической плотности при 510—530 $m\mu$ превышают падение оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла. Поэтому маловероятно, чтобы превращенный хлорофилл в этих опытах переходил в красную восстановленную форму. В этом случае отношение K_{670}/K_{530}, судя по нашим опытам в растворах, должно бы иметь значение 2—3. Работы нашей лаборатории показали, что в зависимости от условий образуются фотовосстановленные формы, не обладающие максимумом при 525 $m\mu$, тем более, что сенсибилизация в растворах идет через образование первичной восстановленной формы хлорофилла [13], по-видимому, не обладающей максимумом при 525 $m\mu$. Более вероятно, что при измерении дифференциальных спектров увеличение поглощения в зеленой области следует приписать не только продуктам превращения хлорофилла, но и превращениям пока не известных переносчиков водорода, возможно, цитохромов. Однако обратимые изменения хлорофилла в красной области спектра так же, как и в наших опытах, следует приписать обратимому фотовосстановлению. Конечно, весь круг этих вопросов нуждается в дальнейшей разработке.

В связи с этими соображениями следует рассмотреть результаты опытов по постепенной дезагрегации хлорофилла в гомогенатах из листьев пиридином. В этих опытах по мере увеличения количества пиридина наблюдается все большие изменения поглощения хлорофилла в максимуме. Однако до полного перехода пигмента в раствор мы не могли наблюдать большого увеличения поглощения при 525 $m\mu$ в результате освещения (рис. 2), то есть фотовосстановление в этих условиях не сопровождается образованием красной восстановленной формы.

Наблюдаемые обратимые превращения хлорофилла в зеленых растворах следует приписать дезагрегированной мономерной форме хлорофилла, количество которой в гомогенатах зависит от физиологических условий и вида растения, как было показано и ранее [2; 3]. Вопрос о природе мономерной формы в гомогенатах требует дальнейшего исследования, в

частности, требуется выяснить возможность ее образования в процессе растирания листьев.

Нам удалось обнаружить фотосенсибилизирующее действие хлорофилла во всех исследованных объектах, но наибольшая величина эффекта наблюдалась в гомогенатах из листьев сахарной свеклы, обладающих большим содержанием мономерной формы хлорофилла. Однако в этой реакции участвует, вероятно, как мономерная, так и агрегированная формы хлорофилла, что показали опыты с коллоидными растворами. Мы наблюдали во всех объектах отчетливое восстановление сафранина с полным обращением реакции в темноте. В случае рибофлавина мы не смогли непосредственно наблюдать восстановление красителя, возможно, из-за быстрой обратной реакции. При комнатной температуре в зеленом растворе с 5% пиридина удавалось лишь наблюдать понижение K в красном максимуме поглощения хлорофилла, вероятно, в результате взаимодействия восстановленной формы хлорофилла с рибофлавином. При низкой температуре наблюдалось значительное понижение K в области поглощения рибофлавина.

Эффект сенсибилизации в наших опытах в отличие от реакции Хилла не связан с естественным состоянием хлорофилла и с целостностью всей биокаталитической системы, так как при нагревании и действии небольших добавок пиридина эффект сенсибилизации сохраняется, тогда как реакция Хилла при этих условиях подавляется полностью.

ВЫВОДЫ

В гомогенатах из листьев сахарной свеклы при освещении в присутствии аскорбината натрия наблюдаются обратимые изменения оптической плотности (K) в красном максимуме поглощения хлорофилла, что следует приписать его обратимому фотохимическому восстановлению.

В таких гомогенатах из листьев разных растений, а также в коллоидном растворе хлорофилла $a+b$, содержащих аскорбинат натрия, наблюдается фотосенсибилизированное восстановление сафранина, метилового красного и рибофлавина, происходящее, вероятно, по тому же элементарному механизму, что и при сенсибилизированных реакциях в растворах, то есть через промежуточное фотовосстановление хлорофилла.

Изученные эффекты фотовосстановления и сенсибилизирующего действия в сильной степени зависят от физиологического состояния и вида растения, из которого приготовлен гомогенат.

Поступила в редакцию
21.II. 1958

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Ж. физ. хим. **30**, 968, 1958.
2. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН **104**, 440, 1955; Воробьева Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **21**, 126, 1956.
3. Красновский А. А., Воробьева Л. М. и Пакшина Е. В., Физиол. раст. **4**, 124, 1957.
4. Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
5. Lynch H., French C. S., Carnegie Instit. of Washington, Year Book, **54**, 166, 1954—1955.
6. Livingston R., Pariser R., J. Am. Chem. Soc. **70**, 1510, 1948.
7. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., ДАН **91**, 343, 1953.
8. Duysens L. N. M., Science **120**, 353, 1954; **121**, 210, 1955.
9. Coleman J. W., Holt A. S., Rabinowitch E., Science **123**, 795, 1956.
10. Kok B., Biochem. biophys. acta **22**, 399, 1956; Белл Л. Н., ДАН **107**, 329, 1956; **113**, 695, 1957.
11. Streler B. L., Lynch V. H., Science **123**, 462, 1956; Arch., Biochem. Biophys. **70**, 527, 1957.
12. Witt H. T., Naturwissenschaften **3**, 72, 1955.
13. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., ДАН **98**, 1017, 1954.

REVERSIBLE PHOTOREDUCTION OF CHLOROPHYLL AND SENSITIZED REACTIONS IN THE HOMOGENATES OF SUGAR BEET LEAVES

L. M. VOROBIEVA and *A. A. KRASNOVSKY*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

By illumination of sugar beet leaves homogenates in the presence of sodium ascorbate there occur reversible changes of the optical density in the red absorption maximum of chlorophyll which is to be attributed to its reversible photochemical reduction.

In such homogenates from the leaves of various plants (as well as in a colloidal solution of chlorophyll *a* + *b)* containing sodium ascorbate there occurs photosensitized reduction of safranin, methyl red and of riboflavine which presumably involves the same elementary mechanism as the photosensitized reactions in solutions proceeding through intermediate photoreduction of chlorophyll.

The above effects of photoreduction and of sensitization greatly depend on the physiological state and the species of the plant from which the homogenate has been prepared.

Доклады Академии наук СССР
1958. Том 122, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и А. В. УМРИХИНА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ДВУХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ДОНОРОВ ЭЛЕКТРОНА ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ПОРФИРИНОВ И ХЛОРОФИЛЛА В ВОДНЫХ СРЕДАХ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 18 VI 1958)

Фотохимическое восстановление хлорофилла в наиболее отчетливой форме наблюдается в случае применения аскорбиновой кислоты в качестве донора электрона ($E'_0 = +0{,}05$ в), тогда как выделение кислорода воды, происходящее при фотосинтезе, соответствует величине $E'_0 = +0{,}8$ в. Поэтому следует выяснить пределы окислительно-восстановительного потенциала систем-доноров электрона, способных к фотохимическому взаимодействию с хлорофиллом и его аналогами.

При исследовании фотосенсибилизированной полимеризации метилметакрилата ([1]) мы обнаружили, что система хлорофилл — соединения двухвалентного железа при освещении красным светом инициирует полимеризацию. Это указывает на возможность элементарного фотовосстановления — переноса электрона от Fe^{2+} к возбужденной молекуле хлорофилла с образованием ион-радикала (восстановленной формы хлорофилла), согласно схеме: $X + Fe^{2+} \rightleftarrows X^- + Fe^{3+}$ (где X — молекула хлорофилла).

Величина E'_0 для Fe^{3+}/Fe^{2+} составляет $+0{,}78$ в, т. е. близка к величине E'_0 системы O_2/H_2O.

В работах нашей лаборатории было показано, что окисленный и восстановленный цитохром с ($E'_0 = +0{,}26$ в) способен к сенсибилизированным хлорофиллом окислительно-восстановительным превращениям ([2]).

Ранее было показано, что порфирины способны к обратимому фотовосстановлению ([3]), однако следовало проверить способность этих пигментов восстанавливаться аскорбиновой кислотой в водных средах. Опыты показали, что при фотовосстановлении гематопорфирина аскорбиновой кислотой в водных растворах серной кислоты образуется восстановленная форма с максимумом поглощения при 500 мμ; исходный порфирин в этой среде в области 450—600 мμ имеет два максимума поглощения — при 590 и 545 мμ (рис. 1*а*). Обратная реакция в присутствии воздуха и в темноте идет медленно.

В случае протопорфирина также наблюдается обратимое образование восстановленной формы с максимумом поглощения при 500 мμ, но реакция идет значительно медленнее, чем с гематопорфирином (рис. 1*б*).

Фотопотенциометрические исследования системы гематопорфирин (протопорфирин) — аскорбиновая кислота в водной кислой среде показали, что при освещении наблюдаются быстрые обратимые изменения потенциала платинового электрода в отрицательную сторону на 100—150 мв, что свидетельствует об образовании активных фотопродуктов, отдающих электрон платиновому электроду (рис. 2*а*). Эти опыты аналогичны изменению фотопотенциала в системе хлорофилл — аскорбиновая кислота в пиридине ([4]).

Однако ни с одним из исследованных соединений железа (оксалат железа; $FeSO_4$, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, $K_4Fe(CN)_6$ и др.) не удалось наблюдать спектральных изменений гематопорфирина и протопорфирина после периода освещения, возможно, из-за быстро идущей обратной реакции. В при-

сутствии соответствующих солей трехвалентного железа происходило медленное необратимое фотоокисление порфиринов. Электрометрические опыты с порфиринами в присутствии соединений Fe^{2+} не показали изменения потенциала электрода при освещении. Лишь с оксалатом железа

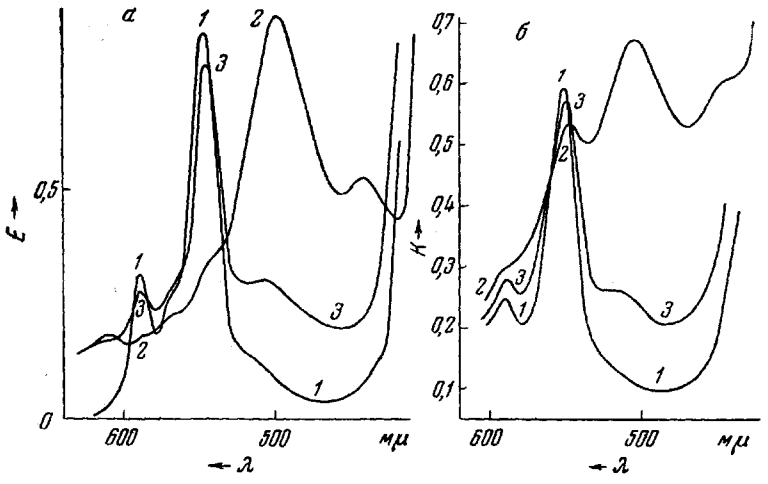


Рис. 1. Фотовосстановление порфиринов аскорбиновой кислотой (3 мг) в водном растворе 2N серной кислоты (4 мл) в вакууме при 20°. *а* — гематопорфирин, *б* — протопорфирин; *1* — исходный спектр раствора порфирина, *2* — после 10 мин. освещения через светофильтр СЗС-8 кинолампой 500 вт, *3* — после обратной реакции в темноте в присутствии воздуха

($E'_0 = +0{,}02$ в) наблюдаются быстрые обратимые изменения потенциала платинового электрода в положительную сторону на 20—25 мв. Вероятно, в данном случае электродноактивными являются образующиеся в результате реакции ионы Fe^{3+}, воспринимающие электрон от платинового электрода, тогда как восстановленная форма пигмента, по-видимому, менее электродноактивна в данной системе (рис. 2*б*). Следует указать, что в опытах Рабиновича с системой тионин — Fe^{2+} [5] наблюдались изменения фотопотенциала электрода в «отрицательную» сторону, что соответствует результатам опытов с аскорбиновой кислотой.

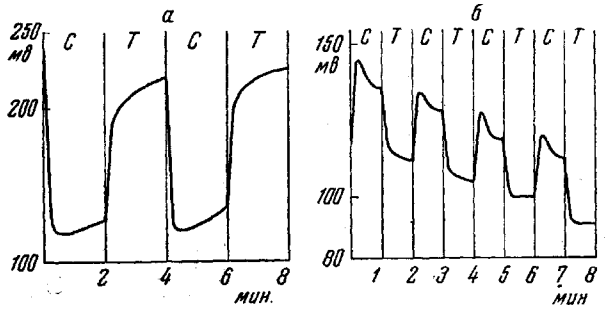


Рис. 2. Изменение фотопотенциала платинового электрода в растворе гематопорфирина в 0,01 N H_2SO_4 (4 мл). *а* — с аскорбиновой кислотой (2 мг), *б* — с оксалатом железа (2 мг). Освещение кинолампой 500 вт через светофильтр СЗС-8; *С* — свет, *Т* — темнота

Другим экспериментальным подходом к обнаружению фотохимического взаимодействия пигмента с донором электрона является фотосенсибилизированное пигментом восстановление различных акцепторов электрона. В этих опытах были исследованы тройные системы: пигмент — донор электрона — акцептор электрона. В качестве донора электрона были использованы аскорбиновая кислота и вышеперечисленные соединения Fe^{2+}, а в качестве акцептора — необратимо восстанавливающийся азокраситель, метиловый красный [6].

Как показали измерения, при освещении системы порфирин — аскорбиновая кислота (или соединения Fe^{2+}) — метиловый красный происходит быстрое восстановление этого красителя (рис. 3). После окончания сенсибилизированного восстановления метилового красного спектральных изменений порфиринов с солями железа не происходит (рис. 4). С протопорфирином картина аналогична. В случае аскорбиновой кислоты после окончания сенсибилизированного восстановления метилового красного при дальнейшем освещении наблюдается восстановление гематопорфирина с образованием его восстановленной формы (рис. 4). В присутствии солей Fe^{3+} наблюдается крайне медленное падение оптической плотности в максимуме метилового красного. В данном случае донором электронов, вероятно, являются ионы Fe^{2+}, образующиеся в результате фотоокисления порфиринов ионами Fe^{3+}. В системе гематопорфирин—метиловый красный (в 1 N H_2SO_4) не наблюдается восстановления метилового красного, либо восстановление его незначительно (в 0,01 N H_2SO_4).

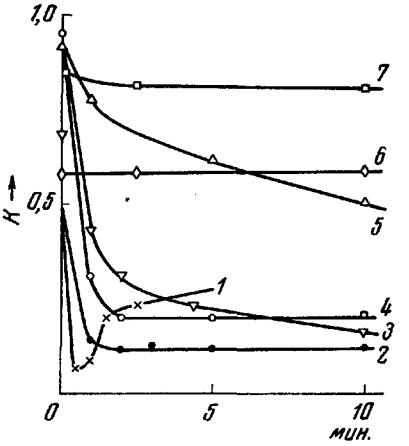


Рис. 3. Скорость сенсибилизированного восстановления метилового красного в водных растворах гематопорфирина в присутствии аскорбиновой кислоты или солей двухвалентного железа (изменения оптической плотности в максимуме поглощения метилового красного при 520 мμ). 3 мг донора электрона в 4 мл 0,5 N H_2SO_4. Освещение через светофильтр ОС-13 кинолампой 500 вт. *1* — аскорбиновая кислота, *2* — сернокислое железо, *3* — оксалат железа, *4* — железоаммиачные квасцы, *5* — $K_4Fe(CN)_6$, *6* — без донора электрона, *7* — щавелевая кислота

Для того чтобы проверить возможность использования Fe^{2+} в реакциях этого типа, идущих с участием хлорофилла, мы исследовали водные коллоидные растворы хлорофилла и гомогенаты листьев сахарной свеклы.

Оказалось, что как коллоидные растворы, так и гомогенаты обладали фотосенсибилизирующим действием: при освещении через красный светофильтр КС-11 наблюдается восстановление метилового красного в присутствии оксалата железа. Контрольные опыты без оксалата железа с щавелевой кислотой дали отрицательные результаты. Эти опыты соответствуют работам нашей лаборатории, в которых было показано фотосенсибилизирующее действие аналогичных систем в реакциях переноса водорода ([7]). Полученные результаты указывают на возможность фотохимического взаимодействия порфиринов с Fe^{2+}, которое можно проследить методом сенсибилизированного восстановления метилового красного. Нам не удалось обнаружить устойчивых фотопродуктов взаимодействия гематопорфирина (протопорфирина) с соединениями железа. Электрометрические измерения дают положительные результаты только в случае применения оксалата железа в качестве донора электрона, имеющего величину E'_0, близкую к аскорбиновой кислоте (+0,02 в).

О механизме реакции. При исследовании фотовосстановления порфиринов в водных средах аскорбиновой кислотой обнаружено, что в результате реакции наблюдается обратимое образование продукта фотовосстановления порфиринов с максимумом при 500 мμ. Электрометрические измерения дают картину, сходную с изменениями фотопотенциала растворов хлорофилла и других пигментов в пиридине с аскорбиновой кислотой. Все эти факты дают возможность предположить, что механизм фотовосстановления порфиринов аскорбиновой кислотой и элементарный механизм реакции сенсибилизированного переноса электрона в водной кислой среде сходны с фотовосстановлением хлорофилла и его аналогов в пири-

дине, изученном в работах лаборатории ([8]). Отличие заключается в том, что порфирины в кислых средах, вероятно, существуют в виде положительно заряженных ионов и восприятие электрона системой сопряженных связей молекулы пигмента ведет к образованию положительно заряженных ион-радикалов. Возможно, что при реакции сенсибилизированного восстановления метилового красного соединениями железа сохраняется тот же элементарный механизм, что и при сенсибилизированных хлорофиллом реакциях. Однако, как мы уже указывали, не удается обнаружить обратимых спектральных изменений порфиринов при взаимодействии с соединениями железа, что может быть связано с быстрым обращением фотопроцесса. В реакциях этого типа можно ожидать образования промежуточных комплексов ионов железа с молекулой пигмента, в которых в результате действия света может идти перенос электрона от иона железа к системе сопряженных связей порфиринового ядра, и обратный процесс может идти в комплексе до его распада с образованием фотопродуктов. Требует исследования возможность сходства элементарных процессов в реакциях этого типа и в фотореакциях железосодержащих производных хлорофилла, изученных в работах Б. Я. Даина с сотр. ([9]).

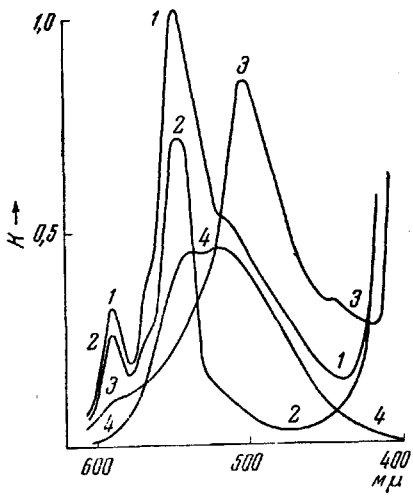


Рис. 4. Изменение спектров поглощения растворов гематопорфирина и метилового красного в процессе фотореакции в присутствии восстановителей. 3 мг аскорбиновой кислоты или 3 мг сернокислого железа. 4 мл 0,5 *N* H_2SO_4. Освещение через светофильтр ОС-13 кинолампой 500 вт. *1* — исходный спектр раствора гематопорфирина и метилового красного, *2* — спектр раствора после 15 сек. освещения с аскорбиновой кислотой или 5 мин. освещения с сернокислым железом (соответствует спектру гематопорфирина из-за полного восстановления метилового красного), *3* — спектр раствора после 5 мин. освещения с аскорбиновой кислотой (соответствует спектру восстановленной формы гематопорфирина), *4* — дифференциальный спектр (соответствует спектру метилового красного (*1*—*2*))

Итак, в результате проведенного исследования обнаружена способность порфиринов к обратимому фотовосстановлению в водных кислых растворах и их участие в фотосенсибилизированных реакциях переноса электрона от ионов железа и аскорбиновой кислоты к азокрасителю метиловому красному; показано участие хлорофилла в реакциях этого типа.

В заключение приносим благодарность акад. А. Н. Теренину за внимание к работе.

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

Поступило
3 VI 1958

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **104**, 440 (1955); Биофизика, **3**, № 5 (1958). [2] А. А. Красновский, ДАН, **103**, 283 (1955); А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, **1**, 120 (1956). [3] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **96**, 1209 (1954); А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **120**, № 3 (1958). [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950); В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953). [5] E. Rabinowitch, J. Chem. Phys., **8**, 551 (1940). [6] J. Bohi, Helv. Chim. Acta, **12**, 121 (1929); J. C. Ghosh, S. B. Sen-Gupta, J. Ind. Chem. Soc., **11**, 65 (1934); R. Livingston, R. Pariser, J. Am. Chem. Soc., **70**, 1510 (1948). [7] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **23**, № 4 (1958). [8] А. А. Красновский, Сборн. Вопросы хим. кинетики, катализа и реакционной способности, Изд. АН СССР, 1955, стр. 92; А. А. Красновский, ЖФХ, **30**, 968 (1956); В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **98**, 1017 (1954). [9] Б. Я. Даин, М. С. Ашкинази, Тез. докл. 2-й Всесоюзн. конфер. по фотосинтезу, М., 1957, стр. 8.

Том III, вып. 5 1958

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ МЕТОДОМ ИНИЦИИРОВАНИЯ ЦЕПНОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. В. УМРИХИНА

Институт биологической химии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В работах нашей лаборатории была обнаружена и детально исследована способность хлорофилла и его аналогов к реакции обратимого фотовосстановления, в основе которой лежит элементарный процесс восприятия электрона от молекулы — донора, возбужденной молекулой пигмента с образованием пары ион-радикалов [1].

Для изучения промежуточного образования свободных радикалов наряду со спектральными методами исследования получили применение методы инициирования цепной полимеризации и электронного парамагнитного резонанса.

Ури наблюдал фотополимеризацию метилметакрилата в присутствии хлорофилла и отметил активирующее действие на этот процесс аскорбиновой кислоты [2]. Остер нашел, что при освещении ряда красителей с аскорбиновой кислотой происходит полимеризация мономеров [3]. Применение окислительно-восстановительных систем, содержащих диэнолы, для инициирования темновой полимеризации изучалось в работах Долгоплоска [4]. Метод электронного парамагнитного резонанса применили Линшитц и Вейссман для исследования «красной» фотовосстановленной формы хлорофилла [5], а Коммонер [6] и Кальвин с сотрудниками [7] — для исследования образования свободных радикалов при освещении хлоропластов.

Цель настоящего исследования — выяснить природу свободных радикалов, образующихся при фотохимических реакциях хлорофилла, его аналогов и производных, инициирующих фотополимеризацию метилметакрилата [8].

Предполагалось, что большой «коэффициент усиления», обусловленный цепным характером полимеризации, позволит обнаружить свободные радикалы в таких системах, где спектральные методы исследования оказались недостаточными.

Методы

Выделение пигментов растений. Хлорофилл $(a+b)$ был выделен из сухих листьев крапивы модифицированным в нашей лаборатории методом Цшейле [9], бактериохлорофилл — из культуры бактерий Rhodopseudomonas [10], протохлорофилл — из внутренних оболочек семян тыквы [11], фикоэритрин — из красных водорослей Callithamnion [12], феофитин получен по методу Фишера [13]. Для разделения и очистки пигменты хроматографировали на колонках из сахарозы. Цитохром *c* был выделен из сердечной мышцы быка по методу Кейлина — Хартри [14]. По этому методу цитохром получается в окисленном состоянии; восстановление вели раствором аскорбиновой кислоты, контролируя увеличение поглощения

в максимуме восстановленного цитохрома (при 550 μм). Реакцию вели в фосфатном буфере pH 8,6 при 50°; во избежание избытка аскорбиновой кислоты восстанавливали приблизительно 90% цитохрома, содержащегося в растворе.

Очистка метилметакрилата. Предварительная очистка реактивного метилметакрилата осуществлялась многократным отмыванием стабилизатора (гидрохинона) 10%-ным раствором соды до полного исчезновения розовой окраски в промывных водах (на 200 *мл* мономера обычно расходовали 4 *л* раствора соды) с последующим отмыванием водой и высушиванием над хлористым кальцием. Дальнейшая очистка достигалась перегонкой в вакууме после предварительного освещения ультрафиолетовым светом ртутно-кварцевой лампы ПРК-2 с целью связывания примесей на начальных стадиях фотополимеризации. Однако предварительное освещение ультрафиолетовым светом обычно не сказывалось на результатах опытов.

Схема опытов в растворе. 2 *мл* эфирного раствора пигмента требуемой концентрации (обычно 10^{-5} *М/л*) испаряли в вакууме в трубке Тунберга, затем вводили донор водорода (5 *мг*) и 2 *мл* смеси метилметакрилата с пиридином в отношении 3 : 1 являющимся оптимальным. Раствор в трубке обычно откачивали вакуумным масляным насосом при энергичном встряхивании и охлаждении, после чего освещали красным светом (через светофильтр RG-2 10^5 *эрг/см*^{2} · *сек*) на установке, состоящей из кинолампы 500 *вт* с конденсатором и сосуда, в котором циркулировала вода из термостата с температурой 20°.

После реакции 0,5 *мл* раствора вводили в 5 *мл* метилового спирта, и о количестве выпавшего полимера судили по нефелометрическим измерениям. Для получения отчетливых результатов ставились все варианты контрольных опытов (в темноте и при освещении) в системах мономер — хлорофилл, мономер — восстановитель. Во всех случаях контрольные опыты в темноте давали отрицательные результаты; система мономер — хлорофилл давала при освещении некоторый эффект, но значительно меньший по сравнению с системой мономер — хлорофилл — восстановитель (см. ниже).

Схема опытов в эмульсиях. Чтобы иметь возможность исследовать ряд восстановителей, растворимых в воде, реакция проводилась в эмульсиях, где хлорофилл находился в растворенном состоянии (в каплях метилметакрилата), а донор водорода — в водной эмульсионной среде. Чтобы избежать значительного светорассеяния, которым обладают мутные эмульсии обычного типа, мы разработали способ приготовления прозрачных эмульсий, в которых дисперсионной средой служил 46%-ный раствор сахарозы или 50%-ный раствор хлористого магния, имеющие тот же показатель преломления, что и метилметакрилат. В качестве эмульгатора использовали 0,5%-ный раствор яичного альбумина в $^1/_{15}$ *М* Na_2HPO_4 или 0,25%-ный водный раствор сывороточного альбумина.

В вакуумную трубку вводили 2 *мл* эфирного раствора хлорофилла с концентрацией около 10 *М/л*. После испарения эфира в вакууме добавляли 2 *мл* свежеперегнанного метилметакрилата.

В 2 *мл* белкового раствора вводили 2 *г* сахарозы и 5 *мг* донора водорода. Полученный раствор приливали к раствору хлорофилла в мономере, получали эмульсию при энергичном взбалтывании. Эмульсию «дотитровывали» водой до полной прозрачности. При этом точно уравнивались показатели преломления дисперсионной среды и дисперсной фазы. Полученная прозрачная зеленая эмульсия обладала характерной красной флуоресценцией хлорофилла. После эвакуирования с охлаждением до —10° в течение 3 мин. (при энергичном встряхивании) в вакуумной трубке эмульсию освещали красным светом 15 мин. в условиях, описанных выше. В случае активной фотополимеризации эмульсия загустевала в виде геля. При менее активной полимеризации эмульсию разрушали до-

бавлением 1 *мл* ледяной уксусной кислоты с последующим центрифугированием при 3000 *g* в течение 10 мин. для разделения фаз. В верхнем слое метилметакрилата проверяли присутствие полимера описанным выше методом.

Фотосенсибилизированная полимеризация

Система хлорофилл — донор электрона (восстановитель). В качестве доноров электронов были использованы соединения, исследованные при реакции фотовосстановления, растворимые в системе метакрилат — пиридин. Наиболее интенсивно реакция шла с аскорбиновой и диоксималеиновой кислотой. В случае применения органических кислот (янтарной, яблочной, щавелевой, уксусной, лимонной, пировиноградной), глютаминовой кислоты, сахарозы, глюкозы, пирокатехина, гидрохинона в вакууме наблюдалась полимеризация, близкая к эффекту в системе хлорофилл — мономер. В присутствии фенилгидразина полимеризацию не удалось наблюдать, хотя фотовосстановление имело место.

В эмульсиях оказалось возможным использовать ряд водорастворимых доноров, важных в биохимическом отношении. Опыты показали весьма эффективное действие диэнолов, цистеина, солей двухвалентного железа (щавелевокислого, сернокислого, соли Мора), которые находились в эмульсии, приготовленной на фосфатном буфере, вероятно, в виде основных фосфорнокислых солей. Контрольные опыты с соответствующими солями трехвалентного железа и контрольные опыты на анионы этих солей дали отрицательные результаты.

Наиболее интересен результат опытов с солями двухвалентного железа. В этой реакции предполагается следующий элементарный процесс:

$$\cdot X \cdot + Fe^{++} \rightleftarrows X^{-} + Fe^{+++},$$

который, вероятно, из-за быстроты обратной реакции пока не удалось наблюдать при спектрофотометрических измерениях. Доводом в пользу возможности течения такого элементарного процесса может служить сенсибилизированное хлорофиллом окисление — восстановление цитохрома, исследованное в нашей лаборатории [15].

В качестве доноров водорода могут быть использованы также белки, действие которых наиболее удобно исследовать в эмульсии. Действительно, в эмульсиях, приготовленных на яичном или сывороточном альбумине без добавок восстановителя или окислителя, наблюдается полимеризация, несколько превосходящая полимеризацию хлорофилла в метилметакрилате. Гораздо активнее в этих реакциях был цитохром, причем окисленный и восстановленный цитохром действовал сходно. Возможно, в данных опытах инициирование является результатом взаимодействия хлорофилла с восстановленными SH-группами белка.

Все приведенные выше результаты относятся к опытам в отсутствие воздуха. Ряд опытов, проведенных без удаления кислорода воздуха, показал, что в растворах полимеризация происходит только в системе хлорофилл-аскорбиновая кислота; в эмульсиях полимеризации в присутствии кислорода воздуха (с аскорбиновой кислотой, цистеином и $FeSO_4$) не наблюдается.

Система хлорофилл — акцептор электрона (окислитель). Чтобы исследовать возможность обратимого фотоокисления молекулы хлорофилла с образованием свободных радикалов, мы применили в качестве акцепторов электрона ряд окислителей — солей трехвалентного железа и нитросоединения. Опыты проводились в растворах и эмульсиях, приготовленных на растворах сахарозы и хлористого магния. 2 *мл* раствора или 4 *мл* эмульсии с хлорофиллом (10^{-5} *М/л*) и 5 *мг* окислителя освещали 30 мин. через светофильтр КС-11. Следующие соединения дали полимеризацию,

близкую к контрольному опыту (система хлорофилл — метилметакрилат): красная кровяная соль, азотнокислый калий, сернокислое железо, сернокислый марганец, железоаммиачные квасцы (окисные), фосфорнокислое железо (окисное), щавелевокислое железо (окисное), азотнокислый калий; все нитросоединения: о-нитрофенол, динитронафталин, 2,4-динитрофенилгидразин, m-динитробензол, а также окись железа привели к полному ингибированию полимеризации.

Система донор электрона — хлорофилл — акцептор электрона. В опытах нашей лаборатории обнаружен и исследован сенсибилизированный хлорофиллом перенос электрона (водорода) от молекулы-донора к молекуле-акцептору посредством обратимо восстанавливающейся молекулы хлорофилла [16]. Наиболее изучена аскорбиновая кислота как донор электрона и рибофлавин, сафранин и пиридиннуклеотиды как акцепторы электрона. Эти соединения быстро реагируют с фотовосстановленной формой хлорофилла, воспринимая от нее электрон. В результате этой реакции образуются более устойчивые соединения, чем, по-видимому, и объясняется сравнительная медленность обратных темновых фракций в такой системе. Можно было ожидать, что введение сафранина или рибофлавина в систему хлорофилл — восстановитель — метакрилат в отсутствие воздуха будет ингибировать полимеризацию вследствие быстрой реакции свободных радикалов фотовосстановленных форм пигментов с этими акцепторами. Наши опыты подтвердили эти предположения (табл. 1).

Таблица 1

Действие сафранина и рибофлавина на полимеризацию метилметакрилата (в вакууме)

К-хлорофилла при 670 *мμ* – 1,0, К-сафранина при 540 *мμ* – 10,0, К-рибофлавина при 448*мμ* – 10,0. Длительность освещения 30 мин. К – коэффициент погашения (экстинкции) при толщине слоя 1 *см*

Пигмент	Восстановитель	Акцептор электронов	Степень полимеризации при 20°	
			свет	темнота
Хлорофилл	Аскорбиновая кислота	Рибофлавин	—	—
»	Аскорбиновая кислота	Сафранин	—	—
»	—	Рибофлавин	++	—
»	—	Сафранин	++	—
»	Аскорбиновая кислота	—	+++	—
Сафранин	»	—	++	—
Рибофлавин	»	—	++	—

Примечание. +++ гель в опытах с эмульсиями или хлопьевидный осадок в опытах с растворами; ++ однородная мутная взвесь полимера в метаноле, промеряемая на нефелометре; + следы полимера в метаноле.

Как сафранин, так и рибофлавин полностью ингибировали полимеризацию. С целью проверки возможности того, что эти соединения ингибируют инициирование полимеризации в результате взаимодействия с фотовосстановленной формой хлорофилла, но не за счет вторичных реакций обрыва цепей, были поставлены опыты по возбуждению полимеризации в системе сафранин — аскорбиновая кислота — мономер и рибофлавин — аскорбиновая кислота — мономер в области максимума поглощения этих красителей, также способных к обратимому фотовосстановлению. Оказалось, что в этих условиях рибофлавин и сафранин сами инициировали фотополимеризацию. Опыты показали, что эти соединения не ингибировали и тепловую полимеризацию метакрилата при 40° (табл. 1).

Можно было ожидать, что в аэробных условиях действие этих соединений не будет проявляться, так как конечным акцептором электронов в этой системе будет кислород, обладающий наиболее высоким значением окислительного потенциала. Действительно, в присутствии воздуха рибо-

флавин и сафранин не оказывали ингибирующего действия на фотополимеризацию. В присутствии воздуха, очевидно, инициируют полимеризацию продукты восстановления кислорода типа свободных радикалов HO_2 и OH.

Таким образом, механизм ингибирования в анаэробных условиях можно объяснить быстрой реакцией этих соединений с фотовосстановленной формой хлорофилла, которая, по-видимому, и инициирует полимеризацию.

Сравнительное исследование различных пигментов (табл. 2). Протохлорофилл в условиях опыта приводит к наиболее активной полимеризации. Действие бактериохлорофилла близко к хлорофиллу. Феофитин менее активен при этой реакции. Полученные результаты могут быть поставлены в связь с реакционной способностью восстановленных форм этих пигментов: у феофитина продукты восстановления более устойчивы, т. е. наименее реакционноспособны, чем у хлорофилла [17].

Опыты с водорастворимым гематопорфирином ставились только в эмульсиях; пигмент находился в водной фазе. Как видно из табл. 2, гематопорфирин отчетливо инициирует полимеризацию. В данном случае радикалы, генерируемые в водной фазе, видимо, инициируют процесс на фазовой границе вода — мономер.

Таблица 2

Сравнительное исследование полимеризации в присутствии различных пигментов

Опыты проводили в вакууме; 10^{-5} *М/л* пигмента, 5 *мг* аскорбиновой кислоты; длительность освещения раствора 30 мин., длительность освещения эмульсии 15 мин.

Пигмент	Донор электрона	Светофильтр	Среда	Степень полимеризации	
				свет	темнота
Протохлорофилл	аскорбиновая кислота	OG=4	раствор	++++	—
Протохлорофилл			раствор	++++	—
			эмульсия	+++	—
Хлорофилл *a* + *b*	аскорбиновая кислота	RG=2	раствор	+++	—
			эмульсия	+++	—
Хлорофилл *a* + *b*			раствор	+	—
Бактериохлорофилл	аскорбиновая кислота	RG=5	раствор	+++	—
			эмульсия	+++	
			раствор		—
Бактериохлорофилл				+	—
Феофитин *a* + *b*	аскорбиновая кислота	RG=2	раствор	++	—
			эмульсия	++	—
Феофитин *a* + *b*			раствор	—	—
Фикоэритрин	аскорбиновая кислота	ЗС=2	эмульсия	—	—
Фикоэритрин + хлорофилл	аскорбиновая кислота	ЗС=2	эмульсия	—	—
Гематопорфирин	аскорбиновая кислота	СЗС=2	эмульсия	+++	—

Примечание. +++ гель в опытах с эмульсиями или хлопьевидный осадок в опытах с растворами; ++ однородная взвесь полимера в метаноле, промеряемая на нефелометре; + следы полимера в метаноле.

В опытах с фикоэритрином, которые также ставились в эмульсиях, пигмент-хромопротеид был одновременно и эмульгатором; небольшие добавки альбумина при малых концентрациях фикоэритрина не влияли на результаты реакции. Во всех вариантах опытов не было обнаружено инициирующего действия этого пигмента, что может быть поставлено в связь с его неспособностью к фотовосстановлению, показанной в нашей лаборатории [12].

Исследования длительности жизни и природы фотопродуктов, инициирующих полимеризацию. В этих опытах применялась методика введения метилметакрилата в систему пигмент — восстановитель после окончания освещения при комнатной температуре; в другом варианте опыта система

пигмент — восстановитель — мономер освещались при —40° (т. е. в условиях, когда возможна первичная фотореакция передачи электрона [18], но отсутствуют условия развития цепной полимеризации) с последующим проявлением действия фотопродуктов — развитием темнового процесса полимеризации 20°.

Таблица 3

Инициирование полимеризации продуктами, переживающими период освещения при 20°
(в вакууме)

Пигмент	Длительность освещения перед сливом мономера, мин.			
	1	5	10	30
Хлорофилл	—	—	—	—
Протохлорофилл	—	—	—	—
Бактериохлорофилл	—	—	—	30 сек.
Феофитин	++	—	—	++

Примечание. Раствор пигмента (10^{-5} *М/л*) и аскорбиновую кислоту в пиридине вводили в нижний конец трубки Тунберга; в боковой отвод—3 *мл* метилметакрилата. После периода освещения метилметакрилат быстро переливали в пиридиновый раствор пигмента и выдерживали при 20° 30 мин.

Из таблицы видно, что эффект удается наблюдать лишь в случае феофитина, что может быть поставлено в связь с большей длительностью жизни его первичной восстановленной формы, фотохимические свойства которой были детально исследованы в работах Евстигнеева и Гавриловой [19]. В случае хлорофилла и протохлорофилла образуются более устойчивые продукты восстановления, способные к обратной реакции. Однако эти продукты не приводят к инициированию полимеризации, что связано со значительной устойчивостью и, следовательно, меньшей реакционной способностью «вторичных» восстановленных форм пигментов, тогда как активные «первичные» формы хлорофилла мгновенно претерпевают обратные реакции после выключения света.

Результаты опытов с приливанием мономера подсказали другой вариант постановки опытов с кратковременным освещением при —40°, когда возможно накопление первичных восстановленных форм лишь у феофитина; у хлорофилла, протохлорофилла и бактериохлорофилла эти формы претерпевают быструю обратную реакцию и в данных условиях, что пока не позволило измерить спектры поглощения «первичных» восстановленных форм этих пигментов.

Таблица 4

Инициирование полимеризации продуктами, переживающими период освещения
T —40°, концентрация пигмента — 10^{-5} *М/л*, аскорбиновой кислоты — 5 *мг*, темновая выдержка — 30 мин. при 20° после освещения.
Опыты в вакууме

Пигмент	Длительность освещения, мин.				
	при —40°				при 20°
	0,5	1	5	10	1
Феофитин	—	++	++	++	—
Хлорофилл	—	—	—	—	++
Протохлорофилл	—	—	—	—	++
Бактериохлорофилл	—	—	—	—	++

Результаты опытов, приведенные в табл. 4, показывают, что в этих условиях полимеризация наблюдается лишь в случае феофитина, что еще раз указывает на связь инициирования полимеризации с длительностью жизни «первичной» фотовосстановленной формы пигмента.

Опыты Евстигнеева и Гавриловой показали, что первичная восстановленная форма феофитина мгновенно реагирует с кислородом воздуха [19]. Были поставлены опыты по выяснению влияния пуска воздуха в систему на полимеризацию до и после приливания метилметакрилата. В трубку Тунберга вводили объем воздуха, равный приблизительно 0,1 *мл*, что составляло 0,02% O_2 в газовой фазе над раствором.

Таблица 5

Влияние кислорода на полимеризацию первичной формой феофитина

Концентрация феофитина -10^{-5} *М/л*, количество аскорбиновой кислоты – 5 *мг*, освещение при 20°, темновая выдержка после приливания метилметакрилата – 30 мин. при 20°

Пуск воздуха	Время освещения	Феофитин
После приливания мономера	30 сек.	++
	5 мин.	+
Перед приливанием мономера	30 сек.	—
	5 мин.	—

Введение воздуха до приливания метилметакрилата приводило к регенерации феофитина и соответственно этому ингибированию полимеризации. Существенно то, что введение O_2 после приливания метилметакрилата не влияло на ход полимеризации (табл. 5).

Эти опыты еще раз указывают на связь инициирования с образованием первичной формы пигмента. В других условиях опыта (в присутствии O_2) полимеризацию инициируют продукты сенсибилизированного окисления.

О механизме инициирования. Можно представить следующую возможную схему первичного акта инициирования цепи (X — хлорофилл, M — мономер):

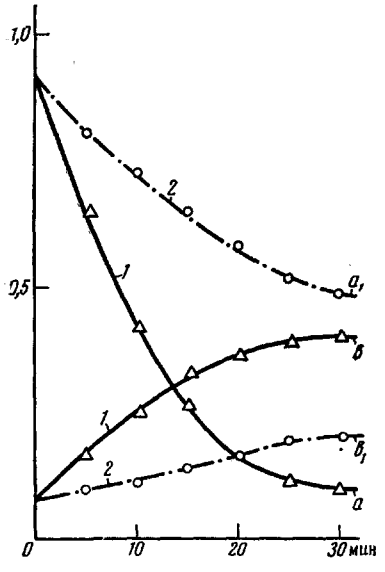
$$\dot{X}^- + M \rightarrow \dot{X}M^{\cdot} + H^+ \rightarrow HXM^{\cdot}$$

Возможность присоединения радикала хлорофилла к полимеру можно было бы установить определением количества хлорофилла в полимере при помощи спектрофотометрических измерений. Действительно, мы обнаружили хлорофилл в осадке полимера с измененным максимумом поглощения (при 655 *мμ* по сравнению с 665 *мμ* в ацетоновом растворе). Многократное перерастворение полимера в ацетоне и переосаждение метиловым спиртом не приводило к удалению хлорофилла из осадка полимера. Однако, проводя термическую полимеризацию (в темноте) метилметакрилата в присутствии хлорофилла, мы также обнаружили хлорофилл в осадке полимера. Поэтому трудно решить вопрос, является ли включение хлорофилла в полимер результатом первичного фотопроцесса или результатом вторичного захвата молекул пигмента радикалами, образующимися при цепной полимеризации.

Опыты, описанные выше, указывают на то, что в инициировании полимеризации в вакууме участвует первичная восстановленная форма пигмента, имеющая природу ион-радикала [19]. Возможность взаимодействия метилметакрилата с этим видом радикалов можно исследовать при помощи двух методов: 1) изучая кинетику фотовосстановления хлорофилла в присутствии и в отсутствие метилметакрилата; этот метод применялся в нашей лаборатории для исследования сенсибилизирующего действия хлорофилла: в присутствии молекул-акцепторов электронов замедляется образование фотовосстановленной формы хлорофилла; 2) изучая прямое взаимодействие первичной восстановленной формы с мономером, что возможно лишь в случае феофитина.

В работе были использованы оба метода. В первом случае мы вводили в систему хлорофилл — аскорбиновая кислота в пиридине 5%

метилметакрилата и изучали кинетику фотовосстановления хлорофилла по сравнению с фотовосстановлением хлорофилла аскорбиновой кислотой в чистом пиридине. Так как при интенсивном освещении не удается проследить разницу в ходе фотовосстановления хлорофилла, интенсивность света была уменьшена нейтральным фильтром НС-9 до 10^3 *эрг/см*^{2} · *сек*. Из рисунка видно, что в присутствии метилметакрилата явно замедляется падение красного максимума поглощения хлорофилла и поднятие максимума фотовосстановления формы при 525 *мμ*. Это указывает на возможность того, что метилметакрилат является акцептором электронов от фотовосстановленной формы хлорофилла.



Влияние метилметакрилата на кинетику фотовосстановления хлорофилла.

Кривые *а* и a_1 — изменение *K* при 670 *мμ* (хлорофилл); кривые *в* и *в*^{1} — изменение *K* при 525 *мμ* (фотовосстановленная форма хлорофилла); *1* — опыты в пиридине, *2* — с добавлением 5% метилметакрилата

Взаимодействие метилметакрилата с первичной формой феофитина исследовали, исходя из опытов Евстигнеева, показавших высокую реакционную способность этой формы пигмента [19; 20].

Опыты ставили следующим образом: в боковой отвод трубки Тунберга вводили 0,5 *мл* метилметакрилата, который приливали к раствору феофитина (10^{-5} *М/л*) в 4 *мл* пиридина (в нижнем конце трубки Тунберга) после 30 сек. освещения при —40°. Измерения *K* при 470 *мμ* показали, что после приливания метилметакрилата первичная форма феофитина реагировала с метилметакрилатом. При освещении пиридиновых растворов феофитина с аскорбиновой кислотой в присутствии метилметакрилата как при —40°, так и при комнатной температуре с добавлением 10%-ного D_2O, т. е. в условиях, когда замедлено образование вторичной формы [20], не удалось наблюдать тормозящего действия метилметакрилата на образование первичной формы; правда, в этих условиях, как показали наши опыты, отсутствуют и условия инициирования полимеризации.

Обсуждение

Изложенный выше материал указывает на то, что инициирование полимеризации фотохимической окислительно-восстановительной системой хлорофилл — донор электрона — метилметакрилат осуществляется путем взаимодействия ион-радикальной формы пигмента с мономером.

Следует рассмотреть и иные возможные пути инициирования за счет других типов радикалов, образование которых может иметь место при этой реакции. Таковыми могут быть: 1) метастабильная, бирадикальная форма пигмента, первичное образование которой вероятно, согласно Теренину [21], Льюису и Каша [22]:

$$X + h\nu \rightarrow X^* \rightarrow {}^{\cdot}X^{\cdot};$$

2) ион-радикал восстановителя (AH^+), также образующийся при элементарном переносе электрона:

$${}^{\cdot}X^{\cdot} + AH \rightarrow \dot{X}^- + \dot{A}H^+;$$

3) в присутствии кислорода в системе возможно образование перекисей или радикалов $\dot{O}H$ или $H\dot{O}_2$ за счет фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления кислорода.

Рассмотрим эти возможности.

Бирадикальная форма пигмента. Освещение раствора пигмента, не содержащего восстановитель, приводит к инициированию полимеризации даже в чистом метилметакрилате, без пиридина, но количество полимера в этом случае во много раз меньше, чем в системах, содержащих донор водорода. Весьма вероятно, что в этом случае полимеризация возбуждается именно бирадикальной формой пигмента. Аналогичное толкование акта инициирования фотополимеризации дается в работе [23]. Тем не менее возможно и иное объяснение: в системе пигмент — мономер возможно элементарное фотовосстановление с использованием в качестве донора электронов молекулы мономера (и вообще растворителя). Действительно, потенциометрические измерения при освещении системы пигмент — пиридин указывают на образование отрицательно заряженных электродно-активных продуктов [24]. Кроме того, окислители ингибируют полимеризацию в системе пигмент — мономер (см. выше), что может быть связано с быстрым взаимодействием фотовосстановленной формы пигмента с окислителями. Замечания Розенберга [25] о возможности инициирования полимеризации триплетным состоянием пигмента в системах, содержащих аскорбиновую кислоту, не подтверждаются эспериментально; эффективная полимеризация наблюдается только в системах, содержащих донор электрона, в качестве которого может быть использована также молекула растворителя.

Ион-радикал восстановителя ($\dot{A}H^+$). Если бы полимеризацию инициировали радикалы восстановителя, то можно думать, что природа пигмента не влияла бы на скорость полимеризации, так как во всех случаях инициирование осуществлялось бы одним и тем же типом радикалов. В действительности этого на наблюдается. Трудно ожидать активности радикала $\dot{A}H^+$ в случае образования активного радикала пигмента. В работах Долгоплоска [4] указывается, что условием инициирования полимеризации окислительно-восстановительными системами, в которых образуется пара радикалов, является образование только одного активного радикала (иначе происходит быстрая рекомбинация). Такими активными радикалами в данной окислительно-восстановительной системе являются радикалы пигмента (ион-радикальная фотовосстановленная форма); скорость полимеризации находится в связи со свойствами восстановленных форм различных пигментов в случае применения одного и того же донора водорода. Поэтому маловероятно, чтобы радикалы $\dot{A}H^+$ инициировали полимеризацию; это также соответствует известным данным о поведении окислительно-восстановительных систем, содержащих диэнолы в качестве инициирующих агентов темновой полимеризации [4].

Участие кислорода в процессе полимеризации. В присутствии воздуха наблюдается энергичная полимеризация в системе хлорофилл — аскорбиновая кислота — метилметакрилат; в этих условиях опыта трудно сомневаться в том, что полимеризация идет за счет радикалов — продуктов восстановления кислорода. Действительно, введение метакрилата в систему хлорофилл — аскорбиновая кислота — кислород после освещения, где нет фотовосстановленных форм пигментов, ведет к инициированию полимеризации.

При обычной методике эвакуирования трубок Тунберга во всех анаэробных опытах вероятно присутствие следов кислорода.

Сенсибилизированное фотовосстановление кислорода в системе хлорофилл — диэнолы может осуществляться по гипотетической схеме [26]:

$$\cdot X \cdot AH \rightleftarrows \dot{X}^- + \dot{A}H^+,$$

$$\dot{X}^- + O_2 \rightarrow \dot{X}O_2 \rightarrow X + \dot{O}_2^-,$$

$$\dot{O}^-_2 + H \rightarrow H\dot{O}_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{и т. д}$$

Если бы образование перекисей и радикалов $\dot{O}H$ и $H\dot{O}_2$ имело место в наших условиях опыта (в вакууме), то последние могли бы инициировать полимеризацию. Чтобы проверить эту возможность, мы провели опыты с тщательным удалением кислорода из реакционной системы. Это достигалось тем, что метилметакрилат освещали в боковом отводе трубки Тунберга после эвакуирования в течение 10 мин. ультрафиолетовым светом для связывания следов кислорода. Затем мономер перегоняли в нижний конец трубки Тунберга, охлаждая его до —40°. В нижнем конце трубки находился раствор хлорофилла в пиридине с аскорбиновой кислотой. В этом случае степень полимеризации была такая же, как и при стандартной постановке опыта, т. е. без столь тщательного удаления кислорода. Наконец, тот факт, что добавки кислорода (около 0,02%) к системе феофитин — аскорбиновая кислота до приливания метилметакрилата ингибируют процесс, тогда как введение воздуха после приливания метилметакрилата не оказывало такого действия, прямо указывает на активность в этих опытах первичной фотовосстановленной формы пигмента. [1]

Выводы

1. Реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла, его аналогов и производных сопровождается образованием свободных радикалов, инициирующих цепную полимеризацию метилметакрилата.

2. В отсутствие кислорода инициирование осуществляется первичными фотовосстановленными формами пигментов, имеющих природу свободных радикалов (ион-радикалов), в присутствии кислорода — перекисными радикалами, образующимися при сенсибилизированном восстановлении кислорода.

3. Наиболее энергичную фотополимеризацию в системе пигмент — донор водорода — мономер вызывают аскорбиновая и диоксималеиновая кислоты, цистеин, соединения двухвалентного железа.

В заключение приносим благодарность акад. А. Н. Терешину, Б. А. Долгоплоску и Х. С. Багдасарьяну за обсуждение вопросов, связанных с работой.

Поступила в редакцию
27. II. 1958

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Ж. физ. химии, **30**, 968. 1956; Докл. АН СССР, **60**, 421, 1948.
2. Uri N., J. Amer. Chem. Soc., **74**, 5808. 1952; Biochem. et biophys. acta, **18**, 209, 1955.
3. Oster G., Nature, **173**, 300. 1954.
4. Долгоплоск Б. Н., Тинякова Е. И., Хим. наука и пром-сть, **2**, 280. 1957.
5. Linschitz H., Weissman S. J., Arch. Biochem. and Biophys., **67**, 491. 1957.
6. Commoner B. et al., Science, **126**, 57. 1957; Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **42**, 710. 1956.
7. Sogo B., Pon G., Calvin M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **43**, 387. 1957.
8. Красновский А. А., Умрихина А. В., Докл. АН СССР, **104**, 882. 1956.
9. Zscheile F. P., Comar C. L., Bot. Gaz. **102**, 463. 1941.
10. Войновская К. К., Красновский А. А., Биохимия, **18**, 626. 1953.
11. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР, **64**, 633. 1949.
12. Красновский А. А., Евстигнеев В. Б., Брин Г. П., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **82**, 967. 1952.
13. Fischer H., Stern A., Die Chemie des Pyrrols, Leipzig, B. 2, H. 2. 1940.
14. Kellin D., Hartree E. F., В кн., Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф., Манометрические методы изучения тканевого обмена, ИЛ, стр. 335. 1951.

[1] Предварительные измерения электронного парамагнитного резонанса при освещении непосредственно в резонаторе системы хлорофил или феофитин (10^{-4} *М/л*) — аскорбиновая кислота (10^{-2} *М/л*) в пиридине в вакууме показали наличие сигнала, исчезающего после выключения света.

Эти опыты были поставлены на установке Института высокомолекулярных соединений АН СССР Е. М. Соминским, Э. Н. Казбековым и А. В. Умрихиной. Приносим благодарность проф. С. Е. Бреслеру за содействие в проведении этих измерений.

15. Красновский А. А., Войновская К. К., Биофизика, **1**, 120. 1956; Докл. АН СССР, **103**, 283. 1955.
16. Красновский А. А., Сб. «Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности», Изд-во АН СССР, стр. 92. 1955.
17. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **98**, 1017. 1954.
18. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **95**, 841. 1954.
19. Евстигнеев В. Б., Диссертация. Окислительно-восстановительные свойства хлорофилла в связи с его ролью при фотосинтезе, М. 1956.
20. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **115**, 530. 1957.
21. Теренин А. Н., Фотохимия красителей, 1947; Acta Physicochimica USSS, 18, 210. 1943.
22. Lewis G. N., Kasha M., J. Amer. Chem. Soc., **66**, 2100. 1944; Lewis G. N., Calvin M., J. Amer. Chem. Soc., **67**, 1232. 1945.
23. Koizumi M., Watanabe A., Kuroda Z., Nature, **175**, 4461. 1955.
24. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **103**, 97. 1955.
25. Rosenberg J. Z., Annual Rev. Plant Physiol., **8**, 123. 1957.
26. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия, **22**, 776. 1957.

STUDIES OF THE FORMATION OF FREE RADICALS IN THE PHOTOREDUCTION OF CHLOROPHYLL AND OF ITS ANALOGUES BY THE CHAIN POLYMERIZATION METHOD

A. A. KRASNOVSKY, A. V. UMARIKHINA

1. The reversible photoreduction of chlorophyll, its analogues and derivatives is accompanied by the formation of free radicals inducing chain polymerization of methylmetacrylate.

2. In the absence of oxygen, the induction was produced by the primary photoreduced pigment forms of a free radical nature (ion radicals); in the presence of oxygen,— by peroxyde radicals, arising in the cource of photosensitized reduction of oxygen.

3. In the «pigment — hydrogen donor — monomer» system, the most active photopolymerization was induced by ascorbic and dioxymaleic acid, cystein and the ferrous compounds.

Received: 27.II. 1958

Доклады Академии наук СССР
1958. Том 120, № 4

БИОФИЗИКА

Ф. Ф. ЛИТВИН и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ В ОБЛАСТИ 400 — 850 мμ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 4 II 1958)

Спектральные измерения флуоресценции листьев позволяют судить о состоянии и превращении пигментов и других биологически важных веществ непосредственно в живой фотосинтезирующей клетке и поэтому представляют особый интерес для биологов. Эти исследования позволили измерить максимумы флуоресценции хлорофилла непосредственно в листе и определить их положение ([1-4]). Применяя метод измерения спектров при низкой температуре, мы обнаружили ряд ранее скрытых промежуточных форм в процессах превращения протохлорофилла в хлорофилл в этиолированных и зеленеющих листьях ([5]).

В литературе нет данных о спектрах флуоресценции зеленых и этиолированных листьев в коротковолновой части видимого спектра.

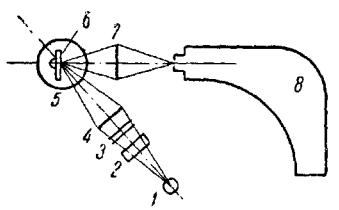


Рис. 1. Установка для фотографирования спектров флуоресценции. *1* — ртутно-кварцевая лампа СВДШ-250, *2* — тепловой фильтр, *3* — стеклянные светофильтры, *4* и *7* — конденсоры, *5* — сосуд Дюара с жидким азотом, *6* — металлический держатель объекта (листа), *8* — спектрограф ИСП-73

В данной работе нами исследовались спектры флуоресценции этиолированных и зеленых листьев в видимой и близкой инфракрасной области спектра (400—850 мμ) с применением фотографического и фотоэлектрического метода при комнатной и низкой температурах.

Для фотографической регистрации спектров использовалась установка, описанная ранее ([5]) (рис. 1). Ширина щели спектрографа обычно была в пределах 0,05—0,2 мм при экспозициях до 20 мин., пластинки типа «панинфра» и «инфрахром» (для красной и инфракрасной области). Микроспектрограммы записывались на регистрирующем микрофотометре МФ-4. Для фотоэлектрических измерений спектров флуоресценции была собрана установка, состоящая из монохроматора, фотоумножителя (ФЭУ-17), предварительного избирательного усилителя с фильтром типа Т, моста и осциллографа*. При измерении спектров вносились поправки на спектральную чувствительность установки.

Использовались зеленые листья с 5—20-дневных растений (фасоли, кукурузы, ржи и др.), выросших под люминесцентными лампами, и этиолированные листья растений тех же видов, выросших в темноте при температуре 20°. Чтобы остановить процессы образования пигментов в этиолированных листьях, они охлаждались до —150°, и их спектры фотографировались при этой температуре. Для возбуждения флуоресценции использовались ртутно кварцевая лампа СВДШ-250. Стеклянными светофильтрами выделялась либо область около 365 мμ (УФС-3), либо 365—570 мμ (СЗС-9 и СЗС-8).

Флуоресценция листьев в области 600—850 мμ исследовалась фотогра-

* Установка была собрана совместно с Ю. А. Владимировым на кафедре биофизики МГУ.

фически. На рис. 2 даны микроспектрограммы этиолированного, зеленеющего и зеленого листьев. В спектре этиолированного листа обнаруживаются

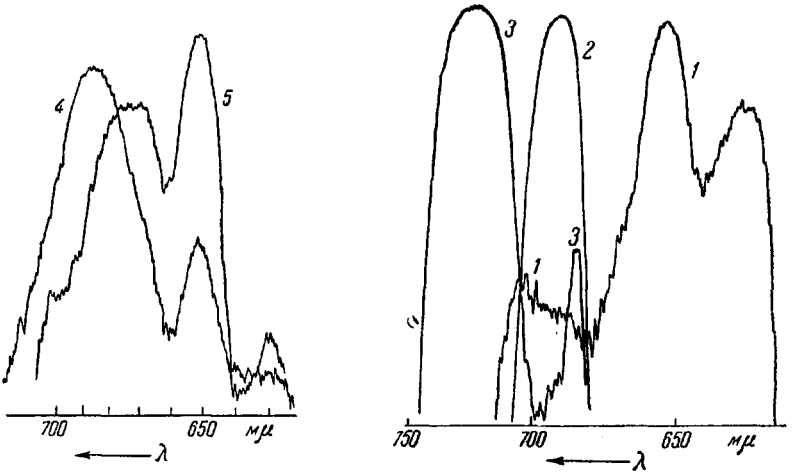


Рис. 2. Микроспектрограммы флуоресценции листьев в области 600—750 мμ. *1* — этиолированный лист фасоли (—150°); *2* — этиолированный лист фасоли после 5 мин. освещения (—150°); *3* — зеленый лист фасоли при комнатной температуре; *4* и *5* — этиолированный лист фасоли после освещения в течение 1 мин. (—150°); промежуточные стадии при разной интенсивности света. Спектры фотографировались на пластинках «панинфра», ширина щели 0,1 мм, экспозиция 10 мин.

максимумы 632, 655, 690 и 707 мμ (максимум при 655 мμ наиболее интенсивен). В первые же минуты протекания фотохимических стадий биосинтеза хлорофилла наблюдаются резкие изменения спектров флуоресценции листьев. Максимумы 655 и 707 мμ исчезают в первые минуты; максимум 632 мμ также исчезает, но медленнее. Появляется новый максимум при 690—684 мμ. Затем в течение первых часов зеленения он ослабевает и появляется максимум при 672—675 мμ, постепенно сдвигающийся в длинноволновую сторону до 680 мμ. В зеленых листьях обнаруживаются три максимума: 686, 730, 735 и 812—815 мμ, а также слабая и очень узкая полоса флуоресценции около 690 мμ, по-видимому, принадлежащая хлорофиллу или его особой форме. Охлаждение не влияет сколь-нибудь значительно на положение максимумов.

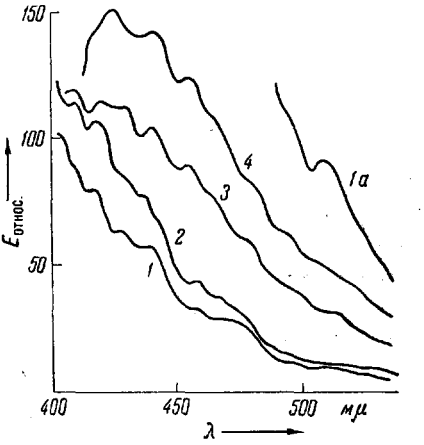


Рис. 3. Спектры флуоресценции листьев в области 400—550 мμ. *1* — этиолированный лист фасоли (—150°); *2* — этиолированный лист ржи (—150°); *3* — зеленый лист фасоли (—150°); *4* — зеленый лист кукурузы при комнатной температуре. Спектры измерялись фотоэлектрически. *1а*—участок кривой *1*, вычерченный в большем вертикальном масштабе

Спектральные исследования флуоресценции листьев в области 400—600 мμ осуществлялись фотографически и фотоэлектрически. На фоне общего ослабления флуоресценции в сторону больших длин волн обнаруживается ряд максимумов, хорошо воспроизводящихся в ряде измерений на разных объектах — при 410, 420—425, 435—440, 455—460 и 515—520 мμ (рис. 3). Общий ход спектральных кривых этиолированных и зеленых листьев несколько различен, но указанные максимумы сохраняются в обоих случаях. Охлаждение усиливает флуоресценцию, и при этом максимумы выявляются более резко.

Несколько максимумов флуоресценции обнаруживаются также и в средней части спектра (500—600 мμ). На рис. 4 представлены микроспектрограммы флуоресценции этиолированных и зеленых листьев в этой области с тремя максимумами—при 535, 555 и 595 мμ.

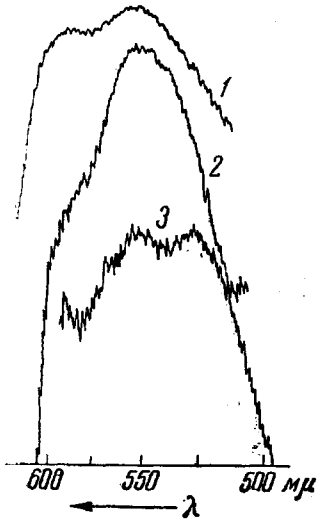


Рис. 4. Микроспектрограммы флуоресценции листьев в области 500—600 мμ. *1* — этиолированный лист фасоли (—150°), *2* —зеленый лист фасоли (—150°), *3* — зеленый лист фасоли при комнатной температуре. Кривые *1* и *2* с пластинок «панинфра», ширина щели 0,1 мм, экспозиция 20 мин, *3* — с пленки «изопанхром» чувств. 250 ед. ГОСТ, ширина щели 01 мм, экспозиция 10 мин.

Флуоресценция листьев в коротковолновой и средней части спектра усиливается по мере увеличения возраста листьев.

В наших опытах наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции листьев (400—600 мμ) под действием ультрафиолета (возбуждающий свет).

Нами исследовались также спектры флуоресценции водных и водно-глицериновых коллоидных растворов ([6]) вещества этиолированных листьев. В спектрах водно-глицериновых растворов коротковолновая флуоресценция оказалась менее интенсивной, а максимум 510—520 мμ более выражен по сравнению со спектрами листьев. (При стоянии растворов этот максимум еще более увеличивается, при охлаждении увеличивается относительная интенсивность максимума 455—465 мμ).

Положение максимумов флуоресценции при 686, 730—735 и 812 мμ согласуется с литературными данными ([1-3]); эти максимумы принадлежат хлорофиллу а, обладающему в растворах тремя максимумами, близкими к вышеуказанным по положению в спектре. Так в пиридине хлорофилл а дает максимум 675, 730—735 и 812 мμ. Относительно большое (по сравнению с растворами) смещение первого максимума объясняется реабсорбцией света флуоресценции ([3], [4]). Нами не было отмечено максимумов флуоресценции хлорофилла b в зеленых листьях, что также согласуется с данными Френча ([3]) и, по-видимому, объясняется миграцией энергии с хлорофилла b на хлорофилл а.

Таблица 1

Положение максимумов флуоресценции этиолированных и зеленых листьев в области (400—850 мμ)

Зеленые листья	Этиолированные листья	Соединения, которым принадлежит флуоресценция
410	410	Неизвестно
420—425	420—425	»
435—440	435—440	Пиридиннуклеотиды в связанной форме?
455—460	455—460	Свободные пиридиннуклеотиды или флавины?
515—520	515—520	
535	535	Продукты превращения пигментов (хлорофилла, протохлорофилла, рибофлавина)?
555	555	
595	595	
	632	Протохлорофилл (I максимум)
	655	Предшественник хлорофилла (форма протохлорофилла)
686		Хлорофилл (I максимум)
(690)	690—694	Предшественник хлорофилла (форма хлорофилла)
	708—707	Протохлорофилл (II максимум)
730—735		Хлорофилл (II максимум)
812		Хлорофилл (III максимум)

Интерпретация спектров этиолированных и зеленеющих листьев более сложна. Максимумы флуоресценции при 633 и 707 мμ принадлежат протохлорофиллу, имеющему в растворе близкие по положению максимумы; так, в пиридине эти максимумы находятся при 635 и 710 мμ. Максимумы при 655 и 690—694 мμ принадлежат, по-видимому, промежуточным фотобиохимически активным формам предшественников хлорофилла в процессе его биосинтеза ([5]). Существенно отметить что максимум 655 мμ лежит в области максимума спектра действия зеленения ([7]). Спектральные изменения флуоресценции, наблюдавшиеся нами, в основном совпадают с последовательностью изменения спектров поглощения этиолированных и зеленеющих листьев, исследованных в недавней работе Шибата ([8]). Сопоставление этих данных позволяет с уверенностью заключить о существовании по крайней мере двух промежуточных фотохимически активных форм предшественников хлорофилла. Их идентификация затрудняется чрезвычайной лабильностью этих форм, исчезающих не только под действием света, но также при экстрагировании и при нарушении нативности структур листа (нагревание).

Интерпретация спектров флуоресценции этиолированных и зеленых листьев в коротковолновой части спектра чрезвычайно трудна. Дюйзенс, исследовавший спектры флуоресценции дрожжей и водорослей, обнаружил максимум флуоресценции около 450 мμ, который он приписывает флуоресценции ДПН в связанной с апоферментом форме, так как этот максимум смещен по отношению к максимуму флуоресценции раствора ДПН (462 мμ ([9])). На полученных нами спектрах обнаруживаются максимумы как около 440, так и в области 455—460 мμ. Возможно, что это свидетельствует о присутствии как связанной, так и свободной формы пиридиннуклеотидов в листе ([10], [11]). В этой же спектральной области лежит максимум флуоресценции рибофлавина.

Помимо этих максимумов в самой коротковолновой части спектра нами обнаружены максимумы при 410 и 420—425 мμ, интерпретации которых мы не можем дать. Существенно отметить, что спектральные кривые флуоресценции дрожжей (исследованные нами совместно с Ю. А. Владимировым), в основном сходны по положению максимумов с кривыми флуоресценции листьев и, возможно, обусловлены какими-то универсальными продуктами обмена или ферментными системами. Флуоресценция с максимумами 535, 555 и 595 мμ может принадлежать промежуточным продуктам превращения флавинов, однако возможно, что эти максимумы принадлежат превращенным формам пигментов (протохлорофилла и хлорофилла). Представляет интерес сопоставление этих данных с максимумами дифференциальных спектров поглощения листьев в этой области спектра.

Таким образом, измерение спектров флуоресценции листьев в области 400—850 мμ при низкой и комнатной температурах позволило выявить новые максимумы, принадлежащие различным формам пигментов, коферментам и пока не идентифицированным веществам.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
16 I 1958

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] C. Dhere, O. Biermacher, C. R., **203**, 417 (1936). [2] C. S. French, Luminescence of Biological Systems, Washington, 1955, p. 51. [3] C. S. French, V. K. Young, J. Gen. Physiol., **35**, 873 (1952). [4] H. J. Virgin, Physiol. Plant., **8**, 389 (1955). [5] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **117**, 106 (1957). [6] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952). [7] V. M. Koski, C. S. French, J. H. Smith, Arch. Biochem. and Biophys., **31**, 1 (1951). [8] K. Shibata, J. Biochem. (Japan), **44**, 147 (1957). [9] L. M. N. Duysens, J. Amesz, Biochem. and Biophys. Acta, 24, 19 (1957). [10] H. Theorell, R. Bonnichsen, Acta Chem. Scand., **5**, 1105 (1951). [11] H. Theorell, A. P. Nygaard, Acta Chem. Scand., **8**, 1649 (1954).

ACADEMY OF SCIENCES OF THE USSR

A.N. Bach Institute of Biochemistry

A.A.Krasnovsky

THE MODE OF CHLOROPHYLL PARTICIPATION IN PHOTO-BIOCHEMICAL ELECTRON (HYDROGEN) TRANSFER

(The Report on the IVth International Congress of Biochemistry, Vienna, September, 1-6,1958)

— o O o —

Moscow
1958

The reaction of reversible photochemical reduction of chlorophyll and its analogues

One of the ways leading to the understanding of a photochemical stage of photosynthesis is the study of the changes of plant pigments under the influence of light.

In 1948 we revealed the ability of chlorophyll, its analogues and derivatives to undergo a reversible photochemical reduction with the formation of unstable photoproducts (which "store" the energy of light quanta) reacting back in the dárkness with a regeneration of the original pigment. In different media the photoreduction may be measured with the aid of a number of methods: by observing the changes in absorption and fluorescence spectra, by measuring the potential of an inert electrode and electric conductivity of the reacting system (etc.).

A comparative study of pigments of a different chemical nature showed that all porphyrin pigments, possessing central atoms of magnesium, hydrogen or zinc are liable to a photoreduction We studied chlorophyll a and b, protochlorophyll, bacteriochlorophyll, all pheophytines, different porphyrins, phtalocyanines. The photoproducts formed differ in their spectral properties and reactivity (see Fig.1). Thus, magnesium complexes of porphyrines differ from those of iron by their ability to reversible oxydoreductive transformations under the influence of light.

Carotenoides and phycobilines are unable to undergo the reactions of this type.

The characteristic peculiarity of all the pigments capable of a photoreduction is the presence of a circularily conjugated system of double bonds which probably accepts an electron after the exitation of a pigment molecule in the elementary photoreduc-

Ascorbic and dioxymaleic acids, cystein, some ferrous compounds and many other substances including some solvents can serve as hydrogen (electron) donors.

In our first paper we proposed basing on Michaelis investigations that the reaction proceeds through one-electron mechanism with the primary formation of an ion-radical pair and a subsequent proton transfer depending on the conditions of acid-base equilibrium. Thus, the reactivity and spectral properties of photoreduction products depend to a great extent on the basidity of the reaction media. The further study of the mechanism of the photoreduction undertaken in our laboratory by Evstigneev who used measuring at low temperatures, has led to the separation of a rapid stage of an electron transfer (with a formation of active primary photoreduced forms) and a slower stage of a subsequent proton uptake. The latter being also illustrated by the measurement of the reaction velocity with deuterated ascorbic acid showing the inclusion of protons into the "dark" stage of the reaction. In our experiments with Umrikhina the intermediate formation of free radicals was shown in the course of this reaction using the methods of the initiation of a chain polymerisation

It is important, that the values of the redox potential (E'_o) of the photoreduced forms of chlorophyll are near to -0,35 volts, more than the E'_o value of pyridinenucleotides indicating the possibility of the reduction of these compounds in the dark stages of the reaction.

A general diagram of the reaction is shown on the fig.2.

Chlorophyll - photosensitized hydrogen (electron) transfer accompanied by the light quanta energy storage

a. Solutions

In 1948 we found that in a solution chlorophyll is capable of photosensitizing hydrogen transfer reactions from ascorbic acid to safranin T and riboflavin. In 1949 in a collaboration with Brin we showed the possibility of a similar photoreduction of pyridinenucleotides and, later, oxydoreductive transformations of cytochrome c.

These sensitized reactions are based on the capacity of chlorophyll for a reversible photoreduction; it is confirmed by the following experimental facts:

1) the sensitized reactions are observed with those hydrogen donors which are liable to the reaction of photoreduction as revealed by different methods;

2) in the ternary pigment - donor - acceptor system the formation of photoreduced forms of the pigment usually cannot be observed because of their rapid reaction with acceptor molecules;

3) it is possible to effectuate separately the photoreduction stage and the subsequent dark stage of the reaction of an acceptor molecule with a photoreduced pigment, especially with more active primary ion-radical photoreduced forms.

Thus, as a result of the "light" stage, the excited chlorophyll molecule accepts an electron from a donor molecule and in the subsequent stage it transfer the electron to an acceptor molecule; the uptake of protons bound with the molecules of the basic solvent proceeds in accordance with the conditions of acid-base equilibrium (see Fig.3)

b. Green leaf homogenates

This trend of our investigations led us to the study of the reactions of a hydrogen transfer in biologically organized systems. Isolated chloroplasts and leaf homogenates are capable of Hill reaction proceeding in oxydative media. The ability to Hill reaction diminishes during the storing of leaf preparations at a room temperature and under the action of low concentrations of organic solvents.

In a collaboration with Vorobyova we have shown that the homogenates both capable of Hill reaction and deprived of their activity preserve in reductive media the ability to more simple photoreactions of hydrogen transfer.

These reactions are similar to those in the solutions and "store" light energy as well. It is better to observe these reactions in leaf homogenates prepared in the presence of natrium-ascorbinate, in water glycerol mixtures which are very much convenient for the spectrophotometric measurements. It is easy to

observe the photosensitized reduction of safranine T reversible in the darkness and irreversible reduction of oxygen and methylred.

Probably, here is preserved the same reaction mechanism as in the solutions, but it is necessary to establish the intermediate chlorophyll transformations.

It was possible to observe small reversible changes in the optical density of chlorophyll in homogenates in the presence of Na - ascorbate, but it is not clear yet whether they are linked with the photosensitizing action.

The state and transformations of chlorophyll in the leaves of plants

For the recent last years we studied photochemical and spectral properties of protochlorophyll, chlorophyll and bacteriochlorophyll in different photosynthetic organisms.

To fix intermediate pigment forms we employed in a collaboration with Litvin the freezing of leaves to the liquid nitrogen temperatures and the subsequent measurement of fluorescence spectra.

In the course of a chlorophyll formation from protochlorophyll in etiolated leaves we revealed differences in absorption and fluorescence spectra of freshly-formed chlorophylls and those accumulated during greening.

These measurements revealed a formation of different species of protochlorophyll and chlorophyll differing in their photobiochemical activity (see the table and Fig. 4).These data are in accordance with the recent experiments of Smith and Shibata.

There are different quantities of unstable, rapidly bleaching "monomeric" forms of chlorophyll in homogenates of leaves from different plants prepared under different conditions. These forms alter by their position of absorption maxima from more stable chlorophyll forms which we could partially separate by the centrifugation at 25 000 g.

It is plausible that in leaves there exists an equilibrium between monomeric and aggregated forms of chlorophyll bound with proteins and lipids depending on a physiological state of plants.

The participation of different forms of chlorophyll in photosynthesis is not clear yet.

In a solution "single" chlorophyll molecule is capable of participating in the processes of electron transfer. This capacity is preserved in an "assembly" of pigment molecules arranged in structures which are considered by some authors to be semiconductors with a possible migration of electrones and holes.

The work of different laboratories using methods of differential spectroscopy, spin-resonance and chemiluminescence indicates the formation of free radicals possesing different activities, linked with photochemical chlorophyll transformations and electron transfer along a chain of conjugated reactions with the participation of intermediate enzymatic systems.

On chlorophyll participation in the hydrogen (electron) transfer in photosynthesis

Thus, the establishment of the capacity of chlorophyll to a reversible photoreduction (electron acceptance) from donor molecules with a "storage" of a light energy serves as a basis for a working hypothesis that in photosynthesis chlorophyll likewise might participate in "uphill" transfer of an electron with its possible raising higher than the level of reduced pyridinenucleotides.

This hypothesis is in accord with the results of Calvin and others who showed that the carbon dioxide reduction cycle operates when "active hydrogen" (on the level of reduced pyridinenucleotides) and energy-rich phosphate esters are fed into a system. The formation of latter according to Arnon can proceed by the way of photosynthetic phosphorylation at the expence of photochemically reduced compounds and oxidants formed in the photoreactions.

Table

FLUORESCENCE MAXIMA OF LEAVES AT LIQUID NITROGEN TEMPERATURE (mμ)

green leaves	etiolated leaves	fluorescent compound
410		unknown
420-425	400-600	unknown
435-440	was not measu-	bound pyridinenucleotides?
455-460	red	free pyridinenucleotides or flavines?
515-520, 555,595		pigment transformation products?
	632	protochlorophyll
	655	active protochlorophyll
686		chlorophyll a (I max)
(690)	(690-693)	chlorophyll precursor
	708	protochlorophyll (II max)
730-735		chlorophyll a (II max)
812		chlorophyll a (III max)

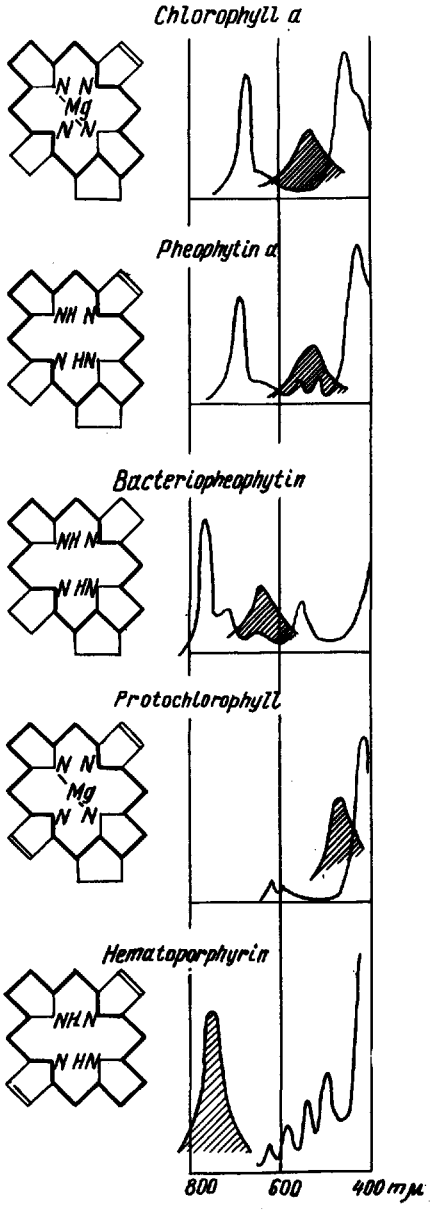


Fig. I. Structure and absorption spectra of pigments and their photoreduction products (shaded)

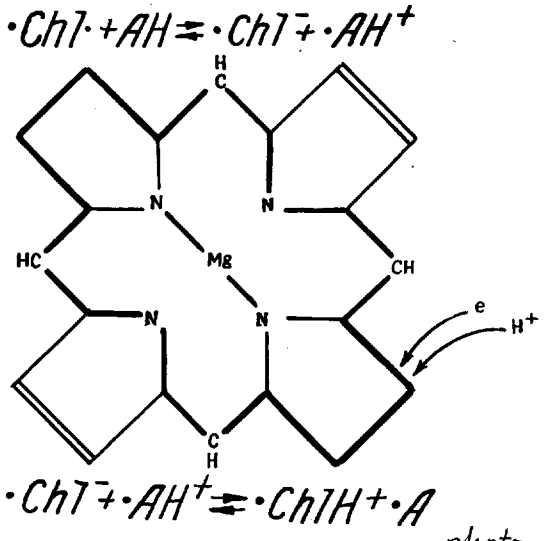


Fig. 2. A general diagram of the photoreduction of the chlorophyll

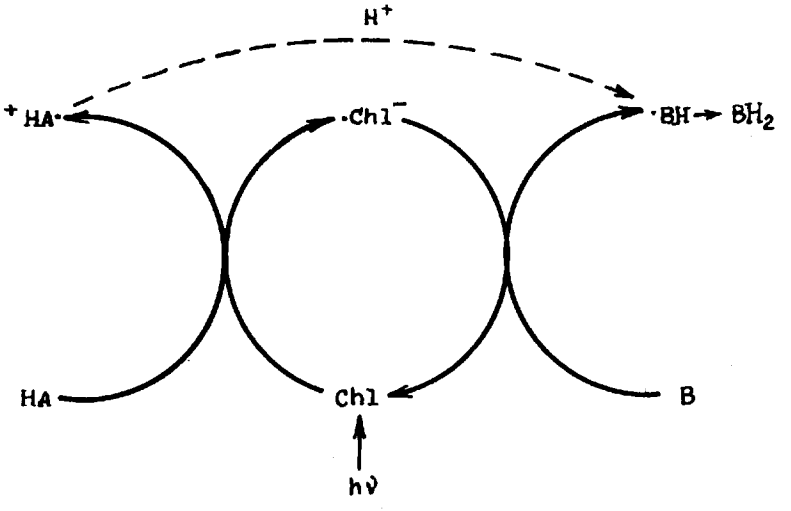


Fig. 3. — Electron transfer; ⋯ proton transfer

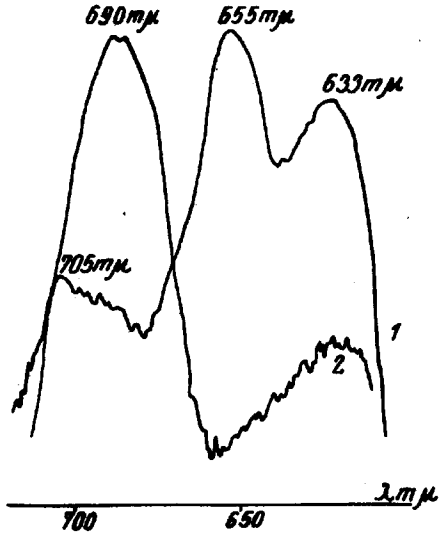


Fig. 4. The fluorescence spectra of leaves during greening. 1 - etiolated leaves
2 - after 1 min illumination

[*Reprinted from "Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957"*]

Participation of Chlorophyll in Photochemical Hydrogen (Electron) Transfer

A. A. KRASNOVSKY

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

Participation of Chlorophyll in Photochemical Hydrogen (Electron) Transfer

A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Moscow, U. S. S. R.

The Reactions of Reversible Photochemical Reduction of Chlorophyll, its Analogues and Derivatives.

In the course of photosynthesis carbon dioxide is reduced by the hydrogen of water; this process requires energy of light which is absorbed by plant pigments, primarily by chlorophyll. If chlorophyll is really involved in the chain of reactions of hydrogen (electrons and protons) transfer from water to carbon dioxide, we may expect participation of this pigment in photochemical oxydo-reductive transformations associated with "storage" of light energy in the reaction products.

In 1948 we demonstrated the ability of chlorophyll, its analogues and derivatives to undergo reversible photochemical reduction (1) with formation of unstable photoproducts (which "store" the energy of light quanta) reacting back in darkness with restitution of the original pigment. For example, when a chlorophyll solution in pyridine is illuminated in the presence of ascorbic acid, a red photoproduct is formed; in darkness a back reaction takes place with regeneration of chlorophyll (2, 2a); under the same conditions protochlorophyll formed a yellow-brown product of photoreduction (3), and bacteriopheophytin formed a green one (4). Similar spectral changes take place when chlorophyll is reduced by the Timiriazev method (5).

The photoreduction of chlorophyll in different media may be measured by a number of methods: by observing the change in absorption spectra, by measuring the potential of an inert electrode in the reaction medium, the electric conductivity of the reacting system, etc. We carried out a comparative study of the properties of chlorophyll and of other pigments—its derivatives and analogues —which showed the significance of different groups of the molecule for this reaction.

The further study of the mechanism of photoreduction by Evstigneyev and Gavrilova in our laboratory (6-10) showed that this reaction consists of two stages: rapid accepting of an electron by the pigment molecule in a long-lived triplet state (according to Terenin (11), Lewis and Kasha), and a slower dark stage of proton transfer to a primarily formed ion-radical. This mechanism was shown experimentally by a number of methods. Thus, when the reacting system is cooled to $-40°$, in the case of pheophitin the primary "brown" ion-radical form appears and is transformed, when the temperature is increased to $+20°$, to a more stable red reduced compound. Measurement of the photopotential at low and room temperature shows the primary formation of electrode-active negatively charged photoproducts (9). A measurement of the electric conductivity upon illumination of the reacting system points to the formation of ions in the process of the photoreaction (10). Finally, the chlorophyll-reductant system, when illuminated, is capable of initiating polymerization of methyl-metacrylate, which testifies to the formation of free radicals during the reaction (12).

There is stepwise formation of an active primary reduced form (whose absorption spectrum could be measured only in pheophitins at low temperatures) and of more stable secondary reduced forms found with all chlorophyll anologues and derivatives. It is important that the values of oxidation-reduction potential of the primary and secondary reduced forms are nearly the same, *viz.*, between -0.35 and -0.40 volts (9, 13). The fact that the formation of secondary reduced forms from the primarily formed ion-radical is connected with the "dark" reaction of proton transfer is confirmed by the results of experiments on the kinetics of photoreduction performed with the use of "ordinary" and deuterated hydrogen donors (14).

A comparative study of pigments of different chemical nature showed that acceptance of the electron by the activated pigment molecule takes place in a system of conjugated double bonds; all porphyrin pigments with a prophin, chlorine and bacteriochlorine structure, possessing central atoms of magnesium, zinc or hydrogen, and also the corresponding phthalocyanines are reactive.

A general diagram of the reaction is written as follows:

$$X + h\nu \longrightarrow X^* \longrightarrow \cdot X\cdot$$
$$\cdot X\cdot + AH \longrightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+$$
$$\cdot X^- + \cdot AH^+ \longrightarrow \cdot XH + \cdot A$$

X, chlorophyll molecule; AH, molecule of the hydrogen donor.

Chlorophyll-Photosensitized Hydrogen (Electron) Transfer from Donor Molecule to Acceptor Molecule.

In 1948 we found that chlorophyll in solution can photosensitize reactions of hydrogen transfer from ascorbic acid

to safranine or riboflavine (15); in 1949 we showed in collaboration with Brin (16, 16a) the possibility of similar photoreduction of pyridinenucleotides, and later, of oxydo-reductive transformations of cytochrome c (17, 17a).

These sensitized reactions are due to the capacity of chlorophyll to be reversibly photoreduced. "Storage" of light energy occurs during this reaction, and this may be characterized by the difference in redox potentials (E_0) measure of the increase in free energy of the system; the E_0 value of the donor molecule (ascorbic acid) is +0.05 v, while E_0 of the acceptor systems may be as low as −0.35 v (flavins, pyridinenucleotides). The course of the sensitized reaction can most conveniently be observed by spectrophotometric measurements. That these reactions actually involve the stage of reversible photoreduction of chlorophyll is confirmed by the following facts: *1*) the sensitized reaction is observed with those hydrogen donors which are liable to the reaction by the reversible photoreduction of chlorophyll as revealed by electrometric, spectral or other methods; *2*) in the ternary pigment-donor-H acceptor system the formation of photoreduced forms of the pigment usually cannot be observed because of their rapid reaction with acceptor molecules; these effects are clearly observed with the more active primary photoreduced form; *3*) it is possible to obtain separately the photoreduction stage and the subsequent dark reaction of an acceptor molecule with the photoreduced pigment.

The general scheme of the reaction is the following. As a result of the "light" stage the excited chlorophyll molecule (probably in the triplet state) accepts an electron from a donor molecule and in the subsequent stage it transfers the electron to an acceptor molecule; the uptake of protons bound with the molecules of base in the medium proceeds in accordance with the conditions of acid-base equilibrium. Under special ambient conditions the rate of the direct photoreactions is higher than the rate of back reactions, and it is possible to observe accumulation of reduction products of the acceptor. Most definite results were obtained when ascorbic acid was used as the hydrogen donor and riboflavin, pyridinenucleotides or oxygen as the final acceptors. Therefore, the terminal stages of the sensitized reaction stated above can be formulated as follows:

$$\cdot X^- + B \longrightarrow X + \cdot B^-\,;\ \cdot B^- + H^+ \longrightarrow \cdot BH \text{ etc.}$$
$$\cdot XH + B \longrightarrow X + \cdot BH$$

Possible Ways of Photoreaction Linkage with the Enzymatic Processes of Hydrogen (Electron) Transfer.

Thus, we see that under the influence of light, chlorophyll can participate in electron transfer. It may therefore be expected that linkage of these processes is possible with the action of oxydo-reductive enzyme systems donating electrons to chlorophyll or accepting electrons from a reduced form of the pigment so as to feed these electrons into the reaction system of stepwise carbon dioxide reduction. Various biocatalytic systems of the chloroplasts have been revealed and investigated by Sissakian (18).

The part played by biochemical systems as electron donors in the reaction of reversible chlorophyll photoreduction can be studied by the methods described above. It appeared that the following compounds can act as donors in this reaction: dienols (ascorbic and dioxymaleic acids), thiol compounds, reduced cytochrome and polyphenols. Electrons can be accepted from a photoreduced form of chlorophyll by: oxygen (13), quinones, flavins, pyridine nucleotides, cytochromes (15-17), and a wide range of compounds with values of the redox potential E ranging from +0.8 to −0.4 v. These results agree with the data published later by Vishniac and Ochoa, Tolmach and Gaffron, and Arnon, who showed that photoreduction of pyridine nucleotides can occur upon illumination of chloroplasts. The application of competitive inhibitors gives some indications as to the possible participation of dehydrogenases in the photosynthetic processes (20).

Up till now it is not clear whether a water molecule can play the role of an electron donor in reactions of this type. According to the investigations of Hill several cytochromes found in the chloroplasts can participate in processes of photosynthetic utilization of a water molecule. It is also not clear as yet whether the products of reversible photooxidation of chlorophyll by oxygen (4, 21) can participate in this process.

It has thus been possible to elucidate the mechanism of participation of chlorophyll in processes of photochemical hydrogen transfer, occuring in solution, in model systems. The mode of action of chlorophyll remains to be studied directly in living photosynthesizing organisms. For this purpose it is important to elucidate the structural organization and enzymatic properties of chloroplasts and the actual state of pigments in plastide granules. We have detected in collaboration with Vorobyeva (22, 22a) reversible photochemical transformations of chlorophyll in homogenates of green leaves containing natural chlorophyll-lipoprotein complexes. In a number of investigations carried out in recent years (Duysens and others) using the method of differential precision spectroscopy, the appearance was demonstrated, after illumination of green leaves, of an absorption peak about 520 mμ which is close to the absorption maximum of a photoreduced form of chlorophyll. It is significant that in the studies of Coleman, Holt and Rabinovitch there was a simultaneous decrease of the maximum of chlorophyll absorption in the red, while Strehler and Linch reported that the back reaction of photoproducts with an absorption maximum at 520 mμ is associated with the phenomenon of photosynthetic chemoluminescence. But the exact nature of these spectral changes requires further investigation. Using the method of paramagnetic resonance, Commoner and other authors obtained evidence pointing to the formation of free radicals upon illumination of chloroplasts. These radicals are probably formed as a result of photochemical transformations of chlorophyll and coupled reactions of electron transfer.

The State of Pigments in Photosynthetic Organisms.

The study of pigment transformations in living organisms is intimately related to the investigation of the structural organization of chloroplasts and of the state of pigments in the granules.

We made a comparative investigation of spectral and photochemical properties of chlorophyll, protochlorophyll and bacteriochlorophyll in various organisms from the phylogenetic aspect and in relation to the process of pigment formation in plants. The experiments showed that pigments can occur in plants in different states and with different bonds (23, 24, 24a-d). Most of the chloro-

phyll and bacteriochlorophyll is present in granules in highly concentrated aggregated structures probably possessing different degrees of orderliness. This is most clearly evident in the instance of bacteriochlorophyll which, in solid films and in colloidal solution possesses an absorption spectrum (with maxima at 800, 850 and 890 mμ) closely similar to the spectrum of bateriochlorophyll in living cells of photosynthetic bacteria (25). Yet, in the homogenates from plant leaves some of the chlorophyll is present in a photochemically unstable form which is rapidly bleached in air upon intense illumination. The amount of this rapidly bleaching form depends on physiological conditions; it is different in homogenates of the leaves of different plant species (26) and is especially abundant during the process of chlorophyll formation in etiolated leaves. This series of investigations from our laboratory cannot be considered here in detail. We shall point only to the fact that chlorophyll freshly formed from protochlorophyll is rapidly bleached when illuminated. In the process of greening and chlorophyll accumulation, the absorption maximum is gradually shifted to 678 mμ and this shift is accompanied by an increase in the light-stability of the pigment. Similar conclusions were made by J. H. C. Smith. Different forms of chlorophyll in homogenates from sugar beet leaves were successfully separated with the aid of high-speed centrifuging at $2\,50\,00\times g$ (26), which led to a gradual shift of the absorption maximum of the "green solution" from 676-678 to 671-673 mμ. Centrifuging of homogenates of leaves containing small quantities of the rapidly bleaching form of chlorophyll did not result in such changes. Interesting experiments on the preparation of the chlorophyll-lipoprotein complex in a crystalline form were made by Takashima. In collaboration with Brin (27) we could show that similar crystals can be obtained from "pure" chlorophyll not containing proteins or lipids.

It is plausible that there exists in leaves an equilibrium between monomeric and aggregated forms of pigment bound with proteins and lipids; the change in intensity of chlorophyll fluorescence in living leaves which was observed in the studies of Frank, Kautsky and Wassink is probably connected with a change of the state of chlorophyll (equilibrium between the aggregated and monomeric forms) as well as with changes in the photostationary concentration of the fluorescent form of chlorophyll.

The problem of absorption of light quanta in the pigment granules is closely connected with that of energy migration between the molecules of chlorophyll and other pigments. The photochemical inertness of phycoerithrin revealed in our work is in agreement with this suggestion (28). Recently theories of energy migration are being favoured which are based on the transfer of a lone electron on the level of a triplet state. The possibility of such a mechanism of energy migration was shown by Terenin and Ermolayev who discovered the phenomenon of sensitized phosphorescence (29, 30).

A "single" chlorophyll molecule in solution is capable of participating in processes of electron transfer; this capacity is preserved in a "collective" of pigment molecules arranged structurally, which are considered by many authors as semiconductors with possible migration of electrons and of electron vacancies, or "holes". The experiments of Evstigneyev and Terenin, establishing the appearance of a potential when aggregated layers of chlorophyll or its analogues are illuminated (31), show that electron migration is possible in a layer of solid chlorophyll and that the surface molecules of this aggregate retain the oxydo-reduction properties of pigment molecules present in the "dissolved" state.

Participation of Chlorophyll in the Process of Hydrogen (Electron) Transfer in Photosynthesis.

The establishment of the mechanism of chlorophyll-photosynthesized reactions in solution and capacity for reversible acceptance of hydrogen (electron) from a donor molecule with "storage" of light energy, served as a basis for the working hypothesis that in photosynthesis chlorophyll likewise might participate in "uphill" transfer of an electron, possible being raised to the level of reduced pyridine nucleotides. This hypothesis is in agreement with Calvin's results showing that the carbon dioxide reduction cycle operates when "active hydrogen" is fed into the system on the level of reduced pyridine nucleotides and of energy-rich phosphate esters, the formation of which according to Arnon, can proceed by way of oxido-reductive (photosynthetic) phosphorylation at the expense of these photochemically reduced compounds and of oxidants formed in the course of the photoreaction.

REFERENCES

1. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **60,** 421 (1948); *Zhurn. Fiz. Khim.* **30,** 968 (1956).
2. Krasnovsky, A. A., Brin, G. P., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **69,** 393 (1949); **89,** 527 (1953).

2a. Krasnovsky, A. A., Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **81,** 1105 (1951).

3. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R.* **64,** 663 (1949).
4. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **81,** 879 (1951).
5. Kosobutskaya, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **74,** 103 (1950).
6. Evstigneyev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **91,** 899 (1953).
7. Evstigneyev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **100,** 131 (1955).
8. Evstigneyev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **95,** 841 (1954); **96,** 1201 (1954).
9. Evstigneyev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **92,** 981 (1953).
10. Evstigneyev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **103,** 97 (1955).
11. Terenin, A. N., *Acta Physicochim. U. R. S. S.* **18,** 210 (1943); *Izvest. Akad. Nauks. S. S. S. R. Ser. Biol.* No. 3, 369 (1947).
12. Krasnovsky, A. A., and Umrikhina, A. V., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **104,** 882 (1955).
13. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **73,** 1239, (1950).
    Evstigneyev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **98,** 1017 (1954).
14. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **96,** 1025 (1954).
15. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **61,** 91 (1948).
16. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* 325 (1949).

16a. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **87,** 109 (1952).

17. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **103,** 283 (1955).
17a. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Biofizika* **1,** 120 (1956).
18. Sisakyan, N. M., "Fermentativnaya aktivnost protoplazmennikh struktur" *Izvest. Akad. Nauk S. S. S. R.* 1951; *Izvest. Akad. Nauk S. S. S. R. Ser. Biol.* No. 5-6 (1956).
19. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **58,** 1087 (1947); *Biokhimiya* 4 (1957).
20. Sisakyan, N. M., Krasnovsky, A. A., Mikhailova, E. S., and Brin, G. P., *Biokhimiya* **18,** 725 (1953).
21. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **58,** 617, 835 (1947).
22. Krasnovsky, A. A., and Vorobyeva, L. M., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **104,** 440 (1955).
22a. Vorobyeva, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimiya,* **21,** 125 (1956).
23. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **69,** (1948); **95,** 611 (1954).
24. Krasnovsky, A. A., and Kosobutskaya, L. M., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **85,** 177 (1952); **91,** 343 (1953).
24a. Krasnovsky, A. A., Kosobutskaya, L. M., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **92,** 1201 (1953).
24b. Kosobutskaya, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimiya* **19,** 37 (1954).
24c. Vorobyeva, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimiya* **21,** 126 (1956).
24d. Krasnovsky, A. A., Nesterovskaya, E. A., and Goldenberg, A. B., *Biofizika* **1,** 328 (1956).
25. Krasnovsky, A. A., Voinovskaya, K. K., and Kosobutskaya, L. M., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **85,** 389 (1952).
26. Krasnovsky, A. A., Vorobyeva L. M., and Pakshina, *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S. S. S. R.* **4,** 124 (1957).
27. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **95,** 611 (1954).
28. Krasnovsky, A. A., Evstigneyev, V. B., Brin, G. P., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **82,** 947 (1952).
29. Terenin, A. N., and Ermolayev, V. A., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **85,** 547 (1952); *Trans. Faraday Soc.* **52,** 1042 (1956).
30. Terenin, A. N., *Radiotekh. i Elektron.* **1,** 1127 (1956).
31. Evstigneyev, V. B., and Terenin, A. N., *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **81,** 223 (1951).

Extrait du *Journal de Chimie Physique*, 1958, p. 968.

- I6 -

REDUCTION PHOTOCHIMIQUE REVERSIBLE DE LA CHLOROPHYLLE ET DE SES ANALOGUES ET MÉCANISME DE LA PHOTOSENSIBILISATION

par A. A. KRASNOVSKY.

[*Institut de biochimie* A. N. BACH *de l'Académie des Sciences d'U.R.S.S.*]

Traduit de l'anglais par Mme J. CYROT.

SOMMAIRE

Nous avons découvert et étudié la réaction de réduction photochimique reversible de la chlorophylle, de ses analogues et dérivés. Dans cette réaction se forment des photoproduits actifs qui « emmagasinent » l'énergie des quanta lumineux.

Il a été prouvé que l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle dans les processus de transfert photochimique d'électron (hydrogène) dans les solutions est basée sur son aptitude à donner une photoréduction reversible.

Le résultat du stade lumineux de la réaction de la chlorophylle avec une molécule donatrice d'électron, est la formation d'un pigment photoréduit. Ce pigment réagit dans un stade obscur subséquent avec la molécule d'un accepteur d'électron provoquant sa réduction. On utilise dans ces réactions l'acide ascorbique et d'autres composés comme donneurs d'électrons et comme accepteurs d'électrons, une grande variété de systèmes avec des valeurs de E_0 allant jusqu'à — 0,35 V (à pH 7).

L'étude des réactions photochimiques de la chlorophylle, à l'état naturel de liaison dans les homogénats de feuilles vertes, a montré la possibilité de telles réactions de transfert d'électron (hydrogène). La détermination du mécanisme de l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle et de ses analogues permet de prouver expérimentalement les hypothèses émises au sujet de la participation de la chlorophylle aux processus de transfert photochimique d'électron dans les photosynthèses, au sujet du mécanisme élémentaire de l'action photodynamique de la porphyrine et de la participation possible des pigments de porphyrine aux différents processus photobiologiques dans les plantes.

Un des moyens pour comprendre l'étape photochimique de la photosynthèse est l'étude des changements des pigments de plantes sous l'influence de la lumière. Déjà au XIXe siècle des recherches avaient été faites dans ce domaine; ainsi, par exemple, Claude BERNARD, GAUTIER et TIMIRIASEV ont montré le rôle possible de changements par réduction reversible de la chlorophylle dans la photosynthèse. Le fait, découvert par nous [1], que la chlorophylle et des produits analogues peuvent subir une photoréduction reversible, est en rapport avec ce type de problèmes. Cette réaction est accompagnée de la formation de photo-produits actifs, « emmagasinant » l'énergie des quanta lumineux, réagissant de façon réversible après arrêt de l'irradiation, avec formation d'une molécule du pigment initial. Nos recherches ont montré que l'action photo-sensibilisatrice de la chlorophylle en solution est basée sur l'aptitude des pigments à photo-réduction reversible et il est à présumer qu'elle est en relation avec la participation de pigments de cette classe dans les processus photobiologiques.

Dans les travaux que nous décrivons ci-dessous, nous avons fait une étude comparative des propriétés de la chlorophylle, de produits analogues et de dérivés, qui permet de se rendre compte de l'influence de diverses substitutions dans une molécule de pigment, comme aussi de la nature de l'atome central métallique, sur les propriétés photochimiques. Nous avons étudié des pigments dérivés de différents organismes et purifiés par chromatographie, aussi bien que des pigments sous forme de composés protéiniques naturels en respectant leurs structures biologiques (suspension de granules).

Nous avons étudié la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* des plantes vertes, la bactériochlorophylle des bactéries photosynthétiques, la protochlorophylle de feuilles fanées et de graines de citrouille, certaines phéophytines, diverses porphyrines, phtalocyanines et phycobilines d'algues.

Le présent mémoire passe rapidement en revue nos recherches; nous ne pouvons donner ici une bibliographie détaillée des travaux effectués dans ce domaine, ni décrire en détail les techniques des expériences. Nous avons utilisé surtout des méthodes spectrales en particulier la spectrophotométrie photoélectrique dans des tubes à vide.

I. — Étude de la réaction de photoréduction réversible.

Mesures spectrophotométriques. — Une illumination de courte durée, par de la lumière rouge

(en l'absence d'air), de solutions dans la pyridine de chlorophylle et de produits analogues avec de l'acide ascorbique provoque la formation de produits de photoréduction de couleur différente

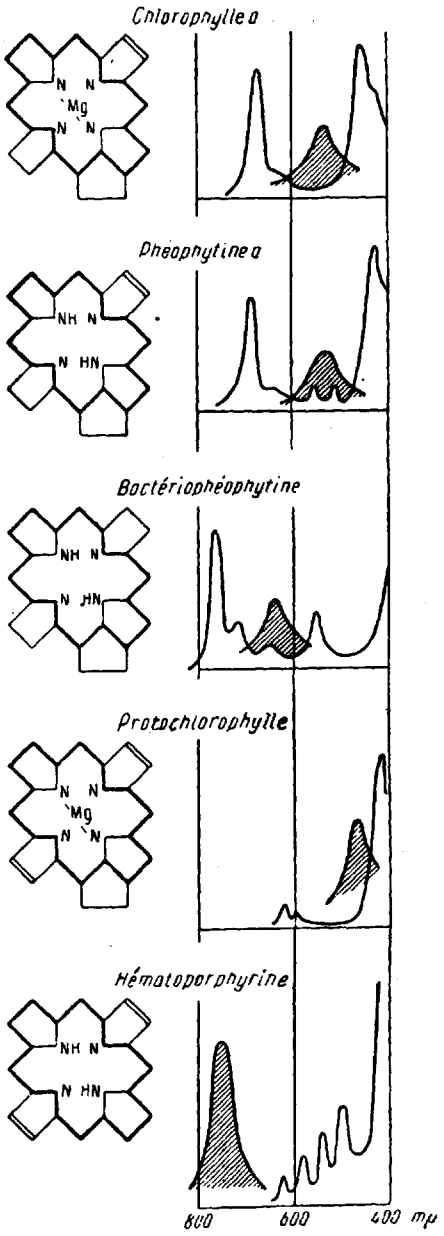


Fig. 1. — Représentation schématique de la structure et des spectres d'absorption des pigments (dans la pyridine avec de l'acide ascorbique) avant réaction, après photoréduction et après réaction inverse dans l'obscurité. Les spectres d'absorption des formes photoréduites de pigment sont ombrés (1).

de celle du pigment initial. Ainsi, la chlorophylle *a* et la phéophytine *a* donnent un photoproduit présentant un maximum pour 523 mμ (1, 2), la protochlorophylle pour 470 mμ (3), la bactériophéophytine pour 640 mμ (4), etc.

Après cessation de l'irradiation, la réaction s'inverse avec retour au spectre d'absorption du pigment initial, processus qui se produit plus rapidement lorsqu'on ajoute des oxydants. Nous avons remarqué que, contrairement à ce qui se passe pour la chlorophylle, la photoréduction de porphyrines conduit à la formation de produits absorbant dans la région spectrale de plus grande longueur d'onde. Ainsi, l'hématoporphyrine donne des produits, ayant un maximum d'absorption pour 650 et 740 mμ (5), qui se trouvent en relation d'équilibre acido-basique.

Les produits de la photoréduction présentent de la fluorescence — la chlorophylle dans la région de 550-650 mμ, la protochlorophylle à 500 mμ environ et l'hématoporphyrine à 760 mμ environ.

Mesures à basses températures. — Evstigneev et Gavrilova (6) ont montré que la vitesse de la réaction de l'acide ascorbique avec la chlorophylle est fortement réduite à — 40°, tandis que la phéophytine donne un photoproduit nouveau brun ayant un spectre différent de celui du composé réduit rouge, qui se forme à la température ambiante. Par chauffage, ce produit primaire se transforme en un composé rouge. Des résultats semblables

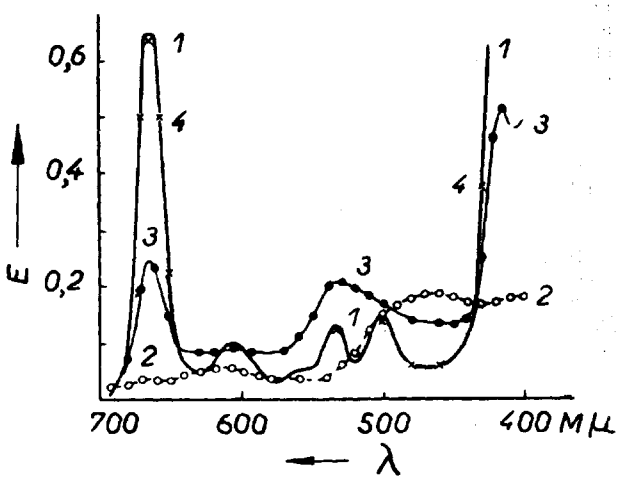


Fig. 2. — Photoréduction de la phéophytine *a* (6).
1. — Spectre d'absorption initial;
2. — après irradiation à — 40°;
3. — à + 20°;
4. — après réaction inverse dans l'obscurité.

ont été obtenus dans le cas de la protéophéophityne et de l'hématoporphyrine. Dans le cas de la phtalocyanine de magnésium la réaction est rapidement reversible à la température ambiante, mais à — 70° on peut mesurer le spectre d'un photoproduit qui est la forme « secondaire » réduite (7) semblable à la

forme « rouge » de la chlorophylle. Il a été impossible jusqu'à présent de mesurer le spectre de la forme photoréduite primaire de la chlorophylle (semblable à la « forme brune » de la phéophytine) en raison de la rapide reversibilité de l'acte primaire de fixation d'un électron par les complexes pigments-magnésium même à basse température.

Variation du potentiel d'oxydo-réduction (E'_0) *dans une photoréaction.* — Dans le travail que nous avons effectué avec BRIN ([8]), nous avons utilisé la méthode des indicateurs d'oxydo-réduction pour suivre la variation de E_0 d'un système après réaction à la lumière. On effectuait une photoréaction de la chlorophylle avec l'acide ascorbique dans un tube à vide de THUNBERG muni d'une tubulure latérale, puis on ajoutait dans l'obscurité, aux produits de la photoréduction, des solutions de composés à E'_0 de valeurs diverses et on observait au spectrophotomètre la vitesse de la réaction inverse.

Tandis que le système chlorophylle-acide ascorbique est capable de réduire (dans la pyridine) des systèmes dont le E_0 va jusqu'à 0,05 V (bleu de méthylène), on observait après irradiation une réduction de systèmes dont le E_0 allait jusqu'à — 0,35 V (Safranine T, pyridine-nucléotides). Ces données ont été confirmées par des mesures du potentiel d'une électrode inerte dans le système réactionnel. Nous avons observé une variation rapide du potentiel

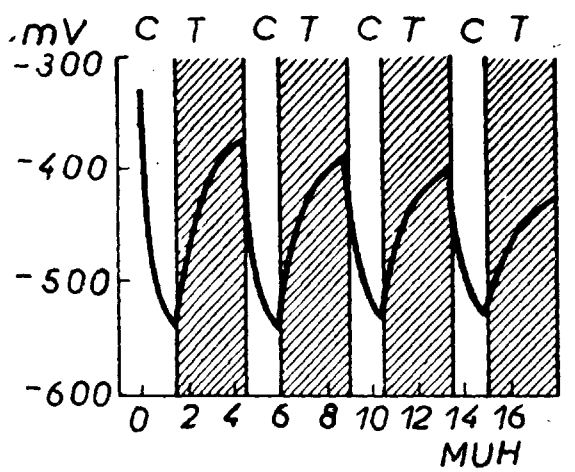


Fig. 3. — Modification du potentiel d'électrode du platine dans une solution de chlorophylle dans la pyridine avec de l'acide ascorbique ([10]) pour des périodes alternées de lumière (C) et d'obscurité (T).

d'une telle électrode par irradiation du système chlorophylle-acide ascorbique ([8]), en accord avec les expériences de RABINOWITCH ([9]) avec le système thionine-ion ferreux. EVSTIGNEEV et GAVRILOVA ont fait une étude détaillée du photopotentiel d'une électrode de platine par irradiation d'une solution réagissante ([10]). Des expériences spéciales ont montré que ce n'est pas l'irradiation de l'électrode qui détermine les photopotentiels, mais la formation de photoproduits au sein de la solution. A basse température on a observé un déplacement plus prononcé des valeurs de E_0 dû à une diminution de la vitesse de la réaction inverse, avec accroissement de la concentration stationnaire du photoproduit.

On a observé une variation de E_0 à — 70° (c'est-à-dire dans des conditions où il n'y a pas formation de la forme « rouge » de la chlorophylle); ce fait donne à penser que le potentiel est déterminé par la formation de la forme primaire réduite, active sur l'électrode et réagissant rapidement de façon reversible, de la chlorophylle et de ses analogues, étudiée par EVSTIGNEEV ([11]). Par irradiation de solutions de chlorophylle et de produits analogues avec de l'acide ascorbique, la valeur ΔE_0 se déplace du côté négatif pour atteindre — 0,35 V, ce qui concorde bien avec les expériences faites avec les indicateurs d'oxydo-réduction ([8]). Ainsi, la forme primaire réduite active sur l'électrode et les formes « rouges » ont des valeurs de E_0 voisines.

Par irradiation dans le vide du système réactionnel, on a observé une augmentation de la conductivité électrique ([12]); lorsque l'irradiation cessait, on retrouvait la valeur initiale de la conductivité électrique, ce qui prouvait la formation d'un photo-

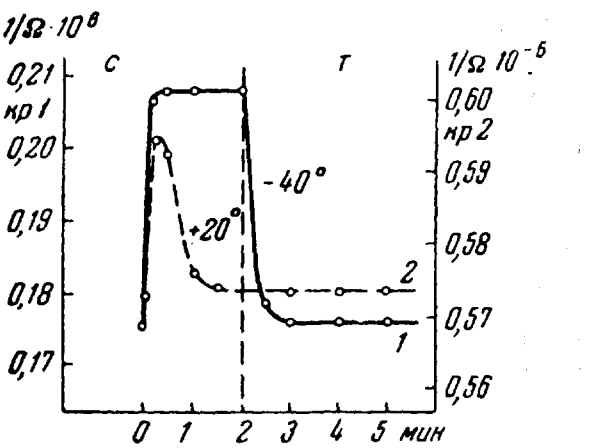


Fig. 4. — Photoconductivité d'une solution de chlorophylle *a* + *b* dans de la pyridine avec la phénylhydrazine ([12]).

produit ionique. Une comparaison qualitative de la cinétique de la photoconductivité avec l'apparition du photopotentiel à différentes températures montre que ce sont bien les produits actifs sur l'électrode qui régissent l'apparition de la photoconductivité. Ainsi, dans le cas de la phéophytine à — 40°, la photoconductivité et le photopentiel se maintiennent après que l'irradiation a cessé, tandis qu'à + 20° on observe une rapide reversibilité des effets dans l'obscurité.

Agents de réduction moléculaires (donneurs d'électrons), réagissant avec la chlorophylle et ses analogues. — Une réaction distincte, avec formation de produits de longue durée de vie, a été observée dans la pyridine lorsqu'on utilisait de l'acide ascorbique et autres diénols, de la phénylhydrazine, de l'hydrogène sulfuré et de la cystéine [1,2]. Pour étudier la formation « cachée » rapidement reversible de photoproduits primaires, il a été nécessaire de recourir à des méthodes permettant d'observer la formation de ces composés pendant la période d'irradiation; celles qui convenaient le mieux dans ce cas étaient les mesures de photopotentiel, la photopolymérisation sensibilisée ou la réduction sensibilisée d'accepteurs d'électrons, réduisant de façon irreversible.

L'hydroquinone, le pyrocatéchol, la thiosinamine et d'autres composés présentaient des variations de E'_0 vers les valeurs négatives par réaction avec la chlorophylle [11]. La méthode de polymérisation [13] a révélé que l'activité des composés ferreux pouvait être due à la réaction reversible :

$$\mathrm{Chl} + \mathrm{Fe^{++}} \rightleftharpoons .\mathrm{Chl^-} + \mathrm{Fe^{+++}};$$

l'oxydation sensibilisée du cytochrome *c* en présence de chlorophylle que nous avons observée [14] témoigne de la possibilité d'un processus reversible également dans ce cas. Ainsi, une molécule excitée de chlorophylle est en mesure de capter un électron aux systèmes ayant des E'_0 allant de — 0,05 à 0,3 V. Il est probable que la chlorophylle réagit facilement avec le cytochrome-*b*, trouvé dans les chloroplastes par HILL [15]; la valeur de E'_0 pour ce cytochrome est voisine de celle de l'acide ascorbique. Cependant la question de savoir si une molécule excitée de pigment peut capter un électron à une molécule d'eau n'est pas encore élucidée jusqu'à présent.

Emploi de donneurs deutérés. — Nous avons trouvé [16] que l'emploi d'acide ascorbique deutéré entraîne un retard de la photoréduction de la chlorophylle qui conduit à la formation de la « forme rouge »; la réaction obscure inverse est en même temps ralentie. (La réaction de HILL est également retardée lorsque la quantité de D_2O dans H_2O s'accroît.) En continuant ces recherches, EVSTIGNEEV et GAVRILOVA [17] ont trouvé que D_2O, bien que ralentissant la formation de la forme « rouge » de la phéophytine, n'affectait pas la vitesse de formation de la forme primaire photoréduite. C'est une autre preuve de la transition d'un électron pendant la formation de la forme « primaire » réduite et de la participation du proton à la formation de la forme « rouge » plus stable.

Réaction avec solvant. — PORRET et RABINOWITCH [18] ont été les premiers à découvrir les effets de la décoloration reversible de la chlorophylle. LIVINGSTON [19] a étudié la décoloration par spectroscopie par éclair et trouvé une augmentation d'absorption par 525 mμ qui correspond au maximum de la forme photoréduite de la chlorophylle. LINSHITZ et RENNERT [20] ont découvert des modifications reversibles du spectre d'absorption de la chlorophylle, en l'éclairant dans un milieu rigide à basse température.

On pourrait penser que ces effets s'expliquent par une photoréduction reversible de la chlorophylle pour laquelle les molécules de solvant agiraient comme donneurs d'électron; en fait, l'oxygène empêche les effets de reversibilité [18], tandis que le « spectre de l'état de triplet », dans les travaux de LIVINGSTON, ressemble au spectre de la forme photoréduite de la phéophytine mesuré par EVSTIGNEEV [6].

Effets des propriétés acide-base du milieu. — Il est possible d'observer dans la pyridine une formation prononcée des formes stables de la chlorophylle. Nous avons déjà suggéré [1] que cette stabilité est en relation avec les conditions d'équilibre acide-base, lorsqu'un proton est lié « entre » une molécule de pigment qui a fixé un électron et une molécule du milieu c'est-à-dire la base :

$$.\mathrm{Chl^-}\ldots\mathrm{H^+}\ldots\mathrm{N}\lessdot$$

Ces composés relativement stables ne sont possibles que lorsqu'on maintient certaines valeurs de l'affinité protonique d'une molécule de pigment et le milieu basique. La basicité optimum du milieu, à laquelle se forment les formes stables réduites, diffère selon les pigments. On pourrait s'attendre à ce que, dans un milieu plus basique que la pyridine, la formation d'ions radicaux chargés négativement (.Chl$^-$), donnant rapidement une réaction inverse, soit prédominante,

$$.\mathrm{Chl^-}\ldots\mathrm{H^+}\ldots\mathrm{N}\lessdot + \mathrm{N'}\lessdot \rightarrow .\mathrm{Chl^-} + \mathrm{H^+N'}\lessdot + \mathrm{N}\lessdot$$

Dans les milieux plus « acides », on peut s'attendre à la formation d'ions-radicaux chargés positivement par fixation respective d'un proton (.ChlH) et deux protons (.ChlH$^+_2$).

En fait nos expériences avec PAKSHINA ont montré que, si l'on ajoute quelques gouttes d'une base forte — pipéridine ou ammoniaque — à une solution pyridinique de la forme « rouge », il se produit rapidement une réaction inverse (due à l'ionisation de la forme réduite); en accord avec ce résultat l'addition de pipéridine ou d'ammoniaque à une solution pyridinique de chlorophylle empêche la formation de la forme « rouge ». Ces expériences doivent être faites rapidement et de préférence à basse température, parce qu'il suffit de 1 % de pipéridine dans la pyridine pour obtenir une coupure graduelle de l'anneau

de cyclopentanone d'une molécule de pigment. Nos expériences avec BRIN ont montré que, si la réaction est faite dans la pyridine, séchée complètement par l'hydrure de lithium, la formation de la forme « rouge »

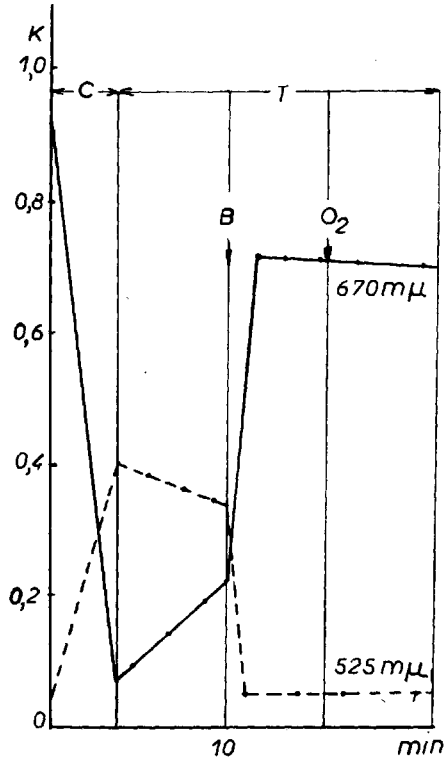


Fig. 5. — Influence des bases fortes sur la vitesse de la réaction inverse de formation de chlorophylle *a* à partir de sa forme photoréduite :
B. — introduction d'une base forte;
C. — lumière;
T. — obscurité.

se produit beaucoup plus lentement que dans la pyridine humide ordinaire, fait qui s'explique par le manque de la pyridine sèche en ions hydrogène nécessaires pour produire la forme « rouge ».

Dans le cas de l'hématoporphyrine dans des milieux fortement basiques (pipéridine), il se produit une forme réduite avec absorption maximum pour 650 mμ, tandis que, dans les solutions plus « acides » (mélanges d'éthanol et pyridine), le maximum est à 740 mμ. Par variation du pH d'un milieu, il est possible de modifier plusieurs fois et de façon réversible la position du maximum d'absorption des formes réduites. Ainsi, la transformation de la forme « 650 » en la forme « 740 » est déterminée non pas par des degrés différents d'oxydo-réduction, comme nous le supposions auparavant ([5]), mais par les conditions d'équilibre acide-base. Il faut remarquer, que lors de la réduction des pigments par le zinc, on observe une acidité optimum pour la formation des formes réduites des différents pigments ([21]).

Ainsi, nous voyons que les propriétés spectrales et l'aptitude à réagir des formes photoréduites de pigments changent énormément selon la basicité du solvant.

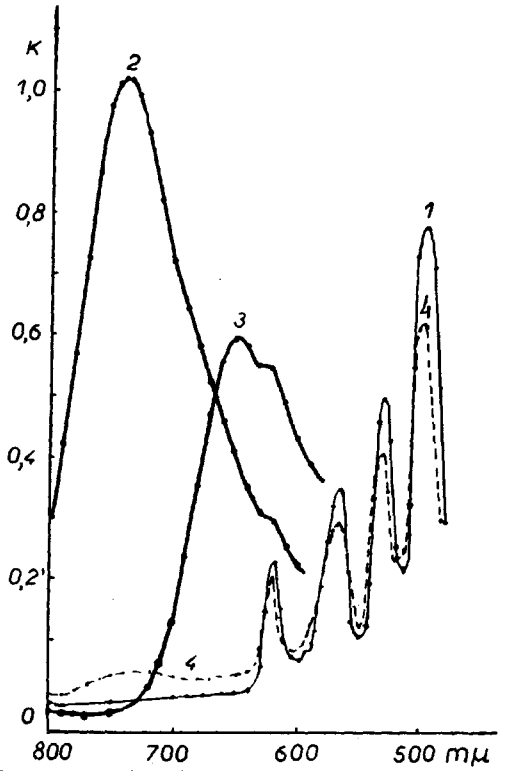


Fig. 6. — Photoréduction de l'hématoporphyrine par l'acide ascorbique dans une solution éthanol-pyridine :
1. spectre d'absorption initial;
2. après éclairage;
3. introduction de quelques gouttes de pipéridine ou d'ammoniaque à — 40°;
4. après réaction inverse dans l'obscurité.

Formation de radicaux libres dans une réaction de photoréduction. — Les molécules oxydantes (quinones, composés nitrés) éteignent la fluorescence de la chlorophylle, mais ne réagissent pas photochimiquement avec la chlorophylle, tandis que les réducteurs, en réagissant avec la chlorophylle, ne produisent pas un effet d'extinction « physique » sur la fluorescence des pigments ([22]). Ces observations prouvent la possibilité de la participation des molécules métastables de pigment à la réaction. Ces molécules sont probablement à l'état de triplet ou de biradical, conformément aux idées de TERENIN, J. N. LEWIS et KASHA, maintenant largement répandues.

Dans un acte élémentaire de photoréduction une molécule excitée de chlorophylle reçoit un électron d'une molécule donatrice avec formation d'une paire ion-radical; l'acte suivant de transfert protonique conduit à la formation de radicaux sous

forme non-ionique :

$$Chl + AH \rightleftarrows .Chl^- + .AH^+ \rightarrow .ChlH + .A$$

URI ([23]) a trouvé que, en présence d'acide ascorbique, la chlorophylle initie la polymérisation du métacrylate de méthyle. Dans nos travaux avec UMRICHINA ([13]), nous avons fait une étude de la photopolymérisation initiée par un système pigment-donateur d'hydrogène dans des solutions de pyridine et des émulsions aqueuses. Cette étude a prouvé que la polymérisation est initiée par la chlorophylle, tous ses analogues et dérivés. Les phycobilines n'affectent pas la polymérisation, ce qui est en accord avec leur inaptitude à la photoréduction. Les diénols, la cystéine, les composés ferreux étaient les donateurs d'électron les plus actifs. (A ce propos nous n'avons pas pu détecter la réaction de Fe^{++} avec la chlorophylle par d'autres méthodes.) Les composés (safranine, riboflavine), réagissant activement sur les formes photoréduites des pigments, empêchaient la polymérisation. Nous sommes arrivés à la conclusion que, dans des conditions d'anaréobie, la polymérisation est initiée par une forme réduite ion-radical du pigment, et, dans des conditions d'aérobie, par les radicaux issus de la réduction photosensibilisée de l'oxygène (OH, HO_2). Il faut noter, au sujet de l'hypothèse de ROSENBERG ([24]) relative à l'influence possible de l'état de triplet du pigment dans ces expériences, qu'on n'a observé de polymérisation active qu'en présence de molécules donatrices d'électron (y compris les molécules de solvant). LINSHITZ et WEISSMAN ([25]) n'ont pas réussi à trouver de résonance paramagnétique de la forme réduite « rouge » de la chlorophylle et on ne sait pas encore exactement à l'heure actuelle si cette forme est un radical (.ChlH) ou un produit à valence saturée ($ChlH_2$). On peut difficilement mettre en doute, cependant, que l'effet primaire d'une formation de paire ion-radical puisse être trouvé en utilisant des mesures de résonance paramagnétique au cours de l'irradiation d'un système pigment-acide ascorbique, à condition que l'installation ait une sensibilité appropriée.

Structure du pigment et son aptitude à photoréduction. — On a observé une réaction avec tous les dérivés de la chlorophylle et analogues, ayant la structure de la porphyrine, de la chlorine et de la bactériochlorine avec des atomes centraux d'hydrogène, de magnésium ou de zinc. DAIN et ses collaborateurs ([26]) ont observé la possibilité d'une photoréduction lente des complexes ferriques de la porphyrine ([18]). Les propriétés spectrales et la réactivité des formes réduites sont différentes suivant les pigments et les solvants. En général les complexes du magnésium donnent des formes réduites plus actives (réagissant rapidement de façon reversible) que les phéophytines-complexes sans magnésium. Les comparaisons de la capacité de réaction avec des pigments possédant des structures différentes indiquent que la caractéristique principale est la présence d'un système de doubles liaisons circulaires conjuguées dans une molécule de pigment.

Mécanisme de photoréduction. — Nous avons mentionné plus haut la possibilité que la transition d'une molécule excitée de chlorophylle à l'état de triplet de longue durée soit le stade primaire « photophysique ». Il est peu probable qu'il se forme des complexes intermédiaires stables de molécules donatrices d'hydrogène avec une molécule de pigment dans une solution de pyridine, parce que les molécules de la base forment des complexes stables qui se lient avec l'atome central de magnésium d'une molécule de pigment ([27]). La formation d'associations de pigment à l'état de triplet avec une molécule donatrice est beaucoup plus probable ([1]). A l'état excité une molécule de pigment présente une affinité accrue (puisqu'il y a un « trou » dans un système de doubles liaisons conjuguées) pour un électron et fixe facilement un électron d'une molécule donatrice. Nous avons déjà suggéré qu'un électron non apparié dans un ion-radical ainsi formé est déplacé dans un système de doubles liaisons conjuguées ([1]) tandis que l'acte obscur subséquent de l'addition d'un proton semble être en relation avec la localisation de la rupture de conjugaison à une certaine place qu'on n'a pas encore découverte.

Le transfert protonique est en relation avec l'établissement d'un nouvel équilibre acide-base après photoréaction. On ne sait pas encore clairement s'il se produit une disproportion des radicaux ni si la forme « rouge » est un leuco-dérivé du type ($ChlH_2$) ou un radical (ChlH), ce qui nous semble plus probable. Le premier stade d'une photoréaction — le transfert d'électron — est complètement reversible dans l'obscurité; après addition d'un proton, la réaction inverse conduit ordinairement à une régénération incomplète du pigment. Nous proposons donc le schéma de réaction suivant :

Stade photophysique :

$$Chl + h\nu \rightarrow Chl^* \rightarrow .Chl.$$

Stade photochimique :

$$.Chl. + AH \rightleftarrows .Chl.AH \rightleftarrows .Chl^- + AH^+ \rightarrow .ChlH + .A$$

II. — Réactions d'oxydo-réduction photosensibilisées par la chlorophylle.

En irradiant avec de la lumière rouge (en l'absence d'air) un système chlorophylle-donateur d'électron-

accepteur d'électron, on observe une réduction sensibilisée des accepteurs d'électron aux dépens des quanta de lumière absorbés par la chlorophylle. Tous les produits analogues à la chlorophylle capables de photoréduction possèdent une activité photosensibilisatrice ([28, 29]). Dans les cas de la bactériochlorophylle et de la bactériophéophytine, les réactions sont excitées par la lumière de la région du proche infrarouge. Dans les tubes à vide de THUNBERG on étudie commodément ces réactions par voie spectrophotométrique en observant la variation de densité optique aux maxima d'absorption de l'accepteur ou l'apparition de nouveaux maxima des composés réduits.

En utilisant de l'acide ascorbique ($E_0 = + 0{,}05$ V) comme donneur d'électron, nous avons observé la photoréduction de la riboflavine ($E_0 = - 0{,}22$ V), de la safranine-T ($E_0 = - 0{,}3$ V) ([28]), des pyridine-nucléotides ($E'_0 = - 0{,}32$ V ([29]). Lorsque la lumière est éteinte, les réactions s'inversent à des vitesses

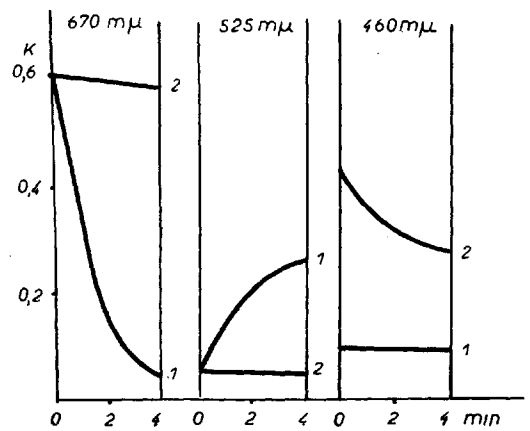


Fig. 7. — Photoréduction, photosensibilisée par la chlorophylle, de la riboflavine par l'acide ascorbique dans la pyridine (dans le vide).
1. système chlorophylle-acide ascorbique;
2. chlorophylle-acide ascorbique-riboflavine. Modification de la densité optique par éclairage en lumière rouge.
Chlorophylle (670 mμ), forme photoréduite de la chlorophylle (520 mμ) riboflavine (460 mμ).

différentes, exigeant parfois l'introduction d'oxygène pour la régénération du colorant à partir de la forme leuco. Ces réactions sont accompagnées, par «stockage» d'énergie lumineuse, d'un accroissement de l'énergie libre du système, caractérisé par une différence dans les valeurs E'_0 du donneur (+ 0,05 V) et de l'accepteur d'électron (— 0,32 V), que l'on peut grossièrement estimer à :

$$\Delta F = 2 . 23{,}06 . 0{,}4 \doteq 18{,}4 \text{ kcal.}$$

La lenteur comparative de la réaction inverse dans les processus que nous avons étudiés, pourrait s'expliquer par la dismutation rapide des semiquinones initialement formées en leuco-composés plus stables; par irradiation la vitesse de dismutation est plus grande que celle des réactions inverses des photoproduits primaires. Nous avons réussi à observer dans des milieux aqueux une oxydo-réduction du cytochrome sensibilisée par la chlorophylle *a* ([14]). Dans cette réaction les protéines (ou l'eau?) pouvaient servir de donneur d'électron, tandis que la photoxydation du cytochrome réduit s'effectuait en présence de l'oxygène de l'air.

Dans un certain nombre de réactions sensibilisées, effectuées dans des conditions d'aérobie, l'oxygène est l'accepteur d'électron final.

L'oxydation d'un certain nombre de composés organiques, sensibilisée par la chlorophylle, est connue depuis longtemps, mais, jusqu'à présent, l'unanimité ne s'est pas faite en ce qui concerne le mécanisme de ce processus. Dans nos expériences avec BRIN, nous avons observé, au moyen de la technique manométrique de WARBURG, la photoxydation d'un certain nombre de donneurs d'hydrogène, capables de photoréduction de la chlorophylle et de la phéophytine ([30]). Il est possible que le stade obscur de la réaction se limite à la régénération par l'oxygène de la chlorophylle à partir de sa forme photoréduite. L'autre mécanisme est moins probable d'une formation primaire de peroxyde de chlorophylle avec pour acte obscur la réduction de ce peroxyde par un donneur d'hydrogène, bien que nous ayons observé des produits instables de photoxydation de la chlorophylle et de la bactériochlorophylle, réagissant (lentement) sur l'acide ascorbique avec régénération du pigment ([4, 31]). Il se peut qu'une photoréaction de la chlorophylle avec un donneur

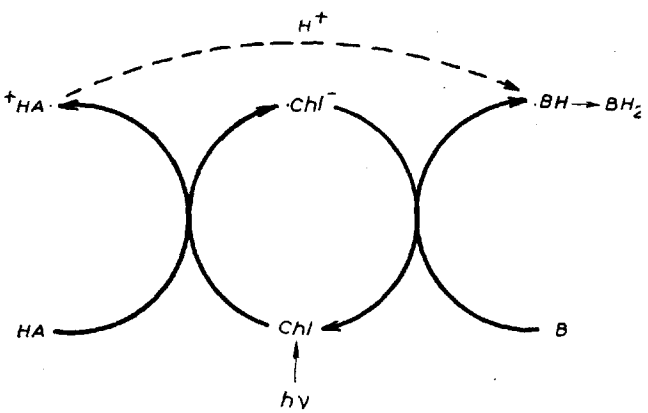


Fig. 8. — Schéma du mécanisme de l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle.
—— transfert d'électron
---- transfert de proton.

d'hydrogène se produise beaucoup plus rapidement qu'une photoréaction avec de l'oxygène.

Les faits suivants prouvent que les réactions

sensibilisées étudiées passent par le stade d'une photoréduction reversible pigment-sensibilisateur.

1) On observe une photoréduction sensibilisée dans un système contenant des donneurs d'hydrogène, prêts à participer à une photoréduction de la chlorophylle observable spectrophotométriquement, électrométriquement ou autrement.

2) Dans un système triple, contenant un donneur d'électron, un pigment et un accepteur d'électron, on ne peut pas observer l'accumulation de la forme photoréduite du pigment, en raison de la réaction rapide de cette forme avec les molécules d'accepteurs.

Les produits de la photoréduction des pigments commencent à s'accumuler quand toutes les molécules de l'accepteur sont réduites; cela est illustré nettement ([32]) par des essais effectués à basse température avec de la phéophytine.

3) Pour finir nous avons séparé expérimentalement le stade photochimique de la réaction (formation des formes photoréduites de pigments) et le stade obscur de la réaction (interaction des pigments photoréduits avec les molécules d'accepteurs d'électron) ([8]). Ces réactions se produisent plus rapidement avec les formes photoréduites « primaires » des pigments, dont on n'observe l'accumulation qu'avec les phéophytines ([32, 10]).

Les résultats expérimentaux dont nous disposons conduisent donc à la conclusion que les réactions sensibilisées procèdent par une photoréduction reversible de la chlorophylle.

Alors qu'un tel mécanisme de réaction est mis en évidence par des expériences directes en solutions, il est difficile de séparer dans le cas de la sensibilisation hétérogène par des pigments à l'état colloïdal ou cristallin, certains stades de réaction, se déroulant aux séparations de phases. On peut s'attendre à des actes élémentaires de transfert d'un électron d'un accepteur à une molécule de pigment (« trou ») à la séparation de phase et on peut retenir aussi l'acte compensateur de transition d'un électron à une molécule d'accepteur. Cette possibilité a été montrée dans les expériences d'Evstigneev et Terenin ([33]), qui ont mesuré le photopotentiel de films solides de pigments dans des milieux aqueux.

III. — État de la chlorophylle et ses propriétés photochimiques.

Jusqu'ici nous avons décrit les réactions d'une molécule de chlorophylle dans des solvants organiques; faisons maintenant une étude des propriétés de la chlorophylle sous forme d'agrégats en solutions colloïdales aqueuses. On sait depuis longtemps que l'on obtient des solutions colloïdales en versant des solutions de chlorophylle (dans l'éthanol, l'acétone, le dioxane et la pyridine) dans un excès d'eau ou de solutions tampons; nous avons trouvé qu'on peut aussi obtenir des solutions colloïdales de chlorophylle en dissolvant directement dans l'eau de la chlorophylle adsorbée sur du sucre par un procédé de chromatographie. Ces solutions colloïdales sont dépourvues de fluorescence (seules celles obtenues à partir de pyridine sont légèrement fluorescentes). La position du maximum d'absorption et la taille des particules dépendent du type du solvant et du pH du milieu aqueux; les études que nous avons faites avec Vorobyova ont montré qu'à pH 4-5 il se faisait des particules plus grandes avec maximum d'absorption à environ 690 mμ, tandis qu'à pH 8-9 il se formait des colloïdes assez stables avec absorption à 670-672 mμ. Nous n'avons pas réussi à observer une photoréduction en solutions colloïdales par spectrophotométrie; cela n'est pas surprenant, du fait que seules les molécules de chlorophylle, présentes à la séparation de phase entre une particule de colloïde et le solvant, peuvent subir une modification chimique. Le nombre de ces molécules est très petit comparativement au nombre total de molécules dans une particule colloïdale. Contrairement à ce qui se passe pour ces systèmes nous avons trouvé que les colloïdes, obtenus en versant des solutions de chlorophylle dans des solutions aqueuses de détergents (anionique, cationique et neutre), avaient une fluorescence très vive, un maximum d'absorption à 668-670 mμ et des propriétés photochimiques semblables à celles de la chlorophylle en solution ([30, 34]). Cela peut être dû au fait que les molécules de pigment sont placées ici sous forme de monocouche sur les micelles de détergent, donc pas sous forme d'agrégats.

Les solutions aqueuses de chlorophylle exercent un certain effet photosensibilisateur, plus notable dans les cas où les accepteurs finaux d'électron sont réduits de façon irreversible, ce qui se produit dans le cas de l'oxygène et des colorants azoïques.

A l'opposé de la faible activité de ces systèmes, les colloïdes obtenus au moyen de détergents exercent un fort effet sensibilisateur, qui n'est pas inférieur à celui de la chlorophylle en solution vraie. Il est donc presque certain que dans ce cas le mécanisme élémentaire du processus est le même.

Nous avons déjà remarqué en 1946 l'effet photocatalytique des phtalocyanines cristallisées qui serait du type photocatalyse par semiconducteur ([35]).

IV. — Chlorophylle in vivo, dans les granules des chloroplastes des feuilles vertes.

Jusqu'ici nous avons décrit des expériences avec de la chlorophylle en solution; nous passons à l'étude de la chlorophylle *in vivo*. Dans les plantes on peut

trouver la chlorophylle sous différents états, ayant des propriétés photochimiques et optiques différentes. Nous avons été amenés à cette conclusion à la suite des expériences suivantes.

1. *Étude de la formation de chlorophylle à partir de la protochlorophylle des feuilles.*

En étudiant les spectres d'absorption d'homogénats de feuilles fanées et de feuilles fraîches, VOROBYOVA et moi avons trouvé que la chlorophylle fraîchement formée avait un maximum d'absorption différent de celui des feuilles parvenues à leur développement et qui disparaissait rapidement par oxydation photochimique (destructive) en présence d'air. Dans le processus d'accumulation de chlorophylle, ce maximum se déplace à 678 mμ en s'accompagnant d'une augmentation de la stabilité du pigment vis-à-vis de l'action de la lumière ([36]). SMITH a également observé des différences dans les spectres d'absorption d'une chlorophylle fraîchement formée ([37]).

En collaboration avec LITVIN nous avons étudié les spectres de fluorescence de feuilles fanées et de feuilles vertes à — 150° (il faut de basses températures pour empêcher le processus de formation de pigment

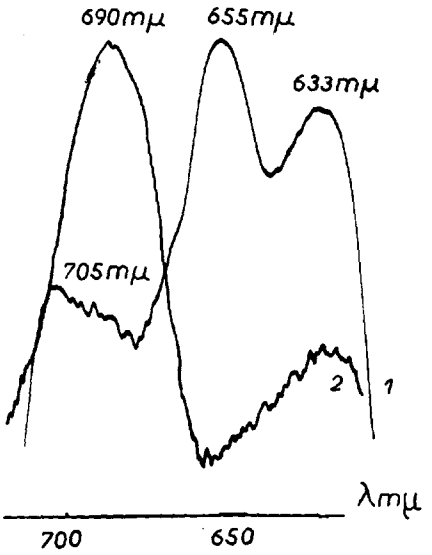


Fig. 9. — Spectre de fluorescence de feuilles de haricots fanées (1) et après irradiation d'une minute (2); ([38]).

au moment de l'exposition). Nous avons observé deux formes de protochlorophylle avec un maximum de fluorescence à 635 et 655 mμ ([38]), la dernière forme étant plus active photochimiquement et se transformant rapidement en des formes intermédiaires de chlorophylle avec maximum d'absorption à 690, 675 et 680 mμ. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par SHIBATA ([39]) qui, en étudiant le processus du verdissement par la spectrophotométrie des feuilles, a trouvé différentes formes de protochlorophylle et des formes intermédiaires de chlorophylle à maxima d'absorption différents.

2. *Étude de la cinétique de photoxydation destructive dans les homogénats de feuilles vertes (suspensions de granule).*

En éclairant intensément à la lumière rouge (10^6 erg/cm^2. sec.) des homogénats de feuilles de betterave sucrière en présence d'air, nous avons remarqué, dans les expériences que nous avons faites avec VOROBYOVA, qu'une partie de la chlorophylle se décolore très rapidement ([40]); ce phénomène s'accompagne d'un affaiblissement de la fluorescence rouge des homogénats. La quantité de cette forme de chlorophylle se décolorant rapidement est différente selon les types de plantes et oscille entre 1 et 20 %. Nous avons trouvé une forte proportion de cette forme dans les feuilles de betterave sucrière, les feuilles de peuplier, etc... et une faible proportion dans les feuilles de céréales ([41]). Il faudrait étudier s'il existe une telle forme instable dans les feuilles intactes des plantes. Dans leurs expériences, FRENCH et YOUNG ([42]) ont remarqué une brusque diminution de la fluorescence de la chlorophylle des algues rouges après irradiation intense; nous pensons que ce phénomène peut s'expliquer par la destruction de la forme de chlorophylle fluorescente « monomère ». Trois formes de chlorophylle avec maxima d'absorption à 690, 675 et 760 mμ ([43]) ont été découvertes en mesurant les spectres d'absorption des algues rouges Phyllophores.

3. *Centrifugation différentielle des différentes formes de chlorophylle.*

En nous basant sur la différence de comportement photochimique de la chlorophylle dans les homogénats, nous avons essayé de séparer ces formes par centrifugation à grande vitesse, car nous pensions que ces formes étaient liées par des éléments structuraux de différentes tailles. En réalité, avec les homogénats de feuilles de plantes possédant une grande quantité de la forme de chlorophylle se décolorant rapidement, une centrifugation, avec champ de 25 000 g , a entraîné un déplacement du maximum d'absorption de la « solution verte » de 677 mμ à 672-673 mμ ([41]).

Propriétés photochimiques de la « solution verte ». — Nous avons étudié les propriétés de la chlorophylle en granules dans des milieux visqueux eau-glycérine, qui permettaient des mesures spectrophotométriques exactes en raison de leur transparence et de leur stabilité du point de vue colloïdal. De tels systèmes permettent également de travailler à basse tempé-

rature. Dans les expériences que nous avons faites avec VOROBYOVA sur de telles solutions vertes de

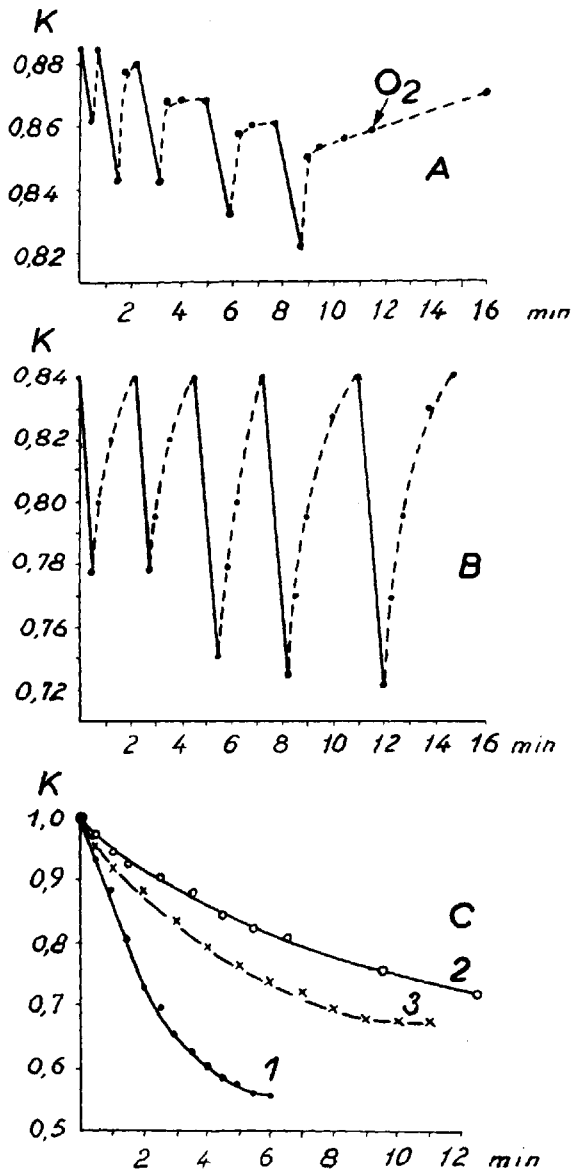


Fig. 10. — Réactions photochimiques dans les homogénats eau-glycérine de feuilles de betterave sucrière vertes en présence d'ascorbate de sodium (dans le vide). Irradiation à la lumière rouge 10^6 erg/cm² sec.
A. Modifications reversibles de la chlorophylle à 675 mμ.
B. Réduction reversible de la safranine T (à 540 mμ) photosensibilisée par la chlorophylle.
C. Réduction irreversible du rouge de méthyle photosensibilisée par la chlorophylle : 1) homogénats de feuilles de betterave sucrière; 2) de feuilles de blé; 3) solution colloïdale de la chlorophylle *a* + *b* (mesures à 470 mμ —— lumière ---- obscurité.

feuilles de betterave sucrière en présence d'ascorbate de sodium, nous avons observé des modifications reversibles de densité optique dans le maximum rouge (jusqu'à 5 %) par irradiation, ce que l'on peut attribuer à une photoréduction reversible de la chlorophylle. Nous n'avons pas réussi à observer des modifications nettes de densité par les mesures au spectrophotomètre BECKMAN pour 520 mμ. En l'absence d'ascorbate, on observe des effets plus faibles ([40]). On peut attribuer les modifications photochimiques reversibles dans les homogénats de feuilles vertes à la forme « monomère » de la chlorophylle, dont les propriétés sont semblables à celles de la chlorophylle en solution.

On sait bien que, dans un milieu oxydant, les homogénats de feuille sont capables de donner une réaction de HILL, c'est-à-dire une évolution photochimique de l'oxygène, liée à une réduction des oxydants, Fe^{+++}, quinones, etc. Le travail que nous avons fait avec VOROBYOVA a montré que, dans un milieu réducteur et s'il y a de l'ascorbate de sodium, les homogénats de feuille sont capables de photosensibiliser la réduction de la safranine-T (reversible) et d'autres composés, aussi bien que la réduction irreversible de l'oxygène et de certains colorants azoïques (rouge de méthyle).

Les feuilles de plantes, contenant une grande quantité de la forme monomère se décolorant rapidement, étaient plus actives dans les réactions de ce type; les feuilles de betterave sucrière, par exemple, sont plus actives que celles de haricots, mais la chlorophylle colloïdale exerce également une certaine activité. Le rôle biologique des différentes formes de chlorophylle et leur mode de participation aux réactions de photosynthèse ne sont pas encore élucidés. Les calculs montrent que deux quanta environ de lumière rouge sont nécessaires pour transférer un électron de l'eau au gaz carbonique; ce phénomène peut exiger deux types de réactions-photochimiques avec une réserve de substrats intermédiaires. Différents types de réaction peuvent être en relation avec les différentes formes de chlorophylle. L'aptitude de la molécule de chlorophylle à capter un électron par irradiation sera de toute façon réservée à un groupe « collectif » de molécules sous des formes agrégées quasi-cristallines. La migration d'énergie entre les molécules de pigment dans de tels agrégats (en granules plastiques) peut se produire sous la forme d'un « trou » et d'un électron non apparié c'est-à-dire à un état de triplet, à l'exemple du mécanisme proposé par TERENIN ([44, 45]).

V. — Mécanisme de la participation de la chlorophylle et de ses analogues dans les processus photobiologiques.

Photosynthèse. — Les études, décrites dans cet article, montrent la possibilité pour la chlorophylle

de permettre un transfert reversible d'électron jusqu'au niveau des nucléotides de pyridine à l'état réduit, avec formation intermédiaire d'ions-radicaux dans le processus de transfert photochimique d'électron. Cela est compatible avec un certain nombre de recherches récentes qui ont révélé la possibilité de la photoréduction d'un nucléotide de pyridine dans des suspensions de chloroplastes et de feuilles de plantes.

Selon le schéma de CALVIN [46], le cycle de la réduction du gaz carbonique est réalisé grâce à l'apport de nucléotides de pyridine réduits photochimiquement et d'esters de phosphates riches en énergie. La formation de tels esters est possible par phosphoration photosynthétique (oxydation), en utilisant des nucléotides de pyridine réduits (flavines) et des oxydants formés dans le photoprocessus [47].

Il est excessivement important de découvrir la possibilité de la formation intermédiaire de formes de chlorophylle modifiées photochimiquement au cours de la photosynthèse des feuilles de plantes. Dans des travaux récents, on a utilisé, pour l'étude du photoproduit primaire, des méthodes de spectroscopie différentielle sur des organismes vivants et de résonance paramagnétique. Par irradiation des feuilles les mesures des spectres différentiels ont montré l'apparition reversible d'un maximum d'absorption à 515-530 mμ [48], accompagnée d'une chute du maximum rouge de l'absorption de la chlorophylle [49], d'une diminution de fluorescence [50] et de l'apparition de chimiluminescence dans la réaction inverse obscure [51]. L'apparition du maximum à 515 mμ peut être en relation avec la formation des formes photoréduites de la chlorophylle et des autres pigments des plantes accepteurs d'électron. On doit cependant considérer le fait que la photoréduction reversible de la chlorophylle n'est pas toujours liée à l'apparition d'un maximum à 520 mμ. Dans les conditions de pH existant dans les granules, il peut arriver qu'il n'y ait pas production de la « forme rouge », sans compter que la forme transitoire active réduite ion-radicalaire de la chlorophylle semble ne pas posséder de maximum dans cette région du spectre.

Les mesures de résonance paramagnétique ont montré que, par irradiation de chloroplastes, il apparaît des électrons non appariés, ce qui prouve la formation de radicaux libres à durées de vie différentes [52]. Enfin, l'apparition de chimiluminescence photochimique semble être en relation avec la recombinaison des radicaux libres formés dans le photoprocessus. Il restait à relier les résultats obtenus par toutes ces méthodes. Ainsi les résultats expérimentaux sont compatibles avec l'hypothèse de la participation de la chlorophylle au transfert photochimique d'électron dans la photosynthèse, avec formation intermédiaire de radicaux libres à durées de vie différentes.

Action photodynamique des porphyrines. — La base de ce phénomène est la photoxydation des métabolites vitaux ou des protéines photosensibilisée par un colorant, qui conduit à une hémolyse de l'érithrocyte et à un certain nombre de troubles, à longue échéance, des fonctions organiques normales [53]. Le mécanisme du processus photochimique primaire, qui est la base des effets photodynamiques, n'est pas encore élucidé. Les études du mécanisme de l'effet sensibilisateur des porphyrines, décrites dans ce mémoire, permettent de prouver l'hypothèse que la photoréduction élémentaire du pigment qui est l'acte photochimique primaire de ce processus; nous avons trouvé que la porphyrine était capable de donner une photoréduction reversible avec les diénols, les cystéines et un certain nombre d'autres composés organiques [5].

L'oxydation des formes photoréduites de la porphyrine par l'oxygène ou d'autres oxydants conduit à la régénération reversible de la molécule initiale de pigment. Dans ce cas, de même que dans le cas de la chlorophylle, les formes ion-radicalaires de pigment sont les plus actives. On peut donc décrire comme suit le mécanisme du processus élémentaire de l'action photodynamique :

Stade photochimique :

$$\leftarrow \; P + AH \; \rightarrow \; .P^- + .AH^+ \; \rightarrow \; .PH + .A$$

Stades obscurs :

$$.P^- + O_2 \; \rightarrow \; .PO_2^- \xrightarrow{+H^+} P + HO_2, \text{ etc...}$$

où P est une molécule excitée de porphyrine, AH une molécule de métabolite ou un petit groupe de protéine, abandonnant un électron. Nous avons étudié tous ces processus *in vitro;* il reste à étudier la formation de photoproduit intermédiaire dans des expériences *in vivo*.

Autres réactions photobiologiques des plantes. — Les études de BORTHWICK et HENDRICK [54] sur les spectres d'action du photopériodisme, de la germination des graines, etc., ont conduit à la découverte du maximum des spectres d'action à environ 650 mμ; on supprimait cet effet de la lumière rouge par une irradiation subséquente avec du proche infrarouge ayant un maximum d'action à 740 mμ.

Ces observations ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse de la présence d'un système de pigment subissant des modifications photochimiques avec formation de photoproduits, en relation avec des maxima à 650 et 740 mμ. Jusqu'à présent les tentatives faites, pour observer une telle transformation des pigments dans les plantes, ont échoué. Nous avons réussi à observer une photoréduction reversible de la porphyrine conduisant à la formation de photoproduits avec des maxima d'absorption à 650 et 740 mμ. Le fait que l'irradiation par l'infrarouge accélère la

réaction inverse de ces photoproduits est d'importance ([55]). Il se peut que la formation reversible des produits de la photoréduction du pigment de la porphyrine ait également de l'importance dans un certain nombre de processus photobiologiques de ce type.

BIBLIOGRAPHIE

(1) A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1948, **60**, 421; *Revue dans Zhur. Fis. Khim.*, 1956, **30**, 968.

(2) A. A. KRASNOVSKY, G. P. BRIN et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1949, **69**, 393; 1953, **89**, 527.

(3) A. A. KRASNOVSKY et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Doklady, Acad. Nauk.*, 1949, **64**, 663.

(4) A. A. KRASNOVSKY et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1951, **81**, 879.

(5) A. A. KRASNOVSKY et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1954, **9**[illegible], 1209.

(6) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady, Acad. Nauk.*, 1954, **96**, 1201.

(7) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1954, **95**, 841.

(8) A. A. KRASNOVSKY et G. P. BRIN. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1950, **73**, 1239.

(9) E. RABINOWITCH. — *J. Chem. Phys.*, 1940, **8**, 551, 560.

(10) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1953, **92**, 381.

(11) V. B. EVSTIGNEEV. — *Diss. Institute Biochim. Acad. Nauk. URSS*, Moscou, 1956.

(12) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1955, **103**, 97.

(13) A. A. KRASNOVSKY et A. B. UMRICHINA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1955, **104**, 882.

(14) A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1955, **103**, 283;
A. A. KRASNOVSKY et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Biofizika*, 1956, **1**, 120.

(15) B. HILL. — *Nature*, 1954, **174**, 501.

(16) A. A. KRASNOVSKY et G. P. BRIN. — *Doklady Acad. Nauk.* 1954, **96**, 1025.

(17) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1957, **115**, 530.

(18) D. PORRET et E. RABINOWITCH. — *Nature*, 1937, **140**, 321.

(19) R. LIVINGSTON. — *J. Phys. Chem.*, 1941, **45**, 312; 1948, **52**, 622;
R. LIVINGSTON et V. RYAN. — *J. am. chem. Soc.*, 1953, **75**, 2176.

(20) H. LINSHITZ et J. RENNERT. — *Nature*, 1952, **169**, 193.

(21) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady Acad. Nauk.* 1956, **108**, 507.

(22) V. B. EVSTIGNEEV et A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1948, **60**, 623;
V. B. EVSTIGNEEV, V. A. GAVRILOVA et A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1950, **74**, 315.

(23) N. URI. — *J. am. chem. Soc.*, 1952, **74**, 5808.

(24) J. L. ROSENBERG. — *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1957, **8**, 115.

(25) LINSHITZ et S. J. WEISSMAN. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **67**, 491.

(26) M. S. ASHKINAZY et B. Y. DAIN. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1951, **80**, 385; 1956, **102**, 767.

(27) V. B. EVSTIGNEEV, V. A. GAVRILOVA et A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1950, **70**, 261.

(28) A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1948, **61**, 91.

(29) A. A. KRASNOVSKY et G. P. BRIN. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1949, **67**, 325;
A. A. KRASNOVSKY et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1952, **87**, 190.

(30) G. P. BRIN et A. A. KRASNOVSKY. — *Biochima* N° 5, 1957;
A. A. KRASNOVSKY et G. P. BRIN. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1947, **58**, 1087.

31) A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk. URSS.*, 1947, **58**, 617, 835.

(32) V. B. EVSTIGNEEV et V. A. GAVRILOVA. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1954, **98**, 1017.

(33) V. B. EVSTIGNEEV et A. N. TERENIN. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1951, **81**, 223.

((34) A. A. KRASNOVSKY et G. P. BRIN. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1948, **63**, 163.

(35) A. A. KRASNOVSKY et G. P. BRIN. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1946, **53**, 447.
A. A. KRASNOVSKY. — *Problems of Kinetics and Catalysis*, 1955, **8**, 40, *A.N. URSS*, Moscou.

(36) A. A. KRASNOVSKY et L. M. KOSOBUTSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1952, **85**, 177; 1953, **91**, 343; 1953, **92**, 1201.

(37) J. H. C. SMITH et A. BENITZ. — *Year Book Carnegie Inst. Wash.*, 1953, **52**, 149.

(38) F. F. LITVIN et A. A. KRASNOVSKY. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1957, **117**, 168.

(39) K. SHIBATA. — *Journ. de Biochimie* (Japan), 1957, **44**, 147.

(40) A. A. KRASNOVSKY et L. M. KOSOBUTSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1955, **104**, 440.
L. M. VOROBYOVA et A. A. KRASNOVSKY. — *Biokhimiya*, 1956, **21**, 126.

(41) A. A. KRASNOVSKY, L. M. VOROBYOVA et E. V. PASKCHINA. — *Physiologie des plantes*, 1957, **4**, 124.

(42). C. S. FRENCH et V. K. YOUNG. — *J. Gen. Physiol.*, 1952, **35**, 873.

(43) A. A. KRASNOVSKY, E. A. NESTEROVSKAYA et A. B. GOLDENBERG. — *Biofizika*, 1953, **1**, 328.

(44) A. N. TERENIN et V. L. ERMOLAYEV. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1952, **85**, 547.

(45) A. N. TERENIN et V. L. ERMOLAYEV. — *Trans. Farad. Soc.*, 1956, **52**, 1042.

(46) M. CALVIN. — *Conférences et rapports*; 3e Congrès International de biochimie, 1956, p. 211, Liège.

(47) D. ARNON. — *Science*, 1955, **122**, 9.

(48) L. M. N. DUYSENS. — *Science*, 1954, **120**, 353.
L. N. BELL. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1957 **107**, 329.

(49) J. W. COLEMAN, A. S. HOLT et E. RABINOWITCH. — *Science*, 1956, **123**, 795.

(50) H. T. WITT. — *Zeit. Electrochem.*, 1955, **59**, 981.

(51) B. L. STREHLER et V. H. LYNCH. — *Science*, 1956, **123**, 462.

(52) B. COMMONER, J. HEISS et J. TOWNSEND. — *Proc. Natl. Acad. Science, Wash.*, 1956, **42**, 710.
B. SOGO, N. PON et M. CALVIN. — *Proc. Natl. Acad. Science. Wash.*, 1957, **43**, 387.

(53) H. BLUM. — *Photodynamic action and diseases caused by light*, 1941.

(54) H. A. BORTHWICK, S. B. HENDRICKS et al. — *Proc. Natl. Acad. Science. Wash.*, 1952, **38**, 62.

(55) A. A. KRASNOVSKY et K. K. VOYNOVSKAYA. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1957, **112**, 911.

Imprimé avec le périodique *Journal de Chimie Physique*. — Dépôt légal 4e trimestre 1958. — N° 2392.
IMPRIMERIE DURAND A CHARTRES. *Printed in France.*

БИОФИЗИКА

Том IV, вып. 5 1959

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА

Е. М. БЕЛАВЦЕВА, Л. М. ВОРОБЬЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва
Лаборатория электронной микроскопии АН СССР, Москва

Изучение упаковки молекул хлорофилла и его аналогов в агрегированных формах — кристаллах и коллоидных частицах — представляет интерес в связи с проблемой состояния этих пигментов в растениях. Агрегация пигментов в большинстве случаев приводит к потере характерной для пигментов в растворе красной флуоресценции и ведет к смещению максимума поглощения в длинноволновую сторону спектра.

Наблюдалось, что положение максимумов поглощения хлорофилла в твердых пленках и коллоидных растворах зависит от природы растворителя и способа получения препаратов. Так, при испарении на стекле эфирных растворов хлорофилла $a+b$ получаются пленки с максимумом поглощения 672—675 *ммк*, тогда как из диоксана получаются пленки и коллоидные растворы с максимумом при 690 *ммк* [1, 2, 3]. Такая же упаковка хлорофилла наблюдалась при измерении спектров поглощения красных водорослей «филлофора» [4], а кристаллы «хлорофилл-белкового» соединения, полученного Такашима [5], вероятно, являются агрегированными формами хлорофилла, обладающими «диоксановой» упаковкой [3]. Было также установлено, что спектры поглощения бактериохлорофилла в живых пурпурных бактериях соответствуют спектрам поглощения агрегированных форм бактериохлорофилла, наблюдаемых в твердых пленках и коллоидных растворах [6].

При испарении безводных растворов хлорофилла в органических растворителях образуется воскообразный осадок, и поэтому долгое время считали, что твердый хлорофилл представляет собой аморфное вещество. Однако в последние годы были найдены доказательства в пользу того, что при соблюдении некоторых условий возможно получить хлорофилл в кристаллическом состоянии. В ряде работ Джакобса, Холта, Веттера и Рабиновича [7—10] было показано, что для кристаллизации необходимо присутствие воды. Кристаллизацию наблюдали при испарении ацетонового раствора хлорофилла, содержащего 1% воды, при испарении смесей серного эфира с петролейным эфиром, пентаном или гексаном с поверхности воды, а также при коагуляции коллоидного раствора из ацетона солями кальция. Феофитины кристаллизовались, по-видимому, в отсутствие воды.

Образование кристаллических структур приводило к наиболее длинноволновому сдвигу максимумов поглощения, как это было показано сначала для хлорофиллида a и b [11, 12], а затем для хлорофилла a и бактериохлорофилла [7—10]. Кристаллические препараты пигментов обладали следующими максимумами поглощения: хлорофиллид a — 740 *ммк*, хлорофиллид b — 725 *ммк*, хлорофилл a — 740 *ммк*, бактериохлорофилл — 865 *ммк*. Было обнаружено, что положение максимума поглощения хлорофиллида a зависит от величины частиц; по мере увеличения частиц наблюдается постепенный сдвиг максимума в длинноволновую область спектра [11].

Для изучения агрегированных форм пигментов, наряду со спектральными методами, было применено рентгенографическое исследование. Электронные микрофотографии показали пластинчатую структуру кристаллов хлорофилла *a* и тетраэдрическую для хлорофиллида, а рентгенограммы содержали резкие кольца, позволившие вычислить для некоторых веществ межплоскостные расстояния [9; 10].

В настоящей работе проведено электронографическое и электронно-микроскопическое изучение препаратов хлорофилла *a*, *b* и *a*+*b*, полученных из разных растворителей и в разных условиях. Мы исследовали также коллоидные частицы, полученные разведением растворов пигментов в органических растворителях водными буферными растворами при различных pH среды. В работе была поставлена задача выяснить степень упорядоченности образуемых структур в зависимости от условий приготовления препаратов, а также установить корреляцию между характером упорядоченности структур и их спектральными свойствами.

Методика работы

Хлорофилл a+b получали из листьев крапивы в условиях, близких к описанным в работе Цшеиле и Комар [13]. Согласно этой методике, при конечной стадии получения хлорофилл *a*+*b* снимали с сахарозы небольшим количеством серного эфира. Эфир испаряли на воздухе при 20—25°, но не до конца и при образовании густой массы хлорофилла в эфире размешивали осадок с легким петролейным эфиром (т. кип. 35—50°). После сушки в вакууме получали «твердый» хлорофилл *a*+*b* [1].

Хлорофилл a и *b* получали хроматографическим разделением на колонках сахарозы из смеси серного и петролейного эфира (т. кип. 50—70°) в отношении 3 : 7. «Твердый» хлорофилл *a* и *b* получали по способу, описанному выше для хлорофилла *a*+*b*, добавляя легкий петролейный эфир к концентрированному раствору пигмента в серном эфире [1].

Феофитин a+b получали из листьев крапивы по Фишеру [14].

Коллоидные растворы готовили из ацетона и диоксана следующим образом: 4 *мг* хлорофилла *a*+*b* растворяли в 0,5 *мл* растворителя и добавляли 3 *мл* воды или фосфатного буфера определенного pH. Растворитель удаляли при кипении полученного раствора в вакуумной трубке в течение 5—10 мин. при откачке масляным форвакуумным насосом. В некоторых случаях растворитель не удалялся.

Препараты для исследования пигментов готовили несколькими способами.

1. Полученный описанным выше способом хлорофилл представляет собой крупные частицы, которые не удается размельчить для получения препаратов, прозрачных для электронов средних энергий. Поэтому мы применили растирание частиц хлорофилла с небольшим количеством петролейного эфира, в котором пигмент растворим в слабой степени. Полученную суспензию наносили на коллодиевую пленку.

2. Раствор хлорофилла в диоксане испаряли на воздухе. Осадок, содержащий небольшое количество диоксана и, возможно, воды, растирали с петролейным эфиром. Полученную массу наносили на каллодиевую или формваровую пленку.

3. Пигмент наносили из растворов на сухую коллодиевую или формваровую пленку. В качестве растворителей использовали этиловый спирт, серный и петролейный эфир, смесь серного и петролейного эфира (25% серного и 75% петролейного).

4. Каплю раствора пигмента в смеси 25%-го серного и 75%-го петролейного эфира наносили на поверхность дистиллированной воды комнатной температуры или при +5°. Пленку, образовавшуюся на поверхности

[1] В дальнейшем изложении хлорофилл *a*, *b* и *a*+*b*, полученные таким способом, обозначаются термином «твердый» хлорофилл.

воды после испарения растворителя, переносили на коллодиевую подложку.

5. На коллодиевую пленку, плавающую на поверхности дистиллированной воды, наносили каплю раствора хлорофилла в петролейном эфире. Благодаря полупроницаемости коллодиевой пленки обеспечивался контакт молекул хлорофилла с молекулами воды.

Феофитин a+b наносили из смеси 25%-го серного и 75%-го петролейного эфира на сухую формваровую пленку или на поверхность дистиллированной воды с последующим перенесением пленки пигмента на подложку.

Коллоидные растворы, полученные описанным выше способом, наносили на коллодиевую пленку-подложку и высушивали в вакууме или на воздухе. Удаление солей производили промывкой высушенных препаратов в дистиллированной воде. В некоторых случаях применяли капельный диализ [15]. Метод высушивания и отмывки солей не оказывал влияния на результаты. Крупные частицы в отдельных случаях растирали с петролейным эфиром, как это выше описано для твердого хлорофилла.

Для измерения спектров поглощения препараты наносили на коллодиевую или формваровую пленку описанными способами. Пленки предварительно укрепляли на латунной рамке с просветом 0,7×2,5 *см*. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Бекмана «против» воздуха.

Полученные объекты исследовали в электронном микроскопе УЭМ-100, позволяющем получать как электронно-микроскопические снимки, так и электронограммы. Электронограммы были получены при плотности тока на объекте $j_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ *А/см*^{2}. Температура объекта, нагреваемого электронным пучком, при $j_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ *А/см*^{2} не превышала 30° [16]. Мощность поглощенной дозы, приблизительная оценка которой производилась по плотности тока j_0, в данных условиях облучения составляла около $6{,}5 \cdot 10^6$ *рад/сек*. На основании данных, полученных ранее [17], такой режим работы прибора позволяет получать дифракционные картины без заметных изменений структуры хлорофилла. В специальных опытах было показано, что в наших условиях не происходит разрушения хлорофилла под действием электронного пучка. Плотность тока на объекте j_0 измерялась цилиндром Фарадея, помещенным на уровне конечного экрана. По плотности тока на экране $j_э$ вычислялась плотность тока на объекте j_0 ($j_0 = j_э \cdot M^2$), где M — увеличение объективной линзы. Электронные микрофотографии приведены с увеличением 12 000. Рентгенограммы получали в камере с плоской кассетой. Этиловый спирт, ацетон, диоксан и петролейный эфир перегоняли с дефлегматором. Эти растворители не обезвоживали. Серный эфир и диоксан чистили от перекисей закисным сернокислым железом, сушили над металлическим натрием и перегоняли.

Результаты исследования структуры агрегированных форм

Хлорофилл a. На электронных микрофотографиях твердого хлорофилла *a*, растертого с петролейным эфиром, видны пластинчатые кристаллы, аморфных областей не наблюдалось. Электронограммы от хлорофилла *a*, приготовленного таким способом, содержат большое число резких интерференционных максимумов и слабый диффузный фон (рис. 1, *1*). Межплоскостные расстояния и соответствующие интенсивности приведены в табл. 1, гр. 1. Таким образом, полученный нами твердый хлорофилл *a* находится в кристаллическом состоянии. Как уже было показано ранее, для кристаллизации хлорофилла необходимо присутствие молекул воды [7, 10]. При нашем способе получения твердого хлорофилла *a*, *b* и *a+b* воду специально не добавляли, однако при испарении эфирного раствора на последней стадии перед добавлением петролейного эфира следы воды

Таблица 1

Средние данные из электронограмм для твердого хлорофилла *a*		Средние данные из электронограмм для твердого хлорофилла *b*		Средние данные из электронограмм для твердого хлорофилла *a* + *b*		Средние данные из рентгенограмм для твердого хлорофилла *a* + *b*	
d, Å	интенсивность**	*d*, Å	интенсивность**	*d*, Å	интенсивность**	*d*, Å	интенсивность**
1		2		3		4	
						14,0	С.
7,68	О. с.	—	—	7,68	С.	7,68	То же
7,36	С.	—	—	7,36	Ср.	—	—
4,38	То же	4,6*	С.	4,38	То же	4,22	Ср.
4,15	»	—	—	4,15	»	4,06	То же
4,08	О. сл.	—	—	4,08	О. сл.	—	—
3,80	То же	—	—	3,80	То же	—	—
3,71	С.	—	—	3,71	Ср.	3,66	Ср.
2,92	Ср.	—	—	2,92	Сл.	—	—
2,83	То же	—	—	2,83	То же	—	—
2,76	»	—	—	2,76	»	2,78	Ср.
2,46	Сл.	—	—	2,46	»	2,44	То же
2,20	То же	—	—	2,20	»	2,17	Сл.
2,09	»	2,1*	Ср.	2,09	»	—	—
2,02	»	—	—	2,02	»	2,05	Сл.
1,95	»	—	—	1,95	О. сл.	—	—
1,86	»	—	—	1,86	То же	1,83	Сл.
1,73	»	—	—	1,73	»	—	—
1,67	О. сл.	—	—	1,67	»	1,62	Сл.
1,53	То же	—	—	1,53	»	—	—
1,43	»	—	—	1,43	»	—	—
1,20	»	1,2*	С.	1,20	»	—	—

* Условные межплоскостные расстояния, вычисленные из электронограмм по диффузным кольцам.

** Интенсивность оценивалась качественно по шкале интенсивностей, предложенной для электронограмм Пинскером [18]. Сокращения означают: О. с. — очень сильная, С. — сильная, Ср. — средняя, Сл. — слабая, О. сл. — очень слабая.

обычно присутствовали благодаря конденсации паров воды из воздуха. Возможно, что этим объясняется кристалличность наших препаратов.

Электронно-микроскопическое исследование показало, что при растирании с петролейным эфиром осадка хлорофилла *a*, полученного после испарения диоксанового раствора, образуются игольчатые кристаллы (рис. 2, *1*). Бесформенных аморфных масс в препаратах не было замечено. Электронограммы от этих препаратов хлорофилла *a* содержат резкие кольца и одно диффузное кольцо с $d=4{,}6$ Å (табл. 2, гр. 1). Известно, что электронограмма от коллодиевой пленки, являющейся подложкой для игольчатых кристаллов, содержит диффузное кольцо примерно с тем же значением *d* [18]. Однако распределение интенсивности первого интерференционного максимума на электронограмме, полученной от коллодиевой пленки при малой плотности тока на объекте [19], отличается от распределения интенсивности диффузного кольца на электронограмме от игольчатых кристаллов. Кроме того, величина интенсивности последнего значительно выше интенсивности кольца на электронограмме от коллодиевой пленки при одинаковых условиях съемки. Следовательно, интенсивное диффузное кольцо $d=4{,}6$ Å относится к хлорофиллу *a*, а не к коллодиевой пленке.

Сравнение результатов опытов с хлорофиллом из диоксанового осадка и опытов с твердым хлорофиллом *a*, растертым с петролейным эфиром, описанных выше, показало различия как в электронно-микроскопической, так и в дифракционной картине. В случае растирания хлорофилла *a*, по-

Таблица 2

Средние данные из электронограмм для игольчатых кристаллов хлорофилла *a*		Средние данные из электронограмм для игольчатых кристаллов хлорофилла *b*		Средние данные из электронограмм для кристаллов хлорофилла *a* + *b*	
d, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность
1		2		3	
10,17	Ср.	10,16	Ср.	10,17	Ср.
6,86	С.	6,86	С.	6,88	С.
6,68	Сл.	6,68	Сл.	6,65	О. сл.
5,91	О. сл.	5,91	То же	—	—
4,6*	Ср.	4,6*	Ср.	4,6*	Ср.
4,61	То же	4,61	То же	—	—
3,49	С.	3,49	С.	3,50	С.
2,33	Ср.	2,32	Ср.	2,35	Сл.
2,15	Сл.	2,16	О. сл.	—	—
1,91	О. сл.	1,91	То же	—	—
1,70	То же	1,70	»	—	—

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1, гр. 1.

лученного после испарения смеси серного и петролейного эфира, видны пластинчатые кристаллы. В случае растирания хлорофилла *a*, испаренного из диоксана, видны игольчатые кристаллы. Значения межплоскостных расстояний и интенсивностей колец у хлорофилла *a*, приготовленного этими двумя способами, также различны. На электронограмме от пластинчатых кристаллов твердого хлорофилла *a* интенсивное диффузное кольцо $d=4{,}6$ Å отсутствует, а число резких рефлексов с увеличением угла отражения значительно больше, чем на электронограмме от игольчатых кристаллов. По-видимому, можно считать, что молекулы в пластинчатых кристаллах твердого хлорофилла упорядочены в бо́льшей степени, чем в игольчатых кристаллах.

На электронных микрофотографиях хлорофилла *a*, полученного при испарении раствора в петролейном эфире на сухой пленке, видны бесформенные образования. Электронограмма от хлорофилла *a*, полученного таким способом, содержит резкие интерференционные максимумы, диффузное кольцо $d=4{,}5$ Å и диффузный фон (рис. 3, *1*; табл. 3, гр 1). Это

Таблица 3

Средние данные из электронограмм для хлорофилла *a* из петролейного эфира (без воды)		Средние данные из электронограмм для хлорофилла *a* из петролейного эфира (контакт с водой)		Средние данные из электронограмм для хлорофилла *b* из петролейного эфира		Средние данные из электронограмм для феофитина *a* + *b* из смеси серного (25%) и петролейного (75%) эфира (без воды)	
d, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность
1		2		3		4	
		6,6*	Ср.	—	—	6,6*	Ср.
4,5*	Сл.	4,5*	Сл.	4,5*	Сл.	5,91	То же
4,15	С.	4,15	С.	4,15	С.	4,6*	Сл.
3,71	Ср.	3,71	Ср.	3,71	Ср.	4,55	Ср.
		3,50	С.	—	—	4,15	То же
2,95	О. сл.	2,95	Сл.	2,95	О. сл.	3,48	С.
		2,42	Ср.	—	—	—	—
2,35	Сл.	2,35	Сл.	2,35	Сл.	—	—
		2,21	Ср.	—	—	—	—
2,04	То же	2,03	То же	2,04	Сл.	—	—
		1,86	Сл.	1,86	То же	—	—
1,86		1,77	То же	—	—	—	—

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1, гр. 1.

свидетельствует о том, что в препаратах, наряду с аморфными структурами, существуют области с микрокристаллическим строением. Число резких рефлексов в этом случае меньше, чем у твердого хлорофилла *a*, но значения межплоскостных расстояний совпадают с соответствующими значениями для твердого хлорофилла *a*. Следует отметить отсутствие нескольких рефлексов сильной интенсивности, характерных для твердого хлорофилла *a* (табл. 1, гр. 1). Возможно, что в наборе межплоскостных расстояний, характерных для твердого хлорофилла *a*, некоторые из них относятся к растворившейся части вещества.

При нанесении хлорофилла *a* из петролейного эфира на коллодиевую пленку, плавающую на поверхности воды, наблюдалась иная электронно-микроскопическая и дифракционная картина. На рис. 3, *2* видны сильно диспергированные частицы; особенно хорошо их структура видна при натенении. Электронограмма от хлорофилла *a*, полученного таким способом, содержит резкие кольца. Из табл. 3, гр. 2 и рис. 3, *2* видно, что в этом случае, наряду с картиной, характерной для хлорофилла *a* на сухой пленке, наблюдаются резкие кольца, по-видимому, относящиеся к хлорофиллу, молекулы, которого при испарении взаимодействовали с молекулами воды. При небольшой концентрации пигмента, т. е. при лучшем контакте с молекулами воды, рефлексы, характерные для хлорофилла *a* на сухой пленке, на электронограмме отсутствовали.

В препаратах, полученных в виде пленки на поверхности дистиллированной воды испарением раствора хлорофилла *a* в смеси серного и петролейного эфира, наблюдались пластинчатые частицы (рис. 3, *4*). Получение препаратов при комнатной температуре приводило к образованию очень мелких частиц. Понижение температуры до +5° вело к образованию более крупных частиц, в отдельных случаях закручивающихся. Однако, наряду с пластинками, в обоих случаях наблюдались образования сетчатого вида, которые на многих препаратах преобладали. Электронограммы от этих препаратов содержат три диффузных кольца, а в отдельных случаях, наряду с большим диффузным фоном,— резкое кольцо $d=3{,}50$ Å. Таким образом, основная масса хлорофилла *a*, испаренного с поверхности дистиллированной воды из смеси серного и петролейного эфира аморфна. Лишь изредка встречаются отдельные пластинчатые образования, обладающие, по-видимому, некоторой упорядоченностью. Однако твердый хлорофилл *a*, суспендированный в петролейном эфире, образует пластинчатые кристаллы без аморфных образований, а электронограмма от него содержит большое число колец, хотя условия получения исходного материала в обоих случаях приблизительно одинаковы. Различия в результатах, вероятно, объясняются пока не выясненными методическими особенностями получения препаратов.

Хлорофилл b. В отличие от хлорофилла *a* в препаратах хлорофилла *b*, приготовленных растиранием твердого пигмента в петролейном эфире, нам не удалось обнаружить кристаллы (рис. 1, *2*). Электронограмма от хлорофилла *b* в этом случае содержит три диффузных кольца $d_1=4{,}6$ Å; $d_2=2{,}1$ Å; $d_3=1{,}2$ Å (рис. 1, *2*; табл. 1, гр. 2). Следовательно, получаемый нами хлорофилл *b* аморфен.

Однако нам удалось получить хлорофилл *b* в кристаллическом состоянии путем растирания в петролейном эфире осадка после испарения диоксанового раствора пигмента. При этом кристаллы имели игольчатую форму, подобно хлорофиллу *a*, полученному в этих условиях, но отличались меньшими размерами. Электронограмма от хлорофилла *b*, полученного таким способом (рис. 2, *2*), также сходна с электронограммой от хлорофилла *a* (рис. 2, *1*; табл. 2, гр. 1, 2). По-видимому, в этих условиях способ упаковки молекул хлорофилла *a* и *b* в кристаллах одинаков.

Для хлорофилла *b* нам не удалось получить различия в структуре при испарении растворов в петролейном эфире на сухой и влажной пленке. В обоих случаях на электронных микрофотографиях не обнаруживалось

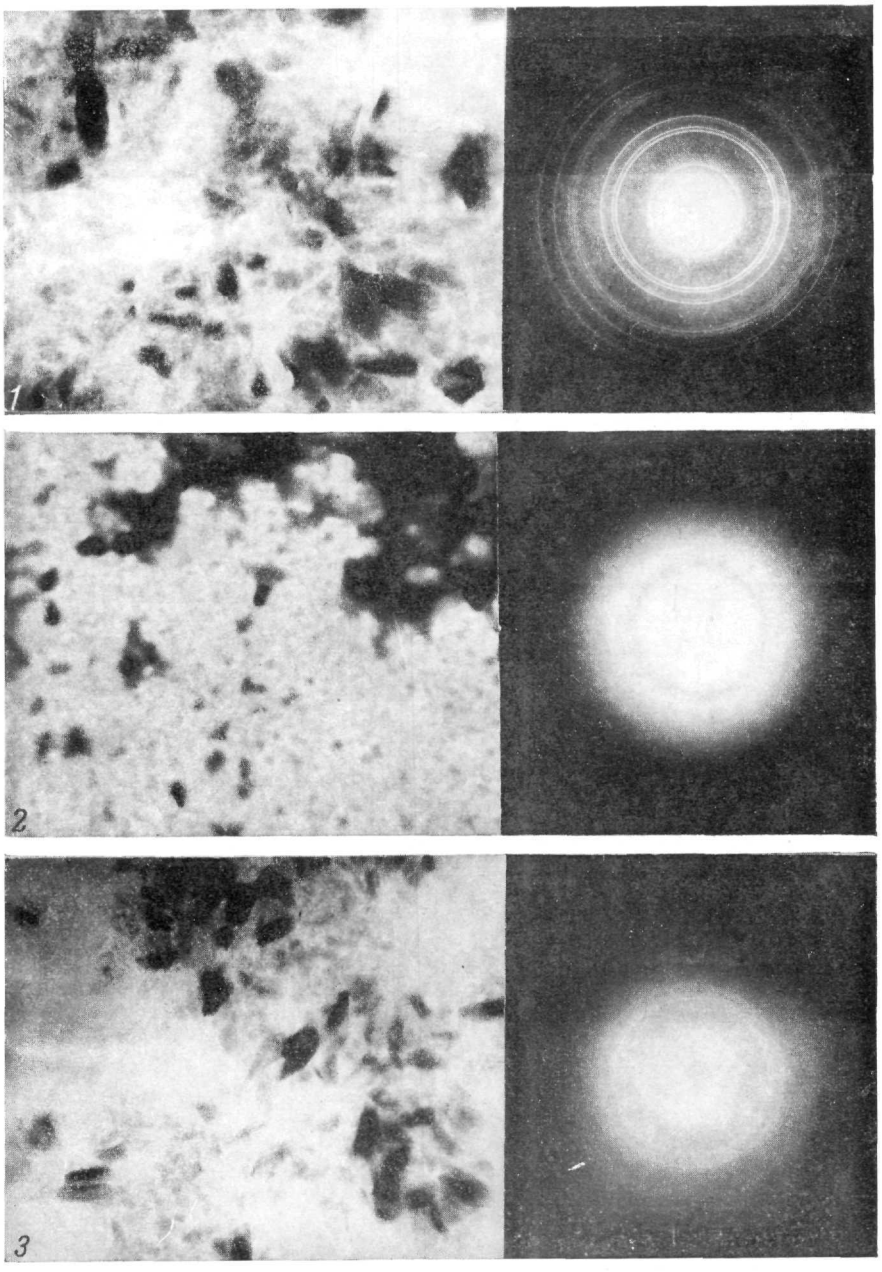


Рис. 1. Микрофотографии *А* и электронограммы *Б* твердого хлорофилла:
1 — хлорофилл *a*, *2* — хлорофилл *b*, *3* — хлорофилл *a*+*b* (увеличение микрофотографий × 12 000)

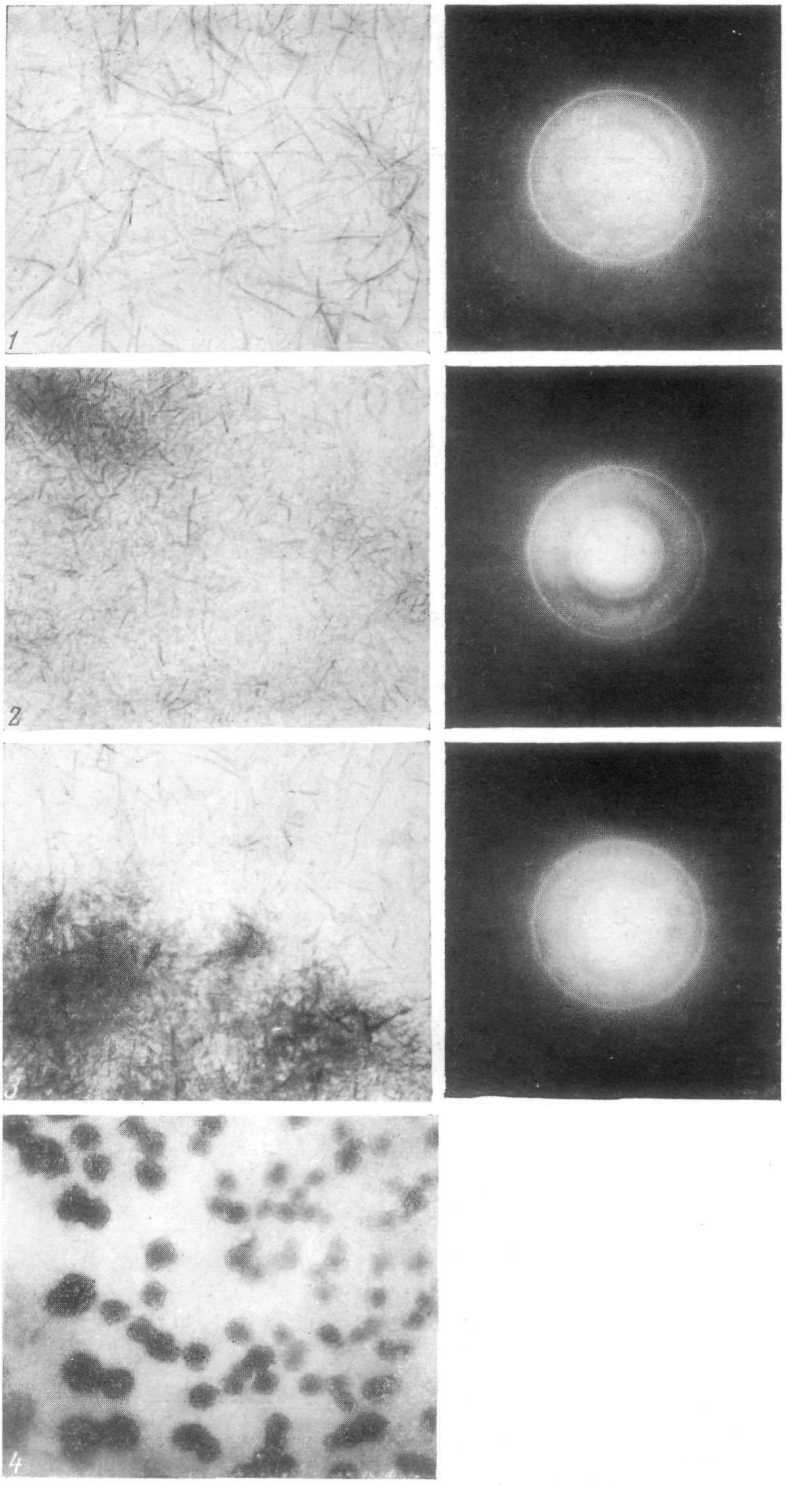


Рис. 2. Микрофотографии *А* и электронограммы *Б* игольчатых кристаллов хлорофилла:

1 — хлорофилл *a*, *2* — хлорофилл *b*, *3* — хлорофилл *a* + *b*, *4* — пленка хлорофилла *a* + *b* из диоксана на угольной подложке (увеличение микрофотографий × 12 000)

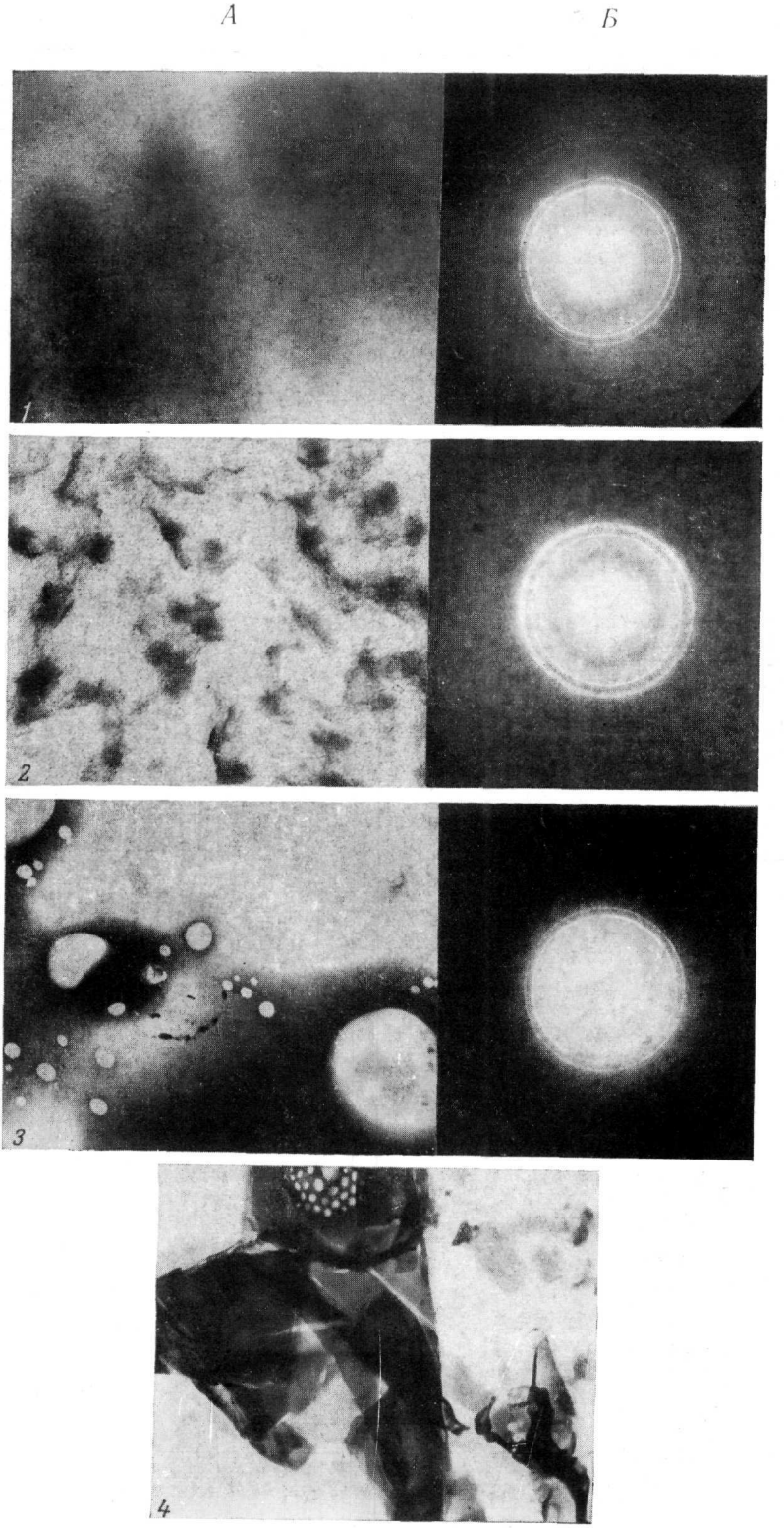


Рис. 3. Микрофотографии *А* и электронограммы *Б*:

1, *2* — хлорофилла *a* из петролейного эфира на сухой *1* и влажный *2* коллодиевой пленке, *3* — хлорофилл *b* из петролейного эфира на сухой коллодиевой пленке, *4* — пленка хлорофилла *a* из смеси серного (25%) и петролейного эфира (75%), образованная на поверхности воды (увеличение микрофотографий × 12 000)

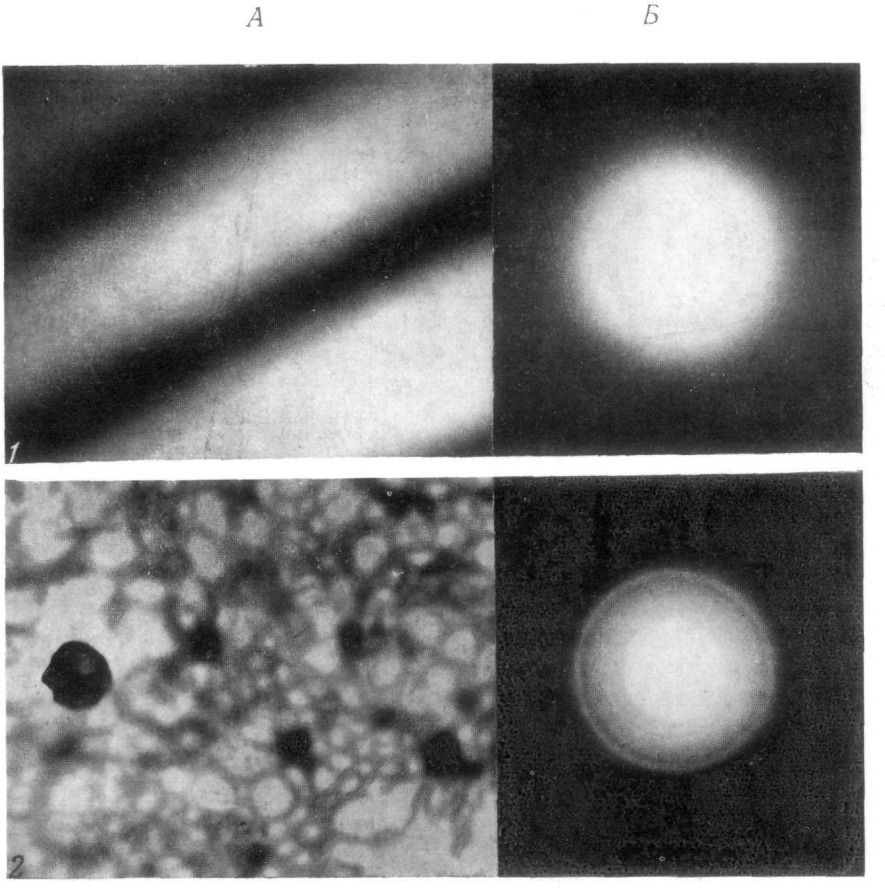


Рис. 4. Микрофотографии *А* и электрограммы *Б*:
1 — хлорофилла *a*+*b* из спирта, *2* — феофитина *a*+*b* из смеси серного (25%) и петролейного (75%) эфира (увеличение микрофотографий × 12 000)

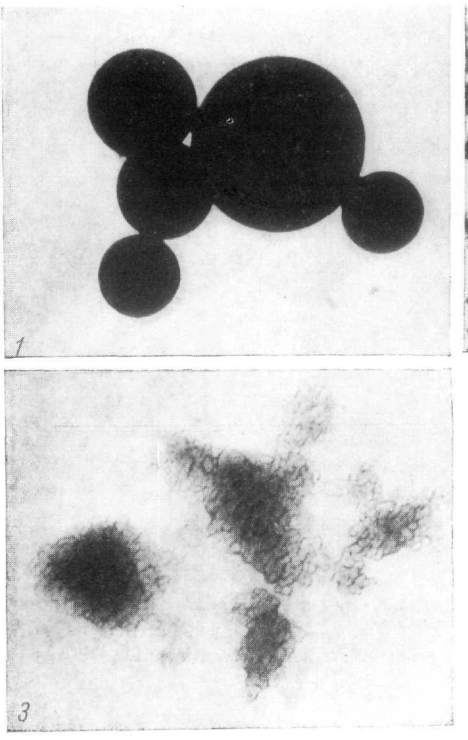


Рис. 5. Микрофотографии водных коллоидных растворов хлорофилла *a*+*в*:
1 — из ацетона при pH фосфатного буфера 4,7; *2* — из ацетона при pH 8,6; *3* — из диоксана при pH 4,7 (увеличение × 12 000)

кристаллов (рис. 3, *3*). Электронограммы от хлорофилла *b* содержат большой диффузный фон и несколько резких колец (табл. 3, гр. 3). Следовательно, основная масса хлорофилла *b* аморфна, но имеются области с микрокристаллическим строением.

Хлорофилл a+b. При растирании твердого хлорофилла *a+b* в петролейном эфире образуется суспензия мелких частиц. На электронных микрофотографиях препаратов, приготовленных из такой суспензии, видны пластинчатые кристаллы, располагающиеся группами (рис. 1, *3*). При напылении препаратов металлом заметно закручивание некоторых пластинок. Наряду с кристаллическими образованиями, на фотографиях имеются бесформенные частицы. Электронограмма от хлорофилла *a+b*, приготовленного таким способом, содержит резкие кольца и большой диффузный фон. Следует отметить, что данные, полученные из электронограмм и рентгенограмм, совпадают (рис. 1, *3*; табл. 1, гр. 3, 4). Появление аморфных областей обусловлено, возможно, присутствием хлорофилла *b*, не кристаллизующегося в данных условиях, либо объясняется растворением части пигмента в петролейном эфире. Результаты исследования говорят о том, что твердый хлорофилл *a+b*, полученный нами, находится в кристаллическом состоянии.

На электронных микрофотографиях препаратов, полученных растиранием осадка с петролейным эфиром после испарения диоксанового раствора хлорофилла *a+b*, видны игольчатые кристаллы (рис. 2, *3*). Кристаллы часто агрегируются. Бесформенных аморфных масс в препаратах не было замечено. Электронограмма от хлорофилла, полученного таким способом, содержит несколько резких колец и одно диффузное кольцо с межплоскостным расстоянием $d=4{,}6$ Å. В табл. 2, гр. 3 приведены межплоскостные расстояния и соответствующие интенсивности, вычисленные из электронограмм. Однако если хлорофилл *a+b* наносили на угольную пленку-подложку непосредственно из раствора пигмента в диоксане, то наблюдались не игольчатые, а пластинчатые образования. По-видимому, образование игольчатых кристаллов при растирании осадка с петролейным эфиром зависит от наличия в нем следов диоксана. Не исключена возможность присутствия в данном случае воды, так как диоксан нами не обезвоживался. Вероятно, имеет значение количество присутствующего диоксана, так как по мере испарения диоксана из осадка количество игольчатых кристаллов на препаратах уменьшалось и появлялись бесформенные образования.

Рентгенографическое исследование показало, что испарение растворов хлорофилла из органических растворителей — серного эфира, смеси серного и петролейного эфира — дает аморфные пленки вещества [20]. Электронно-микроскопическое исследование проведенное нами, не показало наличия кристаллов в препаратах, полученных таким способом из серного и петролейного эфира, их смеси, а также из этилового спирта (рис. 4, *1*). Электронограммы от хлорофилла, полученного таким способом, за исключением пленки пигмента из петролейного эфира, содержат только три диффузных кольца с межплоскостными расстояниями $d_1=4{,}6$ Å; $d_2=2{,}1$ Å; $d_3=1{,}2$ Å. Это указывает на то, что молекулы хлорофилла в этих пленках располагаются вполне беспорядочно.

Электронограммы от хлорофилла *a*, *a+b* испаренного из петролейного эфира, сходны, но последняя имеет бо́льший диффузный фон. На микрофотографиях хлорофилла *a+b*, полученного испарением раствора пигмента в петролейном эфире на коллодиевой пленке, помещенной на поверхности воды, наблюдались диспергированные частицы, похожие на хлорофилл *a* в тех же условиях. Электронограммы от хлорофилла *a* и *a+b* из петролейного эфира, полученных в этих условиях, также сходны. Однако кольцо с $d=3{,}50$ Å в случае хлорофилла *a* более интенсивно. Для хлорофилла *a*, кроме этого кольца, наблюдали еще несколько колец слабой интенсивности. На электронограммах от хлорофилла *a+b* они, ве-

роятно, неразличимы ввиду их еще более слабой интенсивности, чем у хлорофилла *а*.

В препаратах хлорофилла *а+b*, полученных на поверхности воды испарением из смеси серного и петролейного эфира, наблюдались, так же как в случае хлорофилла *а*, пластинчатые частицы. Однако и в этом случае число пластинок невелико, бóльшую часть поля занимают аморфные образования. Электронограмма от хлорофилла *а+b* в этом случае также сходна с электронограммой от хлорофилла *а*. При испарении раствора хлорофилла *а+b* из смеси серного и петролейного эфира на пленке, плавающей на поверхности воды, наблюдали аналогичные электронно-микроскопическую и дифракционную картины.

Феофитин а+b. Из электронных микрофотографий и электронограмм феофитина, полученного в присутствии и отсутствие воды, следует, что для его кристаллизации не обязателен контакт с молекулами воды. На микрофотографии видны кристаллы феофитина на фоне нитевидных структур. Электронограмма феофитина *а+b* отлична от электронограмм хлорофилла *а* и *а+b* (табл. 3, гр. 4; рис. 4, *2*).

Коллоидные растзоры хлорофилла а+b были приготовлены из ацетона при pH 4,7; 8,6 и на дистиллированной воде. Частицы коллоидного хлорофилла на щелочном буфере (pH 8,6) имеют сферическую форму со средним размером 0,05 —0,3 *мк* (рис. 5, *2*). Приблизительно такие же размеры имеют коллоидные частицы хлорофилла в дистиллированной воде. При pH 4,7 наблюдалась сильная агрегация молекул хлорофилла. На микрофотографиях в этом случае видны круглые крупные частицы с размером 1—3 *мк* (рис. 5, *1*). Длительное стояние коллоидных растворов хлорофилла в кислой среде приводит к очень сильной агрегации частиц, что затрудняет исследование пигмента. Это явление не наблюдается в нейтральной и щелочной среде. Электронограммы от коллоидного хлорофилла из ацетона на буфере pH 8,6 и на дистиллированной воде содержат три диффузных кольца с межплоскостными расстояниями $d_1=4{,}6$ Å; $d_2=2{,}1$ Å; $d_3=1{,}2$ Å. Толщина объекта в случае pH 8,6 и дистиллированной воды не превышала 1000 Å, что не препятствовало электронографическому исследованию. Результаты наших опытов свидетельствуют о том, что частицы хлорофилла, осажденные из коллоидных растворов pH 8,6 и из дистиллированной воды, аморфны.

Коллоидные частицы при pH 4,7 имеют также электронограмму с диффузными кольцами. Однако на рентгенограммах частиц из коллоидных растворов при pH 4,7 видны резкие кольца, что свидетельствует об упорядоченном расположении молекул вещества. Следует отметить, что межплоскостные расстояния, вычисленные из рентгенограмм коллоидных частиц и твердого хлорофилла *а+b*, совпадают (табл. 1, гр. 4; 4, гр. 2). По-видимому, несоответствие электронографических и рентгенографических результатов для коллоидов хлорофилла при pH 4,7 обусловлено крупными размерами частиц, вследствие чего они непрозрачны для электронов средних энергий. Это подтверждается также тем, что коллоидные частицы из кислой среды, размельченные в петролейном эфире, имеют дифракционную картину, аналогичную твердому хлорофиллу *а+b*, растертому в петролейном эфире. Таким образом, кислая среда способствует кристаллизации хлорофилла.

Были исследованы также коллоидные растворы хлорофилла из диоксана на дистиллированной воде и на буфере pH 4,7. Из электронных микрофотографий видно, что игольчатых кристаллов в этом случае не наблюдалось, видны лишь пластинчатые образования (рис. 5, *3*). Электронограмма от коллоидного хлорофилла из диоксана при pH 4,7 сходна с электронограммой, полученной от игольчатых кристаллов (табл. 4, гр. 3). Следовательно, при pH 4,7 молекулы хлорофилла располагаются также упорядоченно. Электронограмма от коллоидного хлорофилла на дистиллированной воде содержит только одно кольцо $d=3{,}50$ Å.

Таблица 4

Средние данные из электронограмм для коллоидного хлорофилла *a* + *b* из ацетона при pH 4,7		Средние данные из рентгенограмм для коллоидного хлорофилла *a* + *b* из ацетона при pH 4,7		Средние данные из электронограмм для коллоидного хлорофилла *a*+*b* из диоксана при pH 4,7	
d, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность	*d*, Å	интенсивность
1		2		3	
		14,0	С.		
7,68	О. с.	7,68	То же	10,17	Ср.
7,36	С.	—	—	6,88	С.
4,38	То же	4,20	Ср.	6,65	О. сл.
4,15	»	4,06	То же	4,6*	Ср.
4,08	О. сл.	—	—		
3,80	То же				
3,71	С.	3,60	Ср.	3,50	С.
3,92	Ср.	—	—	—	—
2,83	То же	2,70	Сл.	—	—
2,46	»	—	—	2,35	Сл.
2,20	Сл.	—	—	—	—
2,09	То же	—	—	—	—
2,02	»	—	—	—	—
1,95	»	—	—	—	—
1,86	»	—	—	—	—
1,73	»	—	—	—	—
1,67	О. с.	—	—	—	—
1,53	То же	—	—	—	—
1,43	»	—	—	—	—
1,20	»	—	—	—	—

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.

Спектры поглощения агрегированных форм

Наши препараты твердого хлорофилла *a*, растертого в петролейном эфире, обладали максимумом поглощения при 740 *ммк* (рис. 6, *A*, *1*). Для твердого хлорофилла *b* в подобных условиях длинноволновый сдвиг не был обнаружен. На рис. 6, *A*, *2* видно, что максимум поглощения хлорофилла *b* в этом случае расположен при 660 *ммк*. При растирании с петролейным эфиром твердого хлорофилла *a*+*b* (рис. 6, *A*, *3*) имеется два максимума, один в области 740 *ммк* и второй около 670 *ммк*. Измерения спектров поглощения по методу Шибата [21], устраняющему рассеяние, дают те же положения максимумов. Препараты твердого хлорофилла *a*, *a*+*b* в наших опытах были кристаллическими, твердый хлорофилл *b* — аморфным. Эти данные совпадают с результатами, полученными Джакобсом, Холтом, Веттером и Рабиновичем [7—10] из рентгенограмм и измерения спектров поглощения препаратов хлорофилла *a*, *a*+*b*, приготовленных в сходных условиях.

Из сравнения электронных микрофотографий и электронограмм следует, что хлорофилл *a* обладает бóльшей кристалличностью, чем хлорофилл *a*+*b*. На электронных микрофотографиях твердого хлорофилла *a* мы не наблюдаем аморфных образований, всегда присутствующих в случае хлорофилла *a*+*b*. Электронограмма от хлорофилла *a*+*b* сходна с электронограммой от хлорофилла *a*, но содержит меньшее число интерференционных максимумов по периферии и обладает бóльшим диффузным фоном. Наличие больших аморфных областей в препаратах хлорофилла *a*+*b* объясняется, вероятно, присутствием хлорофилла *b*, не кристаллизующегося в данных условиях и мешающего кристаллизации хлорофилла *a*. Можно предполагать, что на микрофотографиях пластинчатые кристаллы соответствуют хлорофиллу *a*, а аморфные массы — хлорофиллу *b* и части хлорофилла *a*, оставшейся аморфной. Коротковолно-

вый максимум при 670 *ммк* в спектре поглощения хлорофилла *a*+*b* (рис. 6, *А*, *3*), вероятно, определяется этими же причинами — наличием хлорофилла *b* и хлорофилла *a* в аморфном состоянии. При испарении диоксанового раствора пигментов и растирании осадка в петролейном эфире были получены пленки, имеющие следующие максимумы поглощения: хлорофилл *a* — 692 *ммк*, хлорофилл *b* — 675 *ммк*, хлорофилл *a*+*b* — 692 *ммк* (рис. 6, *Б*). Таким образом, в этих препаратах максимумы поглощения хлорофилла *a* и *b* претерпевали смещение в длинноволновую область спектра. В этих условиях наблюдается кристаллизация хлорофилла *a*, *b* и *a*+*b* в форме игольчатых кристаллов, дающих сходные электронограммы.

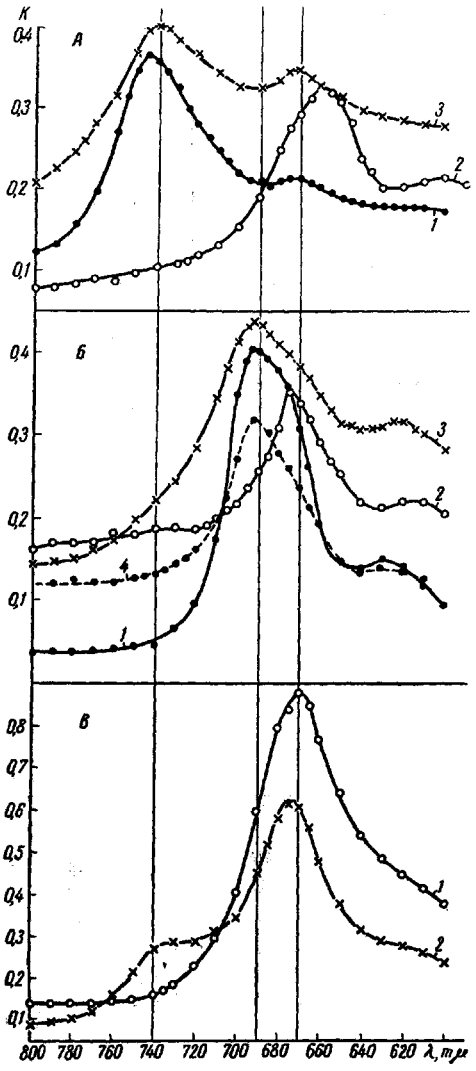


Рис. 6. Спектры поглощения пленок хлорофилла:

А — твердый хлорофилл: *1* — хлорофилл *a*, *2* — хлорофилл *b*, *3* — хлорофилл *a*+*b*; *Б* — игольчатые кристаллы: *1* — хлорофилл *a*, *2* — хлорофилл *b*, *3* — хлорофилл *a*+*b*, *4* — пленка хлорофилла *a*+*b* из диоксана; *В* — пленки хлорофилла *a*+*b*: *1* — из этилового спирта, *2* — из петролейного эфира

В спектре поглощения пленки хлорофилла *a*+*b* из петролейного эфира, полученной в отсутствие воды, наряду с основным максимумом поглощения около 670 *ммк*, присутствует небольшой максимум поглощения около 740 *ммк* (рис. 6, *В*, *2*). Как уже указывалось выше, пигмент в таких пленках обладал некоторой упорядоченностью.

Пленки хлорофилла *a* и *a*+*b* из серного эфира и этилового спирта (рис. 6, *В*, *1*) обладали максимумом поглощения при 670—675 *ммк* и были аморфными.

При исследовании коллоидных растворов хлорофилла *a*+*b* из ацетона также наблюдалась корреляция между спектральными свойствами и степенью упорядоченности молекул в пленках. Было обнаружено, что уменьшение величины pH среды способствует кристаллизации пигмента. Так, в случае приготовления пленки из коллоидного раствора с pH 8,6 максимум поглощения хлорофилла располагался при 670 *ммк*, а электронограмма от такого хлорофилла указывала на аморфное состояние вещества. В случае коллоидного раствора с pH 4,7 наблюдалась резкая агрегация хлорофилла. Максимум поглощения при этом сдвигался в сторону длинных волн и становился более плоским. Последнее затрудняло точное определение положения максимума. Как описано выше, рентгенографическое и электронографическое исследование пленок «кислых» коллоидов показа-

ло, что хлорофилл в них находится в кристаллическом состоянии, подобном твердому хлорофиллу $a+b$.

Коллоидные растворы хлорофилла из диоксана обладали максимумом поглощения около 690 *ммк* подобно игольчатым кристаллам. Как описано выше, величина pH в этом случае также влияла на степень упорядоченности молекул хлорофилла.

Выводы

Произведено систематическое исследование агрегированных форм хлорофилла посредством электронографической и электронно-микроскопической методики и измерений спектров поглощения света в видимой области. В зависимости от условий приготовления объектов были обнаружены следующие типы упаковки молекул хлорофилла в агрегированных формах с различным набором межплоскостных расстояний и соответствующим видом спектра поглощения.

1. «Твердый» хлорофилл a и $a+b$, обладающий наиболее длинноволновым максимумом поглощения при 740 *ммк*. Кристаллизации «твердого» хлорофилла b и сдвига его максимума поглощения не наблюдали.

2. Игольчатые кристаллы хлорофилла, образующиеся при растирании с петролейным эфиром осадка, после испарения диоксанового раствора. Образование таких структур характеризовалось для хлорофилла a длинноволновым сдвигом максимума поглощения до 692 *ммк*. В этих условиях удалось наблюдать кристаллизацию и для хлорофилла b, максимум поглощения которого претерпевал сдвиг до 675 *ммк*.

3. В препаратах хлорофилла a и $a+b$, полученных испарением пигмента из петролейного эфира в отсутствие воды, имеет место частичная кристаллизация вещества. Спектрально это характеризуется образованием небольшого добавочного максимума поглощения при 740 *ммк*, в то время как основной максимум расположен при 670 *ммк*.

4. При испарении растворов хлорофилла в эфире и этиловом спирте во всех случаях образуются аморфные пленки вещества с красным максимумом поглощения при 670—675 *ммк*.

5. В водных коллоидных растворах хлорофилла кислая среда способствует образованию кристаллических структур.

Поступила в редакцию
2.IV.1959

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А.А., Кособуцкая Л.М., Войновская К.К., Докл. АН СССР, **92**, 1201, 1953.
2. Кособуцкая Л.М., Красновский А.А., Биохимия, **18**, 340, 1953.
3. Красновский А.А., Брин Г.П., Докл. АН СССР, **95**, 611, 1954.
4. Красновский А.А., Нестеровская Е.А., Гольденберг А. Б., Биофизика, **I**, 328, 1956.
5. Takashima S., Nature, **169**, 182, 1952.
6. Красновский А.А., Войновская К.К., Кособуцкая Л.М., Докл. АН СССР, **85**, 389, 1952.
7. Jacobs E.E., Holt A.S., J. Chem. Phys., 22, 142, 1954.
8. Jacobs E.E., Holt A.S., Rabinowitch E., J. Chem. Phys., **22**, 142, 1954.
9. Jacobs E.E., Vatter A.E., Holt A.S., J. Chem. Phys., **21**, 2246, 1953.
10. Jacobs E.E., Vatter A.E., Holt A.S., Arch. Biochem. and Biophys., **53**, 228, 1954
11. Rabinowitch E., Jacobs E.E., Holt A.S., Kromhout R., Z. Phys., **133**, 261, 1952.
12. Jacobs E.E., Holt A.S., J. Chem. Phys., **20**, 1326, 1952.
13. Zscheile F.R., Comar C.L., Bot. Gaz., **102**, 463, 1941.
14. Fischer H., Stern A., Die Chemie des Pyrrols, Leipzig, **2**, 329, 1940.
15. Крисс А.Е., Бирюзова В.И., Золковер А.М., Микробиология, **17**, 484, 1948.
16. Стоянова И.Г., Белавцева Е.М., Изв. АН СССР, серия физ., **23**, 754, 1959.
17. Белавцева Е.М., Кристаллография, **4**, 421, 1959.

18. Пинскер З. Г. Дифракция электронов, Изд. АН СССР, М., 1949.
19. Белавцева Е. М., Биофизика, 2, 628, 1957.
20. Hanson E. A., Rec. trav, botan. néerl., 36, 183, 1939.
21. Shibata K., Benson A. A., Calvin M., Biochim. and Biophys. acta. 15, 461, 1954.

STUDY OF THE STRUCTURE OF THE CHLOROPHYLL AGGREGATED FORMS

E. M. BELAVZEVA, L. M. VOROBIEVA, A. A. KRASNOVSKY

A systematic study of the aggregated forms of chlorophyll was carried out by the :tron diffraction and electron-microscopic methods as well as by measuring the orption in the visible part of the spectrum. The following types of molecule packing the aggregated chlorophyll forms with different sets of spacing and the corresponding orption spectrum were established in relation to the conditions of the sample prepa- :on:

1. Solid «a» and «a+b» chlorophylls having absorption maximum at 740 mμ. No stallisation or shift of the absorption maximum was observed in solid chlorophyll «b».

2. Needle-shaped chlorophyll crystals formed by triturating the precipitate after the :poration the dioxane solution with petroleum ether. The formation of these crystals s characterized by the wave-length shift of the absorption maximum to 692 mμ for orophyll «a». Under these conditions we observed the crystallisation of chlorophyll as well; its absorption maximum shifted to 675 mμ.

3. Partial crystallisation of the substance could be observed in chlorophyll «a» and +b» preparations obtained by evaporating the pigment from petroleum ether in the :ence of water; the spectra were characterized by the formation of an additional ab- ption maximum at 740 mμ, whereas the principle absorption maximum was at 670 mμ.

4. By evaporating chlorophyll from ethyl ether and ethyl alcohol solutions amorphous ns were obtained with a red absorption maximum at 670—675 mμ.

5. In colloidal water solutions the acid medium favoured the formation of crystalline orophyll structures.

Received: 2.IV.1959.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ В РАСТВОРАХ ХЛОРОФИЛЛА И ГОМОГЕНАТАХ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ

Г. П. БРИН и *А. А. КРАСНОВСКИЙ*

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

В настоящее время представление о фотохимическом восстановлении пиридиннуклеотидов (*ПН*), как ступени процесса фотосинтеза, получило широкое распространение.

В 1949 г. мы экспериментально установили возможность фотосенсибилизированного восстановления дифосфопиридиннуклеотида (*ДПН*) в растворе за счет энергии света, поглощенного хлорофиллом [1]. В 1951 г. вышли работы Вишняка и Очоа [2; 3], Толмача [4] и Арнона [5], в которых была показана возможность восстановления *ПН* в гомогенатах хлоропластов. В 1956 г. Сан Пьетро [6; 7] продемонстрировал восстановление *ПН* в гомогенатах спектрофотометрическим методом и нашел белковый фактор, катализирующий световую реакцию. К тем же заключениям пришел Арнон с сотр. [8]. Вернон получил подобные результаты для гомогенатов фотосинтезирующих бактерий [9]. Френкель обнаружил восстановление *ПН* с использованием восстановленного флавинмононуклеотида в хроматофорах фотосинтезирующих бактерий [10].

В ряде работ [6—8] о восстановлении *ПН* судили по увеличению коэффициента погашения при 340 *ммк* после освещения и падению этой величины при введении алкоголь-дегидрогеназы и ацетальдегида в качестве субстрата окисления. Измерение спектра поглощения восстановленных форм *ПН* в этих работах сделать не удалось, по-видимому, из-за сильного поглощения света гомогенатами в этой области спектра. Дейсенс и Амец [11] наблюдали восстановление *ПН* непосредственно в живых листьях растений, применив методы дифференциальной спектроскопии и измерения флуоресценции. В работе одного из нас с Литвиным [12] измерение спектров флуоресценции листьев растений при низких температурах позволило обнаружить максимумы, соответствующие связанным и свободным формам восстановленных *ПН*.

В настоящей работе поставлены следующие задачи:

1. Выяснить связь реакции сенсибилизированного фотовосстановления *ДПН* в растворах (модельные системы) с восстановлением этого соединения в гомогенатах листьев растений в процессе последовательного нарушения естественного состояния пигментов при действии пиридина и нагревания.

В модельных системах по мере увеличения количества воды хлорофилл переходит от истинных к коллоидным растворам, тогда как прибавление пиридина к гомогенатам зеленых листьев приводит к постепенному нарушению естественного состояния гранул — нарушению координации фотохимических и ферментативных реакций [13], с конечным переходом хлорофилла в раствор.

2. Установить возможность сенсибилизированного хлорофиллом фотоокисления восстановленных *ПН* в растворах и гомогенатах листьев растений и изучить этот процесс, вероятно, связанный с использованием в организмах восстановленных форм *ПН*.

Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление *ПН*

В нашей первой работе [1] для того чтобы констатировать восстановление *ДПН*, измеряли спектры поглощения пиридиновых растворов, содержащих хлорофилл, аскорбиновую кислоту и *ДПН* (в области от 320 до 400 *ммк*) до и после освещения.

Измерения производили непосредственно в вакуумных трубках Тунберга, что было связано с известными трудностями из-за большого поглощения света пиридином и компонентами реакции в этой области спектра.

В данной работе мы измеряли спектр поглощения реагирующей системы в кюветах с вкладышами (длина оптического пути d=0,15 *см*), переливая в них содержимое вакуумной трубки до и после освещения. Процедура опытов была следующей: в вакуумную трубку вводили 3 *мл* раствора хлорофилла *а* или *а*+*б* в пиридине (коэффициент поглощения E при 670 *ммк* и d = 1,0 *см* был равен 3—5), 4 *мг ДПН* * или 3 *мг*

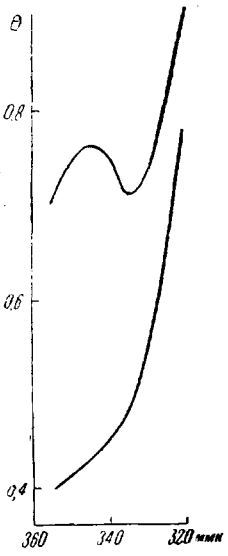


Рис. 1

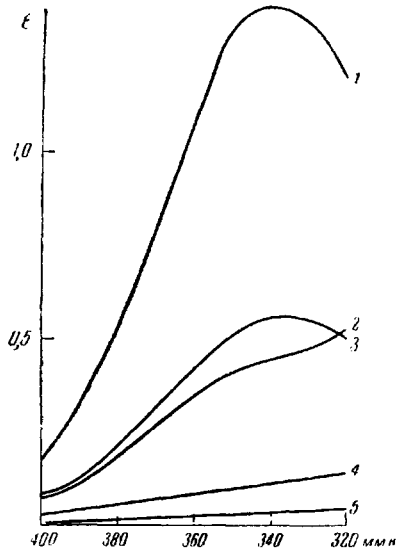


Рис. 2

Рис. 1. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление *ТПН*

Спектры поглощения: *1* — до освещения; *2* — после освещения

Рис. 2. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление *ДПН*.

Опыты проведены в вакууме: *1* — при освещении; *2* — в темноте; *3* — на воздухе при освещении; *4* — при освещении без аскорбиновой кислоты; *5* — при освещении без *ДПН*

трифосфопиридиннуклеотида (*ТПН*), растворенных в 0,6 *мл* 4%-ного водного раствора аммиака и 4 *мг* аскорбиновой кислоты. Часть раствора вводили в кювету с вкладышем, измеряли спектр поглощения в пределах от 320 до 400 *ммк* и переливали обратно в трубку, которую эвакуировали и освещали 5 мин. при t 15° красным светом (светофильтр КС-13) 10^4 *эрг/см²/сек*. После освещения раствор из трубки снова измеряли в кювете с вкладышем. На рис. 1 отчетливо видно, что освещение в области красного максимума поглощения хлорофилла приводит к появлению максимума поглощения, соответствующего восстановленной форме *ПН*. Контрольные опыты (опыты без освещения или опыт с реакционной смесью следующего состава: хлорофилл — *ДПН* или *ТПН* и хлорофилл — аскорбиновая кислота) не приводили к появлению максимумов поглощения в этой области спектра.

Однако наряду с появлением максимума поглощения наблюдался общий подъем спектральной кривой, по-видимому, обусловленный поглощением в этой области спектра продуктами окисления аскорбиновой кислоты и восстановления хлорофилла.

Чтобы иметь возможность наблюдать лишь за восстановлением *ПН*, мы применили также другой метод, основанный на выделении *ДПН* после реакции. В этом случае процедура опытов была следующей: в вакуумную трубку Тунберга вводили 4 *мл* хлорофилла *а* или *а*+*б* в пиридине (E при 670 *ммк* ~ 2), 10 *мг* аскорбиновой кислоты и 10 *мг ДПН* в 1 *мл* 4%-ного водного раствора аммиака. Воздух из трубки эвакуировали вакуумным насосом при кипении растворителя в течение 3 мин., после чего трубку освещали при 15° киноламой мощностью 300 *вт* через конденсор и светофильтр КС-13 в течение 20 мин. После освещения реакционную смесь выливали в

* В работе применяли препараты, содержащие 38—44% *ДНП*, полученные нами из дрожжей обычным методом. Такие препараты содержали *ДПН* главным образом в окисленной форме. Препарат *ТПН* содержал ~ 60% чистого соединения.

пятикратный объем ацетона, охлажденного сухим льдом до —10°. При этом *ПН* переходил в осадок, который отделяли фильтрованием на стеклянном фильтре. Осадок тщательно отмывали от пиридина холодным ацетоном и растворяли в 5 *мл* воды. Спектр поглощения полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-4.

На рис. 2 показаны результаты опытов, проведенных при различных режимах. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление *ДПН* наблюдалось только в присутствии аскорбиновой кислоты при освещении, и было более выражено в вакууме, чем в присутствии воздуха. Следует обратить внимание на то, что реакция идет и в присутствии кислорода воздуха. Вероятно, кислород быстро фотосенсибилизированно восстанавливается и таким образом удаляется из среды реакции, после чего наступает фотовосстановление *ПН*.

То же явление имеет место и при фотовосстановлении хлорофилла аскорбиновой кислотой в присутствии воздуха при слабом освещении — наблюдается индукционный период, соответствующий удалению кислорода из среды реакции за счет сенсибилизированного окисления, на что расходуется часть аскорбиновой кислоты, присутствующей в системе. После этого происходит фотовосстановление хлорофилла. Мы исследовали зависимость фотовосстановления *ДПН* от количества воды в пиридине (от 10 до 70% содержания воды). Концентрация хлорофилла была постоянной ($2 \cdot 10^{-5}$ *М*) для всей серии опытов. Количество *ДПН* и аскорбиновой кислоты составляло 5 *мг* на 1,5 *мл* раствора хлорофилла (в смеси пиридина с водой). При увеличении количества воды в пиридине выше 50% постепенно уменьшается флуоресценция и происходит агрегация — образование коллоидных частиц хлорофилла, достигающая максимума при минимальном количестве пиридина. Зависимость количества восстановленного *ДПН* от количества воды в реакционной смеси (при том же режиме опытов) показана на рис. 3, из которого видно, что наибольшее количество *ДПН* восстанавливается при 20% воды. При 10% воды эффект несколько ниже, что может быть связано с неполным растворением *ДПН*. Действительно, в этих условиях удается наблюдать образование красной фотовосстановленной формы хлорофилла, тогда как при 20% воды, за счет быстротекущих обратных реакций, фотовосстановленной формы хлорофилла не появляется — зеленый цвет раствора не изменяется.

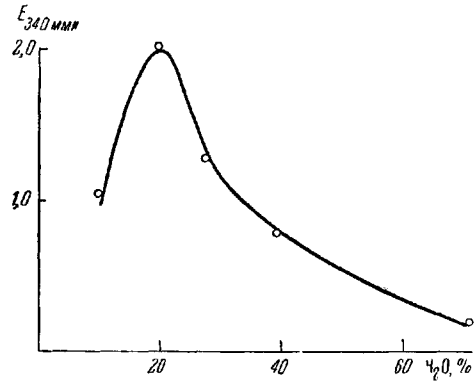


Рис. 3. Зависимость фотовосстановления *ДПН* от количества воды в реакционной смеси

При дальнейшем увеличении количества воды (70%) уменьшается способность к восстановлению, что, по-видимому, связано с постепенной агрегацией хлорофилла. Следует отметить, что отчетливый максимум поглощения восстановленного *ДПН* получился при 10—30% воды в реакционной смеси. При 50% воды этот максимум выражен менее отчетливо. При 70% воды спектр поглощения мало отличается от контрольного опыта в темноте.

Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление *ДПН* в гомогенатах зеленых листьев

Опыты проводили с гомогенатами листьев фасоли, свеклы, шпината и проростками пшеницы. Все растения выращивали в оранжерее. 10 *г* листьев растирали на холоду с 20 *мл* фосфатного буфера, pH 7,0. Суспензию отжимали через полотно и центрифугировали 5 мин. при 1000 *об/мин*. Использовали гомогенат, содержащий осколки хлоропластов и гранулы.

В этих опытах нецелесообразно применять метод выделения *ДПН*, так как в гомогенатах, в отличие от пиридиновых растворов, происходит быстрое ферментативное окисление восстановленного *ДПН*, поэтому измерения необходимо вести в вакууме, непосредственно после освещения. Для проведения этих опытов использовали специальные трубки Тунберга с суженными плоскопараллельными стенками (d=0,15 *см* и рабочий объем 1 ~ *мл*), что давало возможность следить за течением реакции путем спектрофотометрических измерений.

Процедура опытов была следующей: 4 *мг ДПН* растворяли в 0,1 *мл* 4%-ного раствора аммиака и добавляли 0,9 *мл* гомогената листьев или его смеси с пиридином. В опытах сохраняли одну и ту же концентрацию хлорофилла (Е при 670 *ммк*, 0,6—0,8 при d=0,15 *см*).

После эвакуации воздуха измеряли спектр поглощения в диапазоне от 320 до 360 *ммк* и при 670 *ммк*. Раствор освещали киноламой мощностью 300 *вт* через светофильтр КС-13 в течение 20 мин. и измеряли спектр поглощения, после чего пускали воздух и снова измеряли спектр поглощения.

В гомогенатах листьев, в соответствии с опытами Сан Пьетро, наблюдается появление максимума поглощения восстановленной формы *ПН*. Введение пиридина ингибирует эту реакцию. При 10% пиридина еще удается наблюдать некоторое восстановление *ДПН*, тогда как 70% пиридина переводит хлорофилл в раствор, полностью нарушая способность к этой реакции. В случае введения в гомогенат аскорбиновой кислоты (5 *мг* в 1,5 *мл*) наблюдается ингибирование восстановления *ДПН*. Возможно, этот эффект связан с некоторым увеличением кислотности среды. Чтобы проверить это, мы поставили опыты, в которых вместо аскорбиновой кислоты использовали аскорбинат натрия. Фотовосстановление *ДПН* в гомогенатах, содержащих и не содержащих аскорбинат, было близким.

Определение восстановленного *ДПН* (изменение оптической плотности при 340 *ммк*) в условиях освещения и в зависимости от количества введенного пиридина (%) показало следующее:

Добавлено:	0%	5%	10%	70%
ДПН + аскорбиновая кислота	0	0	0,230	0,960
ДПН	0,160	0,080	0,060	0
ДПН+аскорбинат натрия	0,130	—	—	—

Таким образом, введение пиридина в опытах с аскорбиновой кислотой приводит к увеличению количества восстановленного *ДПН*, образовывающегося на свету, достигая максимума при растворении хлорофилла в пиридине.

Следует обратить внимание на следующее обстоятельство. В наших опытах в присутствии 5% пиридина сохраняется способность гомогенатов к восстановлению *ДПН*, тогда как способность к реакции Хилла полностью нарушается при этом количестве пиридина [13]. По-видимому, процесс фотовосстановления *ДПН* и управляющие им ферментные системы более устойчивы к действию пиридина, чем комплекс ферментов, участвующий в реакции Хилла.

Максимум поглощения хлорофилла практически не изменялся в опытах с гомогенатами. Отчетливые максимумы поглощения восстановленного *ДПН* были обнаружены в опытах с аскорбиновой кислотой в интервале от 10 до 70% пиридина. В опытах без аскорбиновой кислоты отчетливые максимумы поглощения наблюдались лишь в том случае, если реакционная смесь содержит не свыше 5% пиридина. В данном случае восстановление *ДПН* идет за счет донаторов водорода, отличных от аскорбиновой кислоты.

Таким образом нарушение естественного состояния связи способствует течению более простой реакции — фотовосстановлению *ДПН* за счет аскорбиновой кислоты, тогда как без вводимого извне донатора водорода способность к восстановлению *ДПН* теряется при нарушении естественного состояния гранул.

Фотосенсибилизированное хлорофиллом окисление восстановленных пиридиннуклеотидов

Как известно, хлорофилл способен сенсибилизировать окисление ряда соединений. Однако до сих пор, насколько нам известно, не была испытана способность *ПН* участвовать в этой реакции.

В наших опытах раствор восстановленного *ДПН* был приготовлен следующим образом: 10 *мг* 44%-ного *ДПН* растворяли в 0,5 *мл* воды. К раствору добавляли 0,5 *мл* 1%-ного $NaHCO_3$, 0,5 *мл* 5%-ного гидросульфита натрия в 1%-ном растворе $NaHCO_3$. После 20 мин. стояния раствора при комнатной температуре добавляли 2,5 *мл* смеси равных объемов 1%-ных растворов $NaHCO_3$ и Na_2CO_3 [14]. Непрореагировавший гидросульфит удаляли продуванием воздуха через раствор и спектрофотометрическим методом контролировали полное разложение гидросульфита. Количество восстановленного *ДПН* определяли по величине коэффициента поглощения при 340 *ммк*.

Окисление восстановленного *ДПН* изучали в растворах хлорофилла и в гомогенатах зеленых листьев, определяя изменение оптической плотности при 340 *ммк* и измеряя поглощение кислорода при окислении *ДПН*.

Фотоокисление *ДПН*-Н в растворах хлорофилла. Водный раствор, содержащий 1 *мг* восстановленного *ДПН* в 1 *мл* жидкости, смешивали с раствором хлорофилла *а*+*б* в спирте или пиридине в отношении 1 : 5. Коэффициент погашения E при 665 или 670 *ммк* был равен 0,6—0,7. Раствор помещали в трубку Тунберга и освещали в присутствии кислорода воздуха в течение 20 мин. через красный светофильтр КС-13. На рис. 4 показаны результаты спектрофотометрических измерений (в области 320—350 *ммк*) растворов хлорофилла в пиридине в присутствии восстановленного *ДПН* до и после освещения.

Результаты показывают, что при освещении максимум восстановленного *ДПН* исчезает за счет окисления. При измерении на приборе Варбурга установлено, что в условиях освещения растворов хлорофилла в спирте красным светом в присутствии восстановленного *ДПН* наблюдалось быстрое поглощение кислорода. В темноте реакция не шла. Концентрация хлорофилла в этих опытах составляла 10^{-5} *М*, концентрация восстановленного *ДПН* — $1{,}5 \times 10^{-4}$ *М*. Результаты опытов представлены на рис. 5. Для сравнения показано окисление аскорбиновой кислоты ($2 \cdot 10^{-3}$ *М*), сенсибилизированное тем же раствором хлорофилла.

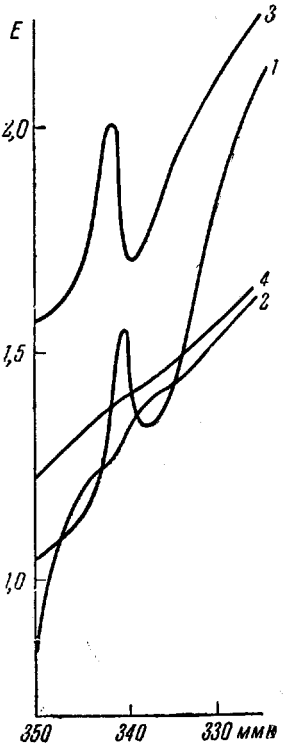


Рис. 4. Фотосенсибилизированное хлорофиллом в растворе и гомогенатом листьев растений окисление восстановленного *ДПН*

Спектры поглощения: *1* — гомогената до освещения; *2* — после освещения; *3* — раствора хлорофилла до освещения; *4* — после освещения

Фотоокисление восстановленного *ДПН* гомогенатами листьев растений. Опыты проводили спектрофотометрическим и манометрическим методами. Исследовали активность неразделенных гомогенатов листьев различных растений и фракций: хлоропластов и надосадочной жидкости. Листья растирали при 0° с $^1/_{15}$ *М* фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 10% сахарозы, отжимали через полотно, центрифугировали при 1000 *об/мин*, затем при 5000 *об/мин*, промывали несколько раз тем же буфером. Для опытов брали гомогенат после первого центрифугирования, надосадочную жидкость после второго центрифугирования и хлоропласты после промывки фосфатным буфером.

Спектрофотометрические измерения. В этих опытах использовали гомогенат из листьев. К 0,9 *мл* гомогената в фосфатном буфере, pH 8,0,

добавляли 0,1 *мл* раствора восстановленного *ДПН*. Снимали спектр поглощения реакционной смеси в области 320—360 *ммк* и освещали красным светом 10^4 *эрг/см²/сек* в течение 20 мин. В конце освещения полностью исчезал максимум восстановленного *ДПН* (рис. 4).

Исследование активности фракций манометрическим методом. Опыты проводили на приборе Варбурга. В опыт брали 9 *мл* гомогената или фракции, содержащих 10^{-5} *М* хлорофилла и 1 *мл* раствора восстановленного *ДПН* $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ *М*. Вначале (12 мин.) измеряли скорость темнового ферментативного окисления восстановленного *ДПН* и затем освещали (18 мин.) красным светом через светофильтр КС-13 и измеряли скорость сенсибилизированного окисления.

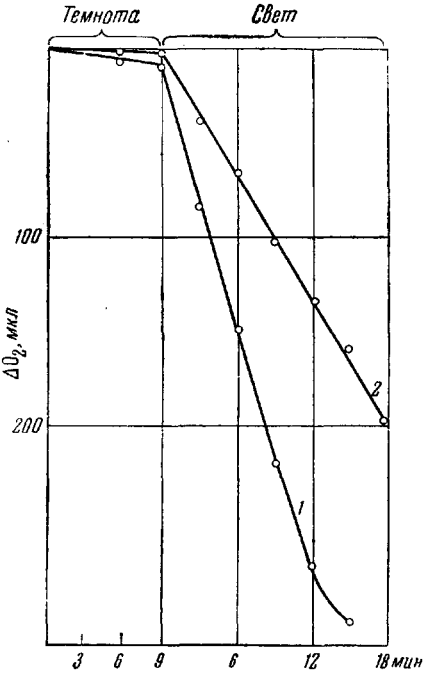


Рис. 5. Сенсибилизированное хлорофиллом фотоокисление *ДПН*Н и аскорбиновой кислоты в спиртовом растворе

1 — *ДПН*Н; *2* — аскорбиновая кислота

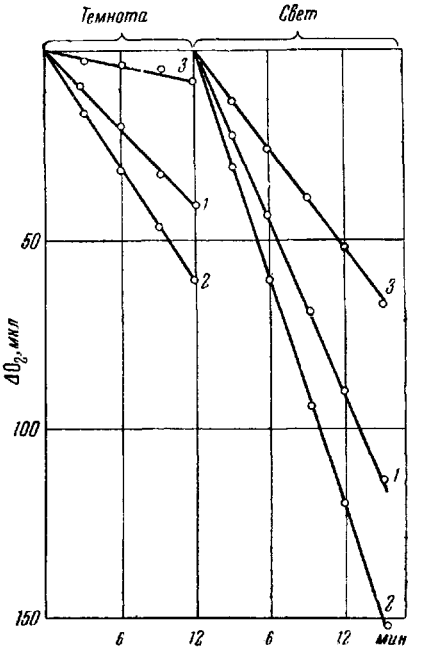


Рис. 6. Фотосенсибилизированное окисление восстановленного *ДПН* разными фракциями гомогената

1 — гомогенат; *2* — надосадочная жидкость; *3* — хлоропласты

Сравнительное исследование фракций показало, что скорость окисления при освещении у неразделенных гомогенатов и надосадочной жидкости гораздо выше, чем у хлоропластов. Однако относительная скорость фо-

Таблица 1

Фотоокисление *ДПН*-Н фракциями гомогенатов листьев растений

Скорость реакции выражена в *мкл* поглощенного кислорода за 1 мин.

С — опыт на свету; *Т* — опыт в темноте; $\Delta = C - T$

Листья растений	Гомогенат			Надосадочная жидкость			Хлоропласты		
	С	*Т*	Δ	*С*	*Т*	Δ	*С*	*Т*	Δ
Свекла	10,0	3,6	6,4	10,7	4,8	5,9	9,6	0,7	8,9
Фасоль	6,7	5,1	1,6	5,2	4,1	1,1	4,8	1,1	3,7
Кукуруза	9,5	5,6	3,9	—	—	—	7,9	1,9	6,9

тохимического окисления (полная скорость реакции при освещении за вычетом скорости ферментативного окисления) выше у фракции хлоропластов (табл. 1). Нагревание до 60° полностью ингибирует ферментативное окисление и значительно снижает скорость фотохимического окисления (табл. 2).

При длительном стоянии фракций на холоду (1°) в темноте — от 1 до 7 дней скорость ферментативного окисления увеличивается, приближаясь к скорости светового процесса, которая практически не изменяется.

Таблица 2

Влияние нагревания (до 60°) на скорость окисления *ДПН*-Н фракциями гомогената

Обозначения, как в табл. 1

Листья растений	Гомогенат			Надосадочная жидкость			Хлоропласты		
	С	*Т*	Δ	*С*	*Т*	Δ	*С*	*Т*	Δ
Свекла	2,9	0,7	2,2	3,0	0,5	2,5	2,0	1,0	1,0
Фасоль	4,7	1,1	3,6	5,3	1,3	4,0	2,2	0,7	1,5
Кукуруза	1,8	0,5	1,3	—	—	—	3,7	1,3	2,4

Введение 5% пиридина значительно снижает скорость ферментативного и фотохимического окисления. Однако, если ввести большое количество пиридина, которое переводит хлорофилл в раствор, то скорость фотосенсибилизированного окисления увеличивается до уровня наблюдаемого нами в истинных растворах хлорофилла (табл. 3).

При введении 0,02 *М* раствора цианистого калия световая и темновая реакции полностью ингибируются.

Таблица 3

Влияние 5% пиридина на скорость окисления *ДПН*-Н фракциями гомогената

Обозначения, как в табл. 1

Листья растений	Гомогенат			Надосадочная жидкость			Хлоропласты		
	С	*Т*	Δ	*С*	*Т*	Δ	*С*	*Т*	Δ
Свекла	4,0	1,7	2,3	6,2	1,5	4,7	2,3	0,7	1,6
Фасоль	4,2	3,5	0,7	4,4	3,9	0,5	1,7	0,7	1,0
Кукуруза	2,0	0,5	1,5	—	—	—	2,3	0	2,3

Из проведенных опытов видно, что свойство фотосенсибилизированного окисления восстановленного *ДПН* в большей степени присуще хлоропластам, чем другим фракциям. При ингибировании пиридином способность к световой реакции сохраняется при полном подавлении ферментативного окисления. Это может служить доводом в пользу того, что световая реакция связана с более стабильными ферментными системами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные опыты показали, что фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление *ПН* аскорбиновой кислотой с «запасанием» энергии света (E_0 аскорбиновой кислоты — 0,05 *в*; E_0 *ПН* — 0,32 *в*) может быть осуществлено в растворах хлорофилла и в биологически дезорганизованных системах — суспензиях хлоропластов и гранул в присутствии пи-

ридина. В интактных гомогенатах для восстановления *ПН* используются отличные от аскорбиновой кислоты донаторы водорода; в этих процессах участвуют специфические белки [6—8]. Вероятно, элементарное фотовосстановление *ПН*, идущее с участием хлорофилла, сопряжено с последующими ферментативными процессами. В связи с этим следует указать, что наблюдалась корреляция между активностью пиридиннуклеотидных дегидраз и фотохимической активностью гомогенатов [15].

Однако трудно с уверенностью судить о выделении кислорода воды при этих реакциях, так как вновь образовавшиеся восстановленные формы *ПН* весьма энергично окисляются как ферментативно, так и фотохимически. В связи с этим следует выяснить значение фотосенсибилизированного окисления *ПН* при осуществлении фотофосфорилирования в хлоропластах, обнаруженного в работах Арнона [8].

В наших предыдущих работах мы неоднократно приводили доводы в пользу того, что в основе фотосенсибилизированных реакций этого типа лежит обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла: при этом молекулами — донаторами водорода, отдающими электрон (водород) возбужденной молекуле хлорофилла, в описанных опытах была аскорбиновая кислота или восстановленный *ДПН*, а акцептором электрона (водорода) — реагирующим в темновом акте реакции (с фотовосстановленным хлорофиллом) — *ПН* или кислород [16].

ВЫВОДЫ

В работе исследовано фотовосстановление *ДПН* и *ТПН* и фотоокисление восстановленного *ДПН* в растворах хлорофилла и в гомогенатах зеленых листьев растений.

В растворах хлорофилла *ДПН* восстанавливается лишь в присутствии аскорбиновой кислоты, тогда как в гомогенатах растений восстановление наблюдается и в отсутствие этого соединения. По мере нарушения естественного состояния гранул пиридином способность к восстановлению *ДПН* утрачивается, но сохраняется способность к более простому фотохимическому процессу — переносу водорода от аскорбиновой кислоты к *ДПН*, достигающему максимума при наибольшем количестве пиридина. Таким образом, в гомогенатах это восстановление связано с ферментативными стадиями, с использованием донаторов водорода, отличных от аскорбиновой кислоты.

Обнаружено, что хлорофилл в растворах и гомогенатах способен к энергичному фотосенсибилизированному окислению восстановленных пиридиннуклеотидов. Это «пиридиннуклеотид-фотооксидазное» действие гомогенатов подавляется при нагревании и действии пиридина.

В экспериментальной части работы принимала участие студентка Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова Т. Н. Красильникова.

Поступила в редакцию
13.VI.1959

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. и Брин Г. П., Докл. АН СССР **67**, 325, 1949.
2. Vishniac W., Ochoa S., Nature **167**, 768, 1951.
3. Vishniac W., Ochoa S., J. Biol. Chem. **195**, 75, 1952; Symp. Phosphorus Metabolism **2**, 467, 1952.
4. Tolmach L., Arch. Biochem. **33**, 120, 1951; Nature **167**, 946, 1951.
5. Arnon D. L., Nature **167**, 1008, 1951.
6. San Pietro A., Science **124**, 118, 1956.
7. San Pietro A., Lang N. M., J. Biol. Chem. **231**, 211, 1958.
8. Arnon D. L., Watley F., Allen M. Nature **180**, 182, 1957; Science **177**, 1026, 1958.
9. Vernon L. P., Ihnen E. D., Biochim. et biophys. acta **24**, 115, 1957.
10. Frenkel A. M., J. Amer. Chem. Soc. **80**, 3479, 1958.
11. Duysens L. M. N., Amesz J., Biochim. et biophys. acta **24**, 19, 1957.

12. Литвин Ф.Ф. и Красновский А.А., Докл. АН СССР **120**, 764, 1958.
13. Кособуцкая Л.М. и Красновский А.А., Биохимия **18**, 340, 1953.
14. Gutcho S., Stewart E., Analyt. Chem. **20**, 1185, 1958.
15. Сисакян, Н.М., Красновский А.А., Михайлов Е.С. и Брин Г.Н., Биохимия **18**, 626, 1952.
16. Красновский А.А., Ж. физ. химии **30**, 968, 1956; J. chim. phys. et phys.-chim. biol. стр. 968, 1958.

CHLOROPHYLL SENSITIZED OXIDATION-REDUCTION OF PYRIDINE NUCLEOTIDES IN SOLUTIONS AND IN HOMOGENATES OF PLANT LEAVES

G. P. BRIN and *A. A. KRASNOVSKY*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A study has been carried out on chlorophyll photosensitized reduction of *DPN* and *TPN* and on oxidation of reduced *DPN* in solutions and in homogenates of green plant leaves.

In pyridine solutions *DPN* is photoreduced only in the presence of ascorbic acid whereas in the homogenates reduction occurs in the absence of external hydrogen donor. With progressive disturbance of the natural state of chlorophyll in the granules by pyridine the capacity to reduce *DPN* in the absence of ascorbic acid is lost but there remains the capacity of a simplier photochemical process — hydrogen transfer from ascorbic acid to *DPN*. In the homogenate this reduction is therefore linked with enzymatic stages.

Chlorophyll in the solution and in the leaf homogenates is capable of rapid photosensitized oxidation of reduced pyridine nucleotides.

БИОФИЗИКА

Том IV, вып. 1 1959

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ФОТОСИНТЕЗ*

А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии АН СССР им. А. Н. Баха, Москва

В процессе фотосинтеза энергия квантов света, поглощаемых пигментами растения, прежде всего хлорофиллом, преобразуется в потенциальную химическую энергию продуктов фотосинтеза. При этом лишь малая часть энергии испускается в виде люминесценции разных типов Например, квантовый выход флуоресценции хлорофилла в живых растениях не превышает 2%, достигая 30% в растворах хлорофилла, выделенного из растения.

Исследование люминесценции пигментов привело к решению существенных вопросов в проблеме использования энергии света при фотосинтезе, энергетики молекул хлорофилла, его аналогов и производных. Ныне особое внимание исследователей привлекает сочетание спектральных методов (изучение квантового выхода, спектра люминесценции и длительности жизни возбужденных состояний) с изучением магнитных свойств возбужденных молекул и их ассоциаций.

В большинстве работ исследуется люминесценция хлорофилла и его аналогов в виде индивидуальных пигментов, выделенных при помощи хроматографии и в виде естественных белково-липоидных соединений в биологических структурах — гранулах хлоропластов.

Общие свойства люминесценции хлорофилла в растворах вообще близки к закономерностям люминесценции органических синтетических красителей. Так, в нашей лаборатории было показано, что спектральные и фотохимические свойства хлорофилла чрезвычайно сходны со свойствами его аналога — синтетического пигмента, фталоцианина магния (тетрафенил-тетразапорфина).

Спектральные свойства хлорофилла в клетках фотосинтезирующих организмов отличаются от его свойств в истинных растворах. При изучении люминесценции пигментов в организмах следует учитывать специфику состояния хлорофилла в гранулах хлоропластов, представляющих собой сложно организованные структуры. Хлорофилл в клетках зеленых растений сосредоточен в особых структурных образованиях — хлоропластах или хлоропластидах, часто имеющих у листьев высших растений форму эллипсоида с величиной осей около 5×2 μ и толщиной 0,5—1 μ . Исследования при помощи микроскопической техники уже давно позволили установить, что хлоропласты имеют гранулярную структуру, причем пигменты сосредоточены в гранулах. Хлоропласты высших растений обычно содержат несколько десятков гранул. Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов фиксированных хлоропластов позволили установить сложную слоистую структуру гранул, где, как полагают, слои (диски), богатые пигментами, чередуются с белковыми слоями; по данным Штейнмана и Сьостранда [1] диаметр дисков гранул некоторых высших растений составляет 0,3—0,6 μ при толщине около 35 Å. Однако действительная топография пигментов в гранулах остается совершенно неясной, так как на элект-

* Полный текст доклада на VI совещании по люминесценции (Ленинград, 17—22 февраля 1958 г.).

ронно-микроскопических картинах черными, якобы «пигментированными», представляются слои, фиксированные OsO_4, по-видимому, содержащие липоиды; процедура фиксации срезов этиловым спиртом приводит к экстрагированию и удалению хлорофилла из срезов, предназначенных для электронной микроскопии [2].

В настоящем обзоре будет дана краткая сводка известных данных о люминесценции хлорофилла в химически индивидуальной форме и в естественном состоянии связи.

I. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ХИМИЧЕСКИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ФОРМЕ

Изучение люминесценции органических красителей в растворах привело к следующей, ныне общепринятой, схеме возбужденных уровней [3], вполне приложимой и к хлорофиллу.

Два больших максимума поглощения хлорофилла в красной и сине-фиолетовой области спектра обычно интерпретируются как два электронных уровня [4], соответствующих переходам:

$$A \rightarrow A^* \text{ и } A \rightarrow A_1^*$$

Флуоресценция, как и у всех красителей, происходит лишь с низшего возбужденного уровня $A^* \rightarrow A$ (рис. 1). Возможен переход возбужденных молекул в синглетном состоянии в метастабильное состояние $A^* \rightarrow A_m$, имеющее, согласно Теренину, Льюису и Каша, природу бирадикала (триплетное состояние). Маловероятен переход из этого состояния «вниз»; $A_m \rightarrow A$ приводит к испусканию замедленного свечения — фосфоресценции, обнаруженной для хлорофилла *b* и других порфириновых пигментов в жестких средах при низких температурах с максимумами в близкой инфракрасной области спектра (около 860 $m\mu$ [5]). В этих условиях возможна также замедленная флуоресценция по пути $A_m \rightarrow A^* \rightarrow A$ со спектром, подобным обычной флуоресценции.

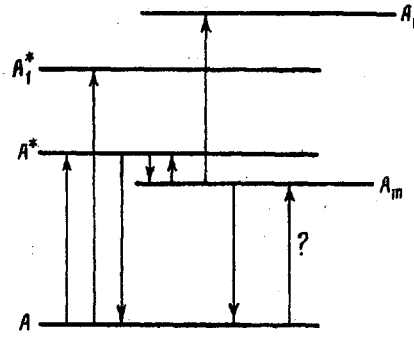


Рис. 1. Уровни возбуждения молекулы хлорофилла

В работах ряда авторов с помощью импульсной техники удалось спектрально обнаружить накопление большого количества молекул пигмента в метастабильном (триплетном) состоянии [6; 7]. Однако в опытах с применением световых импульсов большой мощности возможен не только переход молекул в триплетное состояние, но и осуществление элементарного фотопроцесса между молекулой пигмента и молекулой растворителя, которая может играть роль донора электрона (водорода), приводя к элементарному фотовосстановлению хлорофилла; на эту возможность мы указывали ранее [8], рассматривая опыты Ливингстона [6]. Действительно, спектр поглощения триплетного состояния в этих опытах весьма сходен со спектром поглощения «первичной» фотовосстановленной формы феофитина в опытах Евстигнеева [9].

В самое последнее время Фужимори и Ливингстон [10] изучили влияние различных соединений на флуоресценцию и длительность жизни метастабильных состояний хлорофилла в растворе, наблюдаемых при действии световых импульсов большой мощности.

Опыты показали, что молекулы-восстановители (аскорбиновая кислота) не оказывали действия, тогда как молекулы-окислители, обычно тушащие флуоресценцию, приводили также к «тушению» метастабильного возбужденного состояния. Так, например, половинная длитель-

ность жизни метастабильного состояния хлорофилла в бензоле составляла $4 \cdot 10^{-4}$ сек., а в присутствии $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ *М* хинона сокращалась до $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ сек.

Авторы наблюдали также действие каротиноидов, уменьшающих длительность жизни метастабильных состояний хлорофилла.

При интерпретации этих опытов следует учесть возможность того, что при действии мощных световых импульсов образуются фотовосстановленные формы пигментов путем восприятия электрона возбужденной молекулой пигмента от молекул растворителя или содержащихся в нем примесей, причем этот эффект будет доминировать в средах определенной химической природы. С этой точки зрения легко понять отсутствие действия аскорбиновой кислоты в упомянутых опытах, так как образованная фотовосстановленная форма хлорофилла реагирует не с восстановителями, а с окислителями, что было показано в наших опытах [11].

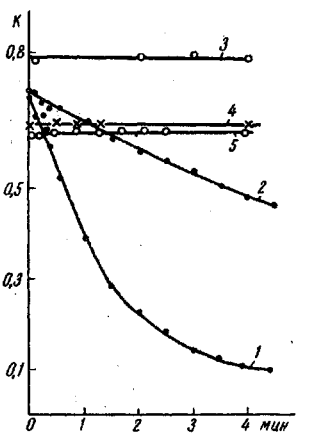


Рис. 2. Кинетика фотохимического восстановления хлорофилла в присутствии различных соединений (4 *мл* раствора хлорофилла в пиридине 10^{-5} *М/л*. 10 *мг* аскорбиновой кислоты, вакуум, освещение через красный светофильтр RG-2 лампой накаливания 500 *вт* при 20°). Измерения оптической плотности (*K*) в максимуме поглощения хлорофилла при 670 *мμ*. *1* — система хлорофилл — аскорбиновая кислота, контрольный опыт; *2* — та же система с добавлением каротина (10 *М/л*). Та же система с добавлением акцепторов электрона: *3* — рибофлавина (10^{-4} *М/л*); *4*— кислорода воздуха; *5*— азокрасителя метилового красного (10^{-4} *М/л*)

Как известно, обнаруженная нами реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла и его аналогов [12] наиболее легко наблюдаема в среде пиридина в вакууме, с аскорбиновой кислотой в качестве донора электрона. При освещении образуется красная фотовосстановленная форма хлорофилла; в темноте реакция идет с регенерацией исходной молекулы хлорофилла и возвращением зеленой окраски раствора. Если в систему хлорофилл — аскорбиновая кислота ввести акцептор электрона, реагирующий с фотовосстановленной формой хлорофилла, то в такой тройной системе мы не будем наблюдать эффекта фотовосстановления пигмента до наступления полного сенсибилизированного восстановления всех присутствующих в системе молекул — акцепторов электрона.

Таким образом, замедление начальных стадий реакции фотовосстановления в присутствии посторонних молекул служит указанием на их взаимодействие с фотовосстановленными формами хлорофилла.

На рис. 2 показана кинетика фотовосстановления хлорофилла *а* (измеренная по падению оптической плотности в максимуме поглощения пигмента) аскорбиновой кислотой и в присутствии акцепторов электрона — кислорода воздуха, рибофлавина, метилового красного. Все эти соединения, быстро реагируя с фотовосстановленными формами пигментов, приводят к устранению наблюдаемого эффекта фотовосстановления. В наших опытах с Е. Б. Пакшиной показано, что подобным является и действие каротина, хотя неизвестно определяется ли его влияние взаимодействием с триплетным состоянием пигмента, или с его фотовосстановленными формами. Во всяком случае, эффект близок к наблюдаемому в опытах Фужимори и Ливингстона [10]. Таким образом, в опытах с импульсным освещением, наряду с возможным образованием триплетных состояний, имеется возможность образования фотореакции восприятия электрона возбужденной молекулой пигмента от молекулы растворителя или содержащейся в нем примеси.

Возможность прямых оптических переходов $A \rightarrow A_m$, а также пере-

ходов $A_m \rightarrow A'_m$ между различными триплетными уровнями хлорофилла еще достоверно не установлена.

Спектры флуоресценции хлорофилла и его аналогов в растворах изучены достаточно хорошо с помощью фотоэлектрических и фотографических методов. При этих измерениях весьма важно устранить искажения в положении главного максимума флуоресценции за счет реабсорбции, что вносит особенно большие искажения при измерении флуоресценции в листьях, обладающих высокой концентрацией хлорофилла [13].

Природа растворителя обычно мало влияет на вид спектра флуоресценции, сдвигая главный его максимум в том же направлении, что и максимум поглощения. Так например, максимум флуоресценции хлорофилла *а* в эфире лежит при 670 *мμ*, а в пиридине — при 673 *мμ*. Следует отметить некоторые особенности структуры пигмента, влияющие на флуоресценцию. Так, замена центрального атома магния на водород в молекулах хлорофилла, протохлорофилла и бактериохлорофилла приводит к образованию соответствующих феофитинов, сохраняющих способность к флуоресценции, спектр которой несколько изменен по сравнению с пигментами — магниевыми комплексами. Введение в центр молекулы меди, железа и некоторых других парамагнитных ионов ведет к «внутреннему тушению» флуоресценции молекулы.

Природа боковых групп — метильной, винильной, карбоксильной — несколько влияет на вид спектра, не изменяя способности пигментов к флуоресценции в растворе. Главной особенностью структуры, определяющей флуоресценцию порфириновых пигментов, является наличие в их молекуле четырех пиррольных ядер, связанных сопряженной по кругу системой двойных связей.

Степень восстановления «полуизолированных» двойных связей молекулы сильно влияет на вид спектра поглощения и флуоресценции. Так, у бактериохлорофилла (у которого восстановлены обе полуизолированные двойные связи) главные коротковолновые максимумы флуоресценции лежат в близкой инфракрасной области спектра (770—790 *мμ*); у хлоринов (восстановлена одна полуизолированная двойная связь) — в области 660—690 *мμ* и у порфиринов — в области 610—640 *мμ*. Соответственно сдвинуты главные максимумы поглощения этих пигментов. Длительность жизни синглетных возбужденных состояний у хлорофилла и его аналогов в растворах имеет порядок $5 \cdot 10^{-9}$ сек.

Фотохимическое восстановление этих пигментов ведет к образованию промежуточных фотовосстановленных форм с максимумами флуоресценции у хлорофилла *а* в области 550—650 *мμ* и у гематопорфирина, согласно нашим опытам с Ю. Ерохиным,— при 760 *мμ*.

Состояние молекул хлорофилла и люминесценции

Хлорофилл в полярных органических растворителях обладает яркой красной флуоресценцией, квантовый выход которой достигает 30%. В особо чистых неполярных растворителях углеводородной природы, не содержащих полярных примесей, флуоресценция крайне слаба и резко усиливается при введении малых добавок полярных соединений [14; 15].

Опыты нашей лаборатории привели к заключению, что координационное связывание полярных молекул (воды, пиридина, спирта) по центральному атому магния молекулы пигмента ведет к дезагрегации димеров пигмента, вероятно, образуемых в неполярных растворителях, что сопровождается увеличением количества флуоресцирующей мономерной формы пигмента. Это заключение сделано на основании того, что феофитины и безмагниевые комплексы фталоцианинов не показали эффекта активации флуоресценции (при введении полярных добавок в растворы пигментов в неполярных растворителях), хотя сами эти соединения обладают яркой флуоресценцией [14; 15].

При вливании в избыток воды растворов пигментов (в пиридине, спирте, ацетоне, диоксане) происходит агрегация молекул пигмента в коллоидные частицы. Образованные коллоидные растворы хлорофилла обычно не обладают флуоресценцией; также не флуоресцируют в видимой области спектра твердые пленки пигментов, полученные при испарении их растворов в органических растворителях в вакууме.

Введение полярных растворителей в водные коллоидные растворы приводит к усилению флуоресценции, обычно достигающей максимума при содержании в воде 40—50% растворителя.

Таким образом, агрегация молекул в коллоидных мицеллах ведет к эффективному размену энергии квантов; при этом возможно образование квазикристаллических структур, обладающих явлением фотопроводимости, что было показано в опытах Теренина, Нельсона [16; 17].

В зависимости от pH водной среды, в которой образуются коллоидные частицы, изменяется их степень дисперсности и спектральные свойства. Наши опыты с Л. М. Воробьевой показали, что в фосфатных буферных растворах (pH 4,5) максимум поглощения коллоидов хлорофилла лежит около 690 *мμ*. При этом образуются крупные частицы, выпадающие в осадок при стоянии. В более щелочных средах (pH 9) образуются весьма устойчивые коллоиды с максимумом поглощения около 670 *мμ*. Щелочные среды благоприятствуют дезагрегации.

Коллоиды, полученные из пиридина, обладают слабой флуоресценцией, что следует объяснить частичной дезагрегацией из-за координационного связывания молекулы пиридина с атомом магния хлорофилла.

Наши опыты с Г. П. Брин показали, что совершенно иными свойствами обладают коллоиды пигментов, полученные при выливании растворов хлорофилла в водные растворы поверхностно-активных веществ — детергентов [18] (анионоидных, катионоидных и нейтральных). Такие коллоиды обладают яркой флуоресценцией и фотохимической активностью, близкой к хлорофиллу в растворах; по-видимому, молекулы пигмента находятся в мицеллах детергента в дезагрегированной «мономерной» форме.

В опытах Рабиновича, Джекобса и Холта [19; 20] было показано, что кристаллические формы хлорофилла *а* и этилхлорофиллида обладают максимумами поглощения, сдвинутыми до 750 *мμ*; эти кристаллы не обладают флуоресценцией.

Мы наблюдали в 1947 году флуоресценцию хлорофилла и фталоцианина магния при адсорбции на различных веществах [18; 21]. Из неорганических адсорбентов наиболее яркой была флуоресценция на окиси магния, из органических — на пальмитиновой кислоте.

Таким образом, известный экспериментальный материал приводит к выводу, что яркая флуоресценция наблюдается у хлорофилла в мономерных формах — в растворах или адсорбированном виде — в разреженных монослоях, тогда как агрегация молекул пигмента ведет к тушению флуоресценции.

В отличие от хлорофилла, хромопротеид красных водорослей — фикоэритрин — обладает флуоресценцией как в растворе, так и в кристаллах и твердых пленках. В этом случае агрегация белка не ведет к агрегации низкомолекулярных хромофорных билиновых групп, положение которых фиксировано на молекуле белка.

Бактериохлорофилл

Существенно сопоставить флуоресценцию хлорофилла с бактериохлорофиллом — пигментом фотосинтезирующих бактерий (эволюционно более старых, чем зеленые растения) неспособных еще к выделению молекулярного кислорода воды при фотосинтезе. Бактериохлорофилл,

полученный путем однократной хроматографии, обладает максимумами флуоресценции в пиридиновом растворе при 780 и 870 *мμ* и часто обладает еще одним максимумом при 700 *мμ*, обязанным примеси хлорофиллоподобного пигмента. При повторной хроматографии удается освободиться от этой примеси.

В отличие от растворенного бактериохлорофилла, обладающего в зависимости от природы растворителя максимумом поглощения в пределах 760—770 *мμ* (соответственно флуоресценции при 770—780 *мμ*), мы нашли, что бактериохлорофилл в твердых пленках и коллоидных растворах обладает двумя отчетливыми максимумами поглощения (при 790—800 *мμ* и 840—880 *мμ*), которые мы приписываем разным типам агрегации — упаковки молекул пигмента в агрегированных структурах [22]. Весьма вероятно, что эти максимумы поглощения соответствуют поглощению бактериохлорофилла в живых бактериях, где, по-видимому, этот пигмент находится в высококонцентрированном агрегированном состоянии. Однако живые бактерии обладают максимумом флуоресценции около 910 *мμ* [23; 24], тогда как известно, что агрегированные формы хлорофилла не обладают флуоресценцией. Следовало измерить флуоресценцию агрегированных форм бактериохлорофилла.

В наших опытах с Л. Матюхиной снимались спектры флуоресценции твердых пленок и коллоидных растворов бактериохлорофилла в вакууме при —150°. При длительной экспозиции удалось обнаружить весьма слабый максимум флуоресценции (около 900 *мμ*), т. е. в том же месте, что и у фотосинтезирующих бактерий. Таким образом, некоторые типы упаковки бактериохлорофилла в агрегированных структурах, по-видимому, также обладают флуоресценцией.

Агрегированные формы пигмента отличаются высокой светоустойчивостью, тогда как бактериохлорофилл в растворе в мономерной форме крайне быстро разрушается при освещении на воздухе. Если бы флуоресценция живых бактерий определялась этой «мономерной» формой пигмента, то освещение интенсивным светом суспензии бактерий на воздухе приводило бы к полной потере флуоресценции, чего, однако, не удалось наблюдать. Освещение ведет к сильному ослаблению флуоресценции при 900 *мμ* и перемещению максимума до 875 *мμ*. Вероятно, флуоресценция бактерий также обязана агрегированным формам бактериохлорофилла. Известно, например, что агрегированные упорядоченные формы цианинов — полимеры Шейбе — обладают дискретным максимумом флуоресценции.

Тушение флуоресценции хлорофилла в растворах

Изучение влияния многих соединений на флуоресценцию растворенного хлорофилла и его аналогов привело к выводу, что наиболее сильным тушащим действием обладают молекулы-окислители, например хиноны, нитросоединения [25; 26]. Наблюдалось также тушение флуоресценции кислородом и окисью азота, что, возможно, связано с парамагнитными свойствами этих молекул. Восстановители — аскорбиновая кислота и другие не оказывали тушащего действия. Следует указать на то, что нам не удалось наблюдать фотохимического взаимодействия хлорофилла с молекулами-окислителями (кроме кислорода), тогда как фотореакция с восстановителями (аскорбиновой кислотой) идет весьма энергично [27].

Работы Э. В. Шпольского с сотрудниками [28] еще в 1936 г. показали отсутствие тушения флуоресценции некоторых красителей-сенсибилизаторов реагирующими в этих реакциях молекулами, что привело к заключению о возможном участии в этих процессах не синглетных

возбужденных состояний, а долгоживущих метастабильных возбужденных состояний. Франк и Ливингстон [29] предложили ряд схем сенсибилизированных реакций, исходящих из представления об участии в них метастабильных состояний пигментов. А. Н. Теренин в своей книге [3] обосновал участие в фотохимических реакциях триплетных состояний пигмента — сенсибилизатора. В согласии с этими положениями находятся наблюдения над тем, что хлорофилл фотохимически взаимодействует с молекулами, не тушащими флуоресценцию. Однако предстоит экспериментальное изучение взаимодействия реагирующих молекул с различными триплетными и метастабильными возбужденными формами молекул пигментов (см. выше). Мы уже указывали на то, что в опытах с применением импульсной техники, наряду с промежуточным образованием триплетных соединений, возможно образование фотовосстановленных форм пигмента, воспринявших электрон от молекулы растворителя или примеси.

Хемилюминесценция

Красная хемилюминесценция фталоцианина магния и хлорофилла со спектром, близким к флуоресценции была исследована в работах Гельбергера [30] и Ротемунда [31] при нагревании растворов пигментов в тетралине, содержащем перекиси. Реакция сопровождается деструктивным окислением хлорофилла. Безмагниевые комплексы (феофитин) не обладают этим свойством, что согласуется с большой прочностью этих соединений к окислению. Механизм хемилюминсценции пигментов пока не ясен, вероятно участие в процессе свободных радикалов, образующихся при термическом распаде перекисей [32]. Яркую хемилюминесценцию этих пигментов особенно легко наблюдать при падении капель раствора пигмента в тетралине на нагретую до 300—400° керамиковую пластинку.

II. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ, СУСПЕНЗИЯХ ХЛОРОПЛАСТОВ И ГРАНУЛ

Флуоресценция. Уже давно было замечено, что листья растений при возбуждении УФ-светом обладают слабой красной флуоресценцией. Интенсивность этой флуоресценции у разных видов растений зависит от возраста, физиологического состояния, температуры и многих других факторов.

Листья многих растений флуоресцируют с оборотной, затененной стороны обычно сильнее, чем с верхней, освещаемой стороны. Освещение интенсивным видимым или УФ-светом ведет к сильному ослаблению флуоресценции хлорофилла, что особенно заметно у красных водорослей [31].

В работах с Воробьевой [33] мы наблюдали действие растворителей при различной их концентрации в воде на флуоресценцию суспензий хлоропластов из листьев растений. Эти опыты показали, что органические растворители ведут к постепенному нарушению естественного состояния хлорофилла (которое мы приписываем дезагрегации), с плавным увеличением флуоресценции, скачкообразно возрастающей при переходе хлорофилла в растворенное состояние (обычно 40—50% растворителя в воде). Сходный тип кривых получается при действии растворителей на нефлуоресцирующие коллоидные растворы хлорофилла.

Кинетика изменения флуоресценции листьев и суспензий одноклеточных водорослей под влиянием ряда воздействий и в течение индукционного периода (от темноты к свету) давно изучалась в работах лабораторий Дж. Франка, Г. Каутского, Е. Вассинка и других исследователей (см. обзоры [34; 35]). Весьма трудно резюмировать громадный

экспериментальный материал, полученный в этих лабораториях. Хотелось бы указать лишь на следующие выводы из этих работ.

После выдерживания растений в темноте включение света обычно ведет к быстрому возрастанию флуоресценции за первые секунды освещения и затем к ее плавному падению до стационарного значения, которое устанавливается через несколько минут. Иногда наблюдается два-три максимума флуоресценции в течение этого индукционного периода.

На ход изменения флуоресценции и уровень ее стационарного состояния влияют многие причины. Так например, в работах Дж. Франка с сотрудниками показано, что повышение парциального давления углекислоты уменьшает стационарный уровень флуоресценции. Интерпретацию этих наблюдений часто проводили с точки зрения простых физических представлений; энергия возбуждения молекулы хлорофилла либо используется для фотопроцесса, либо высвечивается в виде квантов света флуоресценции; если выход флуоресценции уменьшается, то используется больше энергии для фотосинтеза.

Нам кажется, однако, что при интерпретации эффектов изменения флуоресценции хлорофилла в листьях следует учесть влияние изменения состояния хлорофилла в растениях, изменения фотостационарной концентрации пигмента в результате фотохимического процесса и непрерывно идущего биосинтеза пигмента. Действительно, состояние хлорофилла в растениях не является единым.

В настоящее время накоплен экспериментальный материал, указывающий на то, что хлорофилл в растениях может находиться в различных формах, обладающих различными спектральными и фотохимическими свойствами. Перечислим эти результаты.

1. В процессе образования и накопления хлорофилла из протохлорофилла в этиолированных листьях растений наблюдаются различия в спектральных и фотохимических свойствах хлорофилла свежеобразованного из протохлорофилла и образуемого в процессе дальнейшего накопления [36; 37].

2. Изучение кинетики деструктивного фотохимического окисления хлорофилла в гомогенатах из листьев растений показало, что часть хлорофилла выцветает чрезвычайно быстро, это сопровождается резким уменьшением интенсивности флуоресценции; количество быстровыцветающей мономерной формы хлорофилла различно у растений разных систематических типов и зависит от физиологических условий и возраста растений [36].

3. Применяя скоростное центрифугирование (25 000 g) удается частично фракционировать в гомогенатах из зеленых листьев различные формы хлорофилла, обладающие максимумами поглощения при 677—678 $m\mu$ и 670—673 $m\mu$ [37].

4. Применяя метод экстрагирования растворителями Годнев и Осипова [38; 39] обнаружили различия в извлекаемости хлорофилла у различных растений на разных фазах развития.

Существенно выяснить наличие различных форм хлорофилла в живых ненарушенных листьях растений, так как в процессе приготовления гомогенатов вообще возможны изменения нативного состояния пигментно-белковых соединений.

Недавно Френч, пользуясь разработанным им методом «производной» спектрофотометрии [40], показал наличие в листьях максимумов поглощения хлорофилла a при 672 и 678 $m\mu$. Этот новый метод, измеряющий $dD/d\lambda$ как функцию длины волны, позволяет легче выявить максимумы, скрытые при обычном способе спектрофотометрии, измеряющем зависимость оптической плотности D от длины волны.

Для того чтобы с уверенностью судить о превращениях хлорофилла в листьях, важно изучить не только изменения интегральной интен-

сивности флуоресценции, но и изменение спектров флуоресценции в процессе образования хлорофилла и фотосинтетического действия. Быстрые фотохимические изменения хлорофилла требуют весьма быстрой съемки промежуточных форм, что технически трудно достигнуть. В работе с Ф. Ф. Литвином мы пошли по пути фиксации промежуточных стадий методом быстрого охлаждения листьев жидким азотом и снятия спектра флуоресценции при низкой температуре, когда заторможены все дальнейшие реакции [41].

В этих работах в этиолированных листьях обнаружены две формы протохлорофилла с максимумами флуоресценции при 630 и 655 *мμ*, различающиеся по своей фотохимической активности и последовательно образующие формы хлорофилла с максимумами флуоресценции при 690, 675 и 680 *мμ*, причем эффект реабсорбции за счет биосинтетического накопления хлорофилла ведет к дальнейшему смещению максимума до 686 *мμ*. Эти результаты соответствуют опытам Шибата [42], обнаружившего различные формы при спектрофотометрировании этилированных и зеленеющих листьев. На рис. 3 показана первая стадия образования хлорофилла.

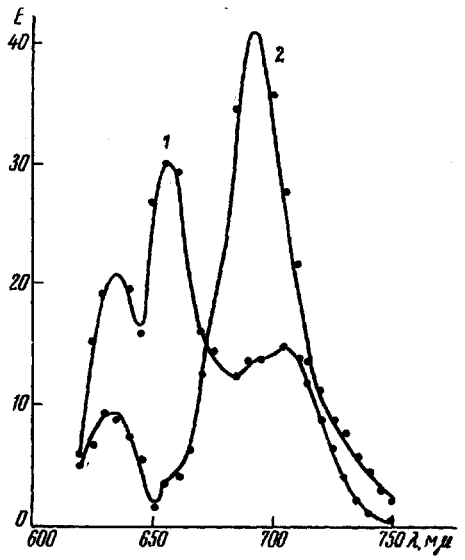


Рис. 3. Спектр флуоресценции этиолированных листьев фасоли *(1)*, после 1 мин. освещения *(2)*. Измерения при —150° (по данным Литвина)

По оси ординат — интенсивность флуоресценции в относительных единицах

Пока нельзя считать ясным, определяются ли различные формы пигментов этапами биосинтеза, например стадией присоединения фитольного «хвоста» [43; 44], или разными формами связи пигмента с белками. Во всяком случае, растворителями удается извлечь на всех этапах биосинтеза лишь обычные протохлорофилл и хлорофилл *а*.

Длительная люминесценция

Помимо флуоресценции, связанной с синглетным возбужденным состоянием молекул хлорофилла ($\tau \sim 10^{-8}$ сек.) за последние годы обнаружены новые типы замедленного свечения хлорофилла в организмах. Так, Стрелер и Арнольд [45] обнаружили в растениях крайне слабое послесвечение, длящееся минуты после выключения света, и, по грубому определению спектрального состава, близкое к флуоресценции хлорофилла. Измерение спектра действия возбуждения послесвечения показало его соответствие спектру действия фотосинтеза (спектру поглощения хлорофилла). Это свечение, которое следует отнести к хемилюминесценции, чувствительно к биохимическим ядрам, температуре и, видимо, связано с элементарными процессами фотосинтеза. Дальнейшее изучение явления привело Стрелера [46] к выводу, что это свечение имеет три составляющих — короткое, длящееся 10^{-3} сек., длительно длящееся (минуты) и промежуточный тип свечения. Энзиматические яды — гидроксиламин, динитрофенол — подавляют длительную компоненту свечения в живых клетках; нагревание до 50° не влияет на короткое свечение, но ингибирует длительное свечение, по-видимому, связанное с биохимическими процессами. К сожалению, до сих пор

неизвестен с полной определенностью спектральный состав различных компонентов свечения.

В этих работах изучалась также корреляция между люминесценцией и изменением поглощения света клетками хлореллы методом дифференциальной спектроскопии [24]. При этом обнаружена качественная связь между долгоживущей люминесценцией и изменением поглощения листьев при 525 и 648 *мμ*. Высказывались предположения, что люминесценция связана с обратными реакциями фотопродуктов, обладающих поглощением в указанной области спектра; природа этих продуктов пока остается неясной. Обращает на себя внимание то, что максимум 525 *мμ* соответствует максимуму фотовосстановленной формы хлорофилла, обнаруженной в наших работах.

Толлин и Кальвин [47] изучали люминесценцию пигментов при разных температурах. В этих работах люминесценция хлоропластов шпината возбуждалась световыми импульсами до $2 \cdot 10^{-3}$ сек. с включением регистрирующего фотоумножителя через разные интервалы времени после возбуждающей вспышки. При комнатной температуре обнаружены три вида послесвечения с полупериодами 0,15 сек., 2 сек. и 15 сек. Последний вид свечения обнаружен лишь при наибольшей чувствительности установки. Эти типы свечения, по-видимому, обладают одинаковым спектральным составом. При понижении температуры до —35° остается лишь наиболее короткоживущий компонент свечения. При —90° наблюдался новый вид свечения с полупериодом 0,3 сек., усиливающийся при дальнейшем охлаждении до —196°. Это свечение возбуждается лишь светом 360—420 *мμ* и лежит, по-видимому, в близкой инфракрасной области спектра (1 *мμ*).

Высушенные в токе азота хлоропласты при нагревании дают два максимума свечения термолюминесценции при 50° и 150°, в согласии с работой Арнольда и Шервуд [48]. Свежевыделенные влажные хлоропласты не давали этого эффекта. Кальвин указывает на качественную корреляцию наблюдаемой люминесценции хлоропластов результатами измерения электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) тех же объектов. Так, люминесценция и ЭПР возбуждаются светом, поглощенным хлорофиллом; время затухания свечения и ЭПР при комнатной температуре близки (секунды); при —140° и в сухих хлоропластах ЭПР сохраняется часами, и, в соответствии с этим, люминесценция в области 700—900 *мμ* не наблюдается; при 60° ЭПР сухих хлоропластов длится несколько секунд и при этой температуре также наблюдается пик термолюминесценции. Наблюдаемое свечение авторы приписывают рекомбинации непарных электронов и «дырок» в квазикристаллической решетке хлорофилла в гранулах.

Различная длительность свечения в этой работе объясняется различной глубиной ловушек, захватывающих мобилизованные светом электроны (см. рис. 1). Низкотемпературное свечение может быть приписано либо испусканию кванта с нижнего триплетного уровня, либо переходу из верхнего в нижнее триплетное состояние, учитывая возбуждение этого свечения в сине-фиолетовом максимуме хлорофилла.

Нам кажется, что применение полупроводниковой модели упрощает действительную картину процесса, не учитывая ее биохимической специфики. Вместо электронных ловушек можно представить образование промежуточных ион-радикалов, обладающих различной длительностью жизни. Разные типы свечения можно объяснить рекомбинацией свободных радикалов с различной длительностью жизни, образуемых на пути фотохимического переноса электрона (при участии хлорофилла) по цепи промежуточных ферментных и окислительно-восстановительных систем. Следует также учесть возможность хемилюминесценции за счет взаимодействия с хлорофиллом перекисных соединений, образуемых при фотосинтезе.

Термолюминесценция хлоропластов

Арнольд и Шервуд [48] недавно обнаружили люминесценцию, возникающую при нагревании сухих пленок хлоропластов после предварительного их освещения видимым светом. Хлоропласты выделяли обычными методами из листьев табака, шпината и других растений и высушивали в токе воздуха на металлических дисках. Диски прижимали к алюминиевому стержню, температуру которого можно было варьировать при помощи нагревателя. Свечение дисков регистрировались фотоумножителем, охлажденным сухим льдом, с длинноволновой

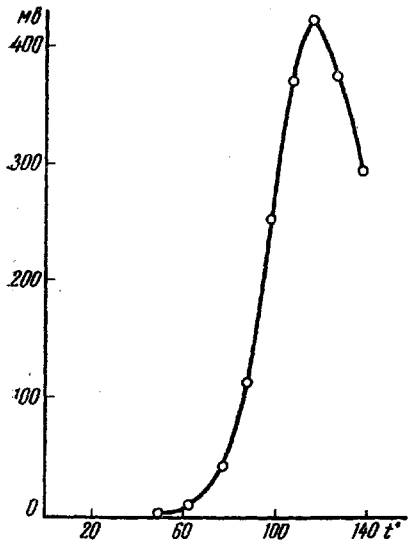


Рис. 4. Термолюминесценция сухих хлоропластов в зависимости от температуры [48]

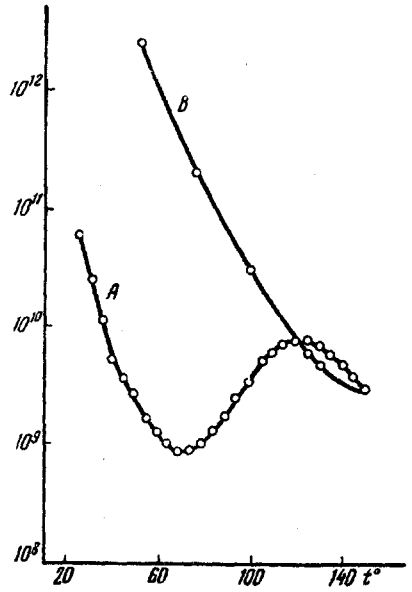


Рис. 5. Сопротивление пленки хлоропластов *(ом)* в зависимости от температуры

А — после освещения, *Б* — по мере охлаждения до комнатной температуры [48]

границей чувствительности 1,3 μ. Максимум свечения наблюдали при нагреве сухих хлоропластов до 100—130° (см. рис. 4). В течение четырех циклов (освещение — нагрев — охлаждение) люминесценция сохранялась, хотя ослаблялась с каждым циклом. С помощью светофильтров грубо измерена спектральная область свечения в пределах 630—800 *мμ*. Освещение при температуре жидкого азота не приводило к измеримым эффектам свечения после нагревания.

Измерение электропроводности хлоропластов на дисках показало ее изменение в зависимости от температуры; при нагреве освещенных хлоропластов наблюдался минимум около 60—70°, тогда как охлажденный препарат показал монотонное падение сопротивления при нагревании (рис. 5).

Авторы приходят к заключению, это эти явления сходны с известной термолюминесценцией кристаллических полупроводников при возбуждении УФ- или рентгеновыми лучами и поэтому к хлоропластам применима обычная для полупроводников модель. При поглощении квантов электрон перемещается в зону проводимости и захватывается в ловушках различной глубины; нагрев освобождает электрон и приводит к высвечиванию и запасенной энергии квантов света. Авторы указывают также, что для определенных суждений нужны измерения фотопроводимости хлоропластов и эффекта Холла.

Следует указать на то, что в этих опытах использовались препараты,

сходные с твердыми пленками хлорофилла, так как биологическая организация системы и нативное состояние белка нарушалось при нагреве препаратов хлоропластов до 140°. Поэтому необходимо выяснить — присуще это явление особому состоянию хлорофилла, или является обычным свойством твердых пленок хлорофилла и других пигментов, изученных в опытах ряда исследователей. Следовало бы также рассмотреть возможность хемилюминесценции, возникающей при взаимодействии хлорофилла с перекисями, образующимися при освещении хлоропластов.

III. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА И МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ КВАНТОВ СВЕТА [49; 50]

Изучение люминесценции дает возможность исследовать миграцию энергии квантов, поглощаемых различными компонентами пигментной системы хлоропластов. При этом пока остаются неясными структурные особенности системы, определяющие эффективное энергетическое сопряжение пигментов разных типов.

Наряду с хлорофиллом, все фотосинтезирующие организмы содержат набор каротиноидов, а синезеленые и красные водоросли, кроме того,— фикобилины (фикоциан и фикоэритрин).

Кванты света поглощаются молекулами пигментов растений, прежде всего хлорофиллом *a* и *b*, каротиноидами и фикобилинами у красных и синезеленых водорослей.

Уже давно было обнаружено явление сенсибилизированной флуоресценции хлорофилла *a* под действием света, поглощаемого другими пигментами (литературу см. в обзорах [49; 50]). Измерения квантового выхода флуоресценции хлорофилла *a* в растениях при возбуждении светом во всех областях видимого спектра показали сравнительно малые колебания этой величины, хотя относительная доля поглощения света хлорофиллом и другими пигментами изменяется чрезвычайно сильно в зависимости от спектральной области возбуждения.

Эти опыты показывают эффективную миграцию энергии кванта света от фикобилинов, некоторых каротиноидов и хлорофилла *в* к хлорофиллу *a*, являющемуся конечным акцептором энергии квантов света, пигментом, непосредственно участвующим в фотохимических процессах.

По-видимому, эта миграция энергии идет по «резонансному» механизму, поскольку здесь соблюдаются условия перекрывания спектра флуоресценции пигмента (донора энергии) со спектром поглощения пигмента (акцептора энергии), с постепенным «спуском» до наиболее низкого уровня, которым обладает хлорофилл *a*.

Иной случай миграции энергии кванта света «внутри» молекулы фикоцианина от ароматических аминокислот белка к билиновому хромофору изучен в работах Баннистера [51], а миграция энергии в молекуле фикоэритрина красных водорослей в работе Конева [52]. Наконец, миграция энергии между аминокислотами рассматривается в работе Владимирова [53].

Миграция энергии между молекулами хлорофилла

В гранулах хлоропластов хлорофилл находится в высококонцентрированном состоянии, благоприятствующем обмену энергии между его молекулами.

Представление о миграции энергии между молекулами хлорофилла впервые высказано в работе Гаффрона и Воля [54], предложивших гипотезу «фотосинтетической единицы», по которой миграция энергии кванта света происходит в «коллективе» нескольких тысяч молекул хлорофилла с конечным использованием этой энергии в одном активном центре.

Опыты Арнольда и Мик [55], в которых была обнаружена деполяризация флуоресценции хлорофилла в хлоропластах при возбуждении поляризованным светом, интерпретируются как следствие быстрого обмена энергии между молекулами хлорофилла, вероятно на уровне синглетного состояния.

В работе С. В. Конева в нашей группе было показано, что деполяризация флуоресценции фикоэритрина независима от вязкости среды и температуры, что свидетельствует о возможности эффективного обмена энергии между эритробилиновыми хромофорами молекулы фикоэритрина.

Измерения средней длительности жизни возбужденной молекулы хлорофилла в растворах и в живых растениях в трех лабораториях [56—58] привели к близким результатам; длительность возбужденного состояния хлорофилла *a* в растворе лежит в пределах $5 \cdot 10^{-9}$—$8 \cdot 10^{-9}$ сек. в зависимости от природы растворителя; в живых растениях — в 3—6 раз меньше, что можно объяснить многими причинами: эффективной миграцией энергии между молекулами пигмента, иным состоянием пигмента в пластидах и, наконец, тем, что лишь часть хлорофилла находится во флуоресцирующем состоянии. Опыты Теренина и Ермолаева [59], в которых была открыта способность к переносу энергии между молекулами органических соединений на уровне триплетного состояния, требуют рассмотрения возможности такого механизма миграции между молекулами хлорофилла и различными его формами и другими пигментами.

По существу миграция энергии между молекулами на уровне триплетного состояния является миграцией непарного электрона и формально может соответствовать полупроводниковой модели — квазикристаллическому агрегату из многих молекул хлорофилла.

В опытах Теренина и Пуцейко [60] была показана возможность фотопроводимости агрегированных форм хлорофилла. В опытах тех же авторов было установлено явление передачи энергии от адсорбированного хлорофилла (фталоцианина) к кристаллической решетке адсорбента — полупроводника, приобретающего «сенсибилизированную» фотопроводимость под действием света, поглощенного хлорофиллом. Вартанян обнаружил фотопроводимость в твердых пленках фталоцианинов [61]. Наконец, Дж. Франк [62] предположил, что возможна передача энергии от возбужденной (синглетной) молекулы хлорофилла к метастабильной (триплетной) молекуле хлорофилла, запасающей в таком процессе энергию двух квантов света. Однако, все эти возможности нуждаются в детальной экспериментальной разработке.

IV. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ПРИРОДА ЭЛЕМЕНТАРНЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Наблюдения, изложенные выше, привели некоторых исследователей к следующей «физической» схеме элементарных процессов. При поглощении кванта света в квазикристаллической форме хлорофилла в гранулах хлоропластов электрон переходит из заполненной зоны в зону проводимости, где он может быть захвачен в «ловушках» (примесных уровнях) различной глубины.

Непарный электрон, согласно этой схемы, принадлежит не единичной молекуле хлорофилла, но делокализован в общей зоне проводимости агрегата многих молекул хлорофилла. Возможно, что это общие уровни хлорофилл-белковых соединений, и непарный электрон мигрирует в зонах проводимости хромопротеида, согласно существующей интерпретации полос парамагнитного электронного резонанса в гомогенатах растительных и животных тканей [63—64]. При этом электрон воспринимается системами, участвующими в реакциях восстановления углекислоты, а «дырка» воспринимает электрон молекулы воды, приводя к ее фотоокислению с конечным выделением кислорода.

Так на языке полупроводниковых представлений описывается элементарный окислительно-восстановительный процесс фотосинтеза. Подобные представления близки к электронным моделям гетерогенного катализа и гетерогенной сенсибилизации кристаллами-полупроводниками. Коммонер и др. [63] наблюдали появление спектра электронного парамагнитного резонанса при освещении хлоропластов; дальнейшее изучение тонкой структуры полосы, вероятно, позволит решить вопрос о том, делокализован ли неспаренный электрон или он принадлежит определенному типу молекул.

Если в полупроводниковых представлениях теряется химическая специфика отдельных видов молекул, участвующих в реакциях, то в отличие от этого может быть нарисована следующая «химическая» картина процесса, согласно которой непарный электрон последовательно локализуется в разных типах молекул пигментов и биокатализаторов, участвующих в последовательных стадиях процесса переноса электрона водорода от воды к углекислоте. Иначе говоря, образуются промежуточные продукты — свободные радикалы, обладающие различной реакционной способностью (длительностью жизни); их рекомбинация ведет к свечению разной длительности.

Так, можно предположить следующие этапы процесса: в результате поглощения кванта света молекула хлорофилла переходит в синглетное и затем в триплетное возбужденное состояние; элементарным фотопроцессом является восприятие электрона молекулой хлорофилла от донорной системы, связанной с фотоокислением воды (цитохромы?); электрон через хлорофилл передается по «эстафете» энзиматических систем к пиридиннуклеотидам, восстановленные формы которых участвуют в процессах восстановления углекислоты при фотосинтезе. Обратные реакции активных восстановителей и окислителей, образуемых в фотопроцессе, могут быть сопряжены с окислительным (фотосинтетическим) фосфорилированием и приводить к люминесценции с различной длительностью.

При рассмотрении подобных схем следует учесть результаты работ, в которых был экспериментально показан механизм фотосенсибилизирующего действия хлорофилла в реакциях фотохимического переноса электрона; в основе его лежит способность хлорофилла к реакции обратимого фотохимического восстановления (обратимого восприятия электрона). Образуемая фотовосстановленная форма хлорофилла, обладающая свойствами ион-радикала [12; 65; 66] в темновом акте реакции может передать свой электрон флавинам и придин-нуклеотидам, непосредственно участвующим в реакциях переноса электрона (водорода) к циклу восстановления углекислоты.

В условиях организации хлоропласта процесс переноса электрона может идти как в объеме, так и на поверхности гранул хлорофилла и белков; в этом случае отдельные элементарные акты, которые легко разделить в растворах, могут быть слиты в результате перестройки электронной системы реагирующих молекул, связанных со структурой специфического белка.

Однако биохимическая специфика хлорофилла и сопряженных с ним энзиматических систем определяют последовательность прохождения мобилизованного в реакции электрона.

Как полупроводниковая, так и химическая модели элементарных процессов являются рабочими гипотезами, с точки зрения которых ведутся дальнейшие работы исследователями разных лабораторий. Эти концепции не являются взаимоисключающими, они рассматривают разные стороны стадии всего процесса. Вероятно явление миграции энергии (электрона) в гранулах между молекулами хлорофилла с последующим участием биохимически-определенных соединений в последующих темновых стадиях процесса.

Задача будущего — выразить эти общие схемы в определенных биохи-

мических формах, выяснив природу элементарных процессов, химическую природу нестойких промежуточных фотопродуктов — свободных радикалов и структурные особенности системы, определяющие разделение активных фотопродуктов и путей их дальнейших превращений.

Поступила в редакцию
23. VI. 1958

ЛИТЕРАТУРА

1. Steinmann E., Sjöstrand F. S., Exptl Cell. Res. 8, 15, 1955.
2. Granick S., Research in Photosynthesis. Intersc. N. Y., 1957.
3. Теренин А. Н., Фотохимия красителей, Изд. АН СССР М., 1947.
4. Рабинович Е., Фотосинтез, 2, ИЛ, М., 1953.
5. Becker R. S., Kasha M., J. Amer. Chem. Soc. **77**, 3369, 1955.
6. Livinston R., J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2179, 1955.
7. Linshitz H., Abrahamson E. W., Research in Photosynthesis, Inter N. Y., 1957.
8. Красновский А. А., ст. в сборнике «Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности», 92, Изд. АН СССР, М., 1955.
9. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., ДАН СССР, **96**, 1201, 1954.
10. Fujimori E., Livingston R., Nature **180**, 1036, 1957.
11. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН СССР, **73**, 1239, 1950.
12. Красновский А. А., ДАН СССР, **61**, 421, 1948; Журн. физ. хим. **30**, 968, 1956.
13. French C. S., Young V., J. Gen. Physiol. **35**, 873, 1952.
14. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А., ДАН СССР **66**, 1133, 1949; **70**, 261, 1950.
15. Livingston R., Watson W., J. Mc. Ardle, J. Amer. Chem. Soc., **71**, 1542, 1949.
16. Terenin A. N., Photoreactions electroniques des colorants organiques Experimentia Suppl. VII, 1957.
17. Nelson R., J. Chem. Phys. **27**, 864, 1957.
18. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН СССР, **63**, 163, 1948; Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия **22**, 776, 1957.
19. Rabinowitch E., Jacobs E., Holt A. S., Kromhout R., Z. Phys. **133**, 261, 1952.
20. Jacobs E., Holt A. S., J. Chem. Phys. **22**, 142, 1954.
21. Красновский А. А., Изв. АН СССР, сер. биол., **3**, 377, 1947.
22. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М., ДАН СССР, **85**, 389, 1952; **92**, 1201, 1953.
23. Vermeulen D., Wassink E. C., Reman H., Emzymologia 4, 254, 1937.
24. Duysens L. M. N., Nature **168**, 548, 1951.
25. Евстигнеев В. Б., Красновский А. А., ДАН СССР, **60**, 623, 1948.
26. Livingston R., Ke C., цит. по Рабиновичу, Фотосинтез 2.
27. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А., ДАН СССР, **74**, 315, 1950.
28. Шпольский Э. В., Шереметьев Г. Д., Ж. физ. химии, 8, 640, 1936; Acta Physicochim., USSR, 5, 575, 1936; Шпольский Э. В., Гришкун Е. В., Ж. физ. химии, **19**, 107, 1945.
29. Franck J., Livingston R., J. Chem. Phys. **9**, 181, 1941.
30. Helberger J. H., Naturwissenshaften **26**, 316, 1938.
31. Rothemund P., J. Amer. Chem. Soc., **60**, 2005, 1938.
32. Linshitz H., цит по Rabinowitch E., Photosynthesis II, 2, 1838; Intersc. N. Y., 1956.
33. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
34. Franck J., Symp. Soc. Exper. Biol. **5**, 160, 1951.
35. Wassink E., Advances in Enzymol. and Related Subjects Biochem. **11**, 91, 1951.
36. Красновский А. А., Воробьева Л. М., ДАН СССР, 85, 177, 1952; **91**, 343, 1953; **92**, 1201, 1953; **104**, 440, 1955; Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биохимия **21**, 126, 1956.
37. Красновский А. А., Воробьева Л. М., Пакшина Е. В., Физиол. растений **4**, 124, 1957.
38. Годнев Т. Н., Изв. АН БССР, **1**, 17, 1948; Рефераты Ин-та биологии АН БССР, 1957, Минск.
39. Осипова О. П., ДАН СССР, **57**, 371; 1947; Физиол. растений, **4**, 29, 1957.
40. French C. S., Huang H. S., Carnegie Inst., of Wash. Year Book, 56, 266 (1956—57); Giese A. T., French C. S., Appl. Specroscopy **9**, 2, 1955.
41. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., ДАН СССР, **117**, 106, 1957.
42. Shibata K., J. Biochem. **44**, 147, 1957.
43. Loeffler J., Carnegie Inst. Wash. Year Book **54**, 159, 1955.
44. Годнев Т. Н., Ефремова Р. В., Кравцов Л. А., ДАН СССР **113**. 646, 1957.
45. Strehler B. L., Arnold W. H., J. Gen. Physiol. **34**, 809, 1951.
46. Strehler B. L., Lynch V., Arch. Biochem. and Biophys. **70**, 527, 1957; Ar-

thur W. E., Strehler B. L., Arch. Biochem and Biophys. **70**, 507, 1957.
47. Tollin G., Calvin M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **43**, 895, 1957.
48. Arnold W., Sherwood H. K., Proc, Nat. Acad. Sci. U. S. A. **43**, 105, 1957.
49. Теренин А. Н., Ермолаев В. Л., Успехи физ. наук **58**, 37, 1956.
50. Rabinowitch E., J. Phys. Chem. **61**, 870, 1957.
51. Bannister T. T., Arch. Biochem. and Biophys. **49**, 222, 1954.
52. Конев С. В., Тезисы докл. II Всесоюзн. конфер. по фотосинтезу, 13, Изд. МГУ, 1957.
53. Владимиров Ю. А., ДАН СССР, **116**, 780, 1957.
54. Gaffron H., Wohl K., Naturwissenhaften. **24**, 81, 103, 1936.
55. Arnold W., Meek E., Arch. Biochem. Biophys. **60**, 82, 1956.
56. Дмитриевский О. Д., Ермолаев В. Л., Теренин А. Н., ДАН СССР, **114**, 751, 1957.
57. Brody S. S., Rabinowitsh E., Science **125**, 555, 1957.
58. Тумерман Л. А., ДАН СССР, **117**, 605, 1957.
59. Теренин А. Н., Ермолаев В. Л., ДАН СССР, **85**, 547, 1952.
60. Пуцейко Е. К., Теренин А. Н., Журн. физ. химии **23**, 676, 1949; ДАН СССР, **70**, 401, 1950.
61. Вартанян А. Г., Крапович И. А., Журн. физ. химии **32**, 178, 1958.
62. Frank J., Research in Photosynthesis, Imersc. N. Y., 1957.
63. Commoner B., Townsend J., Pace G. Nature **174**, 689, 1954.
64. Блюменфельд Л. А., Изв. АН СССР, сер. биол., **3**, 285, 1957.
65. Красновский А. А., Умрихина А. В., ДАН СССР, **104**, 882, 1955; Биофизика, **3**, 5, 1958.
66. Евстигнеев В. Б., Журн. физ. химии, **32**, 969, 1958.

А. А. Красновский

ФОТОБИОХИМИЧЕСКИЙ ПУТЬ УЧАСТИЯ ПИГМЕНТОВ В РЕАКЦИЯХ ФОТОСИНТЕЗА

Запасание энергии света при реакции обратимого фотохимического восстановления хлорофилла

В процессе фотосинтеза происходит восстановление углекислоты за счет водорода воды; этот процесс требует подвода энергии извне; увеличение свободной энергии при реакции $H_2O + CO_2 = {}^1/_6C_6H_{12}O_6 + O_2$ составляет + 120 б. кал., что соответствует трем квантам красного света. Для осуществления этого процесса используется лучистая энергия, поглощаемая пигментами растения, прежде всего хлорофиллом. Каков конкретный путь преобразования энергии квантов в потенциальную энергию продуктов фотосинтеза? На основании известного экспериментального материала трудно сомневаться в том, что преобразование происходит на ранних стадиях процесса в результате элементарной фотохимической реакции, когда энергия кванта света концентрируется в первичных нестойких активных фотопродуктах. Если хлорофилл действительно включается в процесс переноса «водорода» или, иначе говоря, электронов и протонов от воды к углекислоте, то следовало бы искать участие пигмента в фотохимических окислительно-восстановительных превращениях, сопровождающихся «запасанием» энергии света в продуктах реакции. Такого рода превращения хлорофилла искали многие исследователи в течение нескольких десятков последних лет.

Работы К. А. Тимирязева еще в конце XIX в. показали возможность обратимого химического восстановления хлорофилла металлическим цинком. Исходя из этого в 1948 г. нам удалось обнаружить способность хлорофилла к фотохимическому восстановлению —к реакции, идущей с образованием неустойчивых фотопродуктов, обратимо реагирующих в темноте с образованием исходного пигмента [1, 2]. Удача этих опытов определилась выбором донатора водорода — аскорбиновой кислоты и среды (пиридин), в которой были стабилизированы богатые энергией фотопродукты.

Реакция обратимого фотовосстановления сопровождается «запасанием» лучистой энергии в фотопродуктах; эти обстоятельства определили детальное изучение реакции в работах нашей лаборатории и за рубежом [см. 1]. Дальнейшие исследования показали, что реакция эта не является специфической лишь для хлорофилла — к ней способны все его аналоги и производные: протохлорофилл, бактериохлорофилл, безмагниевые производные — феофитины, цинковые комплексы, различные порфирины

и их синтетические аналоги (рис. 1). Фикоэритрин и фикоциан не способны к реакции фотовосстановления и, как показали работы нашей лаборатории [3], отличаются большой фотохимической устойчивостью. Эти свойства фикобилинов соответствуют распространенному представлению о передаче энергии от этих пигментов к хлорофиллу, непосредственно участвующему в реакциях фотосинтеза. Исследование миграции энергии в молекуле фикоэритрина рассматривается в докладе аспиранта С. В. Конева (см. стр. 94).

Сравнительное исследование различных пигментов показывает, что для осуществления реакции фотовосстановления важно наличие системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента. Ступенчатый механизм этой реакции детально изучен в работах В. Б. Евстигнеева и В. А. Гавриловой.

Общая картина механизма реакции близка к той схеме, которая была предложена в нашей первой работе. Согласно с представлениями, которые были рассмотрены в докладе А. Н. Теренина, вероятно то, что возбужденная в результате поглощения кванта молекула хлорофилла переходит в длительно живущее, химически активное бирадикальное состояние. По существу, в этом акте уже происходит первичная конверсия энергии кванта света в потенциальную химическую энергию за счет обращения спина электрона в системе сопряженных двойных связей. Если длительность жизни τ возбужденного состояния хлорофилла составляет 10^{-8} сек., то τ метастабильного состояния в растворе, вероятно, может достигать 10^{-2}—10^{-3} сек.

Возбужденная молекула хлорофилла воспринимает электрон от молекулы-донора с образованием пары первичных ион-радикалов:

$$\cdot X \cdot + AH \rightarrow \cdot X^- + \cdot AH^+.$$

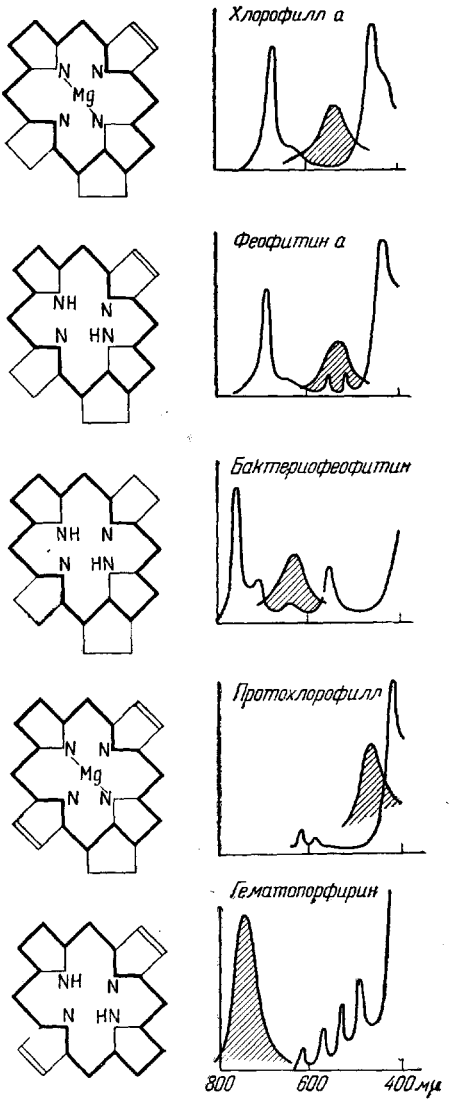


Рис. 1. Схематическое изображение структуры и спектров поглощения пигментов и их фотовосстановленных форм (последние заштрихованы)

Акт восприятия электрона служит первичным фотохимическим процессом, течение которого установлено в прямых опытах. «Темновым» актом реакции является присоединение протона с образованием более устойчивых «вторичных» восстановленных форм:

$$\cdot X^- + \cdot AH^+ \rightarrow \cdot XH + \cdot A \text{ и т. д.}$$

Мы уже высказывали предположение, что первично присоединенный электрон делокализован в системе сопряженных связей, тогда как присоединение протона ведет к фиксации разрыва в определенном месте молекулы. Вероятно, в случае долго живущих восстановленных форм хлорофилла и его аналогов протон присоединен к системе «раскрытых» сопряженных связей, тогда как у порфиринов происходит восстановление «полуизолированных» двойных связей с конечным образованием бактериохлоринподобных соединений [4]. Недавно мы обнаружили у ряда пигментов, в том числе и у пигментов из семян *Poa pratensis* (на прорастание которых действует свет), продукты реакции фотовосстановления, обладающие поглощением в близкой инфракрасной области спектра [5]. Эти наблюдения дают возможность высказать предположение о возможной связи реакции фотовосстановления, кроме фотосинтеза, также и с другими фотобиологическими процессами, у которых отмечены взаимосвязанные максимумы спектра действия в близкой инфракрасной и красной областях спектра (фотопериодизм, прорастание семян и др.).

Мы лишены возможности детально описывать опыты, обосновывающие приведенный элементарный механизм; этот круг вопросов рассмотрен в докладе В.Б. Евстигнеева (см. стр. 44). Здесь мы хотели бы лишь перечислить некоторые методы и результаты опыта (табл. 1).

Таблица 1

Механизм реакции обратимого фотовосстановления

Метод	Результат
Сравнительное спектрофотометрическое исследование фотовосстановления пигментов, обладающих разной структурой	Для реакции существенно наличие системы сопряженных по кругу двойных связей
Спектральные и электрометрические измерения при низких температурах	Разделение фотостадий переноса электрона и темновой стадии реакции
Фотопотенциометрические измерения в процессе реакции	Образование электродно-активных отрицательно заряженных, быстро реагирующих после выключения света фотопродуктов
Измерения фотопроводимости в процессе реакции	Образование фотопродуктов, имеющих ионную природу
Изучение кинетики фотореакции и обратных реакций с применением «обычных» и дейтерированных доноров водорода	Темновая стадия, связанная с переносом протона (дейтерона)
Сенсибилизированная фотополимеризация метилметакрилата	Образование свободных радикалов

Особо стоит вопрос о природе доноров водорода, которые могут быть использованы при реакции. При помощи спектральных измерений нам удалось констатировать реакцию с диэнолами (аскорбиновой и диоксималеиновой кислотой) и соединениями с сульфогидрильной группой (цистеином) [6]; применение фотопотенциометрической и полимеризационной методики показало возможное участие в реакции полифенолов, ионов Fe^{++}, цитохромов и многих других соединений [7].

При дальнейшем изучении механизма реакции возникает вопрос, не образуются ли в качестве промежуточных стадий реакции долго живущие комплексы пигментов с донорами водорода.

Что касается Mg-порфиринов и феофитинов, то спектральные измерения не дают таких указаний; спектры поглощения пигментов в пиридине с аскорбиновой кислотой и без нее одинаковы. Трудно сомневаться, однако, в том, что молекулы пигмента связаны с полярными молекулами среды — органическими основаниями — посредством центрального атома магния, что было показано в работах нашей лаборатории и в работах Ливингстона с сотрудниками [8, 9].

В случае Fe-порфиринов, дающих прочные координационные соединения с донорами электрона, такие промежуточные образования вероятны, и их возникновение показано при биохимических реакциях гемопротеидов.

Если образование комплекса пигмент — донор водорода представляется мало вероятным, то нельзя исключить возможности того, что хлорофилл и его аналоги дают в качестве промежуточной стадии активные комплексы между молекулой пигмента в метастабильном бирадикальном состоянии и молекулой донора водорода до того, как образованные ион-радикалы «расходятся» в разные стороны. Поиски такого рода «активных комплексов» типа $\cdot X \cdot \; AH$ желательны.

Фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода, идущие с «запасанием» энергии света

Обнаружение реакции фотовосстановления дало возможность в модельных системах осуществить реакции переноса водорода, сенсибилизированные хлорофиллом, при которых также происходит «запасание» энергии света.

Освещая красным светом тройную систему хлорофилл — донор водорода — акцептор водорода, мы констатировали перенос водорода от донора к акцептору с обратным ходом реакции в темноте.

Работы лаборатории с полной определенностью показали, что в основе механизма этих реакций лежит обратимое фотовосстановление хлорофилла; реакция состоит из двух стадий — световой (фотовосстановление) и темновой (реакция фотовосстановленной формы с акцептором электрона) с последующими актами присоединения протона и дисмутации радикалов [10]. В качестве доноров водорода АН при этой реакции используются аскорбиновая кислота, цистеин, фенилгидразин и другие соединения; в качестве акцепторов водорода — широкий круг соединений с величиной E_0' от +0,8 (кислород) до —0,42 в (пиридин — нуклеотиды).

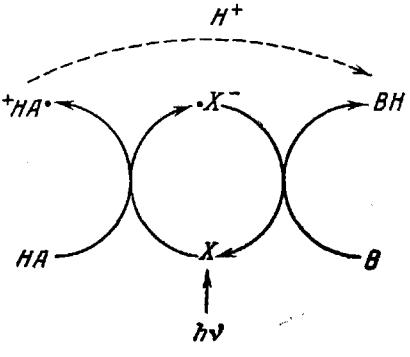


Рис. 2. Механизм участия хлорофилла в сенсибилизированных им реакциях

Полужирные линии — перенос электрона; пунктир — перенос протона; X — хлорофилл; АН —донор водорода (электрона); В — акцептор водорода (электрона)

Механизм реакций этого типа детально рассмотрен в нашем докладе на конференции по химической кинетике, катализу и реакционной способности [см. 10] и в сводной статье [2].

Резюмируем экспериментальные результаты, подтверждающие течение реакции (рис. 2 и табл. 2).

Трудно сомневаться в том, что этот механизм является универсальным для сенсибилизированного хлорофиллом переноса водорода. Г. П. Брин

Таблица 2

Механизм сенсибилизированных реакций

Метод	Результат
Спектрофотометрические измерения сенсибилизированной реакции с разными донорами водорода	Реакция идет лишь с теми донорами, которые способны к реакции фотовосстановления
Спектральные измерения в максимумах поглощения хлорофилла и акцептора водорода	В присутствии акцептора водорода не наблюдается явной реакции хлорофилла с донором водорода
Спектральные и фотоэлектрические измерения при комнатной и низких температурах	Раздельное осуществление реакции по стадиям: а) фотовосстановление; б) реакция фотовосстановленной формы пигмента (первичной и вторичной) с акцептором водорода

в своем докладе описывает ряд реакций, где акцептором электрона служит кислород, а результатом процесса является сенсибилизированное окисление ряда органических соединений.

Желательна хотя бы грубая оценка количества «запасаемой» при этих реакциях лучистой энергии. Мы констатировали восстановление соединений с E_0' до —0,32 в за счет аскорбиновой кислоты с E'_0 равным +0,5 в; $\Delta E_0'$ составляет +0,37 «вверх». Эта величина подтверждается измерениями фотопотенциалов, также дающими величину $\Delta E_0'$ до 0,4 в (см. доклад В. Б. Евстигнеева, стр. 44). Полагая, что восстановление в конечном счете ведет к переносу двух электронов (образование «лейкосоединений»), получим увеличение $\Delta F = 2 \cdot 23{,}06 \cdot 0{,}4 = 18{,}4$ ккал. Конечно, это является лишь грубым приближением; быстрая обратимость реакции пока не дает возможности оценить предельную величину увеличения свободной энергии.

Возможный механизм сопряжений фотохимических реакций хлорофилла с действием биокаталитических систем

Хорошо известно, что процесс фотосинтеза представляет собой сочетание фотохимических и темновых энзиматических стадий.

В докладе Н. М. Сисакяна (см. стр. 213) рассматриваются многообразные биокаталитические свойства хлоропластов. В работах нашей лаборатории были исследованы возможные пути и механизмы сопряжения превращений хлорофилла с обратимыми реакциями окислительно-восстановительных биохимических систем, участвующих в переносе электрона (водорода). Сопряжение такого рода может осуществляться двумя главными путями: 1) восприятие электрона молекулой хлорофилла от системы, связанной с окислением исходного донора водорода; 2) перенос электрона от хлорофилла к системам, участвующим в энзиматических стадиях восстановления углекислоты. Здесь мы не будем рассматривать механизмы сопряжения, построенные на основе передачи энергии на уровне триплетного состояния; эти вопросы рассмотрены в недавних работах А. Н. Теренина [11].

Наши опыты показали, что восприятие электрона (водорода) молекулой хлорофилла при освещении происходит от следующих соединений: от аскорбиновой кислоты ($E_0' = +0{,}05$ в), цистеина, цитохрома *c* ($E_0' = +0{,}28$ в) и, вероятно, от соединений двухвалентного железа, на что указывают наши опыты по сенсибилизированной полимеризации метилметакрилата [см. 7].

Трудно сомневаться в возможности такого рода реакций с цитохромом *b* (обнаруженным Хиллом в хлоропластах), который обладает величиной E_0', близкой к E_0 аскорбиновой кислоты [12].

В качестве акцепторов, воспринимающих электрон фотовосстановленной формы хлорофилла, может использоваться, как показали наши опыты, обширная группа соединений с величиной E_0' от $+0{,}8$ в (кислород) до $-0{,}32$ в (пиридин-нуклеотиды). Наиболее существенно здесь то, что величина E'_0 восстановленной формы хлорофилла превосходит E_0' пиридин-нуклеотидов и флавинов и, таким образом, фотореакции хлорофилла могут быть сопряжены с восстановлением этих соединений. После опытов [13], показавших в 1949 г. возможность фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления пиридин-нуклеотидов, в работах других исследователей было обнаружено восстановление этих соединений в суспензиях хлоропластов [14].

Весьма интересна проблема сопряженного действия Mg и Fe-порфиринов. В наших опытах с К. К. Войновской [15] было обнаружено, что в системах хлорофилл — цитохром *c* и бактериохлорофилл — цитохром *c* освещение в анаэробных условиях ведет к фотовосстановлению цитохрома, а в присутствии воздуха — к фотоокислению восстановленного цитохрома. Таким образом, сенсибилизированные превращения цитохромов могут быть звеном на пути фотосинтетического переноса электрона.

Чрезвычайно важен еще неразрешенный вопрос о месте включения воды как донора электрона (водорода) в систему реакций фотосинтеза. До сих пор не удалось наблюдать непосредственного фотохимического восприятия электрона хлорофиллом от молекулы воды (или иона OH) за счет кванта красного света; осуществление этого процесса в одном акте наталкивается на большие энергетические трудности.

В докладе Б. Я. Даина с сотрудниками рассматриваются данные, указывающие на возможность фотохимического восстановления молекулы железо-порфирина с участием координированных OH-ионов. При этом следует учесть, что центральный ион Fe^{+++} уже обладает значительной окисляющей способностью, и при помощи кванта света должен быть преодолен сравнительно небольшой барьер для осуществления этой реакции. Так, величина E_0' системы Fe^{+++}/Fe^{++} в растворе составляет около $+0{,}75$ в и близка к E_0' системы O_2/H_2O, равной $+0{,}8$ в. Правда, у железо-порфиринов величина E_0 обычно ниже, чем у ионов железа в растворе.

Однако «фоторецептором» при фотосинтезе является хлорофилл, а не железо-порфирины, и участие последних соединений в реакциях фотосинтеза требует обоснования конкретных механизмов использования этими соединениями энергии квантов, поглощенных хлорофиллом.

До сих пор неясны пути участия молекулы воды в фотохимических реакциях. Вероятно, вода вовлекается в систему реакций фотосинтеза путем сопряжения фотохимических реакций хлорофилла с действием биокаталитических систем. Возможно, что железо-порфирины участвуют в этом процессе, будучи сопряженными с хлорофиллом. Моделью такого рода про-

цессов могут служить сенсибилизированные хлорофиллом превращения цитохромов, исследованные в наших работах. Во всяком случае фотохимическое выделение кислорода при реакции Хилла требует сохранения структурной организации гранул. Опыты нашей лаборатории показали, что способность гомогенатов к реакции Хилла быстро падает при действии деструктирующих агентов-растворителей уже при сравнительно низкой их концентрации.

Фотохимические превращения хлорофилла в живых организмах

Итак, исследования фотохимического поведения хлорофилла в растворах позволили выявить механизм сенсибилизирующего действия хлорофилла и возможные пути сопряжения его реакций с действием биокаталитических систем. Следующим этапом является исследование превращений хлорофилла непосредственно в живых фотосинтезирующих организмах. В этом случае необходима особая техника учета быстро текущих обратимых изменений пигментов в гранулах пластид.

В наших работах совместно с Л. М. Воробьевой [16] удалось обнаружить обратимые фотохимические изменения хлорофилла в водно-глицериновых гомогенатах из листьев сахарной свеклы, сохраняющих естественное состояние связи хлорофилла и способность к реакции Хилла.

Непосредственные спектрофотометрические измерения малых изменений оптической плотности живых листьев в видимой области спектра привлекли за последние два-три года внимание многих исследователей, сконструировавших особые приборы для проведения такого рода измерений. В работах последних лет [17—19] было показано, что после светового импульса в живых листьях или одноклеточных водорослях наблюдается появление максимума поглощения при 515—525 $m\mu$, соответствующего максимуму поглощения фотовосстановленной формы хлорофилла. Эти изменения происходят наряду с изменением окислительно-восстановительного равновесия ферментных систем, участвующих в переносе электрона. Следует обратить внимание на то, что, судя по работе Стрелера и Линч [см. 19], обратная реакция фотопродукта с поглощением при 515—520 $m\mu$ сопровождается явлением фотосинтетической хемилюминесценции; в работах Колемана, Холта и Рабиновича [20] отмечается, что появлению максимума поглощения при 520 $m\mu$ соответствует падение красного максимума поглощения хлорофилла. В перечисленных работах указывается на возможную связь этого явления с реакцией обратимого фотовосстановления хлорофилла.

Изучение превращений пигментов непосредственно в живых организмах тесно связано с изучением структурной организации хлоропластов и с состоянием пигментов в гранулах. Современные электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов хлоропластов показывают регулярную, слоистую структуру гранул. Однако разрешающая способность электронного микроскопа не позволяет пока наблюдать за «укладкой» молекул в слоях и формой их связи. Здесь на помощь приходят измерения спектров поглощения и флуоресценции, дающие возможность наблюдать тонкие эффекты изменения состояния и формы связи молекул при агрегации, адсорбции и иных видах междумолекулярного взаимодействия; спектральные измерения особенно пригодны для изучения быстро текущих химических изменений.

Сравнительное исследование спектральных и фотохимических свойств пигментов в живых организмах в процессе нарушения естественной формы связи и в заведомо известных состояниях и формах связи позволяет сделать ценные выводы о состоянии и превращении пигментов в организмах.

Состояние пигментов в фотосинтезирующих организмах

В работах нашей лаборатории производилось систематическое исследование состояния хлорофилла, протохлорофилла и бактериохлорофилла в разных организмах в филогенетическом аспекте и в процессе образования пигментов в растениях.

Прежде всего возникает вопрос, образует ли хлорофилл в гранулах белковое соединение постоянного состава по типу, например, гемоглобина? Такого соединения до сих пор не удалось выделить из листьев, где хлорофилл (в отличие от гема в гемоглобине) слабо связан с белками и липоидами, легко извлекаясь органическими растворителями. Недавно в работе Такашима [21] описано выделение такого рода кристаллического хлорофилл-белковолипоидного соединения. Однако наши работы, совместные с Г. П. Брин, показали, что такие же кристаллические образования получаются из «чистого» хлорофилла, не содержащего белков и липоидов [22].

Экспериментальный материал указывает на то, что химически идентичные пигменты могут находиться в организмах в разных состояниях, обладающих разными фотобиологическими и спектральными свойствами.

Так, например, протохлорофилл, образуемый в этиолированных листьях, обладает максимумом поглощения при 630 $m\mu$ и при освещении переходит в хлорофилл; протохлорофилл, накапливающийся во внутренних оболочках тыквенных семян, имеет максимум поглощения около 650 $m\mu$ и при освещении не образует хлорофилла.

Бактериохлорофилл в разных штаммах фотосинтезирующих бактерий обладает максимумами поглощения при 800, 850, 890 (± 10) $m\mu$, тогда как в растворе этот пигмент имеет один максимум при 770—780 $m\mu$ [23].

За последние годы в нашей лаборатории произведены измерения спектров поглощения хлорофилла во многих фотосинтезирующих организмах. В большинстве сине-зеленых и зеленых водорослей и высших растений главный максимум поглощения хлорофилла лежит в пределах 675—768 $m\mu$. Лишь у глубоководных красных водорослей из Черного моря (филлофора) удалось наблюдать три максимума при 690, 678 и 670 $m\mu$ [24], а у некоторых водорослей из Баренцова моря — при 670 $m\mu$. Однако в последнем случае не было уверенности в том, что состояние этих водорослей при измерении сохранялось нативным.

Состояние пигментов изменяется также в процессе жизненного цикла растений. Т. Н. Годнев и О. П. Осипова наблюдали различную извлекаемость хлорофилла растворителями у растений различного возраста. В нашей работе и Л. М. Воробьевой было исследовано изменение спектральных и фотохимических свойств хлорофилла в процессе его образования из протохлорофилла и накопления в листьях растений [25]. Свежеобразованный из протохлорофилла хлорофилл обладает максимумом поглощения при 670 $m\mu$ и быстро разрушается при интенсивном освещении в присутствии кислорода. В процессе накопления хлорофилла в зеленеющих этиолированных листьях максимум поглощения постепенно передвигается до 678 $m\mu$; параллельно этому растет светоустойчивость пигмента. Измерения были проделаны с гомогенатами этиолированных и зеленых

листьев, но такие же результаты получены и при спектральном наблюдении живых листьев растений. Процесс образования хлорфилла непосредственно в этиолированных листьях фасоли изучен нами совместно с аспирантом Ф. Ф. Литвином методом измерения спектров флуоресценции после световых экспозиций в листьях, замороженных до —120° (в целях остановки течения реакции).

В этиолированных листьях фасоли наблюдаются отчетливые максимумы флуоресценции при 635 и 705 *mμ*, принадлежащие протохлорофиллу, и при 655 *mμ*, принадлежащие пока неизвестной промежуточной форме, возможно, идентичной той форме протохлорофилла, которую наблюдал Смит [26] в этиолированных листьях ячменя, или хлорофиллиду, образование которого описано в докладе Т. Н. Годнева и др. (см. стр. 147).

После 5 сек. освещения образуется хлорофилл с максимумом флуоресценции при 690 *mμ*; дальнейшее освещение и накопление хлорофилла ведет к перемещению главного максимума флуоресценции до 685 *mμ* (за счет внутреннего «самопоглощения» коротковолновой ветви максимума флуоресценции накопившимся хлорофиллом). Эти наблюдения указывают на то, что флуоресценция листьев определяется той формой хлорофилла, которая аналогична свежеобразованному хлорофиллу с максимумом поглощения, лежащим при 670 *mμ*. В процессе зеленения наряду с хлорофиллом в листьях удается наблюдать максимум флуоресценции протохлорофилла при 635 *mμ*.

Исследуя фотохимические и спектральные свойства хлорофилла во «взрослых» растениях, в нашей работе совместно с Л. М. Воробьевой удалось обнаружить различные формы хлорофилла в свежеприготовленных гомогенатах — «зеленых растворах» листьев растений. Исследуя кинетику выцветания хлорофилла в гомогенатах из зеленых листьев, мы обнаружили, что часть хлорофилла выцветает чрезвычайно быстро при значительном ослаблении флуоресценции и (при значительном количестве выцветающей формы у некоторых объектов) перемещении максимума поглощения в длинноволновую область спектра на 1—3 *mμ*. При исследовании более 60 видов различных растений мы обнаружили, что наибольшее количество быстро выцветающей формы (до 20%) содержится в листьях сахарной свеклы, тополя, лебеды и в некоторых других растениях [27]. Количество активной формы в листьях свеклы изменялось в течение периода вегетации, значительно уменьшаясь к осени.

Обнаружение листьев с большим количеством активной (быстро выцветающей) формы хлорофилла определило постановку опытов по разделению различных форм хлорофилла также и другими методами.

В наших опытах совместно с Е. В. Пакшиной [см. 27] скоростное центрифугирование гомогенатов (при 25 000 g) из листьев сахарной свеклы приводило к постепенному перемещению максимума поглощения «раствора» от 677 до 671—672 *mμ*, что указывает на постепенное оседание более «тяжелых» агрегированных форм — структурных элементов гранул — и на обогащение раствора дезагрегированными формами (рис. 3). При этом существенно, что центрифугирование гомогенатов листьев растений, обладающих малым количеством быстро выцветающей формы хлорофилла, не приводило к такому изменению максимума поглощения. Мы уже отмечали, что, используя гомогенаты из листьев свеклы, обладающей значительным количеством быстро выцветающей формы хлорофилла [см. 16], можно наблюдать обратимые окислительно-восстановительные превращения хлорофилла в естественном состоянии путем измерения в «красном» максимуме поглощения хлорофилла при чередующихся периодах света и темноты.

Итак, вся совокупность известных экспериментальных данных указывает на наличие разных форм хлорофилла в листьях растений. Какова же их природа? Прежде всего трудно сомневаться в том, что быстро выцветающие формы хлорофилла, обладающие яркой флуоресценцией, сходные с хлорофиллом в истинных растворах и потому названные нами «мономерными», связаны с липоидами или липопротеинами. В водных растворах хлорофилл может существовать в таком активном состоянии, лишь будучи связанным с мицеллой поверхностно-активных веществ — детергентов, что было показано в опытах нашей лаборатории. Возможно, что эта форма соответствует разреженной форме монослоя хлорофилла, аналогичной «газовой» упаковке в монослоях, наблюдавшейся в работах Джекобса и Холта [28].

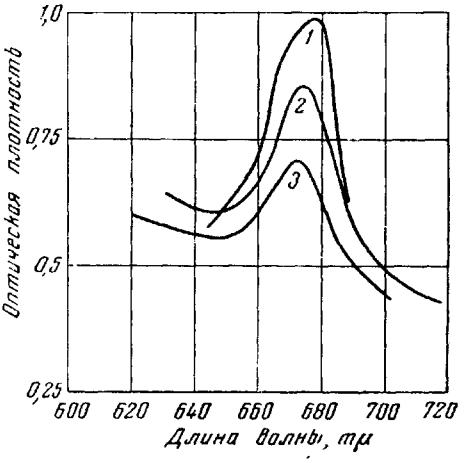


Рис. 3. Спектр поглощения «зеленых растворов» из листьев свеклы

1 — после центрифугирования при 3000*g*, 10 мин.; *2* — при 25 000*g*, 30 мин.; *3* — при 25 000*g*, 90 мин.

Что же касается состояния хлорофилла, определяющего положение главного максимума поглощения, то его спектральные свойства соответствуют агрегированным высококонцентрированным формам, образующимся в твердых пленках и коллоидных растворах хлорофилла.

Так, положение главного максимума поглощения хлорофилла при 676—678 $m\mu$ соответствует твердым пленкам и коллоидным растворам хлорофилла, полученным при pH = 6,5. Кристаллы хлорофилла, выделенные из смеси диоксан—пиридин [см. 22], имеют максимум поглощения при 690 $m\mu$; существенно то, что такой тип «упаковки» хлорофилла обнаружен нами у глубоководных красных водорослей [см. 24].

Все эти опыты приводят к следующей схеме возможных состояний хлорофилла в растениях:

$$\text{Х}\cdot\text{БЛ} \rightleftarrows \text{Х} + \text{БЛ} \rightleftarrows (\text{ХБЛ})_n \rightleftarrows \text{Х}_n + (\text{БЛ})_m,$$

где формы Х·БЛ $\rightleftarrows$ Х + БЛ являются мономерными формами хлорофилла (Х), связанными и не связанными с липопротеинами (БЛ), а Х_n и $(\text{ХБЛ})^n$ — агрегированными формами хлорофилла, связанными и не связанными с белками и липоидами. Равновесие между всеми этими формами изменяется в процессе жизнедеятельности растения.

На начальной стадии развития доминируют дезагрегированные формы пигментов. Представления о различных взаимопереходящих формах хлорофилла в растениях соответствуют известным данным о различии состояний в организмах других биологически важных соединений — нуклеиновых кислот, ферментов, витаминов и т. д.

Особенно отчетливо влияние агрегации (междумолекулярного взаимодействия при высокой концентрации пигмента) выступает у бактериохлорофилла, который в живых клетках бактерий обладает тремя максимумами поглощения — при 800, 850 и 890 $m\mu$, а в растворе — при 770—780 $m\mu$.

Эти большие сдвиги максимумов поглощения бактериохлорофилла в бактериях не могут объясняться слабой связью пигмента с белками, тогда как коллоидные растворы и твердые пленки бактериохлорофилла обладают такими же, что и живые бактерии, положениями главных максимумов, соответствующих, видимо, разным типам упаковки молекул в агрегированных структурах [29].

Мы исследовали спектральные свойства твердых пленок и коллоидных растворов бактериохлорофилла и бактериофеофитина. Последний образует агрегированные формы с максимумом поглощения при 850 $m\mu$, но ни при каких условиях не дает форм «800» и «890», которые наряду с формой «850» образует бактериохлорофилл. Эти наблюдения указывают на возможность разных типов упаковки молекул в агрегированных структурах, где отдельные молекулы пигмента могут быть связаны посредством центральных атомов магния или других группировок. Мы уже высказывали предположение, что эта связь между молекулами пигмента может осуществляться путем сочленения «мостиками» из полярных молекул.

Полученные нами данные о влиянии агрегации на сдвиг максимума поглощения были подтверждены в работах Холта и Джекобса [см. 28], получивших кристаллические формы бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 850 $m\mu$.

Высококонцентрированные «кристаллические» формы пигментов, поглощая свет, используют его в процессе фотосинтеза. Какова же фотобиологическая роль различных форм хлорофилла в растениях? Здесь можно высказать некоторые предположения. Так, например, вероятно, что именно мономерная форма хлорофилла, близкая по свойствам к хлорофиллу в растворах, непосредственно участвует в окислительно-восстановительных превращениях. Известные работы Дж. Франка, Каутского, Вассинка и других исследователей показали, что интенсивность флуоресценции хлорофилла в живых листьях связана с процессом фотосинтеза. Основываясь на наших исследованиях свойств активной формы хлорофилла в листьях, мы уже высказывали предположение, что изменение флуоресценции в листьях связано, с одной стороны, с переходом хлорофилла в «активную» форму, а с другой, — с превращениями этой формы, непосредственно участвующей в фотохимической реакции [30].

Высокий квантовый выход фотосинтеза в оптимальных условиях свидетельствует о том, что весь свет, поглощенный хлорофиллом, может эффективно использоваться для фотосинтеза. С этим связана возможность передачи энергии между агрегированными и мономерными формами хлорофилла, которые могут непосредственно, химически, участвовать в реакции; вероятно, эта передача осуществляется на уровне триплетного состояния в соответствии с опытами А. Н. Теренина и В. Л. Ермолаева [31]. Однако существует также иная возможность — молекулы хлорофилла на фазовых границах (в агрегированных формах) могут участвовать в фотохимических превращениях наряду с «мономерными» формами пигмента. Опыты В. Б. Евстигнеева и А. Н. Теренина [32] по измерению фотопотенциалов твердых пленок пигментов показали, что фотохимические свойства молекулы хлорофилла в твердой пленке на фазовой границе близки к окислительно-восстановительным свойствам хлорофилла в растворе. Наконец возможность двух разных типов элементарных фотореакций может быть связана с различием фотохимической активности хлорофилла, находящегося в разных состояниях. Во всяком случае нужны дальнейшие исследования в этой области, тесно примыкающей к исследованию структуры биохимически активных образований — митохондрий, гранул и хлоропластов.

Общая схема процесса

Изложенный экспериментальный материал дает возможность построить гипотетическую схему, согласно которой пигментная система участвует в процессах «запасания» энергии света при фотосинтезе путем подъема «вверх» (в энергетическом смысле) электрона (водорода) молекулы-донора; сопряжение реакций активных фотопродуктов с системой энзиматических процессов ведет, в конечном счете, к усвоению и восстановлению углекислоты и к выделению кислорода воды в молекулярной форме.

Рассмотрим схему, представленную на рис. 4.

Участие возбужденного хлорофилла в процессе переноса электрона до уровня восстановленных пиридин-нуклеотидов обосновано экспериментально. Участие этих восстановленных соединений в цикле восстановления углекислоты (согласно со схемой Кальвина [33]) также доказано экспериментально.

Наконец, сопряжение реакции фотохимически образованных восстановленных форм пиридин-нуклеотидов и флавинов с реакцией окислительного фосфорилирования обосновано в работах Арнона [34]. Окислителем может служить не кислород, а промежуточные окислители, образуемые при фотопроцессе [см. 34]. Богатые энергией фосфаты также поступают в цикл восстановления углекислоты.

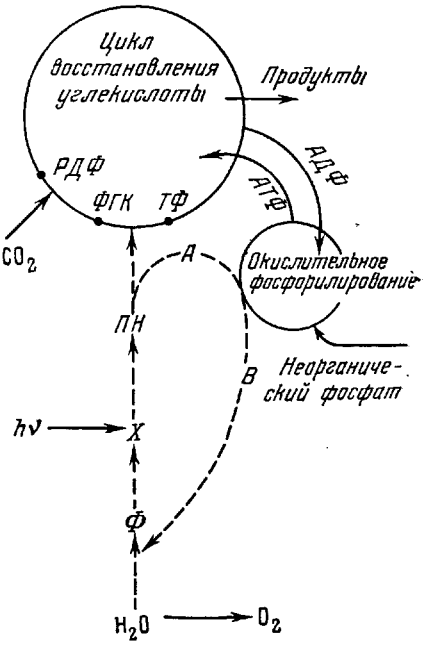


Рис. 4. Схема переноса электрона при фотосинтезе

Пунктир — путь электронов; ПН — пиридиннуклеотиды; Х — хлорофилл; Ф, А, В — ферментные системы; АТФ, АДФ — аденозинтри- и дифосфат; РДФ —рибулезодифосфат; ФГК— фосфоглицериновая кислота; ТФ — триозофосфат

Таким образом, фотохимический подъем электрона (водорода) воды до уровня восстановленных пиридиннуклеотидов обеспечивает работу циклов восстановления углекислоты и фотосинтетического фосфорилирования. В случае бактериального фотосинтеза исходным донором водорода являются сероводород и ряд органических соединений;возможность подъема электрона этих богатых энергией соединений до уровня восстановленных пиридин-нуклеотидов действием одного кванта света показана в наших модельных опытах. Менее ясны реакции «включения» в систему фотохимических реакций такого важного донора водорода, как молекула воды.

До сих пор нельзя считать разрешенным вопрос о том, переносится ли один электрон (водород) от воды до уровня восстановленных пиридиннуклеотидов действием двух квантов с образованием промежуточного резервуара активных продуктов на «полпути».

Исходя из энергетических соображений, мало вероятно преодоление этого предела за счет действия одного кванта, хотя сопряжение со вторичными «хемосинтетическими» реакциями может привести к обоснованию приемлемой схемы процесса [35]; с другой стороны, «двухквантовый»

путь переноса одного электрона находит подтверждение в опытах над более простыми системами.

Так, при реакции Хилла окисление воды (выделение кислорода) ведет к восстановлению хинонов, ионов железа и других систем с E'_0 + 0,3 в. При сенсибилизированных хлорофиллом реакциях возможен подъем электрона от уровня аскорбиновой кислоты до восстановленных пиридиннуклеотидов. Возможность восьмиквантовых схем (два элементарных акта на перенос одного электрона) иногда подвергают сомнению из-за того, что минимальный квантовый расход фотосинтеза достигает четырех. Однако в условиях дышащей клетки всегда возможна «помощь» за счет энергии промежуточных продуктов дыхания [36].

Этот фундаментальный вопрос механизма фотосинтеза до сих пор нельзя считать решенным [37].

Общая схема переноса электрона при фотосинтезе может служить рабочей гипотезой при дальнейших исследованиях, но окончательное и достоверное установление конкретного механизма процесса в живых организмах потребует еще дальнейших исследований учеными различных специальностей.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР.
Москва

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Красновский. «Докл. АН СССР», 1948, **60**, 421.
2. А. А. Красновский. «Журн. физ. хим.», 1956, **30**, 968.
3. А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин, В. А. Гаврилова. «Докл. АН СССР», 1952, **82**, 947.
4. А. А. Красновский, К. К. Войновская. «Докл. АН СССР», 1954, **96**, 1209.
5. А. А. Красновский, К. К. Войновская. «Докл. АН СССР», 1957, **112**, 911.
6. А. А. Красновский, Г. П. Брин. «Докл. АН СССР», 1954, **96**, 1025.
7. А. А. Красновский, А. В. Умрихина. «Докл. АН СССР», 1955, **104**, 882.
8. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский. «Докл. АН СССР», 1950, **70**, 261.
9. R. Livingston, S. Weil. «Nature», 1952, **170**, 750.
10. А. А. Красновский. Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности. Изд-во АН СССР, 1955, стр. 92.
11. А. Н. Теренин. «Усп. физ. наук», 1951, **43**, 347.
12. R. Hill. «Nature», 1954, **174**, 501.
13. А. А. Красновский, Г. П. Брин. «Докл. АН СССР», 1949, **67**, 325; А. А. Красновский. «Докл. АН СССР», 1948, **61**, 91.
14. W. Vishniac, S. Ochoa. «Nature», 1951, **167**, 768.
15. А. А. Красновский. «Докл. АН СССР», 1955, **103**, 283; А. А. Красновский, К. К. Войновская. «Биофизика», 1956, **1**, 120.
16. А. А. Красновский, Л. М. Воробьева. «Докл. АН СССР», 1955, **104**, 440; Л. М. Воробьева, А. А. Красновский. «Биохимия», 1956, **21**, 126.
17. L. M. N. Duysens. «Science», 1954, **120**, 353.
18. H. T. Witt. «Naturwissenschaften», 1955, **42**, 72.
19. B. Z. Strehler, V. Lynch. «Science», 1956, **123**, 462.
20. I. W. Coleman, A. S. Holt, E. Rabinowitch. «Science», 1956, **123**, 795.
21. S. Takashima. «Nature», 1952, **169**, 182.
22. А. А. Красновский, Г. П. Брин. «Докл. АН СССР», 1954, **95**, 611.
23. E. Katz, E. C. Wassink. «Enzymologia», 1939, **7**, 97.
24. А. А. Красновский, Е. А. Нестеровская и А. Б. Гольденберг. «Биофизика», 1956, **5**, 328.
25. А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая. «Докл. АН СССР», 1952, **85**, 177.

26. R. Hill, I. H. C. Smith, C. S. French. «Carnegie Inst. Wash. Year Book», 1953, № 52, 153.
27. А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина. «Физиология растений», 1957, 4, 124.
28. E. E. Jacobs, A. A. Vatter, A. S. Holt. «Arch. Biochem. a. Biophys.», 1954, 53, 288; E. E. Jacobs, A. S. Holt. «J. Chem. Phys.», 1954, 22, 142.
29. А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая. «Докл. АН СССР», 1952, 85, 389; 1953, 92, 1201.
30. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая. «Докл. АН СССР», 1953, 91, 343; А. А. Красновский. «Изв. АН СССР, сер биол.», 1955, № 2, 122.
31. А. Н. Теренин, В. Л. Ермолаев. «Докл. АН СССР», 1952, 85, 547; «Trans. Farad. Soc.», 1956, 52, 1042.
32. В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин. «Докл. АН СССР», 1951, 81, 651.
33. M. Calvin. Conferences et rapports 3-ème Congr. internat. biochim. Liège, 1956, p. 211.
34. D. Arnon. «Science», 1955, 122, 9.
35. O. Warburg. «Naturwissenschaften», 1952, 39, 185.
36. Y. Franck. «Arch. Biochem. a. Biophys.», 1953, 45, 190.
37. E. Rabinowitch. Photosynthesis, v. 1, pt. 2, N. Y. 1945—1955.

Доклады Академии наук СССР
1959. Том 127, № 4

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Е. В. ПАКШИНА

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОВИРИДИНА ЗЕЛЕНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 14 VI 1959)

В 1952 г. в нашей лаборатории было показано, что спектральные и фотохимические свойства бактериохлорофилла в клетках пурпурных бактерий сходны со свойствами агрегированных форм бактериохлорофилла в твердых пленках и водных коллоидных растворах этого пигмента. Характерные для бактериохлорофилла в живых клетках бактерий максимумы поглощения при 850—880 и 800 мμ наблюдаются в твердых пленках и коллоидных растворах пигмента и, по-видимому, принадлежат разным типам упаковки молекул пигмента в агрегированных структурах ([1,2]).

В 1954 г. Джекобс, Фаттер и Холт ([3]) показали, в согласии с нашими результатами, что кристаллические частицы бактериохлорофилла обладают максимумом поглощения при 860 мμ, а в 1956 г. Комен ([4]) воспроизвел описанные в наших работах спектры поглощения в коллоидных растворах бактериохлорофилла.

Зеленые серные бактерии в отличие от пурпурных содержат вместо бактериохлорофилла зеленый пигмент бактериовиридин (или хлоробиум — хлорофилл). Главный максимум поглощения этого пигмента в живых клетках бактерий, как показали Катц и Вассинк ([5]), Ларсен ([6]) и другие, лежит при 730—750 мμ, тогда как пигмент в ацетоновом растворе имеет максимум поглощения ок. 665 мμ, близкий к хлорофиллу а. Можно было ожидать, что столь далекий сдвиг максимума бактериовиридина в инфракрасную область спектра, так же как и в случае бактериохлорофилла, объясняется агрегацией молекул пигмента в упорядоченных структурах.

В данной работе мы исследовали спектральные и фотохимические свойства бактериовиридина в клетках живых бактерий, твердых пленках, коллоидных и истинных растворах.

Спектры поглощения суспензии бактерий. Наши измерения в водных средах (рис. 1) согласуются с описанными ранее ([5, 6]). Если среда содержит 50% глицерина, то в согласии с данными Шапошникова, Кондратьевой и Федорова ([7]), наряду с доминирующим максимумом при 730 мμ наблюдался побочный максимум при 670 мμ, по-видимому, соответствующий «мономерной» форме пигмента. Очевидно, действие глицерина в данном случае не ограничивается уменьшением светорассеяния и выявлением более отчетливой структуры спектра. Можно предполагать, что глицерин не оказывает дезагрегирующего действия на водные коллоидные растворы бактериовиридина и бактериохлорофилла и на суспензии пурпурных бактерий.

Спектры поглощения истинных, коллоидных растворов и твердых (кристаллических) пленок пигмента. Мы выделили чистый пигмент из культуры бактерий Chlorobium lamicula, фильтруя бактериальную взвесь через тальк, экстрагируя пигмент из осадка ацетоном, переводя его в эфир с конечной хроматографией на сахарозе из смеси петролейного и серного эфира (7 : 3). Зеленые бактерии по сравнению с пурпурными содержат мало каротиноидов. Спектр поглощения пигмента в растворе близок к хлорофиллу а. При выливании нескольких капель концентрированного ацетонового раствора пигмента

в избыток дистиллированной воды получается коллоидный раствор пигмента с главными максимумами при 715—720 мμ и 675—680 мμ, что, по-видимому, соответствует двум типам упаковки пигмента. При выливании ацетонового раствора в избыток фосфатного буфера более длинноволновые максимумы наблюдаются в более кислых средах. Спектр поглощения твердой пленки пигмента, полученной при испарении эфирного раствора в вакууме (на стекле), приближается к спектру поглощения живых бактерий, обладая главным максимумом при 730 мμ (см. рис. 1).

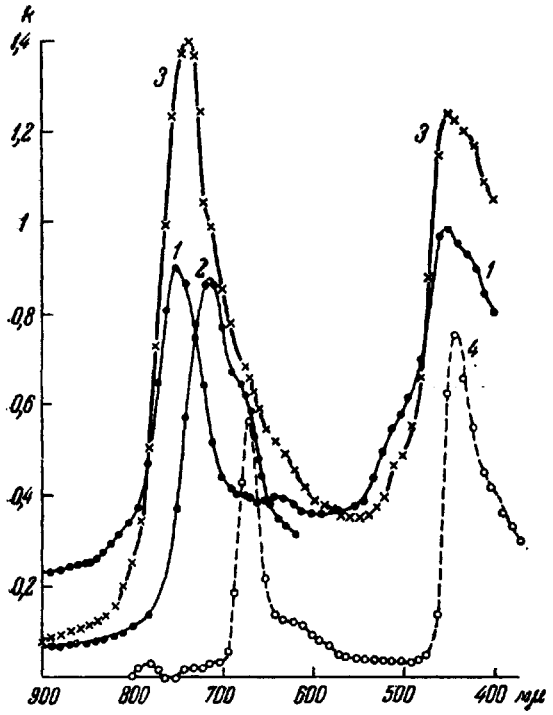


Рис. 1. Спектры поглощения зеленых серобактерий и бактериовиридина: *1*—суспензия бактерий в среде Ларсен; *2* — коллоидный раствор бактериовиридина; *3* — пленка бакетериовиридина на стекле; *4* — раствор бактериовиридина в пиридине

Следует указать на то, что столь далекий сдвиг поглощения (до 730—740 мμ) в случае хлорофилла и этилхлорофиллида наблюдается лишь при образовании кристаллов этих пигментов ([8]); можно думать, что бактериовиридин легко дает агрегированные кристаллические структуры, что, быть может, связано с отсутствием в молекуле этого пигмента «фитольного хвоста». Эта возможность подлежит исследованию.

Спектры флуоресценции* мы снимали при замораживании объектов до —150° С с тем, чтобы устранить фотохимические изменения при экспозиции, следуя описанной ранее методике ([9]). Суспензия бактерий в культуральной среде обладает отчетливыми главными максимумами флуоресценции при 680—690, 750—780 и 840 мμ, в присутствии 50% глицерина увеличивается интенсивность флуоресценции и красный максимум сдвигается в коротковолновую область. Твердые пленки чистого пигмента, полученные испарением эфирного раствора в вакууме (в стеклянных трубках Тунберга), имеют главный максимум флуоресценции при 760—800 мμ. Наконец, истинные растворы в пиридине обладают системой максимумов, сходных с флуоресценцией хлорофилла, с положением главных максимумов при 675—680, 720—730 и 800 мμ.

Измерения показывают, что флуоресценцией обладают как мономерные (растворенные), так и агрегированные формы пигмента. Спектры флуоресценции бактерий нуждаются в дальнейшем более углубленном исследовании.

Фотохимические свойства. Пигмент в пиридиновом растворе с аскорбиновой кислотой или сернистым натрием в качестве донора электрона обладает способностью к обратному фотовосстановлению подобно хлорофиллу а; отличие заключается в том, что в условиях наших опытов наблюдается больше продуктов необратимого восстановления, чем в случае хлорофилла а (рис. 2). Полученный при действии кислоты на эфирный раствор пигмента хлоробиумфеофитин при освещении с аскорбиновой

* В этих измерениях принимали участие Ю. Ерохин и И. Федорович.

кислотой в пиридине при — 40° образует «первичную» восстановленную форму, так же как и феофитин а в опытах Евстигнеева и Гавриловой([14]).

В присутствии кислорода воздуха растворы пигмента в органических растворителях чрезвычайно быстро фотохимически окисляются подобно бактериохлорофиллу; хлорофилл в этих условиях более устойчив. В отличие от истинных растворов, пигмент в коллоидных растворах и водных суспензиях бактерий более устойчив при освещении на воздухе, так же как и в случае бактериохлорофилла ([1,2]).

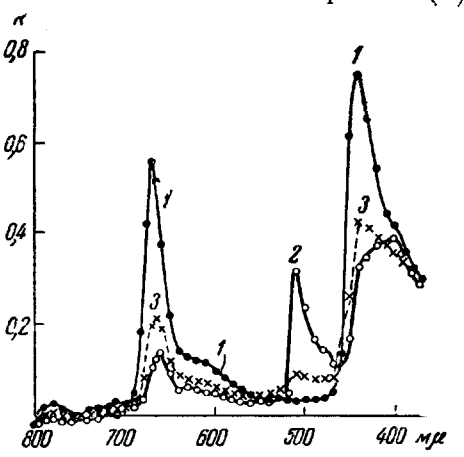


Рис. 2. Фотовосстановление бактериовиридина (восстановитель — сернистый натрий 10 мг на 4 мл пиридинового раствора): *1* — — спектр поглощения до реакции; *2* — после освещения красным светом 10^6 эрг/см^{2}сек, 4 мин.; *3* — после стояния в присутствии воздуха

Однако в водно-глицериновых суспензиях бактерий «мономерная форма» с максимумом при 670 мμ выцветает чрезвычайно быстро; нагревание или длительное стояние суспензии ведет к дальнейшему перемещению равновесия в сторону быстро выцветающей мономерной формы (рис. 3). Следует указать на то, что в предыдущих работа мы не смогли обнаружить подобную быстро выцветающую форму бактериохлорофилла в суспензии пурпурных бактерий ([1,2]). Требует выяснения, не является ли эта форма артефактом, возникающим при действии глицерина.

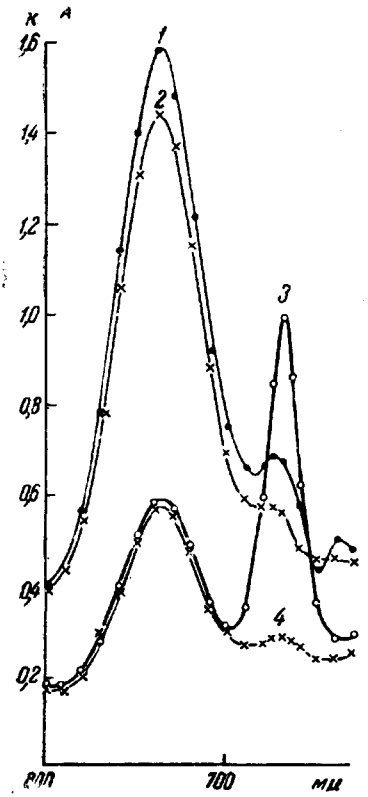


Рис. 3. Фотоокисление бактериовиридина в суспензии зеленых серобактерий, разбавленной глицерином; спектры поглощения: *1* — сразу после разбавления глицерином (1 : 1); *2* — после 2 мин. освещения красным светом 10^6 эрг/см^{2}сек; *3* — исходной суспензии с глицерином после стояния; *4* — после 1,5 мин. освещения той же исходной суспензии с глицерином после стояния

Фотосенсибилизирующее действие. Пигмент в растворе способен сенсибилизировать реакции фотохимического переноса водорода, подобно хлорофиллу. Коллоиды бактериовиридина и бактериохлорофилла (полученные выливанием в избыток воды растворов пигментов в ацетоне или спирте) и суспензии бактерий способны к необратимому фотовосстановлению азокрасителя метилового красного в присутствии аскорбиновой кислоты при освещении к близкой инфракрасной области спектра (>700 мμ). О скорости сенсибилизированной реакции судили по падению коэффициента поглощения k (в процентах) при 465 мμ, в изобестической точке метилового красного).

Наибольшая скорость фотосенсибилизированного восстановления метилового красного наблюдалась в истинных растворах (в пиридине); в коллоидных растворах и суспензиях бактерий скорость реакции была гораздо меньше (рис. 4). Введение глицерина в суспензию бактерий ведет к ускорению фотосенсибилизированной реакции.

Ранее ([1,2]) высказывалось предположение, что непосредственным фотохимическим превращением могла бы подвергаться «мономерная» форма бактериохлорофилла, находящаяся в малом количестве в равновесии с доминирующими агрегированными формами пигмента; нам, однако, не удалось обнаружить такую «мономерную» форму в пурпурных бактериях, в виде отдельной фазы. Что же касается до фотосенсибилизирующей способности, то этим действием обладают не только растворенные «мономерные» формы пигментов, но и агрегированные кристаллические формы.

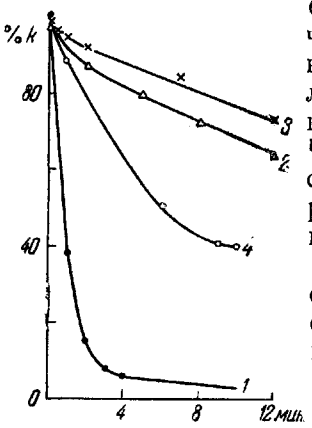


Рис. 4. Сенсибилизированное бактериовиридином фотовосстановление метилового красного. *1* — пиридиновым раствором бактериовиридина, *2* — суспензией бактерий, *3* — коллоидным раствором бактериовиридина, приготовленным на фосфатном буфере (pH 8,5), *4* — коллоидным раствором бактериовиридина, приготовленным на дестиллированной воде

Так, в нашей лаборатории в 1946 г. было обнаружено фотосенсибилизирующее действие кристаллических аналогов хлорофилла — фталоцианинов ([10]), позднее — активность водных коллоидных растворов хлорофилла при фотосенсибилизированных превращениях цитохромов ([11]), окислении аскорбиновой кислоты кислородом ([12]) и азокрасителем метиловым красным ([13]). Евстигнеев и Гаврилова ([14]) показали, что коагулированные коллоиды хлорофилла сенсибилизируют необратимое восстановление азокрасителей в присутствии аскорбиновой кислоты.

Сравнительную фотобиологическую активность агрегированных и мономерных форм, связанных с белками и липоидами, весьма трудно исследовать в живых организмах, если учесть возможность миграции энергии возбуждения между разными формами пигмента.

Однако из наших исследований вытекает, то что главная масса пигмента в фотосинтезирующих бактериях находится в агрегированных упорядоченных формах, и свет, поглощаемый этими формами пигмента, используется для фотосинтеза, о чем свидетельствуют измерения спектра действия ([6]).

В заключение приносим глубокую благодарность академику В. Н. Шапошникову и Е. Н. Кондратьевой (кафедра микробиологии МГУ им. Ломоносова), любезно предоставивших нам культуру Chlorobium lamicula.

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

Поступило
26 III 1959

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 389 (1952). [2] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, **92**, 1201 (1953). [3] E. E. Jacobs, A. E. Vatter, A. S. Holt, Arch. Biochem. and Biophys., **53**, 228 (1954). [6] I. G. Komen, Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 9 (1956). [5] E. Katz, E. C. Wassink, Enzymologia, **7**, 108 (1939). [6] H. Larsen, Kgl. norske vid. selskabs skr., № 1 (1954). [7] В. Н. Шапошников, Е. Н. Кондратьева, В. Д. Федоров, Микробиология, **27**, 529 (1958). [8] E. Rabinowitch, Photosynthesis, **2**, p. 2, N. Y., 1956, 1815. [9] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **117**, 106 (1957). [10] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **63**, 447 (1946). [11] А. А. Красновский, ДАН, **103**, 283 (1955). [12] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, **1**, 120 (1956). [12] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **22**, 776 (1957). [13] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **23**, 761 (1958). [14] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **125**, № 6 (1959).

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК СССР

Т. XXIII, № 1 СЕРИЯ ФИЗИЧЕСКАЯ 1959

Ф. Ф. ЛИТВИН и А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО СОСТОЯНИЯ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ПО СПЕКТРАМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Исследование спектров флуоресценции этиолированных (выросших в темноте) и зеленеющих листьев представляет интерес как для выяснения природы состояния пигментов в листе, так и для изучения процессов их биосинтеза. Весьма существенно, что при этом не происходит нарушения естественного состояния пигментной системы.

Нами исследовались заключительные фотохимические этапы образования хлорофилла в процессе зеленения этиолированных листьев при их освещении.

При комнатной температуре происходят быстрые фотохимические превращения пигментов под действием интенсивного света, возбуждающего флуоресценцию,и это создает значительные трудности для исследования. Фиксирование листьев нагреванием для остановки процессов [1] не достигает цели, так как при этом значительно нарушается нативное состояние объекта. Поэтому мы применили охлаждение этиолированных и зеленеющих листьев (до температуры ниже —100°) и снятие спектров флуоресценции в этом состоянии. Глубокое охлаждение само по себе не вызывает нарушения процесса первоначального образования хлорофилла, а только сильно затормаживает этот процесс [2].

Флуоресценция зеленых листьев исследовалась рядом авторов. Френч и его сотрудники [3] показали, что положение первого максимума флуоресценции хлорофилла в листе (686 mμ) определяется реабсорбцией флуоресценции. Ими было также показано, что в молодых светло-зеленых листьях первый максимум сдвинут в коротковолновую сторону (до 676 mμ). Спектры флуоресценции этиолированного листа, фиксированного нагреванием, исследовались Виргиным [1]. Однако нагревание резко изменяло спектры флуоресценции в связи с нарушением нативности объекта. В литературе мы не нашли данных по спектрам флуоресценции этиолированных и зеленых листьев в коротковолновой области спектра (400—600 mμ).

Нами флуоресценция листьев возбуждалась спектральной областью 360—580 mμ, выделяемой из спектра ртутно-кварцевой лампы СВДШ-250 с помощью стеклянных светофильтров. Спектры фотографировались на спектрографе ИСП-73, на пластинках типа «панинфра». Исследовались спектры нескольких видов растений (фасоль, кукуруза, рожь и т. д.).

В спектрах флуоресценции этиолированных листьев наблюдаются три отчетливых максимума при 633, 655 и 705—707 mμ и более слабый максимум при 690—694 mμ (таблица). Наиболее интенсивна флуоресценция при 655 mμ.

При освещении этиолированного листа в течение одной минуты происходят резкие изменения спектра его флуоресценции. Максимумы 655 и 707 mμ ослабляются и быстро исчезают, максимум 633 mμ также ослабляется, появляется новый максимум: 690—694 mμ. При дальнейшем освещении листьев появляется флуоресценция с максимумом в области 675 mμ, затем этот максимум смещается в длинноволновую сторону до 680—682 mμ.

Положение максимумов флуоресценции в спектрах листьев (в mμ)			Соединения, которым принадлежит флуоресценция
этиолированные	зеленеющие	темно-зеленые	
410		410	Неизвестно
420—425		420—425	Неизвестно
435—440		435—440	Пиридин-нуклеотиды в связанной форме
455—460		455—460	Свободные пиридин-нуклеотиды или флавины
515—520		515—520	Продукты превращения пигментов (хлорофилла или протохлорофилла)?
555		555	
595		595	
632—633			Протохлорофилл
655			Форма протохлорофилла (или протохлорофиллид)
	675		Хлорофилл-*a*
	680—682		
		686	
690—694	690	(690)	Предшественник хлорофилла (хлорофиллид?)
705—707			Протохлорофилл
		730—735	Хлорофилл-*a* (второй максимум)
		812—815	Хлорофилл-*a* (третий максимум)

В зеленых листьях растений, выросших на свету в течение нескольких суток, обнаруживаются три максимума флуоресценции при 686, 730—735 и 812 mμ, что согласуется с литературными данными, а также слабая и узкая полоса флуоресценции при 690 mμ. Положение этих максимумов не изменяется под действием света (таблица).

Итак, в спектрах флуоресценции этиолированных листьев наблюдается по крайней мере три максимума флуоресценции. Очевидно, что максимумы при 633 mμ и 705—707 mμ принадлежат протохлорофиллу. В исследованных нами экстрактах пигментов этиолированных листьев обнаруживаются характерные максимумы флуоресценции протохлорофилла.

Однако в экстрактах из этиолированных листьев не удается обнаружить флуоресценцию, которую по положению спектра можно было бы сопоставить с полосой флуоресценции при 655 mμ, наблюдавшейся нами непосредственно в листе. Таким образом, эта форма пигмента с максимумом 655 mμ, очевидно, свойственна нативному состоянию пигмента.

Существенно отметить, что положение этого максимума весьма близко к максимуму спектра действия зеленения — 650 mμ [4]. В то же время исчезновение этого максимума при освещении листьев во времени полностью соответствует периоду быстрого образования первоначального хлорофилла [5]. Эти данные свидетельствуют о наличии в этиолированных листьях особой формы предшественника хлорофилла, обладающей фотобиохимической активностью и определяющей основные черты конечных стадий процесса биосинтеза хлорофилла.

Результатомф отохимического процесса является образование формы хлорофилла с максимумом флуоресценции при 690 mμ. Этот максимум значительно сдвинут не только по отношению к максимуму флуоресценции хлорофилла-*a* в растворе (669 mμ в ацетоне), но и сильно смещен по отношению к максимуму флуоресценции хлорофилла во взрослых листьях (680 mμ). Однако при экстрагировании пигментов из листьев в растворе обнаруживаются максимумы флуоресценции только хлорофилла-*a*. Очевидно, что «форма 690»и «форма 655» характерны для пигментов (хлорофилла и протохлорофилла) в состоянии естественной связи. Об этом свидетельствуют также опыты с нагреванием листьев. При нагревании этиолированного листа до 90° в воде максимум 655 mμ полностью исчезает, одновременно усиливается флуоресценция при 633 и 692 mμ. При нагревании листа, освещенного в течение 1 мин., максимум 690 mμ смещается до 680 mμ (т. е. к положению, характеризующему флуоресценцию зеленого листа).

Таким образом, обнаруженные промежуточные формы, свойственные живому листу, очень лабильны и быстро исчезают не только при экстрагировании, но и при нагревании листа. Поэтому они не были обнаружены в работах, где изучалось образование хлорофилла по спектрам флуоресценции экстрактов или нагретых листьев [1, 3].

В дальнейшем течении процесса образования хлорофилла максимум 690 mμ смещается в коротковолновую сторону до 675 mμ, а затем постепенно сдвигается опять в длинноволновую сторону до 680 mμ. Это положение максимума соответствует, по-видимому, завершающей стадии биосинтеза хлорофилла. Последующее смещение максимума флуоресценции до 686 mμ, как показал Френч [3], объясняется реабсорбцией света флуоресценции.

В недавно опубликованной работе Шибата [6] была прослежена последовательность изменений спектров поглощения в процессе зеленения этиолированного листа, аналогичная наблюдавшейся нами последовательности изменения спектров флуоресценции. Данные Шибата подтверждаются также нашими измерениями спектров поглощения этиолированного и зеленеющего листа при комнатной температуре на регистрирующем спектрофотометре СФ-2М.

Как в указанной работе, так и по нашим данным, промежуточные формы с максимумами 675 и 680 mμ могут образовываться и в темноте из формы 690, возникшей при освещении этиолированного листа.

Наши измерения спектров флуоресценции зеленеющих листьев при различных температурах, при которых происходил процесс образования хлорофилла, показали, что скорость образования формы 690 почти одинакова при 0, 20 и 40°, что подтверждает фотохимический характер процесса. Однако при 20° указанный процесс идет несколько быстрее, чем при 20 и 40°, а при 90° не идет совсем. Очевидно, фотохимический процесс осложняется при его осуществлении в биологической системе, замедляясь в условиях, ведущих к денатурации белка, связанного с пигментом [2].

Превращение формы 690 в форму 675 зависит от температуры и не идет при 0°.

Таким образом, процесс образования хлорофилла из протохлорофилла, считавшийся фотохимической реакцией, осложненной биологическими условиями [2], по-видимому, является сочетанием различных процессов. При этом собственно фотохимической стадией (осложненной биологическими условиями) является образование хлорофиллоподобного продукта с максимумом флуоресценции 690 mμ. По-видимому, с участием темновых (ферментативных) процессов последовательно образуются формы пигментов с максимумами флуоресценции 675 и 680 mμ.

Интересен вопрос о возможности участия обнаруженных промежуточных форм в процессе биосинтеза хлорофилла во «взрослом» зеленом листе. Весьма вероятно, что на эту возможность указывает слабая полоса флуоресценции при 690 mμ, наблюдавшаяся нами во взрослых листьях, и максимум флуоресценции протохлорофилла, который мы наблюдали в экстрактах зеленых листьев, выдержанных в темноте.

Точная интерпретация обнаруженных изменений спектров флуоресценции листьев в процессе зеленения в настоящее время затруднительна. В первую очередь это относится к объяснению форм с максимумами флуоресценции 655 и 690 mμ, необычно сильно смещенными в длинноволновую сторону. Судя по флуоресценции экстрактов, эти формы обладают спектрами, свойственными протохлорофиллу и хлорофиллу.

В последнее время в работе Вольфа и Прайса [7] и Годнева с сотрудниками [8] обосновываются новые взгляды на процесс биосинтеза хлорофилла, согласно которым заключительные стадии этого процесса осуществляются через протохлорофиллид (Mg-винилфеопорфирин-a_5) и хлорофиллид. Возможно, что наблюдавшиеся нами максимумы 655 и 690 mμ принадлежат соответственно протохлорофиллиду и хлорофиллиду-*a* в связанной с белком форме. При этом смещение спектров в длинноволновую

сторону может быть объяснено ионизацией свободной карбоксильной группы пигмента. Смещение максимума 690 mμ в коротковолновую сторону в этом случае можно связывать с этерификацией хлорофиллида под действием хлорофиллазы.

Для изучения возможного участия ферментативных систем в процессах биосинтеза нами была исследована также флуоресценция листьев в коротковолновой части спектра. При этом обнаружен ряд максимумов при 410, 420, 455, 460 mμ (в этиолированных и в зеленых листьях).

Максимумы 440, 455—460 mμ принадлежат, по-видимому, восстановленным пиридин-нуклеотидам в свободной и связанной с апоферментом форме [9]. Возможно, что флуоресценция в коротковолновой области спектра частично обусловливается клетчаткой листа или близкими к ней соединениями. В средней части спектра обнаружены неидентифицированные нами максимумы при 515—520, 555 и 595 mμ, возможно принадлежащие измененным формам пигментов — хлорофилла и протохлорофилла.

Цитированная литература

1. Virgin H. I., Physiol. Plantarum, 8, 389 (1955).
2. Smith J. H. C., Benitez A. Plant. Physiol., 29, 135, 1954.
3. French C. S., Young V. K., J. Gen. Physiol., 35, 873 (1952); French C. S., статья в сб. Luminescence of Biological Systems, стр. 51.— Washington, 1955.
4. Koski V. M., French C. S., Smith J. H. C., Arch. Biochem. and Biophys., 31, 1 (1951).
5. Koski V. M., Arch. Biochem. and Biophys., 29, 339 (1950).
6. Shibata K., J. Biochem. (Japan), 44, 147 (1957); Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР, 117, 106 (1957).
7. Wolf J. B., Price L., Plant. Physiol., 31, 30 (1956).
8. Годнев Т. Н., Шлык А. А., Ляхнович Я. П., Физиол. растений, 4, вып. 5, 393 (1957).
9. Duysens L. M. N., Amesz I., Biochim. et biophys. acta, 24, 19 (1957); Theorell H., Nydaard A. P., Acta Chem. scand., 8, 1649 (1954).

Доклады Академии наук СССР
1959. Том 127, № 3

БИОХИМИЯ

Ф. Ф. ЛИТВИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. Т. РИХИРЕВА

ОБРАЗОВАНИЕ И ПРЕВРАЩЕНИЕ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 11 IV 1959)

В настоящее время достаточно определенно установлено, что непосредственным предшественником хлорофилла при зеленении этиолированных листьев является протохлорофилл. В последние годы было показано, что заключительные этапы образования хлорофилла в листе — сложный процесс, включающий в себя целый ряд промежуточных стадий фотохимического и ферментативного характера ([1-6]). Однако все эти исследования были осуществлены на этиолированных листьях растений, выросших из семян в темноте. В связи с этим возникает вопрос об участии протохлорофилла в процессе нормального биосинтеза хлорофилла в зеленых листьях растений, выросших на свету. Решение этой проблемы обычными методами — абсорбционными методами спектрофотометрии — наталкивается на значительные трудности, связанные с необходимостью обнаруживать весьма малые количества протохлорофилла на фоне высоких концентраций основных пигментов листа (хлорофиллов и каротиноидов).

Для исследования образования протохлорофилла в зеленых листьях мы применили метод фотографирования спектров флуоресценции листьев при глубоком охлаждении объекта. Установка для фотографической регистрации спектров флуоресценции была описана ранее ([3,4]). Спектры фотографировались на панхроматической пленке чувствительностью 250 единиц ГОСТ (в случае экстрактов) или на пластинках «панинфра» (в случае листьев). Ширина щели спектрографа ИСП-73 была обычно 0,1 мм, экспозиция 10 сек. (экстракты) или 20—30 мин. (листья). В основных опытах использовались зеленые листья 7—15-дневных растений фасоли сорта Северная звезда, выращенных под люминесцентными лампами дневного света. Для приготовления экстрактов бралась навеска листьев (до 1 г); в случае необходимости взвешивание производилось в темноте. Листья растирались в ступке, пигменты экстрагировались 4—5 мл 80% ацетона, и экстракт отфильтровывался через бумажный фильтр. Перед фотографированием спектров флуоресценции концентрации экстрактов выравнивались по оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла а и затем охлаждались жидким азотом. О наличии протохлорофилла в экстрактах судили по появлению максимума флуоресценции при 629 мμ. В опытах исследовались экстракты листьев растений, выросших под люминесцентными лампами и помещавшихся на разное время (2, 4, 6 и 10 час.) в темноту при 20°. Для опыта брались половинки листовых пластинок. Затем растения вновь выставлялись на свет и освещались в течение 15 мин. на расстоянии 20 см от десяти 30-ваттных люминесцентных ламп, после чего приготовлялись экстракты из вторых половинок листовых платинок.

Для количественного определения концентрации протохлорофилла в экстракте одновременно производилось фотографирование серии стандартных растворов. Стандартные растворы получались путем добавления к исходному экстракту пигментов не затенявшихся растений (0 час. в темноте) определенных количеств ацетонового раствора хроматографически очищенного протохлорофилла оболочек семян тыквы, идентичного по свойствам протохлорофиллу этиолированных листьев. В качестве критерия накопления активного протохлорофилла бралась разница в концентрации протохлорофилла между листьями, помещавшимися в темноту, и листьями с тех же

растений, дополнительно освещавшихся в течение 15 мин. Концентрация протохлорофилла определялась спектрофотометрически, исходя из коэффициента поглощения, данного Коски с сотр. Данные о навеске листьев и о концентрации хлорофилла a и b в листе (определение производилось спектрофотометрически) позволяли оценивать содержание активного протохлорофилла в миллиграммах на грамм сырого веса и его относительное содержание (по отношению к хлорофиллу). Проводился контроль за изменением соотношения основных пигментов листа по спектрам поглощения экстрактов, бравшихся для измерения спектров флуоресценции. При этом не было обнаружено каких-либо существенных изменений этого соотношения.

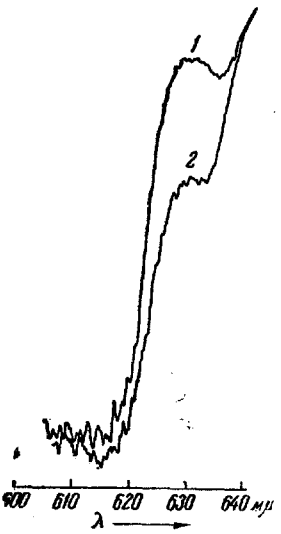


Рис. 1. Микроспектрограмма флуоресценции ацетонового экстракта: *1* — из листьев растений, находившихся 4 часа в темноте, *2* — после дополнительного освещения тех же листьев в течение 15 мин. (экспозиция при фотографировании 15 сек., щель 0,4 мм)

Как показали измерения спектров флуоресценции экстрактов, в зеленых листьях, выросших на свету и не подвергавшихся затемнению, четко обнаруживаются следы протохлорофилла. После помещения этих растений в темноту уже в первые 2 часа наблюдается значительное увеличение содержания протохлорофилла (см. табл. 1). В последующие часы содержание протохлорофилла продолжает возрастать с несколько меньшей скоростью. При выставлении растений из темноты на свет накопившийся протохлорофилл очень быстро исчезает (рис. 1). В течение первых 5—10 мин. количество накопленного протохлорофилла уменьшается в несколько раз, после 15—17 мин. количество протохлорофилла примерно соответствует его содержанию в незатемнявшемся листе.

Количество активного протохлорофилла, образующегося в зеленых листьях в первые часы затемнения, превосходит количество протохлорофилла, накапливаемого этиолированными растениями кукурузы за 15 дней (0,003 мг/г по данным Коски и др. ([7])). Концентрация активного протохлорофилла, образующегося в зеленом листе, в течение 10 час. достигает 1,6% по отношению к содержанию хлорофилла; эта цифра соответствует примерно количеству обновляемого хлорофилла за тот же интервал времени, по данным Шлыка и Годнева ([8]).

Таблица 1

Образование активного протохлорофилла в зеленых листьях фасоли

Время пребыв. раст. в темноте при 26°, час.	Протохлорофилл, исчезающий при последующем осв. раст. (15 мин.), мг на 1 г сырого веса
2,5	0,002
4	0,007
10	0,014

Как показали наблюдения, способность образовывать протохлорофилл зависит от возраста листьев, значительно ослабевая к 20—25 дню для первых листьев растений фасоли. Вторые листья 20—25-дневной фасоли вновь обладают способностью к образованию протохлорофилла.

Помимо описанных результатов опытов с растениями фасоли сходные результаты были получены при изучении накопления протохлорофилла в листьях некоторых других видов растений — бобов, кукурузы, пшеницы.

Нами были осуществлены также исследования процесса образования протохлорофилла непосредственно по спектрам флуоресценции зеленых листьев. С этой целью мы фотографировали спектры флуоресценции листьев растений, выросших на свету и затем помещенных в темноту на 1—2 суток. Для остановки процессов биосинтеза листья охлаждались в темноте жидким азотом до —150°. При этом было обнаружено появление максимума флуоресценции при 632—637 мμ, соответствующего, по-видимому, максимуму

флуоресценции протохлорофилла в листе ([3]). В исследованиях по спектрам поглощения и спектрам флуоресценции этиолированных листьев ([2-4]) были обнаружены разные формы протохлорофилла, в различной мере участвующие в процессе образования хлорофилла. С целью выявления этих форм мы провели измерения спектров флуоресценции зеленых листьев при более глубоком охлаждении (объект погружался в жидкий азот). Спектры либо фотографировались, либо регистрировались на установке, состоящей из спектрографа ИСП-51, выходного коллиматора, фотоумножителя ФЭУ-22 и записывающего устройства. В затемнении зеленых 12-дневных растений фасоли в течение 1—2 суток в спектрах флуоресценции листьев обнаруживается появление отчетливого максимума флуоресценции активной формы протохлорофилла при 656 мμ. Освещение этих листьев лампой накаливания 500 вт при комнатной температуре или при 0° приводит к быстрому (1—5 мин.) изчезновению максимума 656 мμ (рис. 2).

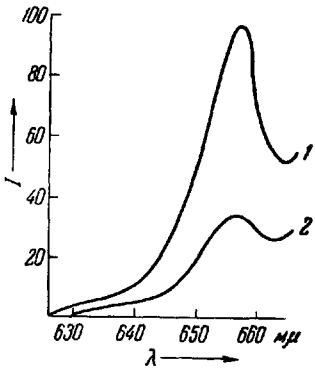


Рис. 2. Спектр флуоресценции зеленого листа фасоли: *1*—лист растения, находившегося в темноте 48 час., *2* — половина того же листа, дополнительно освещенного 15 мин. Фотоэлектрические измерения, щель 0,4 мм. (*I*) — в относительных единицах

Для выяснения путей биосинтеза в зеленом листе представляет интерес обнаружение промежуточной формы с максимумом флуоресценции 690 мμ, появляющейся в первые минуты освещения этиолированных листьев ([3]). В спектрах флуоресценции зеленых листьев при охлаждении до температуры жидкого азота обнаруживается максимум при 690—697 мμ, который по интенсивности не уступает первому максимуму хлорофилла в листе. При этом оба максимума, по-видимому, имеют тонкую структуру (рис. 3). Максимум 690—697 мμ обнаружен и в листьях, охлажденных на свету, и в листьях, помещавшихся в темноту на 1—2 суток, и в листьях, освещавшихся после затемнения. В связи с этим затруднительно дать точную интерпретацию обнаруженному максимуму.

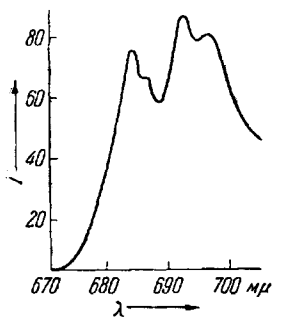


Рис. 3. Спектр флуоресценции зеленого листа фасоли, охлажденного до температуры жидкого азота. Фотоэлектрические измерения, щель 0,07 мм. *J* —*b* относительных единицах

Таким образом, применяя методику измерения спектров флуоресценции экстрактов пигментов и листьев при глубоком охлаждении, нам удалось обнаружить образование активных форм протохлорофилла в зеленых листьях растений.

Сопоставление наших данных о скорости накопления протохлорофилла с данными о скорости обновления хлорофилла, полученными изтопным методом ([8]), дает основание полагать, что биосинтез хлорофилла в зеленых листьях также осуществляется с участием активных форм протохлорофилла.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 III 1959

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] I. E. Loeffler, Carnegie Inst. Wash. Yearbook, № 54, 159 (1954—1955). [2] K. Shibata, J. Biochem. Japan, **44**, 147 (1957). [3] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **117**, 106 (1957). [4] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **120**, 764 (1958). [5] I. B. Wolf, L. Price, Arch. Biochem. and Biophys., **72**, 293 (1957). [6] Т. Н. Годнев, А. А. Шлык, Я. П. Ляхнович, Физиол. раст., **4**, в. 5, 393 (1957). [7] V. M. Koski, Arch. Biochem and Biophys., **29**, 339 (1949). [8] А. А. Шлык, Метод меченых атомов в изучении биосинтеза хлорофилла, Минск, 1956.

СВЕТОВАЯ РЕАКТИВАЦИЯ ЦИТОХРОМОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ И НЕ СОДЕРЖАЩИХ ХЛОРОФИЛЛ

Н. М. СИСАКЯН, А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА и *Г. П. БРИН*

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

В хлоропластах листьев растений содержатся различные ферментные системы, которые могут участвовать в процессах фотосинтеза. Для изучения возможных путей участия ферментативных систем в цепи фотосинтетических реакций может быть применен метод избирательного обратимого ингибирования данной ферментной системы с изучением действия на процессы дыхания и фотосинтеза. В гомогенатах зеленых листьев возможно изучение этих воздействий на часть реакций фотосинтеза, сопровождающихся фотохимическим выделением кислорода — реакцию Хилла.

В нашей предыдущей работе мы изучали влияние конкурентного ингибирования дегидразных ферментов амидом никотиновой кислоты и нашли корреляцию между подавлением активности этих ферментных систем и фотохимических процессов [1].

Среди ферментных систем, которые могут быть связаны с процессом фотосинтеза [2], представляет интерес изучение цитохромоксидазы, чрезвычайно широко распространенной в тканях высших растений [3].

В данной работе мы исследовали влияние окиси углерода на цитохромоксидазную и фотохимическую активности гомогенатов тканей растений. Окись углерода, реагируя с железопорфирином цитохромоксидазы, образует комплексы, разрушаемые видимым светом [4].

Возможность реактивации подавленных окисью углерода процессов исследовалась нами при действии «белого» света, поглощаемого цитохромоксидазой и хлорофиллом, и красного света, поглощаемого только хлорофиллом.

Для определения цитохромоксидазной и фотохимической активностей применяли манометрический метод. Опыты проводили при температуре 24—25°. Об активности цитохромоксидазы судили по количеству поглощенного кислорода при окислении восстановленного гидрохиноном цитохрома *с* (10 *мг* гидрохинона на 1 *мл* $1{,}80 \cdot 10^{-4}$ *М* цитохрома *с*). Ингибитором медьсодержащих оксидаз служил $0{,}014 \cdot M$ диэтилдитиокарбамат натрия. Фотохимическую активность измеряли по восстановлению фенолиндофенола [5].

Навеску листьев растирали на холоду с 1/15 *М* фосфатным буфером, pH 7,2, и центрифугировали 1—3 мин. при 2000—2500 об/мин. Полученную суспензию использовали для опытов.

Для определения цитохромоксидазной активности в главную часть манометрических сосудов наливали по 2 *мл* суспензии, в центральный стаканчик — 0,3 *мл* 20%-ного KOH и в боковой отвод — 0,5 *мл* восстановленного цитохрома *с* и 0,5 *мл* диэтилдитиокарбамата натрия.

Для определения фотохимической активности в сосуды Варбурга наливали по 3 *мл* суспензии и в боковой отвод 1 *мл* насыщенного при комнатной температуре фенолиндофенола (0,01 *М*). Опыты были проведены в атмосфере 90% CO и 10% O_2. Контрольными служили сосуды, в которых была создана атмосфера 90% N_2 и 10% O_2. Газовые смеси пропускали через сосуды в течение 20 мин. по 1 *л* на каждый сосуд, что составляет 40-кратный объем по отношению к емкости сосуда. За время пропускания газа сосуды термостатировали.

При определении цитохромоксидазной активности пара сосудов (один с атмосферой $CO+O_2$, другой с N_2+O_2) во время пропускания газовых смесей и проведения измерений находилась на свету, вторая, такая же пара,— в темноте. Освещение производили светом лампы накаливания (200 *W* на расстоянии 6 *см* от нити лампы до дна сосуда около $2 \cdot 10^{-4}$ *эрг/см² · сек*) без светофильтра или через красный светофильтр RG-2. При определении фотохимической активности газовые смеси пропускали через сосуды в темноте.

Цитохромоксидазную активность определяли в течение 30—40 мин. Фотохимическую активность — 21 мин. на красном свету.

Были исследованы суспензии листьев фасоли, свеклы, лебеды, клевера, пшеницы, картофеля, настурции. Во всех случаях мы наблюдали подавление цитохромоксидазной активности окисью углерода в темноте и отсутствие подавления на свету. Для примера на рис. 1 приведены данные, полученные с суспензией из листьев фасоли.

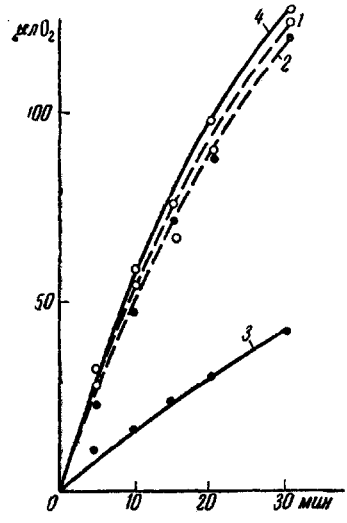


Рис. 1. Цитохромоксидазная активность суспензии листьев фасоли:

1 и *2* — в атмосфере $N_2 + O_2$; *3* и *4* — в атмосфере $CO + O_2$; ● — в темноте; o — на свету

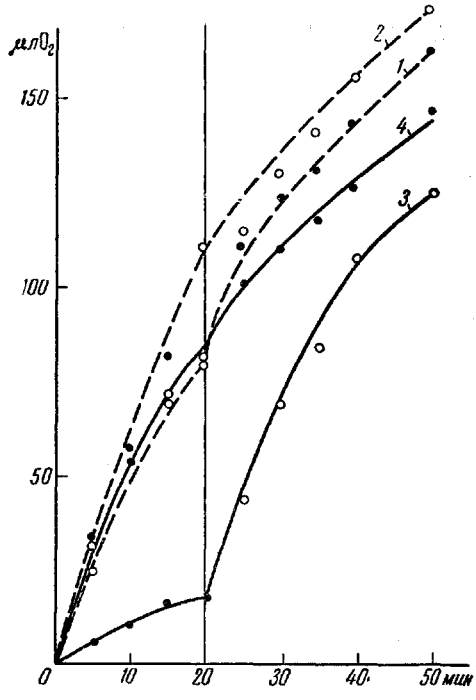


Рис. 2. Цитохромоксидазная активность суспензий листьев лебеды:

1 и *2* — в атмосфере $N_2 + O_2$; *3* и *4* — в атмосфере $CO+O_2$; ● — в темноте; o — на свету

Из рис. 1 видно, что свет не оказывает влияния на активность цитохромоксидазы суспензий в атмосфере $N_2 + O_2$. В атмосфере окиси углерода в темноте наблюдается значительное снижение активности фермента. При освещении белым светом цитохромоксидазная активность не тормозится окисью углерода; ее активность близка по величине к активности в атмосфере $N_2 + O_2$.

Фотохимическая активность не подавлялась действием окиси углерода. Восстановление фенолиндофенола, которые мы наблюдали по выделению кислорода, было одинаковым в атмосфере $N_2 + O_2$ и $CO + O_2$.

В другой серии опытов после 20-минутного измерения активности цитохромоксидазы манометры меняли местами — стоявшие в темноте переставляли на свет, стоявшие на свету — в темноту, после чего измерение активности проводили еще в течение 30 мин.

В этом случае мы наблюдали не только отсутствие ингибирования на свету, но также и реактивацию цитохромоксидазной активности, подавленной окисью углерода (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что подавленная в темноте активность цитохромоксидазы суспензии листьев лебеды (кривая *3*) реактивируется белым светом.

Так как определение фотохимической активности проводили на красном свету, мы исследовали влияние этого света на подавленную окисью углерода цитохромоксидазную активность суспензий зеленых листьев (табл. 1). Оказалось, что на красном свету наблюдается увеличение цитохромоксидазной активности подавленной окисью углерода, хотя и в несколько меньшей степени, чем на белом свету.

Таблица 1

Действие окиси углерода, красного и белого света на активность цитохромоксидазы

Активность в % от контроля ($N_2 + O_2$), принятого за 100

Растения	Условия опыта			
	$CO + O_2$, темнота	$CO + O_2$, красный свет	$CO + O_2$, темнота	$CO + O_2$, белый свет
Лебеда	22	62	22	71
Свекла	31	49	50	72
Фасоль	22	72	33	91
Картофель	23	35	30	58
Настурция	33	100	21	92
Клевер	—	—	29	68

Исследования действия красного и белого света проводили раздельно, и в каждом опыте ставили свои темновые и световые контроли в атмосфере N_2+O_2; следует заметить, что контрольные опыты в атмосфере азота на свету отличались от темновых не более чем на 10%, что не превышает ошибки метода.

За 100% активности цитохромоксидазы принимали среднюю величину контрольных измерений (темновых и световых) за 20 мин, выраженную в *мкл* кислорода. Несмотря на то, что цитохромоксидаза не поглощает свет в области пропускания красного светофильтра *, мы наблюдали реактивацию цитохромоксидазной активности зеленых суспензий, подавленную окисью углерода при действии красного света в степени, близкой к реактивации белым светом.

С целью выяснения причины этого явления мы провели сравнительное исследование на растениях различного физиологического состояния, содержащих и не содержащих хлорофилл. Объектами исследования служили ростки и зеленые листья картофеля, зерна молочной спелости, этиолированные и зеленые проростки пшеницы. Характер постановки этой серии опытов в основном не отличался от описанной ранее, за исключением того, что при перестановке сосудов на свет из темноты (и обратно) краны перекрывали, и последующие отсчеты производили вновь от нулевых показаний.

Полученные данные представлены на рис. 3 и 4 и в табл. 2.

В результате проведенных опытов было установлено, что белый свет реактивирует подавленную окисью углерода цитохромоксидазную активность как зеленых суспензий, так и суспензий, не содержащих хлорофилл (кривые *4*, рис. 3 и 4, *А*). Красный свет оказывает реактивирующее действие только на цитохромоксидазную активность суспензий, в которых присутствует хлорофилл (кривые *4*, рис. 3 и 4, *Б*). Особенно

* Окисленная форма очищенного препарата цитохромоксидазы сердечной мышцы свиньи имеет максимум поглощения при 595 *мкм* (основной) и при 420 *мкм* (слабый), восстановленная форма при 605 и 445 *мкм* [6].

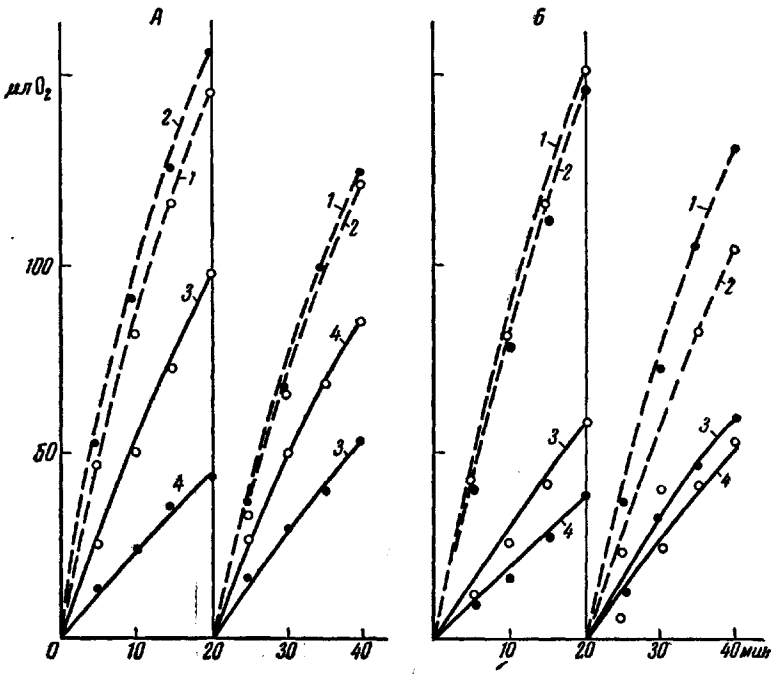


Рис. 3. Действие белого (*А*) и красного (*Б*) света на активность цитохромоксидазы суспензии листьев картофеля:
1 и *2* — в атмосфере N_2+O_2; *3* и *4* — в атмосфере $CO+O_2$; ○ — на свету; ● — в темноте

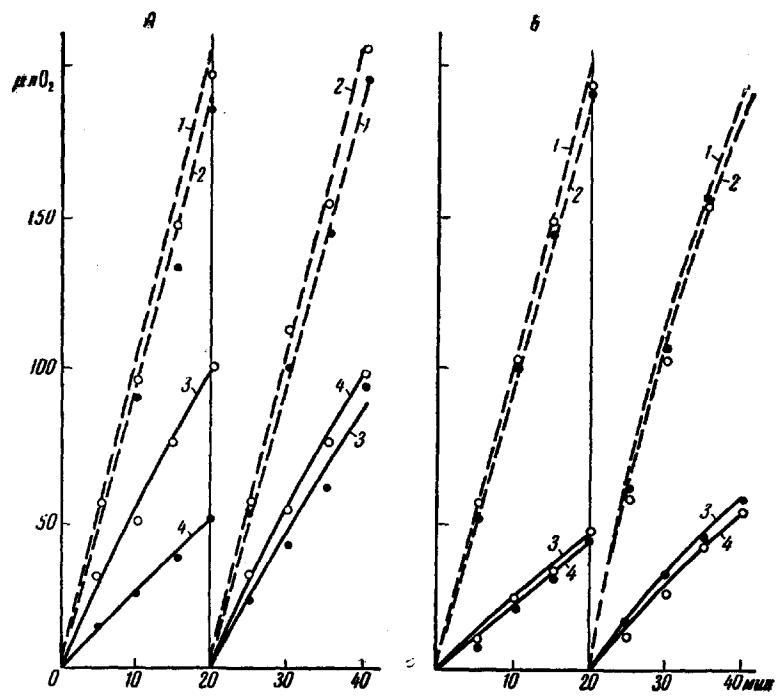


Рис. 4. Действие белого (*А*) и красного (*Б*) света на активность цитохромоксидазы суспензии ростков картофеля:
1 и *2* — в атмосфере $N_2 + O_2$; *3* и *4* — в атмосфере $CO+O_2$; ○ — на свету; ● — в темноте

отчетливо этот факт удалось наблюдать в суспензиях из ростков и листьев картофеля. Незначительное реактивирующее действие красного света на активность цитохромоксидазы суспензии из этиолированных проростков и зерен пшеницы (табл. 2), по-видимому, можно объяснить наличием в них протохлорофилла, который в ходе постановки опыта при рассеянном освещении превращается в хлорофилл.

Таблица 2

Действие окиси углерода, красного и белого света на активность цитохромоксидазы растений, не содержащих хлорофилл

Активность в % от контроля ($N_2 + O_2$), принятого за 100

Объекты исследования	Условия опыта			
	$CO + O_2$, темнота	$CO + O_2$, красный свет	$CO + O_2$, темнота	$CO + O_2$, белый свет
Ростки картофеля	24	24	51	100
Зерна пшеницы молочной спелости	37	50	36	79
Этиолированные проростки пшеницы	20	27	20	49

Таким образом, из проведенных опытов видно, что белый свет реактивирует подавленную окисью углерода активность цитохромоксидазы как зеленых суспензий, так и суспензий, не содержащих хлорофилл. Красный свет реактивирует подавленную окисью углерода цитохромоксидазную активность суспензии только при наличии в них хлорофилла; в суспензиях, не содержащих хлорофилл, реактивация красным светом не наблюдается.

О действии CO на фотохимическую активность суспензии зеленых листьев судить не удается, так как наличие хлорофилла способствует реактивации подавленной окисью углерода цитохромоксидазной активности на красном свету.

Из рис. 5 видно, что фотохимическая активность в атмосфере $CO+O_2$ не отличается от фотохимической активности в атмосфере $N_2 + O_2$.

Итак, проведенные опыты показывают, что наличие хлорофилла определяет световую реактивацию подавленной окисью углерода цитохромоксидазной активности. Возможно, что это явление по своему механизму сходно с явлением фотосенсибилизации окислительно-восстановительных превращений цитохрома *c* под действием света, поглощенного хлорофиллом [7].

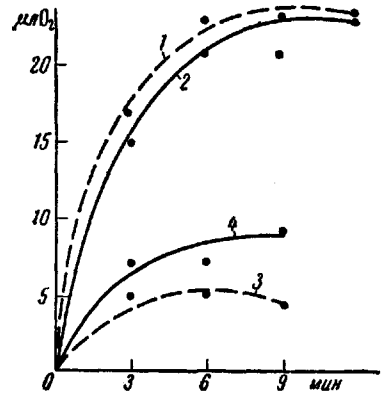


Рис. 5. Фотохимическая активность суспензий листьев (*1* и *2*) и ростков (*3* и *4*) картофеля: — — — — в атмосфере N_2+O_2; ——, атмосфере $CO+O_2$

Можно высказать следующие предположения о механизме изученного нами явления:

1) энергия кванта света, поглощенного хлорофиллом, используется для диссоциации комплекса цитохромоксидазы *c* окисью углерода;

2) увеличение поглощения кислорода при освещении гомогенатов красным светом определяется не только реактивацией цитохромоксидазы, но и фотосенсибилизированным хлорофиллом окислением восстановленного цитохрома.

Опыты, описанные в настоящей статье, не позволяют пока придти к определенному заключению о механизме обнаруженного явления; исследования в этом направлении продолжаются.

ВЫВОДЫ

Для выяснения связи между фотохимической и цитохромоксидазной активностью гомогенатов зеленых листьев применен метод торможения цитохромоксидазной активности окисью углерода и ее световой реактивации. Белый свет реактивирует подавленную окисью углерода активность цитохромоксидазы зеленых суспензий и суспензий, не содержащих хлорофилл. Красный свет реактивирует подавленную окисью углерода цитохромоксидазную активность суспензий только у зеленых тканей растений. Таким образом, проведенные опыты показывают, что наличие хлорофилла в тканях определяет реактивацию подавленной окисью углерода цитохромоксидазной активности под действием красного света.

Поступила в редакцию
15. XII. 1957

ЛИТЕРАТУРА

1. Сисакян Н. М., Красновский А. А., Михайлова Е. С. и Брин Г. П., Биохимия **18**, 725, 1953.
2. Gocum C. S., Amer. J. Bot. **33**, 10, 1946.
3. Hartree E. F., Advances Enzymol. **18**, 2, 1957.
4. Warburg O., Biochem. Z. **177**, 471, 1926.
5. Holt A. S., French C. S., Arch. Biochem. **19**, 429, 148.
6. Smith L., Stetz E., J. Biol. Chem. **209**, 819, 1954.
7. Красновский А. А., Докл. АН СССР **103**, 283, 1955; Красновский А. А. и Войновская К. К., Биофизика **1**, 120, 1956.

LIGHT REACTIVATION OF CYTOCHROME OXIDASE ACTIVITY OF PLANT TISSUES CONTAINING AND LACKING CHLOROPHYLL

N. M. SISSAKIAN, A. A. KRASNOVSKY, E. S. MIKHAILOVA and *G. P. BRIN*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

In order to elucidate the relation between the photochemical and cytochrome oxidase activity of the homogenates of green leaves use was made of inhibition of cytochrome oxidase by carbon monoxide and subsequent light reactivation. White light reactivates cytochrome oxidase inhibited by carbon monoxide both in green suspensions and in those containing no chlorophyll. Red light reactivates the inhibited cytochrome oxidase only in green plant tissues. Thus, the experiments showed that the presence of chlorophyll in the tissues makes possible red light reactivation of cytochrome oxidase inhibited by carbon monoxide.

БИОФИЗИКА

Том V, вып. 2 1960

СПЕКТРЫ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА, НАБЛЮДАЕМЫЕ ПРИ ОСВЕЩЕНИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ И РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

Н. Н. БУБНОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. В. УМРИХИНА, В. Ф. ЦЕПАЛОВ, В. Я. ШЛЯПИНТОХ

Институт химической физики АН СССР, Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Процесс переноса электрона (водорода) при фотосинтезе, очевидно, связан с образованием свободных радикалов как самого хлорофилла, так и промежуточных соединений, поскольку большинство окислительно-восстановительных реакций протекает путем одноэлектронных переносов.

Для регистрации свободных радикалов в последнее время широко применяют метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В ряде работ метод ЭПР был использован для исследования природы первичных продуктов фотосинтеза. Коммонер [1] обнаружил сигнал ЭПР в суспензии хлоропластов и водорослей, который возрастал в 5—6 раз при освещении, но спектр сигнала на свету почти не отличался от спектра в темноте. Длительность жизни радикалов, индуцируемых светом, составляла несколько минут. При освещении диализованных хлоропластов [2] сигнал ЭПР отличался от сигнала в темноте и сигнала, наблюдаемого при освещении недиализованных хлоропластов, по величине g-фактора, структуре, ширине линий и длительности жизни. Этот сигнал исчезал в темноте за 5—10 сек. Кальвин [3] в ряде работ приводит данные по обнаружению сигнала ЭПР в хлоропластах, хроматофорах водорослей, целых клетках различных водорослей и бактериях при освещении исследуемых объектов при —140° и —170°, т. е. в условиях, когда полностью заторможены ферментативные реакции. При низкой температуре сигнал сохранялся в темноте в течение нескольких часов; при повышении температуры до +25° сигнал исчезал в темноте в пределах одной-двух минут, хотя время роста сигнала при комнатной и низкой температурах одинаково.

По-видимому, свободные радикалы, обнаруженные Коммонером и Кальвином при освещении исследуемых объектов, связаны с образованием неустойчивых продуктов фотосинтеза. Природа этих радикалов пока не выяснена. Скорее всего, при освещении образуется несколько видов свободных радикалов, отличающихся по активности и времени жизни. На этот факт указывают и сами авторы цитированных работ.

Изучение радикалов, образующихся при фотохимических реакциях хлорофилла в модельных системах, может способствовать установлению природы радикальных промежуточных продуктов фотохимической стадии фотосинтеза. Модельной системой, в которой происходит запасание энергии света в фотопродуктах, является реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла [4]. Как было показано путем спектральных и электрометрических измерений [5; 6], фотовосстановле-

ние осуществляется путем следующих элементарных стадий:

$$X + AH \rightarrow \dot{X}^- + \dot{A}H^+ \rightarrow \dot{X}H + \dot{A},$$

где: X — хлорофилл, AH — аскорбиновая кислота.

Фотопродукты, образованные при реакции фотовосстановления, инициируют полимеризацию метилметакрилата [7]. Линшитц и Вейссман [8] показали, что «красная» фотовосстановленная форма, образуемая после освещения системы хлорофилл — фенилгидразин в толуоле, не дает сигнала ЭПР. Однако при освещении системы хлорофилл — аскорбиновая кислота в пиридине в вакууме непосредственно в резонаторе прибора удалось наблюдать появление небольшого сигнала ЭПР, исчезающего сразу же после выключения света [7]. Коммонер [9] сообщил на IV Международном биохимическом съезде в Вене в 1958 г., что ему удалось наблюдать появление сигнала ЭПР при реакции фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой, причем, по его данным, сигнал соответствовал монодегидроаскорбиновой кислоте.

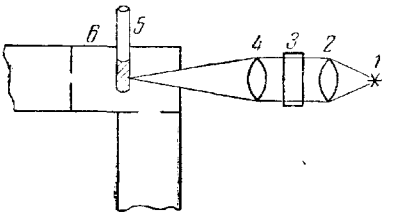


Рис. 1. Схема установки: *1* — источник света; *2* и *4* — линзы; *3* — светофильтры; *5* — исследуемый объект, *6* — резонатор ЭПР-спектрометра

С целью сравнительного изучения методом ЭПР радикальных промежуточных продуктов, образуемых при фотохимической стадии фотосинтеза и в модельных системах, была проведена настоящая работа.

Опыты проводились на ЭПР-спектрометре с высокочастотной модуляцией магнитного поля [10]. Для снятия спектра ЭПР в процессе освещения использовали резонатор с отверстием, через которое свет попадал на образец (рис. 1). В опытах регистрировали первую производную линию поглощения ЭПР. В качестве источников света использовали киноламу (700 *вт*) и ртутную кварцевую лампу СВДШ-250 с конденсором. На пути пучка света устанавливались теплоизолирующий светофильтр — 10%-ный раствор хлористого кальция (толщина слоя 4 *см*) и светофильтр, поглощающий ультрафиолетовую часть спектра — насыщенный раствор азотистокислого натрия (толщина слоя 3 *см*). В ряде опытов использовались светофильтры КС-11 и СЗС-9.

Спектр ЭПР при освещении листьев растений

Объектами исследования служили листья злаков: Triticum vulgare, Hordeum vulgare, Avena sativa и листья декоративного пестролистного растения Sancheria. Растения выращивались в оранжерее.

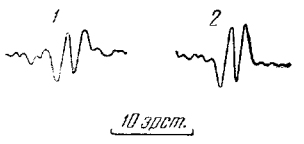


Рис. 2. Спектры ЭПР, возникающие при освещении листьев злаков: *1* — Triticum vulgare; *2* — Hordeum vulgare (комнатная температура).

При освещении листьев Sancheria возникает сигнал, имеющий вид широкой полосы со сложной структурой. Участки листа, содержащие хлорофилл, и бесхлорофилльные давали различные спектры. Длительное время жизни образующихся радикалов (порядка минут), по-видимому, свидетельствует об их малой активности.

Совсем иного вида сигнал ЭПР наблюдается при освещении листьев злаков Triticum vulgare и Hordeum vulgare (в Avena sativa сигнал не обнаружен) (рис. 2). Этот сигнал, наблюдавшийся в тех же условиях и ранее [11], представляет собой дублет с расщеплением $\Delta H \sim 1{,}8$ *э*. Ширина каждой компоненты дублета составляет $\sim 1{,}9$ *э*. Значение g-фактора 2,004. Этот сигнал принадлежит значительно более активному радикалу, исчезающему сразу же после

выключения света. При освещении листьев через красный светофильтр КС-11 сигнал ЭПР обнаружить не удалось.

Первоначально мы предположили, что дублетный сигнал возникает в результате образования радикальной формы хлорофилла. С целью проверки этого предположения были проведены опыты в модельных системах, в которых мы пытались получить сигналы ЭПР радикальных восстановленных или окисленных форм хлорофилла и родственных пигментов — феофитинов *а* и *б*, гематопорфирина и фталоцианина магния.

Опыты по фотоокислению пигментов молекулярным кислородом в пиридиновом или спиртовом растворах дали отрицательные результаты. Сигнал ЭПР не был получен ни с одним из перечисленных пигментов ни при комнатной, ни при низкой температуре (—30°, —60°).

Спектр ЭПР при реакции фотовосстановления хлорофилла и родственных пигментов

Наши опыты по фотовосстановлению хлорофилла и его аналогов проводились в ампулах, в отсутствие или в присутствии воздуха. Растворенный кислород удалялся откачкой на вакуумной установке, и под вакуумом ампула отпаивалась. Затем ампула помещалась в резонатор ЭПР спектрометра, где и проводилась фотохимическая реакция. В этих

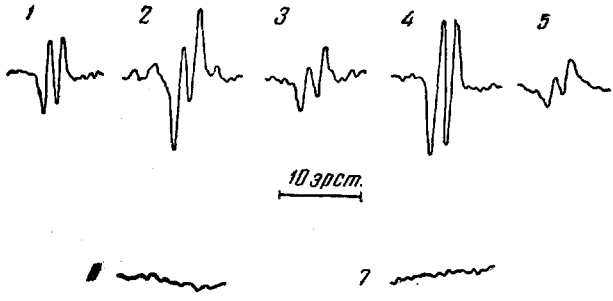


Рис. 3. Спектры ЭПР, возникающие в ходе реакции фотовосстановления пигментов аскорбиновой кислотой

(растворитель — пиридин, концентрация пигмента 10^{-3} *М*, концентрация аскорбиновой кислоты 1 *М*; (комнатная температура); светофильтр — КС-11 (в опытах 1, 2, 5, 6, 7; СЗС-9 в опыте 4);
1 — хлорофилл *а*, *2* — хлорофилл *а*+*в*, *3* — феофитин *а* + *в*, *4* — гематопорфирин, *5* — фталоцианин магния, *6* — раствор аскорбиновой кислоты в пиридине без пигмента, *7* — раствор хлорофилла в пиридине без аскорбиновой кислоты

опытах ампулы освещались либо нефильтрованным светом лампы СВДШ-250 или кинолампы (700 *вт*) или на пути пучка света помещали красный светофильтр КС-11 в опытах с хлорофиллом, феофитином и фталоцианином, и сине-зеленый светофильтр СЗС-9 в опытах с гематопорфирином. Сигнал наблюдался как при освещении без светофильтров, так и с фильтрами.

В опытах по фотовосстановлению пигментов аскорбиновой кислотой в пиридиновых растворах был получен сигнал ЭПР, причем спектр сигнала, изображенный на рис. 3, оказался совпадающим для всех изученных пигментов. Из сравнения рис. 2 и 3 видно также, что спектры ЭПР живого листа и модельных систем совпадают как по ширине полос дублета, так и по величине расщепления. Совпадающими оказываются также и величины g-факторов. Опыты по фотовосстановлению пигментов, в которых получались дублетные сигналы, проводились в пиридиновых растворах. Контрольные опыты показали, что при освещении пиридиновых растворов пигмента без аскорбиновой кислоты или раствора аскорбиновой кислоты в пиридине сигнал ЭПР не возникает.

Для того, чтобы выяснить, с каким из компонентов системы связано появление сигнала ЭПР, были проведены опыты по фотовосстановлению пигментов в других растворителях (толуол, этанол) и с различными восстановителями: гидразином, фенилгидразином, тиомочевиной, диоксималеиновой кислотой, гидроксиламином, солями закисного железа. Проводились опыты с добавками едкого натра или уксусной кислоты с целью повышения устойчивости ион-радикальных форм. Однако ни в одном из этих опытов не удалось получить сигнала ЭПР. Проводившиеся параллельно в целях контроля опыты по обнаружению сигнала ЭПР при фотовосстановлении эозина показали, что с любым из перечисленных восстановителей в спирте и пиридине получается триплетный сигнал, характерный для восстановленной формы эозина [12]. Добавки щелочи стабилизировали семихинон эозина, увеличивая время его жизни от нескольких секунд до многих часов.

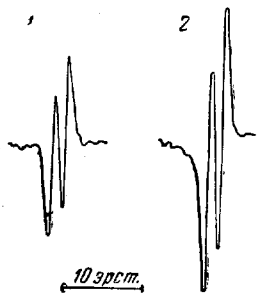


Рис. 4. Спектры ЭПР, возникающие при освещении пиперидиновых растворов: *1* — аскорбиновой кислоты, *2* — хлорофилла *а* + + *в* с аскорбиновой кислотой (концентрация пигмента — 10^{-4} *М*, концентрация аскорбиновой кислоты 1 *М*, комнатная температура; в опыте с хлорофиллом использовался красный светофильтр КС-11)

Установить природу радикала, образующегося при реакции пигментов с аскорбиновой кислотой, нам удалось в опытах, в которых реакция фотовосстановления проводилась в растворе пиперидина; в этом растворителе дублетный сигнал резко усилился. Эффект усиления сигнала ЭПР в пиперидине наблюдался со всеми пигментами. Следует отметить, что и в реакции фотовосстановления эозина в пиперидине получался интенсивный дублетный сигнал вместо триплетного сигнала семихинона эозина, получавшегося в других растворителях в присутствии той же аскорбиновой кислоты. Наиболее существенно то, что интенсивный дублетный сигнал получен при освещении раствора аскорбиновой кислоты в пиперидине без пигмента (рис. 4).

Нужно отметить, что при внесении аскорбиновой кислоты в пиперидин раствор принимает зеленоватую окраску. Максимум поглощения раствора лежит при 385 *мм*, что, по-видимому, объясняется образованием комплекса аскорбиновой кислоты с пиперидином. Возникновение сигнала ЭПР происходило в этом случае в результате прямого фотохимического процесса, вероятно, за счет переноса электрона в окрашенном комплексе пиперидин — аскорбиновая кислота. В отличие от этого, в пиридиновом растворе аскорбиновой кислоты не имеет места образование радикала аскорбиновой кислоты в прямой фотореакции — радикал образуется только в результате взаимодействия возбужденной молекулы пигмента с молекулой аскорбиновой кислоты.

Следует полагать, что радикал, дающий дублетный спектр ЭПР, является полуокисленной формой аскорбиновой кислоты — монодегидроаскорбиновой кислотой, поскольку в исследуемой системе происходит восстановление пигментов и, следовательно, имеет место образование восстановленной формы пигмента и окисленной формы аскорбиновой кислоты [4]. Это следует также и из опытов, в которых было показано, что сигнал возникает и в присутствии кислорода в системах, содержащих аскорбиновую кислоту, в пиридине — в присутствии пигмента и в пиперидине — с пигментом или без пигмента, т. е. в условиях, когда возможно фотоокисление аскорбиновой кислоты. Впуск кислорода в раствор, содержащий радикалы, не уменьшает интенсивности сигнала. В то же время, как известно, в присутствии кислорода восстановленные формы пигментов не образуются, и наблюдается лишь сенсибилизированное фотоокисление аскорбиновой кислоты [13]. Реакция кислорода

с фотовосстановленными формами пигментов приводит к быстрой обратной регенерации пигмента.

Таким образом, экспериментальный материал указывает на то, что при фотовосстановлении пигментов аскорбиновой кислотой наблюдаемый сигнал принадлежит радикальной полуокисленной форме аскорбиновой кислоты. Форма и ширина линий указывают на то, что в живом листе, в пиридиновых растворах пигментов и в растворах пиперидина с пигментом и без пигмента при освещении мы регистрируем одно и то же соединение — радикальную окисленную форму аскорбиновой кислоты.

Реакции между валентнонасыщенными молекулами идут по правилам 0→0 или 0→2. Это означает, что в результате реакции образуются две свободные валентности или свободные валентности вообще не возникают. Поэтому появление радикальной формы аскорбиновой кислоты в реакции между возбужденной молекулой пигмента и аскорбиновой кислотой в пиридине является бесспорным доказательством существования радикальной формы пигмента. Вывод об образовании радикальных форм пигментов в данной системе подтверждается и тем, что в присутствии пигмента время жизни радикала аскорбиновой кислоты значительно уменьшается (в пиперидине) от нескольких минут до нескольких секунд, тогда как в растворе одной аскорбиновой кислоты в пиперидине сигнал сохраняется длительное время. Этот факт указывает на возможность реакции рекомбинации радикалов пигмента и аскорбиновой кислоты и на возможность реакции взаимодействия радикала аскорбиновой кислоты и неизменного пигмента. Так, при введении раствора хлорофилла в пиперидиновый раствор, содержащий радикалы аскорбиновой кислоты, сигнал ЭПР быстро исчезал (в течение 2—3 сек.). Так как в этой реакции взаимодействуют монорадикал и насыщенная молекула, то свободная валентность не может исчезнуть. Но ни в одном из опытов нам не удалось обнаружить спектра ЭПР радикальных форм пигментов, по-видимому, из-за их чрезвычайно высокой активности и, соответственно, малого времени жизни.

В настоящей работе нас чрезвычайно интересовал вопрос, образуется ли радикал аскорбиновой кислоты в живом листе за счет энергии света, поглощаемой хлорофиллом, или он возникает путем прямой фотореакции аскорбиновой кислоты. Предпринятая попытка снять спектр действия реакции образования радикалов в листе не увенчалась успехом, поскольку интенсивность полосы ЭПР поглощения даже при облучении интегральным нефильтрованным светом ртутно-кварцевой лампы была малой. При освещении листа через светофильтр КС-11, пропускающий спектральную область, поглощаемую только хлорофиллом, сигнал вообще не обнаруживается, что может быть связано либо с сильным уменьшением интенсивности возбуждающего света, либо с тем, что радикал образуется лишь при освещении листьев коротковолновой частью спектра. Опыты с этиолированными листьями пшеницы не дали воспроизводимых результатов. Таким образом, вопрос о механизме образования радикалов аскорбиновой кислоты в листьях растений при освещении остается открытым.

Выводы

1. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) обнаружено образование свободных радикалов при реакции фотовосстановления аскорбиновой кислотой хлорофилла *а*, хлорофилла *а+в*, феофитина *а+в*, гематопорфирина и фталоцианина магния, а также при освещении листьев некоторых злаков. Спектр ЭПР во всех случаях обладал сходной структурой.

2. Спектр ЭПР обнаруженных радикалов как в модельных системах, так и в листьях представляет собой дублет с расщеплением $\Delta H \sim 1{,}8$ *э*. Значение *g*-фактора 2,004.

3. Полученный спектр ЭПР принадлежит радикальной окисленной форме аскорбиновой кислоты (вероятно, монодегидроаскорбиновой кислоте), на что указывают следующие факты: структура спектра не зависит от природы пигмента; сигнал ЭПР наблюдается лишь в случае применения аскорбиновой кислоты в качестве донора водорода и появляется также при прямой фотореакции аскорбиновой кислоты в пиперидине.

4. Установлено, что в модельных системах радикальная форма аскорбиновой кислоты может образоваться как за счет энергии света, поглощаемой пигментом, так и путем прямой фотореакции аскорбиновой кислоты, связанной с сильным основанием.

Поступила в редакцию
22.XI.1959

ЛИТЕРАТУРА

1. Commoner B., Heise J., Torunsend J., Proc. Nat. Acad. Sci. US **42**, 710, 1956.
2. Commoner B., Heise J., Lippicott B. B., Norberg R. E., Passoneau J. V., Science **126**, 57, 1957.
3. Calvin M., Sogo P. B., Science **125**, 499, 1957; Calvin M., Brookhaven Symposia in Biology, N 11, **160**, 1958.
4. Красновский А. А., Докл. АН СССР **60**, 421, 1948.
5. Красновский А. А., ЖФХ **30**, 968, 1956.
6. Евстигнеев В. Б., ЖФХ **32**, 969, 1958.
7. Красновский А. А., Умрихина А. В., Биофизика **3**, 547, 1958.
8. Linschitz H., Weissmann S. J., Arch. Biochem. and Biophys. **67**, 491, 1957.
9. Коммонер Б., Сообщ. на IV Междунар. биохим. конгрессе, Вена, 1958.
10. Семенов А. Г., Бубнов Н. Н., ПТЭ **1**, 92, 1959.
11. Бубнов Н. Н., Цепалов В. Ф., Шляпинтох В. Я. Изв. АН СССР, серия физическая, № 10, 1959.
12. Бубнов Н. Н., Кибалко Л. А., Цепалов В. Ф., Шляпинтох В. Я., Оптика и спектроскопия **7**, 117, 1959.
13. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия **22**, 776, 1958.

ELECTRON SPIN RESONANCE SPECTRA OBSERVED ON THE ILLUMINATION OF PLANT LEAVES AND CHLOROPHYLL PHOTOREDUCTION

M. N. BUBNOV, A. A. KRASNOVSKII, A. V. UMRICHINA, V. F. TSEPALOV. V. Ya. SHLYAPINTOKH

1. The formation of free radicals on photoreduction of chlorophyll a, chlorophyll a+b, pheophytin, haemato-porphyrin and magnesium phtalocyanine with ascorbic acid, as well as on the illumination of certain cereals leaves was observed with the aid of electron spin resonance (E.S.R.) measurements. The electron spin resonance spectrum possessed similar structure in all cases listed above.

2. E.S.R. spectrum of the radicals found represents a doublet with a splitting $\Delta H \sim 1.8$ ersted in model systems as well as in the leaves. The value of g factor — 2.004.

3. The found E.S.R. spectrum referrs to the oxydised radical form of ascorbic acid (probably to monodehydroascorbic acid) The following points to this fact: the structure of the E.S.R. spectra does not depend on the pigment nature: E.S.R. signal is observed only in the case of ascorbic acid used as a hydrogen donor; the same E.S.R. signal appears on the direct photoreaction of ascorbic acid in piperidin too.

4. It has been stated that the radical form of ascorbic acid in model systems can be formed at the expence of the energy of light absorbed by the pigment as well as at the expence of the direct photoreaction of ascorbic acid bound with a molecule of a strong base.

Received: 22.XI.1959

УСПЕХИ ХИМИИ

Т. XXIX 1960 г. Вып. 6

РЕАКЦИЯ ОБРАТИМОГО ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА, ЕГО АНАЛОГОВ И ПРОИЗВОДНЫХ

А. А. Красновский

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 736
I. Изучение реакции обратимого фотовосстановления 737
1. Спектрофотометрические измерения 737
2. Структура пигмента и способность к реакции 741
3. Сравнение свойств промежуточных форм, образующихся при фотовосстановлении и «темновом» восстановлении цинком 741
4. Изменения флуоресценции при реакции 741
5. Изменение окислительно-восстановительного потенциала E_0 при фотореакции 742
6. Молекулы-восстановители (доноры электрона), реагирующие с хлорофиллом и его аналогами 744
7. Влияние кислотно-основных свойств среды 745
8. Образование свободных радикалов при реакции фотовосстановления . 746
9. Хемилюминесценция при обратных реакциях продуктов фотовосстановления хлорофилла 748
10. Об образовании предреакционных ассоциатов 749
11. Механизм фотовосстановления 749
II. Окислительно-восстановительные реакции, фотосенсибилизированные хлорофиллом 751
III. Фотореакции коллоидных растворов хлорофилла 753
IV. Фотохимические свойства хлорофилла в гранулах хлоропластов . . . 754
V. Обратимые фотохимические превращения хлорофилла в живых листьях растений 754
VI. Реакция обратимого фотовосстановления и возможный механизм участия хлорофилла и его аналогов в фотобиологических процессах 755
1. Фотосинтез 756
2. Фотодинамическое действие порфиринов 756
3. Другие фотобиологические реакции 757
Заключение 757

ВВЕДЕНИЕ

Одним из путей, ведущих к познанию фотохимической стадии фотосинтеза, является изучение превращений пигментов растений под действием света. В 1948 г. нам удалось обнаружить способность хлорофилла и его аналогов к реакции обратимого фотохимического восстановления [1]. Эта реакция сопровождается образованием активных фотопродуктов («запасающих» энергию квантов света), обратимо реагирующих после прекращения освещения с регенерацией исходной молекулы пигмента. Дальнейшие исследования показали, что реакция обратимого фотовосстановления лежит в основе фотосенсибилизирующего действия хлорофилла в растворах и может быть привлечена для объяснения механизма ряда фотобиологических процессов. За истекшие 10 лет изучению реакции фотовосстановления хлорофилла, его аналогов и производных были посвящены многие работы в СССР и за рубежом и ныне своевременно дать обзор этих исследований. Краткие сводки даны в предыдущих статьях автора [2].

В работах лаборатории фотобиохимии Института биохимии АН СССР проводилось сравнительное изучение свойств хлорофилла, его аналогов и производных, позволяющее выявить значение отдельных группи-

ровок молекул пигментов и природы центрального атома металла в проявлении фотохимических свойств. Исследовались пигменты, выделенные из различных организмов и очищенные при помощи хроматографии, а также пигменты в виде естественных белковых соединений непосредственно в биологических структурах (в суспензиях гранул и хлоропластов) и листьях растений.

Изучались хлорофилл *a* и *b* зеленых растений, бактериохлорофилл фотосинтезирующих бактерий, протохлорофилл этиолированных листьев и оболочек семян тыквенных, соответствующие феофитины, различные порфирины, фикобилины и синтетические аналоги этих пигментов — фталоцианины. В этих работах были применены и разработаны методы выделения и хроматографической очистки перечисленных выше пигментов растений.

Все изученные пигменты отличаются характерными спектрами поглощения и флуоресценции, изменяющимися не только при химических превращениях пигментов, но и при изменении состояния их молекул — агрегации в коллоидные частицы, образовании координационных соединений и т. д. Поэтому в излагаемых ниже исследованиях применялись спектрофотометрические измерения в процессе реакции при помощи фотоэлектрических приборов. В наших работах широко применялась спектрофотометрия в вакуумных трубках, приспособленных для измерения на приборах Бекмана и СФ-4. Для изучения реакции в ряде работ применялись измерения спектров флуоресценции, фотопотенциала инертного электрода и фотопроводимости в реагирующей смеси. Образование свободных радикалов при реакции измерялось при помощи методов инициирования фотополимеризации и электронного парамагнитного резонанса.

Для изучения активных промежуточных продуктов реакции и расчленения отдельных стадий использовались следующие методические приемы: 1) применение сред, в которых стабилизуются промежуточные продукты реакции; мы нашли, что таким действием обладают органические основания; 2) применение низких температур, которое позволило изолировать фотостадию переноса электрона от последующих темновых стадий реакции; 3) применение дейтерированных доноров водорода, что позволило наряду с опытами при низких температурах изучить стадию переноса протона в реакции.

Все эти приемы применялись в сочетании с методами измерений, позволяющими следить за образованием фотопродуктов непосредственно во время освещения реагирующей системы и продуктов «переживающих» период освещения.

I. ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТИМОГО ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ

1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ (см. рис. 1)

Хлорофилл. Кратковременное освещение красным светом пиридиновых растворов хлорофилла без доступа воздуха в присутствии восстановителя (аскорбиновой кислоты или фенилгидразина) приводит к образованию продукта фотовосстановления красного цвета с максимумом поглощения при 520—525 *mμ*. При выключении света реакция идет обратно с регенерацией хлорофилла — возвращением зеленого цвета раствора — более быстро при введении окислителей — кислорода воздуха и др. [1, 2].

В качестве побочного процесса наблюдалась частичная феофитинизация, в особенности при избытке аскорбиновой кислоты и более длительном освещении. Обратимость реакции с хлорофиллом *a* была более полной, а из хлорофилла *b* при восстановлении в пиридине получались наряду с обратимо реагирующими соединениями продукты необратимого фотовосстановления [3].

Реакцию удавалось наблюдать также в спиртовых растворах в присутствии органических оснований — пиридина, никотина, фенилгидразина, гексаметилентетрамина и в пиридине в присутствии до ~50% воды [3, 4].

Продолжая эти исследования, Евстигнеев и Гаврилова [5] показали, что в толуольном растворе хлорофилла фотовосстанавливается фенилгиразином. В этих условиях была показана возможность фотовосстановления хлорофилла *b* с хорошей обратимостью. При понижении температуры до —40° чрезвычайно замедлялось образование красной фотовосстановленной формы хлорофилла.

Холт и Рабинович [6], воспроизведя наши опыты, отметили, что цикл «фотовосстановление — обратная реакция» можно повторять многократно со все увеличивающимся количеством необратимо измененного хлорофилла. Линшитц и Вейссман [7] наблюдали образование красной фотовосстановленной формы хлорофилла в фенилгидразине. Линч и Френч [8] воспроизвели фотовосстановление хлорофилла в пиридине и обратили внимание на то, что реакцию удается наблюдать при добавлении 50% пиридина в водную взвесь хлоропластов. Раков и Кениг [9], изучая реакцию фотовосстановления хлорофилла, указали, что при нарушении циклопентанонового кольца молекулы хлорофилла им не удалось наблюдать течения реакции, что, по их мнению, свидетельствует о необходимости этой группировки молекулы для реакции.

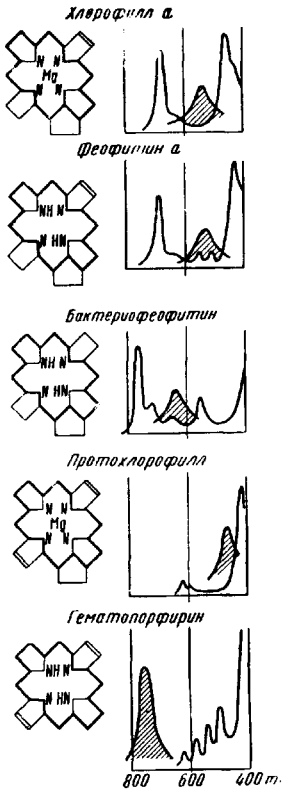


Рис. 1. Изменения спектров поглощения хлорофилла и его аналогов при фотовосстановлении аскорбиновой кислотой в пиридине [2] (структура молекул пигментов показана схематично); кривыми показан вид спектра поглощения пигмента до реакции и после обратной реакции; заштрихованы спектры поглощения промежуточных фотовосстановленных форм

По-видимому, этот вывод не обоснован, так как ряд других аналогов и производных хлорофилла, не имеющих циклопентанонового кольца (порфирины, фталоцианин магния), полностью способны к фотовосстановлению.

Баннистер [10], изучая в своей диссертационной работе реакцию обратимого фотовосстановления хлорофилла, пришел к выводу, что реакция идет лишь при введении спирта или воды в пиридин, что способствует образованию аскорбат-иона, являющегося активным донором электрона. Квантовый выход образования «красной» восстановленной формы хлорофилла достигает 0,05 при 40% воды в пиридине; при фотореакции также наблюдалась феофитинизация. В эфирных растворах, освобожденных от кислорода, хлорофилл фотовосстанавливается фенилгидразином в форму с максимумами поглощения при 410 и 520 $m\mu$. В согласии с работами нашей лаборатории, Баннистер приходит к выводу об участии в реакции не синглетного, а триплетного возбужденного состояния хлорофилла.

Феофитин. Мы наблюдали обратимое фотовосстановление феофитина с образованием «красной» формы, близкой по спектру к соответствующей форме хлорофилла [3].

Детальные сравнительные исследования хлорофилла и феофитина были сделаны в работе Евстигнеева и Гавриловой, наблюдавших более быстрое восстановление феофитина [11]. Эти авторы нашли, что при реакции в пиридиновом растворе при —40° феофитин образует промежуточ-

ный фотопродукт бурого цвета, переходящий при нагревании в красную фотовосстановленную форму [12]. Эта «первичная» восстановленная форма феофитина и других пигментов была детально изучена в работах Евстигнеева [13].

Этилхлорофиллид ведет себя подобно хлорофиллу, образуя «красную» восстановленную форму. Холт [14] отметил обратимое фотовосстановление хлорофиллида в присутствии версена.

Протохлорофилл и его производные. При фотовосстановлении аскорбиновой кислотой протохлорофилл образует фотопродукт коричневого цвета с максимумом поглощения при 470 $m\mu$, обратимо реагирующий (окисляющийся) с образованием зеленого протохлорофилла [15]. При этом не удается отметить образования хлорофилла, хотя долгое освещение ведет к образованию небольшого количества продукта с максимумом поглощения при 675 $m\mu$. Протофеофитин также способен к обратимому фотовосстановлению. Нарушение циклопентанонового кольца этих соединений посредством пиперидина или спиртовой щелочи ведет к образованию порфинов, которые фотовосстанавливаются подобно другим порфиринам (см. ниже). В опытах Евстигнеева и Гавриловой, проведенных при —40°, были измерены спектры поглощения первичной фотовосстановленной формы протофеофитина, аналогичной по своим свойствам первичной форме феофитина [16].

Бактериохлорофилл и *бактериофеофитин.* Фотовосстановление бактериохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридине приводит к образованию фотопродуктов, не обладающих характерным спектром поглощения в видимой области спектра [17]. Реакция идет глубже и более обратимо в более основных средах — в присутствии пиперидина, аммиака и фенилгидразина как восстановителя. С сернистым натрием реакция на воздухе быстро обратима и образуется продукт фотовосстановления зеленого цвета с максимумом при 660 $m\mu$.

Бактериофеофитин в этих условиях образует более устойчивый зеленый продукт фотовосстановления [17].

Бактериовиридин. Изучение [18] свойств пигмента зеленых серных бактерий, близкого по свойствам к хлорофиллу, показало что этот пигмент образует «красную» фотовосстановленную форму, похожую на продукт фотовосстановления хлорофилла *a*. Феофитин, полученный из бактериовиридина, также похож по своим свойствам на феофитин *a*, образуя первичную и вторичную фотовосстановленные формы. Бактериовиридин отличается от хлорофилла большей скоростью фотоокисления в растворе, что приближает его к бактериохлорофиллу, чрезвычайно быстро разрушающемуся при освещении.

Порфирины. Поведение протопорфирина, гематопорфирина, порфирина фотосинтезирующих бактерий и порфирина, полученного из протохлорофилла, оказалось сходным; различия наблюдались лишь в скорости прямых и обратных реакций [19, 20, 21].

Фотовосстановление этих соединений мы изучали в органических растворителях и в водных кислых и щелочных растворах. В основаниях — пиперидине и пиридине — при реакции с аскорбиновой кислотой обычно образуется зеленый фотопродукт с максимумом поглощения при 640—660 $m\mu$, при пуске воздуха обратимо превращающийся в порфирин. В воде в присутствии 10% пиридина образуется фотопродукт с максимумом поглощения при 740—750 $m\mu$ [19]. Оба соединения связаны условиями кислотно-основного равновесия, переходя друг в друга при изменении основности среды [20]. По-видимому, эти продукты отличаются условиями диссоциации карбоксильных групп порфирина.

В кислых водных растворах резко меняется вид спектра поглощения порфиринов из-за присоединения протонов атомами азота пиррольных ядер; при этом образуется промежуточный фотовосстановленный продукт с максимумом поглощения при 520 $m\mu$ [21] (см. рис. 2).

В случае проведения реакции и измерения при —40° наблюдалось образование «первичной» формы гематопорфирина с максимумом 450 $m\mu$ при нагревании частично переходящей в «зеленую» фотовосстановленную форму с максимумом поглощения при 650 $m\mu$ [16].

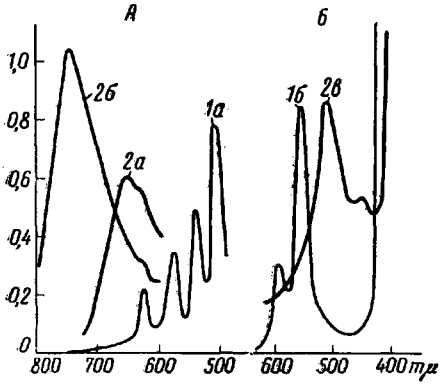


Рис. 2. Спектры поглощения фотовосстановленных форм гематопорфирина в основных кислых средах [20, 21]
1 — спектр поглощения порфирина до фотовосстановления и после обратной реакции в темноте, *А* — в пиридине и этаноле, *Б* — в 1 *N* H_2SO_4, *2* — после фотовосстановления аскорбиновой кислотой; *а* — в пиридине, *б* — в смеси пиридин — спирт, *в* — в 1 *N* H_2SO_4

Металлические комплексы хлорофилла и его аналогов. Мы не смогли наблюдать фотовосстановление медных комплексов феофитина, но обладающий флуоресценцией цинковый комплекс показал способность к фотовосстановлению в опытах Востриловой и Дуловой [22]. Раков и Кениг [9] указали на хорошую обратимость фотовосстановления этого соединения.

Даин с сотрудниками [23, 24] установили и детально изучили фотовосстановление железных комплексов хлорофилла; они предположили, что при реакции имеют место перенос электрона в комплексе Fe-хлорофилла с OH'-ионами, молекулами воды, ионами металла-восстановителя. Даин и Ашкинази [24] предположили, что в возбужденном состоянии электронная система этих пигментов неустойчива, что приводит к последующему (после поглощения света) внутрикомплексному переносу электрона от органического скелета молекулы к центральному атому железа, подвергающемуся при этом фотовосстановлению. Образующийся дефект заряда пополняется за счет окисления растворителя. Так как эти, следующие друг за другом, акты переноса электрона наступают немедленно вслед за актом поглощения света, то это приводит к значительному сокращению периода жизни возбужденного соединения. Это проявляется, по мнению авторов, в некотором расширении полос поглощения, исчезновении флуоресценции и колебательной структуры.

Мы наблюдали весьма медленное фотовосстановление цитохрома *С* под действием видимого света в анаэробных условиях и фотоокисление его восстановленной формы в присутствии воздуха [25, 26].

Фталоцианины. При освещении пиридинового раствора фталоцианина магния с аскорбиновой кислотой, наряду с образованием необратимо восстанавливающихся продуктов, удалось заметить стадию фотовосстановления, быстро обратимую в темноте [27].

Проводя реакцию при низкой температуре, Евстигнеев и Гаврилова наблюдали быстрое образование «красной» фотовосстановленной формы с максимумом 550 $m\mu$, мгновенно регенерирующейся в исходный фталоцианин при пуске воздуха [28]. Так же, как и в случае хлорофилла, не удалось измерить спектр «первичной» фотовосстановленной формы этого соединения. Фталоцианин меди не способен к реакции этого типа.

Каротиноиды. В нашей лаборатории пытались наблюдать фотовосстановление β-каротина, ксантофилла, каротиноидов фотосинтезирующих бактерий в разных средах с разными восстановителями, но ни в каких условиях не смогли наблюдать образования обратимо реагирующих продуктов этих соединений [29].

Фикобилины. Фикоэритрин красных водорослей и фикоциан не обладают ни способностью к этой реакции, ни фотосенсибилизирующим

действием [30]; делались попытки фотовосстановления эритробилина, полученного при кислотном гидролизе фикоэритрина, но это соединение также не оказалось способным к фотореакции.

2. Структура пигмента и способность к фотовосстановлению

На основании изложенного материала мы приходим к заключению, что реакцию фотовосстановления удалось наблюдать у всех производных и аналогов хлорофилла, обладающих структурой хлорина, бактериохлорина и порфирина с центральными атомами водорода, магния или цинка.

Спектральные свойства и реакционноспособность восстановленных форм различных пигментов различны в разных средах. Магниевые комплексы обычно образуют более активные (быстрее обратимо реагирующие) восстановленные формы, чем безмагниевые феофитины.

Сопоставление способности к реакции и структуры различных пигментов указывает на то, что главным признаком, определяющим способность пигментов к реакции обратимого фотовосстановления, является наличие в молекуле пигмента системы сопряженных по кругу двойных связей, связывающих четыре пиррольных кольца.

3. Сравнение свойств промежуточных форм, образующихся при фотовосстановлении и «темновом» восстановлении цинком

Тимирязев впервые обнаружил способность хлорофилла к восстановлению металлическим цинком с последующей регенерацией пигмента при действии воздуха на восстановленные соединения [31].

Кун и Винтерштейн указали на тождественность хлорофилла *a* до восстановления цинком и после обратной реакции [32]. Однако Ротемунд, Альберс и Кнорр [33] указали на то, что спектр пигмента после регенерации не идентичен спектру исходного хлорофилла.

В нашей лаборатории [34] изучали восстановление хлорфилла и его аналогов в пиридиновом растворе металлическим цинком в присутствии уксусной кислоты; в этих условиях после регенерации происходит замена магния на цинк и образование цинкового комплекса хлорофилла. Среди промежуточных продуктов частично образуется соединение со спектром «красной» фотовосстановленной формы хлорофилла. Евстигнеев и Гаврилова [35] изучали действие количества кислоты на восстановление цинком и нашли, что при некотором минимальном количестве кислоты удается получить продукт восстановления хлорофилла, идентичный по спектру с красной фотовосстановленной формой, из которого регенерируется хлорофилл, а не его цинковый комплекс.

При восстановлении раствора хлорофилла в пиридине амальгамой цинка в вакууме образуются продукты со спектром поглощения, отличным от красной формы; возможно, что в этих условиях частично образуются продукты одноэлектронного восстановления, соответствующие первичной фотовосстановленной форме хлорофилла с неизмеренным пока спектром; после пуска кислорода мгновенно идет обратная реакция с образованием хлорофилла. Восстановление гематопорфирина в этих условиях приводит к образованию продукта, идентичного по спектру «первичной» фотовосстановленной форме.

Таким образом, варьируя условия восстановления хлорофилла цинком, можно получить промежуточные соединения, идентичные продуктам фотовосстановления.

4. Изменения флуоресценции при реакции фотовосстановления

Все изучаемые порфириновые пигменты обладают характерной флуоресценцией, обычно красного цвета — лишь бактериохлорофилл обладает максимумом флуоресценции, лежащим в близкой инфракрасной области (780 $m\mu$).

В начале исследования реакции мы наблюдали, что при фотовосстановлении обратимо падает красная флуоресценция хлорофилла и появляется оранжевое свечение фотовосстановленной формы при 600—630 $m\mu$. Евстигнеев [5] наблюдал при замораживании фотовосстановленного хлорофилла до температуры жидкого азота появление зеленой флуоресценции с максимумами (в толуольном растворе) 525—520 и 550—570 $m\mu$. Гачковский [36] описал появление ряда максимумов флуоресценции при фотовосстановлении хлорофилла и феофитина, в том числе интенсивного максимума при 730 $m\mu$.

В нашей работе с Ерохиным [37] были предприняты систематические исследования спектров флуоресценции при фотовосстановлении пигментов аскорбиновой кислотой в пиридине. У всех исследованных пигментов — хлорофилла *a* и *b*, протохлорофилла, бактериовиридина, соответствующих феофитинов и порфиринов обнаружена флуоресценция фотовосстановленных форм. Лишь в случае первичных фотовосстановленных форм феофитинов мы не смогли наблюдать резко выраженных максимумов флуоресценции при низкой температуре. Мы не смогли также наблюдать максимума флуоресценции фотовосстановленной формы хлорофилла и феофитина при 730 $m\mu$, описанной в работе Гачковского [36]. По-видимому, в этой работе наряду с флуоресценцией регистрировалось рассеивание замороженным объектом возбуждающего света — группы ртутных линий 733 $m\mu$, вероятно, проходящих через примененную в данной работе комбинацию светофильтров.

5. Изменение окислительно-восстановительного потенциала E_0 при фотореакции

Для того чтобы оценить сдвиг E_0 системы после реакции, в нашей работе с Брин [38] был применен метод редокс-индикаторов. В вакуумной трубке, имеющей боковой отвод, проводили фотореакцию хлорофилла с аскорбиновой кислотой, после чего к продуктам фотовосстановления приливали в темноте растворы соединений с различной величиной E_0 и наблюдали за скоростью обратной реакции путем спектрофотометрических измерений.

Если до освещения система хлорофилл — аскорбиновая кислота в пиридине способна восстановить соединения с E_0 до 0,05 V (метиленовой голубой), то после освещения наблюдалось восстановление соединений с E_0 до — 0,35 V (сафранин Т, пиридин-нуклеотиды). Эти данные были подтверждены измерениями потенциала инертного электрода в реагирующей системе. Мы обнаружили резкое изменение потенциала такого электрода при освещении системы хлорофилл — аскорбиновая кислота, подобно опытам Рабиновича [39], для системы тионин — ионы железа.

Евстигнеев и Гаврилова детально исследовали фотопотенциал платинового электрода при освещении реагирующего раствора [40]. В особых опытах было показано, что фотопотенциал определяется не освещением электрода, а образованием фотопродуктов в толще раствора. При понижении температуры наблюдалось повышение величины E_0 за счет уменьшения скорости обратных реакций и увеличения стационарной концентрации фотопродукта. Изменение наблюдалось при —40° (т. е. в условиях, когда не происходило образования «красной» формы хлорофилла); эти наблюдения привели к выводу, что потенциал определяется образованием первичной, быстро обратимо реагирующей «электродноактивной» восстановленной формы пигментов, детально изученной в работах Евстигнеева [13]. Выводы о промежуточном образовании «первичной» восстановленной формы получили подтверждение также в работе Баннистера [10] при исследовании квантового выхода реакции в зависимости от концентрации восстановителя. Величина E_0 при освеще-

нии растворов хлорофилла и его аналогов с аскорбиновой кислотой достигала —0,35 V, что соответствует опытам с применением редокс-индикаторов [38]. Таким образом, «электродно-активная» форма и «красная» восстановленная форма имеют близкие величины E_0.

Гендрих [41] наблюдал изменение фотопотенциала при освещении системы хлорофилл — аскорбиновая кислота и изучал влияние ряда неорганических ионов на этот процесс. Он установил, что ионы Cu^{2+} и Ni^{2+}, которые могут связываться с аскорбиновой кислотой, препятствуют появлению фотопотенциала.

При освещении системы хлорофилл — фенилгидразин в вакууме Евстигнеев и Гаврилова наблюдали повышение электропроводности [42]; при выключении света электропроводность возвращалась к прежнему уровню, что свидетельствует об образовании фотопродуктов, имеющих природу ионов. Сопоставление кинетики фотопроводимости и появления фотопотенциала при разных температурах указывает на то, что именно электродно-активные продукты определяют появление фотопроводимости. Так, при —40° фотопроводимость и фотопотенциал «держатся» после выключения света, тогда как при +20° наблюдается быстрая обратимость эффектов в темноте.

При освещении системы хлорофилл — аскорбиновая кислота в пиридине потенциал платинового электрода после освещения изменяется в отрицательную сторону на 0,3—0,35 V, что свидетельствует об образовании электродно-активных продуктов (фотовосстановленной формы пигментов), отдающих свой электрон электроду в согласии со схемой первичного фотопроцесса: $X + AH_2 \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH_2^+$; $AH_2^+ \rightarrow \cdot AH + H^+$, в сильных основаниях возможна дальнейшая диссоциация: $\cdot AH \rightarrow A^- + H^+$.

При этом возникает вопрос, почему платиновый электрод, заряжаясь отрицательно, воспринимает заряд восстановленной формы пигмента, но не отдает электрон окисленной форме донора водорода.

По-видимому, здесь играют роль следующие обстоятельства: преимущественная адсорбция фотопродуктов определенной природы на платине и условия кинетики вторичных превращений фотопродуктов. Если, например, скорости дисмутации одного из семихинонов пары ($\cdot X^-$ или $\cdot AH_2^+$) выше, чем скорость дисмутации его партнера, то стационарная концентрация медленно дисмутируемого соединения будет выше, что скажется на потенциале электрода. Кроме того, вероятно, что окисленный продукт (монодегидроаскорбиновая кислота) $\cdot AH$ обладает способностью восстановителя — соединения, отдающего электрон электроду с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. Таким образом, возможно, что оба фотопродукта, образуемые при реакции, склонны отдать электрон электроду. Поэтому желательно исследовать электродную активность не только первичной восстановленной формы пигментов, но и образуемого «полуокисленного» соединения.

С этой точки зрения следует сопоставить картину явления в случае восстановителя другой химической природы — ионов двухвалентного железа. В работе автора с Умрихиной [21] изучался фотопотенциал платинового электрода в кислых водных растворах, в системе порфирин — аскорбиновая кислота; в этой системе фотопотенциал изменялся в отрицательную сторону, так же как и в системе хлорофилл — аскорбат в пиридине. Однако в случае применения оксалата железа как донора электрона фотопотенциал изменялся в положительную сторону, так как в этом случае, по-видимому, более электродно-активными были ионы Fe^{3+}, образующиеся при элементарном фотопроцессе: $X + Fe^{2+} \rightleftarrows \rightleftarrows \cdot X^- + Fe^{3+}$. Кинетика изменения фотопотенциала электрода в изучаемых системах нуждается в более детальном изучении.

6. МОЛЕКУЛЫ-ВОССТАНОВИТЕЛИ (ДОНОРЫ ЭЛЕКТРОНА), РЕАГИРУЮЩИЕ С ХЛОРОФИЛЛОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ

Реакция в наиболее отчетливом виде с образованием долгоживущих продуктов наблюдалась в пиридине при применении аскорбиновой кислоты и других диенолов, фенилгидразина, сероводорода, цистеина [1, 2, 3]. Чтобы исследовать быстро обратимое, «скрытое» образование первичных фотопродуктов, нужно было применить методы, позволяющие наблюдать за образованием этих соединений во время периода освещения; более чувствительными были методы измерения фотопотенциала, сенсибилизированной фотополимеризации или сенсибилизированного восстановления необратимо восстанавливающихся акцепторов электрона.

Изменение E_0 в отрицательную сторону при реакции с хлорофиллом обнаружили гидрохинон, пирокатехин, тиозинамин и ряд других соединений [13]. Остер и Холт [43] использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту в ракциях этого типа. Метод полимеризации [44, 45] показал также активность соединения двухвалентного железа. Наблюдавшееся нами сенсибилизированное окисление цитохрома в присутствии хлорофилла [25, 26] указывает на возможность обратимого процесса и в этом случае. Из опытов Ракова и Кенига [9] как будто явствует возможность использования гемохромогенов как доноров электрона. Таким образом, восприятие электрона возбужденной молекулой хлорофилла возможно с участием систем, обладающих E_0 от —0,3 до +0,3 V.

Вероятно, хлорофилл мог бы реагировать с цитохромом *b*, обнаруженным в хлоропластах [46]; величина E_0 цитохрома *b* близка к E_0 аскорбиновой кислоты. Однако до сих пор остается неясной возможность восприятия возбужденной молекулой пигмента электрона от молекулы воды.

Применение дейтерированных доноров. Применение дейтерированной аскорбиновой кислоты приводит к замедлению фотовосстановления хлорофилла, ведущему к образованию «красной» формы [47]; обратная темновая реакция при этом также идет медленнее; реакция Хилла также замедляется при увеличении количества D_2O во воде [47].

При этом D_2O, замедляя образование «красной» формы феофитина, не влияет на скорость образования «первичной» фотовосстановленной формы [48]; при низкой температуре скорость образования первичной формы феофитина одинакова в случае применения дейтерированной и недейтерированной аскорбиновой кислоты [48]. Эти наблюдения являются подтверждением перехода электрона при образовании «первичной» формы и участия протона при образовании более устойчивой «красной» формы.

Реакция с растворителем. Порре и Рабинович [49] впервые наблюдали эффект обратимого выцветания хлорофилла в метаноле. Ливингстон [50, 51, 52] изучал обратимые спектральные изменения растворов хлорофилла методами импульсной спектроскопии и нашел рост поглощения при 525 $m\mu$, что соответствует максимуму фотовосстановленной формы хлорофилла. Линшитц и Реннерт [53] обнаружили обратимые изменения спектра поглощения хлорофилла, освещая его в стеклообразных средах при низкой температуре. Линшитц и Абрагамсон [54], применяя технику импульсной спектроскопии, отметили в растворах хлорофилла в пиридине обратимое понижение максимума поглощения хлорофилла в красной области спектра и появление максимума в зеленой области при 525 $m\mu$, а также некоторое увеличение поглощения при 700 $m\mu$. Авторы отмечают, что в пиридине длительность жизни продукта с поглощением при 525 $m\mu$ больше, чем в других растворителях, и обратимость процесса лучше, чем в очищенном метаноле.

Теренин с сотрудниками[55] наблюдали при помощи импульсной техники обратимое понижение максимума поглощения в растворах фталоцианина магния, а также появление новых максимумов в гематопорфирине[56].

В опытах этого типа раствор подвергался действию чрезвычайно мощного светового импульса длительностью $\sim 10^{-5}$ сек., возникающего при разряде батареи конденсаторов в разрядной трубке (50 джоулей); через 10^{-4}—10^{-5} сек. после действующего импульса через раствор пропускали «регистрирующий» световой импульс другой разрядной трубки.

Мы уже высказывали предположение[57, 58], что наблюдаемые в описанных опытах эффекты объясняются обратимым фотовоссстановлением хлорофилла, при котором молекулы растворителя являются донорами электрона (водорода). Действительно, кислород ингибировал обратимые эффекты в опытах Ливингстона в согласии с быстрой реакцией окислителей с фотовосстановленной формой хлорофилла.

О том, что в опытах с применением импульсной техники наблюдается преимущественно образование фотовосстановленных форм пигмента, по нашему мнению, свидетельствуют недавние опыты Ливингстона и Фужимори[59]. В этих опытах изучалось действие различных соединений на τ-длительность жизни метастабильного возбужденного состояния хлорофилла. Оказалось, что молекулы-окислители сокращают время τ, а восстановители (аскорбиновая кислота) не влияют на длительность τ.

Эти результаты легко понять, допуская, что при действии световых импульсов образуется фотовосстановленная форма хлорофилла; понятно, что эта форма не реагирует с восстановителем (аскорбиновой кислотой), но реагирует с окислителем (хиноном). Действие каротина в этих опытах соответствует влиянию этого соединения на фотовосстановление хлорофилла, наблюдавшееся в наших опытах[29, 60].

Спектр «триплетного» состояния в работах Ливингстона и Линшитца похож на спектр «первичной» фотовосстановленной формы феофитина, измеренной Евстигнеевым, в нем есть также область поглощения, соответствующая красной форме хлорофилла. По-видимому, в этих опытах главным является эффект восприятия электрона возбужденной молекулой пигмента, тогда как возможное образование менее длительного метастабильного состояния накладывается на главный эффект и трудно различимо при использованной технике регистрации (см. также[56]).

7. ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ СРЕДЫ

Отчетливое образование относительно устойчивых фотовосстановленных форм хлорофилла удается наблюдать в пиридине. Мы уже высказывали предположение, что эта устойчивость связана с условиями кислотно-основного равновесия, когда протон находится «между» молекулой пигмента, воспринявшей электрон, и молекулой среды — основания

$$\cdot X^- \cdot\cdot H^+ \cdot\cdot N\langle\!\langle .$$

Образование этих относительно стабильных соединений возможно лишь при соблюдении определенных значений сродства к протону молекулы пигмента и среды — основания. Оптимум основности среды, при котором образуются устойчивые восстановленные формы, отличается у различных пигментов. Следовало ожидать, что в среде более основной, чем пиридин, будет доминировать образование отрицательных ион-радикалов $\cdot X^-$, быстро реагирующих обратно. В более «кислых» средах можно было ожидать образования радикалов $\cdot XH$ при восприятии од-

ного протона и положительно заряженных ион-радикалов $\cdot XH_2^+$ при восприятии двух протонов.

Действительно, если ввести несколько капель сильного основания — пиперидина или аммиака в пиридиновый раствор «красной» формы, происходит быстрая обратная реакция (за счет ионизации восстановленной формы) [20]; в соответствии с этим пиперидин или аммиак, добавленный в пиридиновый раствор хлорофилла, затрудняют образование «красной» формы при фотореакции. Эти опыты нужно вести быстро и лучше при низких температурах, так как даже 1% пиперидина в пиридине ведет к постепенному нарушению циклопентанового кольца молекулы хлорофилла. Если вести реакцию в пиридине, тщательно высушенном гидридом кальция, то образование «красной» формы идет гораздо медленнее, чем в обычном реактивном влажном пиридине, что объясняется недостатком «водородных ионов» в сухом пиридине, нужных для образования «красной формы».

В случае гематопорфирина в сильно основных средах (пиперидин) образуется восстановленная форма с максимумом поглощения при 650 $m\mu$, а в средах менее основных (спиртопиридиновые смеси) — с максимумом 740 $m\mu$. Изменяя основность среды, можно многократно и обратимо изменять положение максимума поглощения восстановленных форм [20].

Таким образом, переход формы «650» в «745» определяется не различными уровнями окисления-восстановления, как предполагалось раньше [19], а условиями кислотно-основного равновесия. Следует указать на то, что при восстановлении пигментов цинком, по Тимирязеву, наблюдается оптимум кислотности при образовании восстановленных форм различных пигментов [35].

Таким образом, в зависимости от основности среды-растворителя в широких пределах изменяются спектральные свойства и реакционная способность фотовосстановленных форм пигментов. Требует более детального изучения влияние основности среды на свойства и поведение «полуокисленных» при реакции молекул-доноров электрона; следует полагать, что монодегидроаскорбиновая кислота также более устойчива в основных средах, находясь там в форме ион-радикала, по-видимому, именно эта форма обнаруживается в опытах измерения электронного парамагнитного резонанса (см. ниже).

8. ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ

Молекулы-окислители (хиноны, нитросоединения) тушат флуоресценцию хлорофилла, но не реагируют с ним фотохимически, тогда как восстановители, реагируя, не оказывают «физически» тушащего действия на флуоресценцию пигмента [61]. Эти наблюдения указывают на возможность участия в реакции именно метастабильных молекул пигмента, находящихся, согласно исходным представлениям Теренина, Дж. Н. Льюиса и Каша, получившим ныне всеобщее распространение, в триплетном или бирадикальном состоянии. Обращение спина электрона при образовании долгоживущего метастабильного уровня определяет длительное существование «дырки» — вакантного электронного уровня, образованного в результате возбуждения молекулы пигмента.

В элементарном акте фотовосстановления происходит восприятие электрона возбужденной молекулой хлорофилла от молекулы донора; при этом должно произойти образование пары ион-радикалов; последующий перенос протона может вести к образованию пары радикалов в неионной форме:

$$X + AH_2 \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH_2^+ \rightleftarrows \cdot XH + \cdot AH.$$

Ури [62] заметил, что хлорофилл в присутствии аскорбиновой кислоты инициирует полимеризацию метилметакрилата.

Детальное исследование [44, 45] инициирования полимеризации системой пигмент — донор водорода в пиридиновых растворах и в водных эмульсиях показало, что полимеризацию инициируют хлорофилл, все его аналоги и производные. Фикобилины в согласии с их неспособностью к фотовосстановлению не оказывали действия на полимеризацию. В качестве доноров электрона наиболее активны диенолы, цистеин, соединения двухвалентного железа. (Кстати, другими методами мы не могли обнаружить взаимодействие Fe^{2+} с хлорофиллом.) Полимеризацию тормозили соединения (сафранин, рибофлавин), активно реагирующие с фотовосстановленными формами пигментов.

В анаэробных условиях полимеризацию, по-видимому, инициирует ион-радикальная восстановленная форма пигмента, а в присутствии кислорода — перекисные радикалы — продукты фотовосстановления кислорода (OH, HO_2). По поводу замечания Розенберга [63] о возможном действии в этих опытах триплетного состояния пигмента следует указать, что активная полимеризация наблюдалась лишь в присутствии молекул-доноров электрона. Линшитц и Вейссман [7] не нашли парамагнитного резонанса у «красной» восстановленной формы хлорофилла и до сих пор не ясно, является ли эта форма радикалом или валентно-насыщенным продуктом дисмутации, XA_2. Более вероятной следует считать вторую возможность. Мы указали [58], что при измерении парамагнитного резонанса во время освещения системы хлорофилл — аскорбиновая кислота будет обнаружен эффект образования ион-радикалов при достаточной чувствительности установки. Действительно, проведенные вскоре после этого измерения [45] показали, что освещение систем хлорофилл — аскорбиновая кислота и феофитин — аскорбиновая кислота в вакууме, непосредственно в резонаторе, конденсированным светом ртутно-кварцевой лампы, приводит к появлению сигнала, мгновенно исчезающего после выключения света. Сигнал имел наибольшую величину при освещении системы феофитин — аскорбиновая кислота, при —40°, т. е. в условиях, благоприятствующих образованию ион-радикальной восстановленной формы. Без восстановителя эффект наблюдать не удалось.

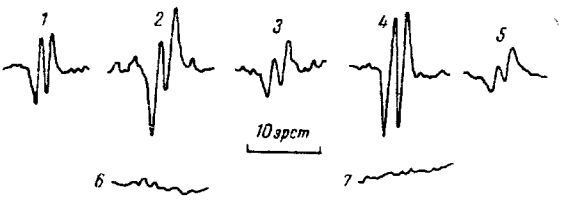


Рис. 3. Спектр электронного парамагнитного резонанса, возникающий во время освещения системы пигмент — аскорбиновая кислота [65]
1 — хлорофилл *а*; *2* — хлорофилл *а* + *в*; *3* — феофитин *а* + *в*; *4* — гематопорфирин; *5* — фталоцианин магния; *6* — аскорбиновая кислота без пигмента; *7* — хлорофилл без аскорбиновой кислоты

Как мы уже упоминали, в элементарном фотопроцессе переноса электрона образуется пара ион-радикалов — радикальная восстановленная форма пигмента ($\cdot X^-$) и радикальная окисленная форма аскорбиновой кислоты ($\cdot AH^+$), которая в сильных основаниях может быть в форме отрицательно заряженного ион-радикала.

Коммонер [64] сообщил на IV международном биохимическом конгрессе, что структура ЭПР сигнала, наблюдаемая при фотовосстановлении хлорофилла аскорбиновой кислотой, соответствует радикальной окисленной форме аскорбиновой кислоты. Эти выводы соответствуют данным, полученным в институтах Химической физики и Биохимии АН СССР [65], где было показано, что структура сигнала ЭПР одинакова при фотовосстановлении аскорбиновой кислотой различных пигментов: хлорофилла, гематопорфирина, феофитина, фталоцианина магния (см. рис. 3). Сигнал ЭПР с такой же структурой наблюдается при освещении аскорбиновой кислоты в пиперидине, дающей окрашенный комплекс с этим сильным основанием. При применении других восстано-

вителей (фенилгидразин) не удается наблюдать ЭПР сигнал, по-видимому, вследствие очень малой фотостационарной концентрации радикальной восстановленной формы хлорофилла.

Таким образом, образуемая при реакции фотовосстановления окисленная форма аскорбиновой кислоты (монодегидроаскорбиновая кислота) обладает большей устойчивостью, не претерпевает в основных средах быстрых вторичных реакций — дисмутации и др. и существует, вероятно, в форме ион-радикала.

Следует отметить, что в этой работе наблюдалось появление ЭПР сигнала с той же структурой, что и при фотовосстановлении хлорофилла при освещении листьев некоторых злаков непосредственно в резонаторе прибора.

9. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ ОБРАТНЫХ РЕАКЦИЯХ ПРОДУКТОВ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА

Стрелер и Арнольд [66] обнаружили в зеленых листьях и хлоропластах весьма слабое красное послесвечение, длящееся в течение нескольких минут после выключения света. Дальнейшие исследования показали, что свечение состоит из ряда составляющих, обладающих различной длительностью. Это слабое свечение удалось обнаружить при помощи счетчика фотонов, приемником служил фотоумножитель, охлаждаемый жидким азотом.

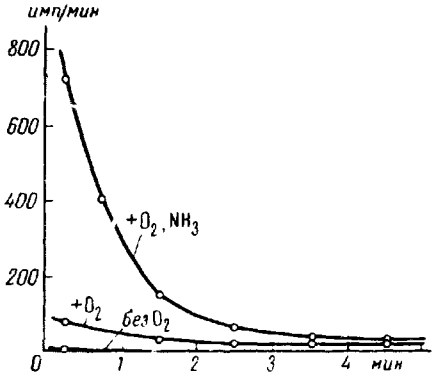


Рис. 4 Хемилюминесценция, возникающая при окислении фотовосстановленной формы хлорофилла (измерения при помощи счетчика фотонов) [69]
без O_2 – – после освещения системы хлорофилл — аскорбиновая кислота без воздуха; $+ O_2$ — пуск воздуха в темноте после реакции фотовосстановления; $+O_2, NH_3$ — пуск воздуха и введение раствора аммиака после фотовосстановления

Для того чтобы судить о природе свечения в листьях, желательно исследовать все типы хемилюминесценции хлорофилла. Так, давно известно красное свечение, возникающее при окислении хлорофилла и его аналогов перекисью тетралина [67, 68].

При помощи счетчика фотонов удалось наблюдать хемилюминесценцию при обратимом окислении фотовосстановленного аскорбиновой кислотой хлорофилла [69]. После освещения пиридинового раствора хлорофилла с аскорбиновой кислотой или фенилгидразином обратная реакция (в темноте) без воздуха сопровождается крайне слабым послесвечением. Введение воздуха увеличивает эффект, ускоряя обратную реакцию. Введение в систему аммиака, чрезвычайно ускоряющего обратную реакцию красной фотовосстановленной формы хлорофилла [20], также приводит к чрезвычайному усилению эффекта свечения [69] (см. рис. 4).

Без восстановителя в данном режиме опытов свечения не наблюдается. Механизм процесса нуждается в изучении; можно высказать предположение, что при темновом взаимодействии восстановленной формы хлорофилла с кислородом происходит образование бирадикала — триплетного состояния, которое за счет запаса тепла системы переходит в синглетное возбужденное состояние, испускающее свечение, подобное по спектру флуоресценции:

$$XH_2 + O_2 \rightarrow XH_2 \cdot O_2 \rightarrow \cdot X \cdot + H_2O_2$$

$$\cdot X \cdot \rightarrow X^* \rightarrow X + h\nu.$$

Возможно также образование возбужденных состояний и при обратных реакциях ион-радикальных фотопродуктов по «обратному пути» фотовосстановления:

$$\cdot XH + \cdot AH \rightarrow X^* + AH_2; \quad X^* \rightarrow X + h\nu$$

Дальнейшие работы должны показать, можно ли приписать длительное свечение в опытах Стрелера и Арнольда окислению хлорофилла или его фотовосстановленной формы.

10. ОБ ОБРАЗОВАНИИ ПРЕДРЕАКЦИОННЫХ АССОЦИАТОВ

Условием осуществления элементарного фотопроцесса является контакт реагирующих молекул; длительность этого контакта может быть различна. Жизнь «активного комплекса» в момент соударения длится очень недолго, однако наряду с этим возможно образование долгоживущих предреакционных ассоциатов, распадающихся после акта электронного переноса.

В нашем случае мыслимы три типа ассоциатов с молекулой-донором водорода, образуемых либо с участием невозбужденной молекулы пигмента, либо с возбужденной молекулой в синглетном состоянии, либо с длительно живущей возбужденной молекулой в триплетном состоянии.

Образование долгоживущих ассоциатов хлорофилла с аскорбиновой кислотой в среде пиридина маловероятно, так как молекулы среды (основания) сами координационно взаимодействуют с центральным атомом магния молекулы хлорофилла [70]. Действительно, введение аскорбиновой кислоты в пиридиновый раствор хлорофилла не изменяет его спектра поглощения. Однако образование ассоциатов с малой длительностью жизни, в которых происходит перенос электрона, является возможным. С другой стороны, Даин с сотрудниками [23] наблюдали изменение спектра поглощения при взаимодействии хлорофилла и ионов металлов, свидетельствующее, по мнению авторов, об образовании долгоживущих комплексов.

Об образовании комплексов с молекулой в синглетном возбужденном состоянии, вероятно, можно было бы судить, измеряя длительность возбужденного состояния (τ) пигмента при введении аскорбата или другого донора водорода; такие опыты, по-видимому, не проводились.

Наконец, подобные опыты можно было бы осуществить с пигментами в триплетном состоянии, высокая химическая активность которых, указанная в работах Теренина [71], делает их склонными к образованию ассоциатов.

Опытами Евстигнеева и Гавриловой [111] показано, что скорость образования первичной фотовосстановленной формы феофитина не зависит от температуры, если вязкость среды сильно не изменяется; если же вязкость увеличивается за счет введения глицерина, то скорость реакции уменьшается. При замерзании раствора реакция не идет; авторы считают, что для течения реакции нужны кинетические соударения и маловероятно существование «в темноте» долгоживущих ассоциатов.

11. МЕХАНИЗМ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ

Используя представления Михаэлиса об «одноэлектронном» механизме окислительно-восстановительных реакций, мы предложили [1] схему процесса, состоящую из следующих стадий:

1. Восприятие электрона возбужденной (вероятно, метастабильной бирадикальной) молекулой пигмента (X) от молекулы-донора водорода (AH_2) с образованием пары ион-радикалов. Мы указали на вероятность восприятия электрона системой сопряженных по кругу двойных связей молекулы пигмента (см. схему на стр. 750).

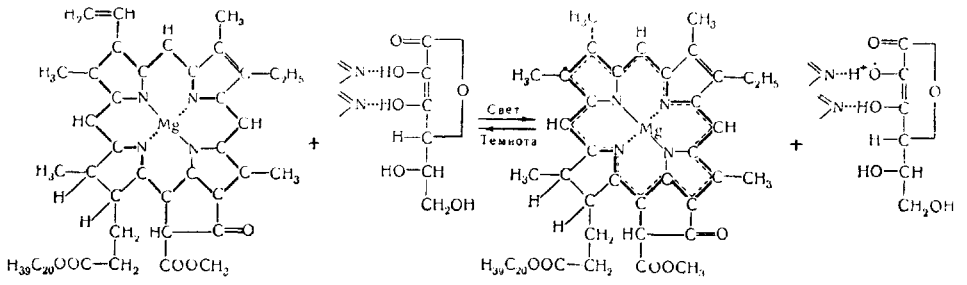


Рис. 5. Схема фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой. Жирной линией показан один из возможных путей сопряжения по кругу системы двойных связей молекулы хлорофилла.
Пунктиром показано восприятие электрона системой сопряженных связей возбужденной молекулы хлорофилла; $\geqslant N$ молекулы среды-основания, связанные водородной связью с реагирующими соединениями

$$X + AH_2 \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH_2^+; \quad \cdot AH_2^+ \rightleftarrows \cdot AH + H^+.$$

Перенос протона, связанного с молекулами среды-основания, с образованием пары радикалов и последующим образованием валентнонасыщенных соединений:

$$\cdot X^- + \cdot AH_2^+ \rightarrow \cdot XH + \cdot AH \rightarrow XH_2 + A.$$

Экспериментальный материал подтвердил в основных чертах эту схему процесса.

Приведем сводку основных опытных данных (описанных в предыдущих разделах обзора), подтверждающих указанный механизм реакции.

Опытные данные	Следствие
1. Способностью к обратимому фотовосстановлению обладают все пигменты со структурой порфина, хлорина, бактериохлорина, азапорфина, независимо от природы боковых групп (с H, Mg или Zn в центре молекулы).	Для реакции существенно наличие в молекуле пигмента сопряженной по кругу системы двойных связей, связывающей четыре пирольных кольца.
2. Основность среды, в которой идет реакция, сильно влияет на спектральные свойства и реакционноспособность продуктов фотовосстановления.	Различные типы продуктов фотовосстановления связаны условиями кислотно-основного равновесия (перемещение протона).
3. При освещении системы пигмент—донор водорода потенциал инертного электрода изменяется в отрицательную сторону и увеличивается электропроводность системы.	Образуются продукты, имеющие природу ионов и активные фотопродукты, отдающие электрон электроду.
4. Освещение при низкой температуре тормозит образование устойчивых продуктов фотовосстановления; в этих условиях происходит быстро обратимый первичный процесс, сопровождающийся эффектами, указанными выше (в п. 3).	Реакция включает световую стадию переноса электрона в темновую стадию.
5. В случае применения дейтерироводных доноров водорода тормозится темновая стадия реакции.	Темновая стадия связана с переносом протона.
6. Система пигмент—донор водорода при освещении инициирует фотополимеризацию метилметакрилата. При освещении системы пигмент—донор водорода наблюдается появление спектра электронного парамагнитного резонанса, исчезающего после выключения света.	При реакции образуются фотопродукты, имеющие природу свободных радикалов (ион-радикалов).

Таким образом, в условиях, когда заторможены темновые стадии реакции, связанные с переносом протона (водорода), наблюдается «в чистом виде» перенос электрона. В средах различной основности устанавливается различное протолитическое равновесие. Зависимость

спектральных свойств фотопродуктов от характера среды особенно отчетливо наблюдается для порфиринов, у которых возможны различные ступени кислотно-основного равновесия, связанные с наличием в их молекуле кислых (карбоксил) и основных (пиррольный азот) группировок. Число протонов, присоединенных к молекуле, и число перенесенных электронов в общем случае не одинаково и фотопродукты могут иметь природу катионов и анионов, что видно из резких отличий в свойствах фотовосстановленных форм гематопорфирина в различных средах — от сильных оснований (пиперидин) до сильных кислот (водный раствор серной кислоты).

Дальнейшие исследования структуры полос парамагнитного резонанса фотопродуктов позволят, вероятно, решить вопрос о локализации электрона и протона в молекуле пигмента.

II. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ, ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ

При освещении красным светом системы хлорофилл — донор электрона — акцептор электрона наблюдается сенсибилизированное восстановление молекул-акцепторов электрона за счет квантов света, поглощаемых хлорофиллом [72]. Этой способностью обладают все изученные аналоги хлорофилла (в том числе фталоцианин магния), способные к реакции фотовосстановления. В случае бактериохлорофилла и бактериофеофитина реакции возбуждаются светом близкой инфракрасной области спектра [73, 74].

За ходом реакции удобно следить путем спектрофотометрических измерений в вакуумных трубках Тунберга, наблюдая за изменением оптической плотности в максимумах поглощения акцепторов или за появлением новых максимумов восстановленных соединений.

Используя аскорбиновую кислоту ($E_0 = +0{,}5$ V) в качестве донора электрона, мы наблюдали фотовосстановление рибофлавина ($E_0 = -0{,}22$ V), сафранина Т ($E_0 = -0{,}3$ V), пиридиннуклеотидов ($E_0 = -0{,}32$ V). При выключении света эти реакции идут обратно с разной скоростью, иногда требуя введения кислорода для регенерации красителя из лейкоформы.

При этих реакциях происходит «запасание» энергии света — увеличение свободной энергии системы, характеризуемое величиной ΔE_0 донора ($E_0 = +0{,}05$ V) и акцептора ($E_0 = -0{,}32$ V) электрона, которое можно грубо оценить: $\Delta F = 2 \cdot 23{,}06 \cdot 0{,}4 = 18{,}4$ *ккал*.

Сравнительную замедленность обратных реакций в исследованных нами процессах следует объяснить быстро идущей дисмутацией первично образуемых семихинонов до лейкосоединений; при освещении скорость дисмутации выше скорости обратных реакций первичных фотопродуктов.

В водной среде нам удалось наблюдать сенсибилизированное хлорофиллом окисление-восстановление цитохрома С [25, 26]. При этой реакции донорами электрона могли служить белки (вода?). Фотоокисление восстановленного цитохрома мы вели в присутствии кислорода воздуха.

В случае применения азокрасителей в качестве акцепторов электрона происходит их необратимое восстановление; уже давно в реакциях этого типа применяли азокраситель метиловый красный [75, 76]. В этом случае, однако, восстановление метилового красного аскорбиновой кислотой и фенилгидразином происходит медленно и в темноте, но свет чрезвычайно сильно ускоряет течение этой реакции.

В ряде сенсибилизированных реакций, идущих в аэробных условиях, кислород является конечным акцептором электрона. Сенсибилизированное хлорофиллом окисление ряда органических соединений известно давно, но доныне не было единого мнения о механизме этого процесса. При помощи манометрического метода Варбурга [77, 78] наблюдалось

фотоокисление ряда доноров водорода, способных к фотовосстановлению хлорофилла и феофитина. Вероятно, и в этом случае темновая стадия реакции сводится к регенерации хлорофилла из промежуточной фотовосстановленной формы за счет ее окисления кислородом. Альтернативный механизм первичного фотообразования перекиси хлорофилла с темновым актом восстановления этой перекиси донором водорода менее вероятен, хотя нами были обнаружены лабильные продукты фотоокисления хлорофилла и бактериохлорофилла, медленно взаимодействующие с аскорбиновой кислотой с регенерацией пигмента [17, 79, 80]. Реакция фотовосстановления хлорофилла донором водорода идет гораздо быстрее, чем фотореакция с кислородом.

О том, что изученные сенсибилизированные реакции идут через стадию обратимого фотовосстановления пигмента-сенсибилизатора, говорят следующие факты:

1. Сенсибилизированное восстановление наблюдается в системе, содержащей доноры водорода, способные участвовать в реакции фотовосстановления хлорофилла.

2. В тройной системе, содержащей донор электрона, пигмент и акцептор электрона, не удается наблюдать накопления фотовосстановленных форм пигментов вследствие их быстрой реакции с молекулами-акцепторами электрона; лишь после того, как весь акцептор будет «сенсибилизированно» восстановлен, начинается образование фотовосстановленной формы пигмента-сенсибилизатора. Это проявляется в форме индукционного периода сенсибилизированных реакций (см., например, [21]).

3. Наконец, удается раздельно осуществить фотостадию реакции (образование фотовосстановленных форм пигмента) и их взаимодействия в темноте с молекулами-акцепторами электрона. В случае хлорофилла это иллюстрируется опытами с «красной» фотовосстановленной формой [38], однако «первичные» фотовосстановленные формы реагируют с акцепторами гораздо быстрее, что было показано в опытах Евстигнеева [13]. Весьма показательно действие акцепторов на фотопотенциал электрода в системе хлорофилл — аскорбиновая кислота [28] и «тушащее» действие этих соединений на фотопроводимость системы хлорофилл — аскорбиновая кислота [81] вследствие их быстрой реакции с фотовосстановленной формой хлорофилла.

Таким образом, имеющийся экспериментальный материал приводит к выводу, что сенсибилизированные реакции идут через стадию обратимого фотовосстановления хлорофилла и его аналогов. Этот механизм сенсибилизации, установленный в экспериментах с хлорофиллом, сходен со схемой Вейсса [82], предложенной им более 20 лет назад для красителей-сенсибилизаторов, способных к образованию лейкосоединений.

В работах нашей лаборатории детально исследовано участие фотовосстановленных форм пигментов при сенсибилизированных реакциях, однако требует более глубокого изучения участие в этих реакциях «полуокисленных» форм молекул-доноров электрона, типа монодегидроаскорбиновой кислоты, стационарная концентрация которой достаточно высока, о чем свидетельствуют измерения электронного парамагнитного резонанса.

Эти «полуокисленные» соединения, по-видимому, способные не только к обратным реакциям с восстановленными формами пигмента, но и способны окисляться дальше (до дегидроаскорбиновой кислоты), передавая свой водород акцептору — молекуле кислорода, метилового красного и т. д. Неясны, однако, пределы восстановительной способности этих соединений — вряд ли они могут восстанавливать системы со столь высоким потенциалом, как сафранин и пиридиннуклеотиды.

Итак, механизм сенсибилизированной хлорофиллом или его аналогами реакции переноса водорода от молекулы AH_2 к молекуле B может

быть выражен следующей схемой:

1. Фотовоссановление:

$$X + AH_2 \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH_2^+ \rightleftarrows \cdot XH + \cdot AH.$$

2. Темновые стадии реакции с акцептором водорода (электрона) B; регенерация хлорофилла из фотовосстановленных форм:

$$\cdot X^- + B \rightarrow X + \cdot B^-; \quad \cdot B^- + H^+ \rightarrow \cdot BH.$$

$$\cdot XH + B \rightarrow X + \cdot BH; \text{ возможно и } \cdot AH + B \rightarrow A + \cdot BH.$$

3. Дисмутация семихинонных форм:

$$2 \cdot BH \rightarrow B + BH_2.$$

Суммарный процесс:

$$AH_2 + B + (X) \rightarrow A + BH_2 + (X).$$

Если в растворах такой механизм реакции доказывается прямыми опытами, то в случае гетерогенной сенсибилизации на кристаллах пигментов и в коллоидных растворах весьма трудно разделить отдельные стадии реакции, протекающей на фазовой границе. Можно думать, что и здесь сохраняются элементарные акты перехода электрона от акцептора к молекуле пигмента («дырке») на фазовой границе и компенсирующий акт отдачи электрона молекуле-акцептору. На возможность такого механизма мы указывали при изучении фотокаталитического действия гетерогенных сенсибилизаторов [83, 84]. На эту возможность указывают опыты Евстигнеева и Теренина по измерению фотопотенциалов твердых пленок пигментов в водных средах [85].

III. ФОТОРЕАКЦИИ КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ ХЛОРОФИЛЛА

Выше описаны реакции молекулы хлорофилла в органических растворителях; рассмотрим теперь свойства хлорофилла в агрегированных формах — водных коллоидных растворах.

Давно известно, что такие коллоиды образуются при вливании растворов хлорофилла (в спирте, ацетоне, диоксане, пиридине) в избыток воды или буферного раствора. Мы нашли, что коллоидные растворы хлорофилла получаются также при прямом растворении в воде хроматографической зоны хлорофилла, адсорбированного на сахаре. Положение максимума поглощения и величина частиц зависят от вида растворителя и от pH водной среды; показано [86], что при pH 4—5 образуются более крупные частицы с максимумом поглощения 690 $m\mu$, а при pH 8—9 весьма устойчивые коллоиды с максимумом при 670—672 $m\mu$. В отличие от этих систем мы нашли, что коллоиды, полученные при вливании растворов хлорофилла в водные растворы детергентов (анионоидных, катионоидных и нейтральных), обладали яркой флуоресценцией, максимумом поглощения при 669—670 $m\mu$ и фотохимическими свойствами, сходными с хлорофиллом в растворе [77, 87]. Это, вероятно, определяется тем, что молекулы пигмента расположены в виде монослоя на мицелле детергента, т. е. находятся в дезагрегированной форме.

Водные коллоиды хлорофилла обладают фотосенсибилизирующим действием, наиболее заметным в том случае, если конечный акцептор электрона восстанавливается необратимо, что имеет место в случае кислорода и азокрасителей (метилового красного). В некоторых опытах наблюдалась полимеризация акриламида при освещении красным светом водных коллоидных растворов хлорофилла в вакууме.

В отличие от сравнительно слабой активности этих систем коллоиды, полученные при помощи детергентов, обладают сильным сенсибилизирующим действием, не меньшим, чем у хлорофилла в растворах

Трудно сомневаться в том, что здесь сохраняется тот же элементарный механизм процесса, что и в растворах. Фотосенсибилизирующее действие коагулированных коллоидов хлорофилла изучалось в недавних работах нашей лаборатории [88].

IV. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА В ГРАНУЛАХ ХЛОРОПЛАСТОВ

Свойства хлорофилла в гранулах мы изучали в вязких водноглицериновых средах, допускающих точные спектрофотометрические измерения вследствие прозрачности этих сред и их устойчивости в «коллоидном» смысле. Такие системы допускают работу и при низких температурах.

В таких «зеленых растворах» из листьев сахарной свеклы в присутствии аскорбата удалось наблюдать при освещении малые обратимые изменения оптической плотности (до 3%) в красном максимуме поглощения хлорофилла, что следует приписать обратимому фотовосстановлению; при этом наблюдались также изменения фотопотенциала инертного электрода в отрицательную сторону. На спектрофотометре Бекмана мы не могли обнаружить отчетливых изменений оптической плотности при 520 $m\mu$. Без аскорбата наблюдаются меньшие по величине эффекты. В гомогенатах зеленых листьев такие обратимые фотохимические изменения следует приписать «мономерной» форме хлорофилла близкой по свойствам хлорофиллу в растворе [86, 89, 90].

Хорошо известно, что в «окислительной» среде гомогенаты листьев способны к реакции Хилла — выделению кислорода, сопряженному с восстановлением окислителей — Fe^{3+}, хинонов и т. д. В «восстановительной» среде в присутствии аскорбата натрия, гомогенаты листьев способны к обратимому фотосенсибилизированному восстановлению сафранина и других соединений, а также к необратимому восстановлению кислорода и метилового красного [91].

Листья растений, обладающие большим количеством быстровыцветающей мономерной формы, более активны в реакциях этого типа; например, листья сахарной свеклы активнее листьев фасоли.

До сих пор не ясно, какова биологическая роль различных форм хлорофилла и каков способ их участия в реакциях фотосинтеза. Подсчеты показывают, что для переноса одного электрона от воды к углекислоте требуется около двух квантов красного света, что, возможно, требует двух типов фотохимических реакций с резервом промежуточных соединений между ними. Возможно, что разные типы реакций связаны с разными формами хлорофилла. Во всяком случае, способность молекулы хлорофилла к восприятию электрона при освещении сохраняется у «коллектива» молекул в агрегированных формах. Миграция энергии между молекулами пигмента в таких агрегатах (в гранулах пластид), вероятно, может происходить в виде «дырки» и неспаренного электрона и на уровне триплетного состояния, например, по механизму, предложенному в работах Теренина и Ермолаева [92, 93].

V. ОБРАТИМЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЖИВЫХ ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

Быстро идущие обратимые превращения хлорофилла при фотохимических реакциях в живых листьях требуют особых методов регистрации. В настоящее время для этого используется техника дифференциальной и импульсной спектрофотометрии, измерения флуоресценции и электронного парамагнитного резонанса.

В опытах Колемана, Холта и Рабиновича [94] удалось наблюдать обратимые изменения в красном максимуме поглощения хлорофилла в суспензии хлореллы и одновременно в области 520 $m\mu$, которые можно

приписать обратимому фотовосстановлению. В последующей работе Коулеман и Рабинович [95] указывают на сходство дифференциальных спектров после освещения суспензии Chlorella и после фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой; приводятся доводы, указывающие на возможность обратимого фотовосстановления хлорофилла в живых организмах. Однако требует объяснения тот факт, что при фотовосстановлении хлорофилла отношение падения оптической плотности в красном максимуме поглощения ($\Delta D_{670\ m\mu}$) к росту плотности в максимуме фотовосстановленной формы ($\Delta D_{520\ m\mu}$) составляет величину 2—3, тогда как в клетках хлореллы это отношение едва достигает единицы. В опытах Витта [96], сделанных при помощи импульсной техники, падению оптимальной плотности в красном максимуме поглощения соответствовали обратимое падение красной флуоресценции хлорофилла и появление максимума при 520 $m\mu$.

Появление этого максимума после освещения живых листьев было впервые обнаружено Дюсенсом [97] и далее изучалось в работах Витта [96], Белла [98] и других авторов. Удивительно соответствие этого максимума поглощению «красной» фотовосстановленной формы хлорофилла.

Опыты Осиповой и Тимофеевой [99] показали высокое содержание основных аминокислот в белках гранул; основываясь на этих данных, Раков и Кениг [9] указали на возможность наблюдения фотовосстановленной формы хлорофилла в опытах Витта. Однако не ясно — сохраняется ли в этих опытах соотношение величины падения оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла и максимуме при 520 $m\mu$, наблюдающемся при фотовосстановлении. Понятно, что условия кислотно-основного равновесия в хлоропластах могут сильно отличаться от условий в пиридиновых растворах и обратимое фотовосстановление хлорофилла может идти и без накопления «красной» формы [91].

Если природу появления максимума поглощения при 515—520 $m\mu$ в листьях пока нельзя считать ясной, то весьма вероятно, что обратимое изменение красного максимума поглощения хлорофилла можно приписать фотовосстановлению.

Вероятно, для выяснения сущности превращения хлорофилла в листьях многое даст использование методов флуоресцентной спектроскопии. Измерения Литвина [100] показали наличие в живых зеленых листьях максимумов флуоресценции, лежащих в области фотовосстановленных форм хлорофилла, однако сейчас еще трудно дать их определенную интерпретацию.

Требуется также выяснить, связано ли с явлением элементарного фотовосстановления хлорофилла появление полос парамагнитного резонанса, наблюдавшееся в опытах Коммонера [101], а затем Кальвина с сотрудниками [102].

Явление хемосинтетической люминесценции, наблюдавшееся в листьях растений, суспензиях хлоропластов и в растворах хлорофилла, указывает на возможность образования сходных фотопродуктов во всех этих случаях.

VI. РЕАКЦИЯ ОБРАТИМОГО ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ И ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Изложенный выше материал показывает, что для хлорофилла и вообще всех порфириновых пигментов чрезвычайно характерна способность к обратимому фотохимическому восстановлению — обратимому восприятию электрона (водорода) от молекул-доноров. Мы уже высказывали предположение, что это свойство может играть роль при осуществлении элементарных процессов участия хлорофилла и его аналогов в реакциях фотосинтеза и при других фотобиологических явлениях.

1. ФОТОСИНТЕЗ (см. обзор [112])

В изложенных выше работах удалось установить, что фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в реакциях фотохимического переноса водорода (электрона) определяется его способностью к обратимому фотовосстановлению.

В световом акте реакции возбужденная молекула пигмента воспринимает электрон (водород) молекулы-донора, в темновом акте — передает его молекуле-акцептору. Эти работы дают возможность обосновать рабочую гипотезу, что и при фотосинтезе хлорофилл участвует в процессе обратимого переноса электрона (с его подъемом выше уровня восстановленных пиридиннуклеотидов), что согласуется с рядом исследований, показавших возможность фотовосстановления пиридиннуклеотидов в суспензиях хлоропластов и в листьях растений [103–105].

Представление об участии хлорофилла в процессе переноса электрона с промежуточным образованием свободных радикалов согласуется с результатами измерений электронного парамагнитного резонанса в хлоропластах и в листьях растений [101, 102] и наблюдениями о наличии весьма слабого длительного послесвечения (хемилюминесценции) после освещения листьев растений [66].

Накопившийся ныне экспериментальный материал указывает, что для работы цикла энзиматических реакций восстановления углекислоты следует обеспечить фотохимическое образование восстановленных пиридиннуклеотидов и богатых энергией фосфорных эфиров.

Фотохимический перенос электрона (водорода) «вверх» до уровня восстановленных пиридиннуклеотидов обеспечивает возможность действия цикла ассимиляции углекислоты согласно схеме Кальвина [106]. Образование богатых энергией фосфорных эфиров, нужных для функционирования цикла восстановления углекислоты, происходит в согласии с работами Арнона [107] путем анаэробного фотосинтетического фосфорилирования, при котором образование аденозинтрифосфата из аденозиндифостата и неорганического фосфата происходит за счет окислительно-восстановительных процессов — темновых реакций, активных фотопродуктов, идущих с участием биокаталитических систем — цитохромов, производных нафтохинона (витамина К) и др. Таким образом, спуск «вниз» фотохимически мобилизованного электрона обеспечит возможность осуществления фосфорилирования и «запасания» энергии в аденозинтрифосфате.

2. ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОРФИРИНОВ

В основе этого явления лежит фотосенсибилизированное красителем фотоокисление жизненно-важных метаболитов или белков, приводящее к гемолизу эритроцитов и ряду далеко идущих нарушений нормальных функций организмов [108]. До сих пор нельзя считать ясным механизм первичного фотохимического процесса, лежащего в основе фотодинамического действия. Изложенные здесь исследования механизма фотосенсибилизирующего действия порфиринов позволяют обосновать гипотезу об элементарном фотовосстановлении пигмента в качестве первичного акта в этом процессе. Так, в наших работах была установлена способность порфиринов к обратимому фотовосстановлению диенолами, цистеином, рядом других органических соединений.

Окисление фотовосстановленных форм порфиринов кислородом или другими окислителями приводит к обратной регенерации исходной молекулы пигмента. В этом процессе, так же как и в случае хлорофилла, наиболее активны ион-радикальные формы пигментов. Можно предположить, что механизм элементарных процессов фотодинамического действия соответствует схеме фотосенсибилизированных порфиринами реак

ций, приведенной выше (см. стр. 753); AH_2 соответствует молекуле окисляющегося метаболита (аминокислоте в белках и т. д.), X — молекуле пигмента-порфирина.

3. ДРУГИЕ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Изучение спектров действия различных фотобиологических процессов — фотопериодизма, прорастания семян под действием света и т. д. в работах Бортвика, Гендрикса и сотрудников [109] привело к обнаружению максимума спектра действия при 650 $m\mu$; эффект красного света устранялся последующим освещением с максимумом спектра действия при 740 $m\mu$.

Эти наблюдения привели авторов к гипотезе о наличии пигментной системы, претерпевающей обратимые фотохимические превращения с образованием фотопродуктов, обладающих взаимосвязанными максимумами поглощения при 650 и 740 $m\mu$.

Такого рода переходов пигментов пока не удалось найти в растениях. Мы уже указывали выше, что удалось наблюдать обратимое фотовосстановление порфиринов, ведущее к образованию фотопродуктов с максимумом поглощения 740 $m\mu$; существенно то, что освещение инфракрасным светом ускоряло обратную реакцию этих фотопродуктов [110].

Возможно, что обратимое образование продуктов фотовосстановления порфириновых пигментов может играть роль и в ряде фотобиологических процессов такого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хлорофилл, его аналоги и производные обладают способностью к реакции обратимого фотохимического восстановления. При реакции образуются фотопродукты, запасающие энергию света; в темновом акте процесса эти фотопродукты претерпевают обратные реакции, ведущие к образованию исходной молекулы пигмента. Способность хлорофилла и его аналогов к обратимому фотовосстановлению лежит в основе фотосенсибилизирующего действия этих пигментов в окислительно-восстановительных реакциях.

Полученные экспериментальные данные дают основание для рабочей гипотезы, что способность хлорофилла и его аналогов к реакциям фотохимического переноса электрона (водорода) может быть связана с участием этих пигментов в фотобиологических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948).
2. А. А. Красновский, ЖФХ, **30**, 968 (1956); J. Chim. Phys., **1958**, 968.
3. А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН **69**, 393 (1949).
4. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953).
5. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **91**, 899 (1953).
6. E. Rabinowitch, Photosynthesis, vol. II. part 2, 1519, Interscience, N. Y., 1956.
7. H. Linshitz, S. J. Weissman, Arch. Biochem. Biophys., 67, 491 (1957).
8. V. H. Lynch, C. S. French, Carnegie Inst. Year Book, **54**, 166 (1954—1955).
9. B. Rackow, H. König. Ztschr. Electrochem., **62**, 482 (1958).
10. T. T. Bannister, Dissc. Abstr., **49**, № 10, 2438 (1959).
11. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950).
12. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **96**, 1201 (1954).
13. В. Б. Евстигнеев, ЖФХ, **32**, 969 (1958).
14. A. S. Holt. в книге Research in Photosynthesis, Interscience, N. Y., 1957, стр. 55.
15. А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **64**, 663 (1949).
16. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **118**, 1146 (1958).
17. А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951).
18. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **127**, 913 (1959).
19. А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **96**, 1209 (1954).
20. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **120**, 581 (1958).
21. А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **122**, 1061 (1958).

22. Н. В. Вострилова, В. И. Дулова, ДАН, УзССР (1958), № 5, 19.
23. М. С. Ашкинази, Б. Я. Даин, ДАН, **80**, 385 (1951); **102**, 767 (1955).
24. Б. Я. Даин, Тезисы докладов II Всесоюзн. конфер. по фотосинтезу, Изд. МГУ, М., 1957.
25. А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, **1**, 120 (1956).
26. А. А. Красновский, ДАН, **103**, 283 (1955).
27. А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951).
28. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **98**, 1017 (1954).
29. А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. В. Пакшина, Биохимия, **25**, № 2 (1960).
30. А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин, В. А. Гаврилова, ДАН, **82**, 947 (1952).
31. К. А. Тимирязев, Nature, **32**, 342 (1885); **34**, 52 (1886).
32. R. Kuhn, A. Winterstein, Ber., **66**, 1741 (1933).
33. P. Rothemund, Cold Springs Harb. Symp. Quant. Biol., **3**, 71 (1935).
34. Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, ДАН, **74**, 103 (1950).
35. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **108**, 507 (1956).
36. В. Ф. Гачковский, Биофизика, **4**, 19 (1959).
37. А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Биофизика, 1960, в печати.
38. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950).
39. E. Rabinowitch, J. Chem. Phys., **8**, 551, 560 (1940).
40. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилов, ДАН, **92**, 381 (1953).
41. W. Hendrich, Roczni chemi, **32**, 107 (1958).
42. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **103**, 97 (1955).
43. G. Oster, в книге Research in Photosynthesis, Interscience, N. Y., 1955.
44. А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **104**, 882 (1955).
45. А. А. Красновский, А. В. Умрихина, Биофизика, **3**, 547 (1958).
46. R. Hill, Nature, **174**, 501 (1954).
47. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **96**, 1025 (1954).
48. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **115**, 530 (1957).
49. D. Porret, E. Rabinowitch, Nature, **140**, 321 (1937).
50. R. Livingston, J. Phys. Chem., **45**, 312 (1941); **52**, 622 (1948).
51. R. Livingston, V. Ryan, J. Am. Chem. Soc., **75**, 2176 (1953).
52. R. Livingston, в книге Research in Photosynthesis, Interscience, N. Y., 1957, стр. 3.
53. H. Linshitz, J. Rennert, Nature, **169**, 193 (1952).
54. H. Linshitz, T. W. Abrahamson, в книге Research in Photosynthesis, N. Y. Interscience, 1957, стр. 31.
55. А. Н. Теренин, А. В. Карякин, Е. Б. Любомудров, П. Э. Сушинский, Е. Д. Дмитриевский, Оптика и спектроскопия, **1**, 456 (1956).
56. А. Н. Теренин, General Discussion of Faraday Soc., April, 1959.
57. А. А. Красновский, в сб. Вопросы химической кинетики, Изд. АН СССР, 1955, стр. 92.
58. А. А. Красновский, J. Chim. Phys., **1958**, 968.
59. E. Fujimori, R. Livingston, Nature, **180**, 1036 (1957).
60. А. А. Красновский, Биофизика, **4**, 3 (1959).
61. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, **74**, 315 (1950).
62. N. Uri, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5808 (1952).
63. J. L. Rosenberg, Ann. Rev. Plant Physiol., **8**, 115 (1957).
64. B. Commoner, Персональное сообщение на IV Международном биохимическом конгрессе, Вена, 1958.
65. Н. Бубнов, А. Красновский, А. Умрихина, В. Цепалов, В. Шляпинтох, Биофизика, **5**, 121 (1960).
66. B. L. Strehler, W. A. Arnold, J. Gen. Physiol., **34**, 809 (1951).
67. P. Rothemund, J. Am. Chem. Soc., **60**, 2005 (1938).
68. J. Helberger, Naturwiss., **26**, 316 (1938).
69. Ф. Ф. Литвин, Ю. А. Владимиров, А. А. Красновский, Усп. физ. наук, **74**, № 1 (1960).
70. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, **70**, 261 (1950).
71. А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947.
72. А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948).
73. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949).
74. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952).
75. J. Bohi, Helv. Chim. Acta, **12**, 121 (1929).
76. J. C. Ghosh, S. B. Sen-Gupta, J. Indian Chem. Soc., **11**, 65 (1934).
77. Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **22**, 776 (1957).
78. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947).
79. А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947).
80. А. А. Красновский, ДАН, **58**, 836 (1947).
81. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **127**, 198 (1958).

82. J. Weiss, Trans. Faraday Soc., **32**, 1331 (1936).
83. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946).
84. А. А. Красновский, Проблемы кинетики и катализа, Изд. АН СССР, Москва, **8**, 40 (1955).
85. В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин, ДАН, **81**, 223 (1951).
86. Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **21**, 126 (1956).
87. А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **63**, 163 (1948).
88. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **126**, 410 (1956).
89. А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина, Физиология растений, **4**, 124 (1957).
90. А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина, Физиология растений, **4**, 124 (1957).
91. Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **23**, 760 (1958).
92. А. Н. Теренин, В. Л. Ермолаев, ДАН, **85**, 547 (1952).
93. A. N. Terenin, V. L. Ermolaev, Trans. Faraday Soc., **52**, 1042 (1956).
94. J. W. Coleman, A. S. Holt, E. Rabinowitch, Science, **123**, 795 (1956).
95. J. W. Coleman, E. Rabinowitch, J. Phys. Chem., **63**, 30 (1959).
96. H. T. Witt, Naturwiss., **42**, 72 (1955).
97. L. M. Duysens, Science, **120**, 353 (1954).
98. Л. Н. Белл, ДАН, **107**, 329 (1956).
99. О. П. Осипова, И. Тимофеева, ДАН, **74**, 972 (1950).
100. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **120**, 764 (1958).
101. B. Commoner и другие, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **42**, 710 (1956).
102. B. Sogo, N. Pon, M. Calvin, там же, **43**, 387 (1957).
103. W. Vishniac, S. Ochoa, Nature, **167**, 768 (1951).
104. L. Tolmach, Arch. Biochem., **33**, 120 (1951).
105. D. J. Arnon, Nature, **167**, 1008 (1951).
106. M. Calvin. Conferences et rapports. 3-éme Congres Intern. de Biochemie, Liege, 1956, стр. 211.
107. D. Arnon, Science, **122**, 9 (1955).
108. H. Blum, Photodynamic action and diseases caused by light, 1940.
109. H. A. Bortwick, S. B. Hendricks и другие, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **38**, 662 (1952).
110. А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **112**, 911 (1957).
111. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **114**, 1066 (1957).
112. А. А. Красновский, Первичные процессы фотосинтеза, Ann. Rev. Plant Physiology, **11** (1960).

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ГОМОГЕНАТАХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и *М. И. БЫСТРОВА*

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

Обширный экспериментальный материал указывает на то, что протохлорофилл, образующийся в этиолированном растении, является непосредственным предшественником хлорофилла. Однако детальные исследования образования хлорофилла в живых, неповрежденных листьях, осуществленные в последнее время при помощи методов абсорбционной спектроскопии [1] и флуоресцентной спектрофотометрии в сочетании с глубоким охлаждением живых листьев [2], позволили установить, что процесс превращения протохлорофилла в хлорофилл в живом листе протекает через ряд промежуточных стадий.

Наряду с этим было показано, что протохлорофилл и свежеобразованный хлорофилл существуют в формах, отличающихся наличием «фитольного хвоста» [3—6]. Этерификация фитолом может осуществляться после стадии восстановления пигмента-предшественника. Но, как мы увидим из последующего изложения, пока не установлено соответствие между разными формами пигментов, обнаруженными спектральными методами, и химически различными промежуточными формами.

В первой фотохимической стадии образования хлорофилла участвует чрезвычайно лабильная и фотохимически активная форма протохлорофилла, обладающая максимумом поглощения в естественном состоянии связи в области 650 *ммк* [1] и флуоресценции при 655 *ммк* [2]. Обнаружение этой формы пигмента, существующей в живом этиолированном листе с ненарушенной нативной структурой, объяснило ранее непонятный сдвиг максимума «спектра действия» образования хлорофилла в длинноволновую сторону (650 *ммк*) [7; 8] по сравнению с положением максимума поглощения протохлорофилла в растворе (625—630 *ммк*). Эта активная форма протохлорофилла напоминает «хлорофиллоген» в работах Любименко [9].

Уже в первые минуты действия света на этиолированный лист активная форма протохлорофилла исчезает, давая начало новой промежуточной форме хлорофилла с максимумом поглощения при 684 *ммк* [1] и флуоресценции при 690 *ммк* [2]. Эта форма претерпевает изменения в темновой стадии, в результате которой образуются другие промежуточные формы, приводящие в конечном итоге к образованию хлорофилла, обладающего максимумами поглощения при 676 *ммк* [1] и флуоресценции — при 680 *ммк* [2]. Весь процесс последовательных превращений пигментов, протекающих в живом листе с ненарушенной нативной структурой, можно представить в виде следующей схемы [1; 2]: $П_{655(650)} \rightarrow X_{690(684)} \rightarrow X_{680(670-672)} \rightarrow X_{684-686(676-678)}$,
где $П$ — протохлорофилл, X — хлорофилл; цифрами обозначены максимумы флуоресценции и соответствующие им максимумы поглощения (цифры в скобках).

Красновский и Кособуцкая [10; 11] показали, что и гомогенаты — коллоидные растворы вещества этиолированных листьев — сохраняют способность к образованию хлорофилла, и при освещении их происходит фотохимическое превращение протохлорофилла в хлорофилл. В первой работе использовались коллоидные растворы вещества этиолированных листьев фасоли в фосфатном буфере, при освещении которых образуется первичный хлорофилл с максимумом поглощения при 670 *ммк*. Эта форма пигмента быстро выцветает при дальнейшем освещении. Смит с сотр. [12], исследуя эту реакцию в глицериновых экстрактах из этиолированных листьев, обнаружили начальное образование из пигмента-предшественника другой формы хлорофилла, имеющей максимум поглощения при 680 *ммк*. При стоянии свежеобразованный хлорофилл испытывает смещения красного максимума поглощения в коротковолновую сторону — до 672 *ммк*.

Смит предпринял попытку очистки «голохрома» — пигменто-белкового соединения путем переосаждения сульфатом аммония и получил сохранение активности в этих условиях [13].

Данная работа проводилась для изучения механизма образования хлорофилла в гомогенатах этиолированных листьев и выявления отличий от процесса, идущего непосредственно в живых листьях. Исследовались процессы, протекающие в гомогенатах при освещении, и не ставилась задача четкого разграничения световых и темновых стадий. Была использована методика флуоресцентной спектрофотометрии в сочетании с глубоким охлаждением объектов. По своей чувствительности измерения флуоресценции превосходят методы адсорбционной спектроскопии. Глубокое охлаждение, тормозя фотобиохимические процессы, дает возможность их остановить и исследовать быстропротекающие промежуточные стадии.

В работе изучали: спектры флуоресценции неосвещенных гомогенатов; последовательные спектральные изменения, происходящие при их освещении, а также влияние различных условий и воздействий на флуоресценцию неосвещенных и освещенных гомогенатов и на ход изменений флуоресценции при освещении.

МЕТОДИКА

Этиолированные листья 12—15-дневных растений фасоли сорта «Северная звезда», выращенных при 20—23°, тщательно растирали в полной темноте с 20 *мл* фосфатного буфера, охлажденного до 0° и имеющего нужную величину pH. Суспензию отфильтровывали через полотняный фильтр для освобождения от крупных клеточных обломков *.

Гомогенат разделяли на отдельные равные порции по 3 *мл* при помощи наполняемого до краев стеклянного 3-*мл* стаканчика. Все указанные операции производили в полной темноте, наощупь, что требовало некоторого навыка со стороны экспериментатора.

Пробы хранили при 0° в темноте, и всю серию опытов проводили с одним и тем же материалом.

Каждую пробу (3 *мл*) подвергали соответствующей обработке (освещение, нагревание, добавление растворителей), после чего к ней добавляли 5 *мл* глицерина для просветления и стабилизации гомогената. Буферно-глицериновый гомогенат после тщательного перемешивания помещали в сосуд Дюара с жидким азотом и выдерживали в нем несколько минут. В этих условиях образуется прозрачный леденец.

Пробирку с замороженным гомогенатом переносили в держатель-«холодопровод», представляющий собой медную трубку, в нижней части которой был запрессован медный стержень, а в средней вырезано небольшое отверстие для освещения объекта и прохождения света флуоресценции. Внутренний диаметр трубки-держателя соответствовал наружному диаметру опытной пробирки. Охлаждение исследуемых образцов во время измерения флуоресценции достигалось погружением нижнего конца держателя в сосуд Дюара с жидким азотом. Тонкий слой антифриза (5% раствора глицерина в спирте), наносимый кисточкой на наружную поверхность пробирки непосредственно перед фотографированием, предохранял от запотевания.

Флуоресценция возбуждалась ртутно-кварцевой лампой СВДШ-250 через водный фильтр и набор синих светофильтров СЗС-9 и СЗС-8.

Для регистрации спектров флуоресценции использовали установку, идентичную описанный Литвиным и Красновским [2]. Регистрацию спектров осуществляли фотографическим методом с использованием фотопластинок «панифра», обладающих достаточно высокой чувствительностью в исследуемой спектральной области (620—720 *ммк*).

Отсутствие отраженного возбуждающего света в области флуоресценции контролировали в опытах с применением красного светофильтра КС-11, помещенного перед щелью спектрографа.

Обычно экспозиции составляли 2,5—3 мин. при ширине входной щели спектрографа 0,1 *мм*. Такие короткие экспозиции сокращали до минимума действие возбуждающего света, а малая ширина щели обеспечивала хорошее разрешение по спектру. Положения полос флуоресценции с точностью до ±1 *ммк* и почернения пластинок, позволяющие качественно оценивать интенсивности максимумов, определяли на нерегистрирующем микрофотометре МФ-2. Спектры флуоресценции записывали на регистрирующем микрофотометре МФ-4.

* Центрифугирование при 15 000g не изменяло способности надосадочной жидкости к образованию хлорофилла.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры флуоресценции исходных (неосвещенных) гомогенатов этиолированных листьев фасоли

Гомогенаты готовили на $^1/_{15}$ *М* фосфатных буферных смесях с pH 4,5, 6,5 и 8,5. Спектр флуоресценции гомогената при pH 8,5 (рис. 1, кривая *1*) обнаруживает два отчетливо выраженных максимума: при 635 и 655 *ммк* и два — менее четких и более слабых — при 687—689 *ммк* и 705—707 *ммк*. Наиболее интенсивен максимум 655 *ммк*. Отличия вида спектра флуоресценции при pH 6,5 заключаются в том, что максимум 635 *ммк* менее интенсивен и проявляется только в виде «плеча» у основного максимума при 655 *ммк*. При pH 4,5 коротковолновый максимум раздваивается на полосы, расположенные в области ~628 и 642 *ммк*.

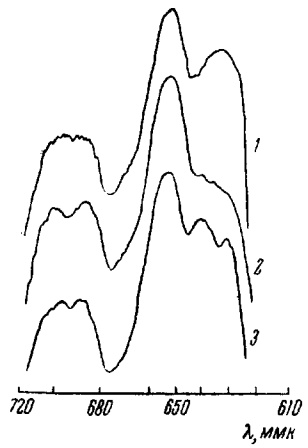


Рис. 1

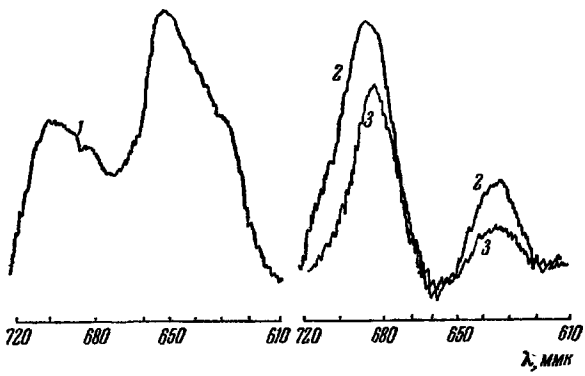


Рис. 2

Рис. 1. Спектры флуоресценции неосвещенных гомогенатов этиолированных листьев фасоли при разных pH

1 — pH 8,5; *2* — pH 6,5; *3* — pH 4,5

Рис. 2. Изменения флуоресценции при освещении гомогената в аэробных условиях (pH 6,5)

1 — исходный гомогенат (без освещения); *2* — после 15 сек. освещения; *3* — после 5 мин. освещения

Для выяснения влияния глицерина сравнивали свойства гомогенатов, содержащих глицерин или равный объем буферной смеси. В обоих случаях общий вид спектра флуоресценции, положения максимумов и соотношения их интенсивностей не отличаются. Это дало нам основание использовать глицерин в качестве вещества, уменьшающего светорассеяние, и в силу вязкости, стабилизирующего дисперсные системы.

Изменения флуоресценции при освещении гомогенатов

Гомогенаты освещали на расстоянии 30 *см* от ламп дневного света (освещенность ~2000 люкс) при 22—24°. На рис. 2 представлены спектры флуоресценции гомогената при pH 6,5 до освещения (кривая *1*), после 15-секундного (кривая *2*) и 5-минутного освещения (*3*).

Уже в первые секунды действия света на гомогенат (в аэробных условиях) происходят глубокие спектральные изменения. Максимум 655 *ммк* резко уменьшается по интенсивности уже после 1 сек. освещения и на протяжении 1 мин. действия света исчезает полностью; в то же время максимум 635 *ммк* уменьшается лишь в небольшой степени. Одновременно с исчезновением флуоресценции при 655 *ммк* возникает интенсивный максимум в области 687—689 *ммк*, который после нескольких минут освещения смещается в коротковолновую сторону — до 680 *ммк*. Даль-

шейшее действие света вызывает уменьшение обоих максимумов, происходящее за счет выцветания пигментов в присутствии кислорода воздуха. Появление интенсивного максимума 687—689 *ммк* при одновременном ослаблении флуоресценции в области 655 *ммк* происходит уже под действием очень слабого, сумеречного света.

Максимум 687—689 *ммк* медленно появляется и в «замороженном» гомогенате при продолжительном действии возбуждающего света, что согласуется с данными Смита [14], наблюдавшего зеленение этиолированных листьев при —70°. Учитывая это, мы при фотографировании спектра считали «исходной» лишь первую экспозицию.

Влияние pH на изменения флуоресценции при освещении гомогенатов в аэробных условиях

Последовательность спектральных изменений, происходящих при освещении гомогенатов с pH 4,5, 6,5 и 8,5 одна и та же, но скорость реакции и величина коротковолнового смещения главного максимума флуоресценции различны.

На рис. 3 графически изображены сдвиги положений длинноволнового максимума, происходящие в гомогенатах на свету в условиях равных pH. Начало всех кривых соответствует положению длинноволнового максимума флуоресценции в первую секунду действия света. При pH 8,5 скорость и величина коротковолнового смещения максимума флуоресценции больше, чем при других pH, что свидетельствует о более высокой скорости пигментных превращений.

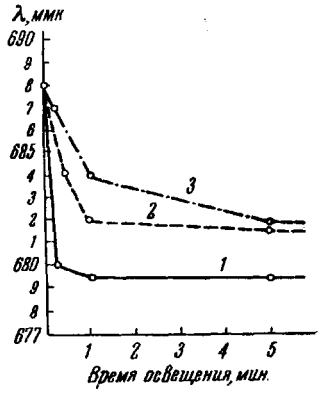


Рис. 3. Смещения длинноволнового максимума флуоресценции при освещении гомогенатов в условиях разных pH
1 — pH 8,5; *2* — pH 6,5; *3* — pH 4,5

Сопоставление изменений флуоресценции при освещении этиолированных листьев и гомогенатов

Этиолированные листья фасоли освещали в тех же условиях, что и гомогенаты. Из освещенных листьев готовили гомогенаты, спектры флуоресценции которых в каждый момент освещения сравнивали с соответствующими спектрами флуоресценции освещенных гомогенатов.

В таблице представлены почернения пластинки (цифры в скобках)

Освещение гомогенатов

До освещения	634(56)	656(75)	690(32)	710(16)
5 сек. освещения	634(50)	655(28)	687(173)	— —
30 » »	635(49)	655(14)	684(142)	— —
5 мин. освещения	635(36)	— —	682(77)	— —
30 » »	— —	— —	—	— —

Освещение целых листьев

До освещения	634(56)	656(65)	690(32)	710(16)
5 сек. освещения	—	—	690(170)	—
30 » »	—	—	690(250)	—
5 мин. освещения	—	—	690(130)	—
30 » »	—	—	684(68)	—

и максимумы флуоресценций (λ, *ммк*) при освещении гомогенатов и неповрежденных листьев.

Длинноволновый максимум флуоресценции (688—690 *ммк*) в целых листьях сохраняется более длительно, чем в гомогенатах. Очень краткое освещение гомогената вызывает коротковолновое смещение этого максимума, в то время как в листе его положение не изменяется на протяжении более длительных периодов освещения. Другое отличие заключается в том, что соотношение интенсивностей максимумов флуоресценции в освещенных листьях сдвинуто в сторону преобладания длинноволнового максимума (688—690 *ммк*). Даже после освещения листьев в течение нескольких секунд максимум 635 *ммк* полностью исчезает, в то время как у освещенных в течение того же промежутка времени гомогенатов флуоресценция при 635 *ммк* еще достаточно интенсивна и соизмерима с длинноволновым максимумом.



Рис. 4

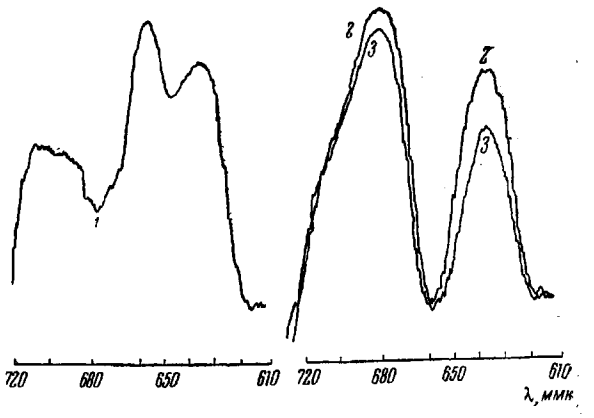


Рис. 5

Рис. 4. Спектры флуоресценции гомогената (pH 6,5), освещенного 5 мин. (*1*), и гомогената, приготовленного из этиолированных листьев, освещенных 5 мин. (*2*)

Рис. 5. Изменения флуоресценции при длительном освещении гомогената (pH 8,5) в анаэробных условиях

1 — исходный гомогенат без освещения; *2* — после 20 мин. освещения; *3* — после 1 часа 20 мин. освещения

На рис. 4 представлены микрофотограммы спектров флуоресценции непосредственно освещенного в течение 5 мин. гомогената (кривая *1*) и гомогената, приготовленного из освещенных в тех же условиях этиолированных листьев (кривая *2*).

Изменения флуоресценции при освещении гомогенатов в анаэробных условиях

В данной серии опытов 3 *мл* пробы гомогената этиолированных листьев при pH 8,5 помещали в вакуумные трубки Тунберга, из которых откачивали воздух 5—7 мин. масляным форвакуумным насосом при взбалтывании.

Кратковременное освещение (от нескольких секунд до нескольких минут) гомогенатов этиолированных листьев в анаэробных условиях вызывает изменения, аналогичные тем, которые были констатированы для тех же объектов, освещенных в присутствии воздуха.

Продолжительное освещение гомогената не изменяет вида спектра флуоресценции по сравнению с кратковременным освещением. Поло-

жения обоих максимумов, соотношения их интенсивностей, общие контуры спектра остаются неизменными после продолжительного освещения, так как в этих условиях не происходит деструктивного окисления пигментов (рис. 5).

Итак, появление интенсивного максимума при 680 *ммк* при некотором ослаблении интенсивности флуоресценции в области 635 *ммк* является конечным итогом спектральных изменений при освещении гомогенатов. Более продолжительное освещение на воздухе вызывает выцветание пигментов, следствием чего является ослабление флуоресценции.

Влияние различных воздействий на флуоресценцию неосвещенных гомогенатов этиолированных листьев

Нагревание. 3 *мл* пробы нагревали до 40, 50, 60, 80 и 100° путем выдерживания пробирок с гомогенатом на водяной бане в течение 2 мин. в полной темноте. На рис. 6 изображены микрофотограммы неосвещенных гомогенатов, нагретых до 40° (кривая *2*) и 50° (кривая *3*) в сравнении с тем же гомогенатом без нагревания (кривая *1*).

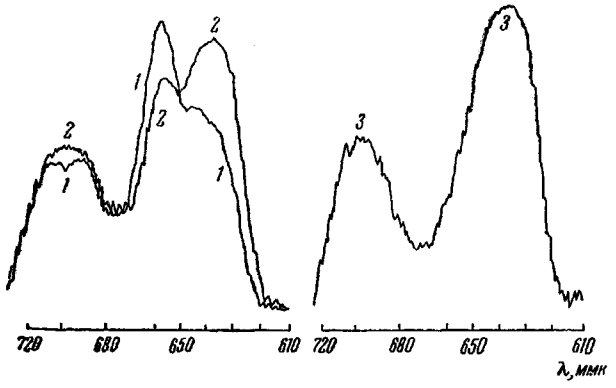


Рис. 6. Действие температуры на флуоресценцию неосвещенного гомогената (pH 6,5)

1 — исходный гомогенат без нагревания; *2* — после нагревания до 40°; *3* — после дальнейшего нагревания до 50°

Нагревание вызывает глубокие изменения в спектрах флуоресценции; даже после нагревания пробы до 36—40° резко ослабевает максимум при 655 *ммк* и увеличивается интенсивность флуоресценции в области 635 *ммк*. Вместо двух длинноволновых максимумов (688 и 707 *ммк*) появляется один — в области 698 *ммк*.

Нагревание до 50° вызывает полное исчезновение максимума 655 *ммк* и дальнейшее возрастание интенсивности флуоресценции в области 635 *ммк* с увеличением при 698 *ммк;* при 60—80° лишь в незначительной степени увеличивается интенсивность максимума 635 *ммк* и, наконец, нагревание до 100° вызывает уменьшение общей интенсивности флуоресценции. Это наглядно иллюстрируется графиком (рис. 7), на котором представлены изменения относительных величин максимумов неосвещенного гомогената в зависимости от действия температуры. Эти результаты соответствуют опытам по нагреванию этиолированных листьев. Результаты нагревания до 100° соответствуют опытам Виргина [15], наблюдавшего у нагретых этиолированных листьев максимум флуоресценции при 630 *ммк*.

Действие растворителей. Равные (3 *мл*) пробы одного и того же гомогената в полной темноте разливали по пробиркам, содержащим

растворитель и буферный раствор в таких соотношениях, чтобы конечное содержание растворителя в опытных образцах составило 1; 2,5; 5; 10; 20 и 30%. После тщательного перемешивания с растворителем пробы выдерживали в темноте при 0° на протяжении нескольких минут, вслед за чем их спектры флуоресценции фотографировали при замораживании.

Действие растворителей вызывает резкие изменения флуоресценции, аналогичные наблюдаемым во время нагревания. 1%-ный пиридин вызывает падение максимума 655 *ммк* и возрастание флуоресценции при 635 *ммк*. При добавлении 2,5% пиридина максимум 655 *ммк* полностью исчезает, флуоресценция в области 635 *ммк* резко увеличивается и вместо двух длинноволновых максимумов (688 и 705 *ммк*) появляется один (696 *ммк*). Дальнейшее повышение концентрации пиридина вызывает возрастание общей интенсивности флуоресценции.

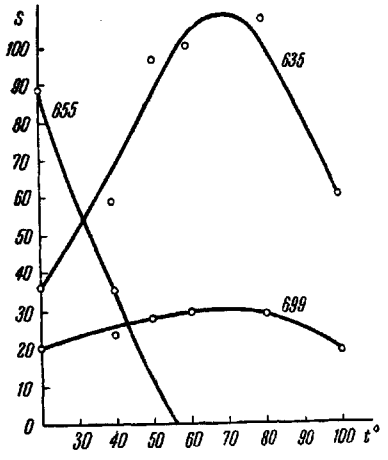


Рис. 7. Изменение относительных интенсивностей максимумов флуоресценции неосвещенного гомогената под влиянием нагревания

Спирт оказывает подобное пиридину влияние на изменение флуоресценции, но действие этого растворителя менее эффективно. Заметное уменьшение интенсивности максимума 655 *ммк* имеет место лишь в присутствии 10- и 20%-ного спирта, полное исчезновение максимума 655 *ммк* при резком возрастании флуоресценции в области 635 *ммк* происходит при действии 30%-ного спирта на неосвещенный гомогенат. Следует заметить, что 20%-ный спирт по сравнению с 10%-ным вызывает заметное снижение общей интенсивности флуоресценции, что, по-видимому, связано с коагуляцией белков.

Эти эффекты соответствуют наблюдениям Кособуцкой и Красновского [16] о действии растворителей на фотохимическую активность и спектральные свойства гомогенатов зеленых листьев и опытам Литвина и Красновского [17] по действию растворителей на этиолированные листья.

Влияние сильно кислой и сильно щелочной среды. Гомогенаты этиолированных листьев готовили обычным образом на буферных растворах с pH 2,5 и 10, что достигалось прибавлением 0,1 н. HCl в $^1/_{15}$ *М* раствор K_2HPO_4 (pH 2,5), 0,1 н. NaOH в раствор Na_2HPO_4 (pH 10).

В этих условиях максимум 655 *ммк* полностью исчезает, резко понижается общая интенсивность флуоресценции, которая проявляется в виде слабого максимума при 635 *ммк* и едва уловимого длинноволнового максимума, находящегося приблизительно в области 702 *ммк* в сильнокислой и в области 696 *ммк* — в сильнощелочной среде. Это связано, по-видимому, с денатурацией белков.

Изменения флуоресценции в гомогенатах этиолированных листьев при освещении после различных воздействий

Воздействия, под влиянием которых исчезает максимум флуоресценции 655 *ммк*, полностью инактивируют способность к образованию хлорофилла. К такому эффекту приводят: нагревание выше 50°, наличие в среде более 1% пиридина и свыше 20% спирта, а также сильнокислая (pH 2,5) и сильнощелочная (pH 10) среды. Гомогенаты, подвергнутые указанным воздействиям, при освещении в аэробных условиях обнаруживают лишь падение общей интенсивности флуоресценции,

происходящее за счет выцветания имеющихся в них пигментов. Реакций, ведущих к образованию хлорофилла, в таких условиях наблюдать не удается.

Более мягкие воздействия, не вызывающие полного исчезновения максимума 655 *ммк*, сохраняют способность гомогената к образованию хлорофилла. Общий характер и направленность изменений флуоресценции при этом аналогичны тем, которые происходят в ненарушенных гомогенатах, однако процесс не доходит до конечной стадии (образования хлорофилла с флуоресценцией при 680 *ммк*), а завершается образованием пигментных форм, флуоресцирующих при 684—682 *ммк*.

Конечным результатом спектральных изменений, наблюдаемых при освещении в аэробных условиях гомогената, предварительно нагретого до 40°, является образование максимума при ~683 *ммк* и ослабление флуоресценции при 635 *ммк*. Общая интенсивность флуоресценции по мере освещения уменьшается. При освещении гомогената, содержащего 1% пиридина, пигментные превращения завершаются так же, как и в предыдущем случае, образованием пигмента, флуоресцирующего при 682 *ммк*, и падением флуоресценции в области 635 *ммк*. При освещении гомогената, содержащего 10—20% спирта, спектральные изменения завершаются образованием максимума при 684—685 *ммк*, интенсивность которого сильно падает уже после 5 мин. освещения (в результате выцветания пигмента). На рис. 8 изображены смещения положений длинноволнового максимума флуоресценции, имеющие место при освещении гомогенатов этиолированных листьев, содержащих 10 и 20% спирта и 1% пиридина.

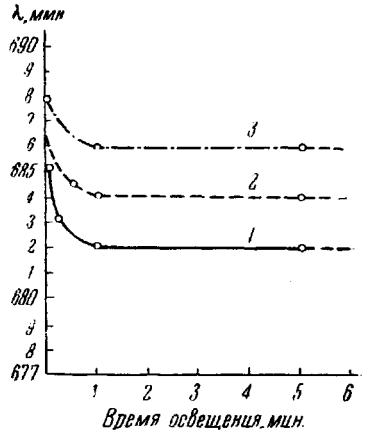


Рис. 8. Смещения положений длинноволнового максимума флуоресценции при освещении гомогенатов, содержащих 1% (*1*) пиридина, 10% (*2*) и 20% (*3*) спирта

Изменения флуоресценции при освещении гомогенатов, содержащих 60% глицерина

В данной серии опытов к 3 *мл* гомогената в темноте добавляли глицерин в количестве 5 *мл*, после тщательного перемешивания буферно-глицериновые гомогенаты подвергали освещению, как описано выше (в предыдущих опытах глицерин добавляли к освещенным гомогенатам).

В первые секунды освещения максимум 655 *ммк* полностью исчезает, и интенсивность флуоресценции при 635 *ммк* уменьшается. Одновременно с этим появляется интенсивный максимум при 688 *ммк*, положение которого не изменяется на протяжении последующего освещения. Дальнейшее освещение (10 мин. и более) вызывает уменьшение общей интенсивности флуоресценции, максимум 688 *ммк* сильно падает; однако положение его сохраняется неизменным. Поэтому можно считать, что образование максимума 688 *ммк* при падении флуоресценции при 635 *ммк* и является конечным итогом пигментных превращений, протекающих при освещении буферно-глицериновых гомогенатов. Иными словами, глицерин стабилизирует максимум флуоресценции 688 *ммк*, препятствуя дальнейшим превращениям, результатом которых является его коротковолновое смещение.

Влияние некоторых воздействий на флуоресценцию освещенных гомогенатов этиолированных листьев фасоли

Мы исследовали влияние нагревания и действия пиридина на начальную, промежуточную и конечную стадии пигментных превращений в освещенных гомогенатах, характеризующихся последовательными положениями длинноволнового максимума флуоресценции при 688, 684 и 680 *ммк*.

Пиридин добавляли к исследуемым пробам с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация составила 2,5 и 5%. Пробирки с опытными образцами нагревали путем выдерживания 2 мин. в кипящей воде. Исследуемые пробы готовили в соответствии с найденными условиями образования разных форм: 688 *ммк* — освещение гомогената (1 мин.) в присутствии 60% глицерина (pH 6,5 и 8,5); 684 *ммк* — освещение гомогената (10 сек.) при pH 8,5; 680 *ммк* — освещение гомогената (30 сек.) при pH 8,5. Нагревание и добавление пиридина к освещенным гомогенатам, обладающим максимумами флуоресценции при 684 *ммк* и 688 *ммк*, в обоих случаях вызывает смещение этих максимумов в коротковолновую сторону (до 680 *ммк*); общая интенсивность флуоресценции при этом повышается, положение коротковолнового максимума (635 *ммк*) остается неизменным (рис. 9). Это свидетельствует о том, что указанные воздействия приводят к спектру, свойственному растворам хлорофилла и протохлорофилла.

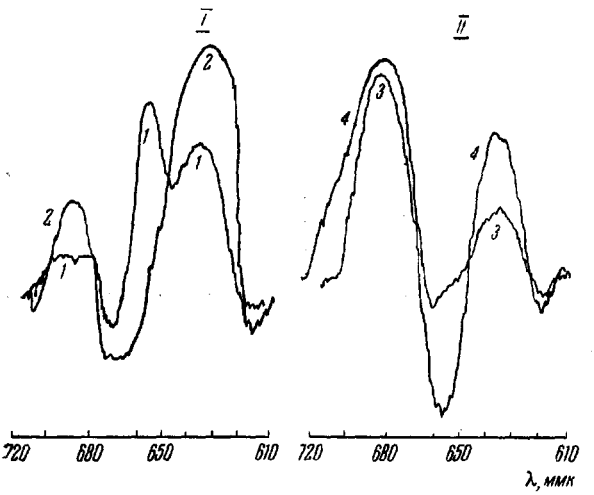


Рис. 9. Действие пиридина на флуоресценцию неосвещенного (*I*) и освещенного гомогената с максимумом флуоресценции 684 *ммк* (*II*)

1 — исходный неосвещенный гомогенат до обработки пиридином; *2* — неосвещенный гомогенат, содержащий 2,5% пиридина; *3* — гомогенат после 10 сек. освещения; *4* — освещенный (10 сек.) гомогенат, содержащий 2,5% пиридина

Гомогенаты, обладающие после освещения максимумом флуоресценции при 680 *ммк* (конечная стадия пигментных превращений), под влиянием нагревания и добавления пиридина увеличивают общую интенсивность флуоресценции, без изменения положения максимумов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гомогенаты этиолированных листьев обнаруживают спектры флуоресценции, аналогичные спектрам живых неповрежденных этиолированных листьев [2]. Максимум 655 *ммк* является самым интенсивным в спектре гомогената и принадлежит особой активной форме протохлорофилла. Воздействия, нарушающие нативность структуры (нагревание, растворители), вызывают нарушения связи между протохлорофиллом и белковым компонентом, в результате чего пигмент переходит в другую, более устойчивую форму (635 *ммк*). Спектр флуоресценции гомогената меняется таким образом, что максимум 655 *ммк* полностью исчезает при сильном возрастании максимума флуоресценции при

635 *ммк*. Одновременно с этим появляется максимум флуоресценции при 696—698 *ммк*.

Таким образом, максимумы при 655 и 635 *ммк* принадлежат различным формам протохлорофилла. Требует исследования возможность химических различий пигмента в разных формах; изменения, происходящие под влиянием нагревания и воздействия растворителей, свидетельствуют скорее о различиях в форме связи в пигментно-белковом комплексе.

Наряду с этим в ряде работ показано существование промежуточных форм, отличающихся наличием фитола в молекуле пигмента [3—6]. Обе формы протохлорофилла, по-видимому, находятся в равновесии: форма 655 *ммк* легко превращается в форму 635 *ммк*, но условия обратного перехода пока не найдены. Неустойчивая форма, флуоресцирующая при 655 *ммк*, чрезвычайно активна фотобиохимически, полностью превращаясь при освещении. Другая устойчивая форма протохлорофилла с максимумом флуоресценции при 635 *ммк* мало активна, и в условиях наших опытов только часть ее претерпевает превращения, приводящие к образованию хлорофилла. Возможно, что превращение идет также через образование формы 655 *ммк*. Бóльшая часть формы 635 *ммк* подвергается фотоокислению и выцветает при освещении в аэробных условиях.

В отличие от этого, в неповрежденных листьях форма протохлорофилла с максимумом при 635 *ммк* по сравнению с гомогенатами отличается более высокой активностью и вслед за более активной формой (655 *ммк*) почти целиком превращается. Поэтому в живых листьях происходит количественное превращение всего присутствующего протохлорофилла в хлорофилл. В гомогенатах, где нарушена структура, свойственная живому листу, и несколько видоизменено в связи с этим состояние пигментов, не весь присутствующий протохлорофилл превращается в хлорофилл.

Результатом первой стадии пигментных превращений в гомогенатах является образование формы, флуоресцирующей при 688 *ммк*. Эта форма хлорофилла, по-видимому, аналогична той, которая появляется в живых неповрежденных листьях в результате начальной фотохимической стадии процесса, обладая максимумами флуоресценции при 690 *ммк* [2] и поглощения при 684 *ммк* [1]. Однако в отличие от целых листьев, где первая стадия процесса протекает в течение сравнительно длительного времени (до 10 мин.), в гомогенатах, где несколько нарушена координация всех биохимических процессов, та же стадия завершается быстро (до 1 мин. освещения) и форма 688 *ммк* быстро включается в цепь дальнейших превращений.

В гомогенатах, содержащих глицерин, процессы, перерабатывающие эту первичную форму, сильно заторможены, поэтому даже после длительного времени освещения (несколько десятков минут) обнаруживается только форма, флуоресцирующая при 688 *ммк*. В гомогенатах, не содержащих глицерина, форма 688 *ммк* превращается в хлорофилл с максимумом флуоресценции при 680 *ммк*, образование которого в гомогенатах по спектрам поглощения было обнаружено Красновским и Кособуцкой [10; 11]. Промежуточные стадии пигментных превращений выпали из поля зрения этой работы из-за недостаточно строгого соблюдения условий затемнения при приготовлении гомогенатов и меньшей чувствительности метода абсорбционной спектроскопии.

В живых листьях с ненарушенной структурой происходит дальнейший синтез протохлорофилла и накопление хлорофилла, в течение которых меняются естественные формы связи между компонентами пигментно-белкового комплекса, увеличивается их степень агрегации, что проявляется в смещении максимума поглощения (670 *ммк*) в длинноволновую сторону — до 678 *ммк* [10; 11]. В отличие от этого в

гомогенатах образование первичного хлорофилла, флуоресцирующего при 680 *ммк*, является конечной стадией пигментных превращений.

Важен тот вывод, что воздействия, нарушающие нативность структуры (следствием чего является полное исчезновение формы протохлорофилла с максимумом флуоресценции при 655 *ммк*), вместе с тем полностью инактивируют способность пигментной системы к превращениям при освещении. Более мягкие воздействия, не вызывающие полного исчезновения протохлорофилла с флуоресценцией при 655 *ммк*, сохраняют и способность пигментной системы к превращениям при освещении. Однако в таких гомогенатах, где частично нарушена структура, процесс образования хлорофилла протекает не до конечной стадии, свойственной гомогенатам с ненарушенной структурой, а завершается образованием промежуточных пигментных форм, флуоресцирующих при 684 *ммк* (в присутствии 10—20% спирта) и 682 *ммк* (после нагревания до 40° и в присутствии 1% пиридина).

Промежуточные формы пигментов с максимумами флуоресценции соответственно в области 684 *ммк* и 682 *ммк*, наряду с начально образованным пигментом, флуоресцирующим при 688 *ммк*, и хлорофиллом с максимумом при 680 *ммк*, образованным в течение конечной стадии пигментных превращений, являются, по-видимому, разновидностями естественного хлорофилл-протеидного комплекса. В пользу этого говорит то, что при воздействии нагревания и растворителей на начальную и промежуточные пигментные формы (флуоресцирующие соответственно при 688 и 684—682 *ммк*) в гомогенатах обнаруживаются только оставшиеся непревращенными протохлорофилл с максимумом 635 *ммк* и хлорофилл с максимумом при 680 *ммк* (стабильная «мономерная» форма хлорофилла). Наличие формы с флуоресценцией при 655 *ммк* в гомогенатах этиолированных листьев является необходимым условием пигментных превращений, протекающих при освещении.

В дальнейших исследованиях следует выявить природу связи протохлорофилла с белком, определяющую восстановление «полуизолированных» двойных связей в его молекуле. В отличие от гомогенатов, неспецифическое фотовосстановление протохлорофилла в растворе ведет, как это было показано ранее [18], к обратимому восстановлению по системе сопряженных по кругу двойных связей.

ВЫВОДЫ

В гомогенатах этиолированных листьев фасоли, как и в неповрежденных этиолированных листьях, находятся две формы протохлорофилла. Лабильная форма с максимумом флуоресценции при 655 *ммк* (фотохимически активна и при освещении целиком превращающаяся в хлорофилл) и форма с максимумом флуоресценции при 635 *ммк*, менее активная (при освещении лишь часть ее превращается в хлорофилл, а большая часть выцветает).

Определение спектральных изменений флуоресценции гомогенатов при освещении позволило установить последовательность происходящих в них пигментных превращений. Первая, быстрая стадия процесса, протекающая при освещении гомогената, ведет к образованию пигмента, флуоресцирующего при 688 *ммк*. Эта начальная форма хлорофилла претерпевает дальнейшие превращения, в результате которых образуется первичный хлорофилл с максимумом флуоресценции при 680 *ммк*. Образование этого пигмента является конечным результатом превращений, протекающих в гомогенатах при освещении, и осуществляется в широком пределе pH. В отличие от листьев, дальнейшее освещение не ведет к сдвигу максимума флуоресценции до 686 *ммк*.

В присутствии 60% глицерина процесс останавливается на стадии образования формы с максимумом флуоресценции при 688 *ммк*. Нагре-

вание и действие растворителей ведут к полному нарушению активной формы протохлорофилла с флуоресценцией при 655 *ммк* и соответственно инактивируют процесс образования хлорофилла.

В заключение выражаем глубокую благодарность Ф. Ф. Литвину за обсуждение результатов работы и помощь в налаживании методики флуоресцентной спектрофотометрии.

Поступила в редакцию
24.VIII.1959

ЛИТЕРАТУРА

1. Schibata K., J. Biochem. (Japan), **44**, 147, 1957.
2. Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **117**, 106, 1957; Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **120**, 764, 1958; Литвин Ф. Ф., Исследование состояния и превращения пигментов при фотосинтезе. Дис., М., 1958.
3. Loeffler J. E., Carnegie Inst. Wash. Yearbook No 54, 159, 1954—1955.
4. Годнев Т. Н., Шлык А. А. и Ляхнович Я. П., Физиол. растений **4**, 393, 1957.
5. Wolf J. B., Price Z., Arch. Biochem. and Biophys. **72**, 293, 1957.
6. Судьина Е. Г., Исследование зависимости образования хлорофилла от активности хлорофиллазы. Дис., Одесса, 1958.
7. Frank S. K., J. Gen. Physiol. **29**, 157, 1946.
8. Koski V. M., French C. S. *et al.*, Arch. Biochem. and Biophys. **31**, 1, 1951.
9. Любименко В. Н., Изв. Рос. АН СССР, 6 сер. **17**, 129, 1923.
10. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **85**, 177, 1952; Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **91**, 343, 1953.
11. Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **19**, 37, 1954.
12. Smith J. H. C., Ahrne J. M., Carnegie Inst. Wash. Yearbook, No, 54, 1957, 1954; Smith J. H. C., Kupke D. W., Nature **178**, 752, 1956; Smith J. H. C., Kupke D. W., Loeffler J. S., Research in Photosynthesis, Intersience Publ., N. Y., 1957.
13. Smith J. H. C., Carnegie Inst. Wash. Yearbook No 57, 287, 1957—1958.
14. Smith J. H. C., Benitez A., Plant Physiol. **29**, 135, 1954.
15. Virgin H. J., Physiol. Plantarum **8**, 389, 1955.
16. Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
17. Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А., Изв. АН СССР, сер. физ. **23**, 82, 1959.
18. Красновский А. А. и Войновская К. К., Докл АН СССР **64**, 663, 1949.

STUDIES ON CHLOROPHYLL FORMATION IN THE HOMOGENATES OF ETIOLATED LEAVES WITH THE USE OF FLUORESCENT SPECTROPHOTOMETRY

A. A. KRASNOVSKY and *M. I. BYSTROVA*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Two forms of protochlorophyll are present in the homogenates of etiolated bean leaves as well as in intact etiolated leaves. The labile form with a fluorescence maximum at 655 *mμ* is photochemically extremely active and upon illumination completely transforms into chlorophyll. The other form with a fluorescence maximum at 635 *mμ* is much less active and when illuminated only partly transforms into chlorophyll while its major part is bleached.

By means of fluorescence spectra measurements at liquid nitrogen temperature after homogenate illumination it proved possible to follow up the sequence of the pigment transformations. The first rapid stage of the process is completed by formation of a pigment with fluorescence maximum at 688 *mμ*. This primary form of chlorophyll undergoes further transformations which results in the formation of the chlorophyll with a fluorescence maximum at 680 *mμ*. The formation of this pigment form is the final result of transformations occurring in the illuminated homogenates and is accomplished within a wide range of pH. In contrast to intact leaves, further illumination does not cause a shift to 686 *mμ* in the fluorescence maximum.

In the presence of 60% glycerol the process is stopped at the stage of formation of the chlorophyll form with a fluorescence maximum at 688 *mμ*. Heat and solvents cause complete destruction of the active form of protochlorophyll with fluoresence at 655 *mμ* and inactivate correspondingly the process of chlorophyll formation.

ДЕЙСТВИЕ КАРОТИНА НА ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА и Е. В. ПАКШИНА

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

Известно, что свет, поглощенный каротиноидами ряда фотосинтезирующих организмов, может использоваться для фотосинтеза; причем наиболее вероятно, что энергия квантов света, поглощенных каротиноидами, передается хлорофиллу *а*, непосредственно участвующему в процессах фотосинтеза. В работах Сапожникова и сотр. [1; 2] имеются данные, указывающие на возможность участия каротиноидов в реакциях переноса кислорода в процессе фотосинтеза.

Однако мало изучена конкретная природа фотохимического взаимодействия между каротином и хлорофиллом. Так, например, Аронов и Маккиней [3] показали, что при освещении растворов хлорофилла в ацетоне или в бензине в присутствии кислорода происходит необратимое разрушение хлорофилла, которое существенно замедляется при добавлении в раствор каротина. Пепковиц [4] наблюдал разрушение каротина в ацетоновых экстрактах зеленых листьев при освещении солнечным светом. При освещении экстрактов из красной моркови концентрация каротина в них не изменялась; добавление хлорофилла вызывало падение содержания каротина. В опытах с чистым каротином, растворенным в петролейно-эфирном растворе хлорофилла, также имело место разрушение каротина [4]. Линч и Френч показали, что извлечение каротина из лиофилизированных препаратов хлоропластов значительно понижает их фотохимическую активность [5]. Фуджимори и Ливингстон отмечали, что в присутствии каротина и окислителей уменьшается длительность жизни «триплетного состояния» молекул хлорофилла в растворах, измеренная при помощи импульсной техники [6].

Мы уже указывали на то [7], что при действии световых импульсов большой энергии на растворы хлорофилла возможно их фотовосстановление молекулами растворителей или содержащихся в них примесей. С этой точки зрения понятно действие окислителей, быстро реагирующих с фотовосстановленными формами хлорофилла. Наши опыты показали, что каротин тормозит фотовосстановление хлорофилла, по-видимому, обратимо реагируя с фотовосстановленными формами пигмента, о чем мы кратко сообщили ранее [8].

В настоящей работе поставлена задача — систематически исследовать действие каротина на фотохимические реакции хлорофилла, изученные в нашей лаборатории. Однако прежде всего мы проверили способность каротина к обратимым превращениям под действием света.

ПРЕПАРАТЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали β-каротин Краснодарского витаминного завода, перекристаллизованный из бензола, и хлорофиллы *а*+*в* и *а*, выделенные из крапивы и очищенные хроматографическим методом. Опыты проводили с растворами каротина в органических растворителях и водными коллоидными растворами каротина, которые готовили по ранее описанной методике [9], а также с кристаллическим каротином (в виде взвеси в буферном растворе) и в виде естественного белкового соединения (гомогенат из корней моркови). Все растворители, использованные в работе, перегоняли перед опытом.

Опыты по фотосенсибилизированному окислению аскорбиновой кислоты проводили в приборе Варбурга при *t* 25° в сосудах особой формы [10]. Освещение сосудов производилось со стороны дна лампой накаливания в 200 *вт* через светофильтр, отсекающий ультрафиолет (GG-1 в опытах с каротином), и через красный светофильтр RG-2 в опытах с хлорофиллом.

Все опыты по фотовосстановлению и фотоокислению каротина и хлорофилла, а также действию каротина на сенсибилизированное хлорофиллом фотовосстановление метилового красного проводили в трубках Тунберга. Освещение осуществлялось в фокусе конденсора кинолампы 300 или 500 *вт* через красный светофильтр в опытах с хлорофиллом и без светофильтра в опытах с каротином в специальном осветительном устройстве, соединенном с ультратермостатом, позволяющем проводить опыты при определенной температуре. Интенсивность освещения в большинстве опытов составляла 10^4 *эрг/см²/сек*. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-4 со специальной колодкой, допускающей измерения в пробирках и трубках Тунберга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фотохимические свойства каротина

Фотовосстановление. Мы исследовали способность β-каротина к фотовосстановлению аскорбиновой кислотой в различных средах, учитывая выявленное ранее значение основности среды для течения этой реакции. В качестве сред были испытаны: этиловый спирт, этиловый спирт в смеси с H_2SO_4, пиридин, пиперидин и ледяная уксусная кислота. В растворе каротина в разных растворителях вводили 10 *мг* аскорбиновой кислоты, эвакуировали воздух и освещали в течение 3 мин.

Концентрация каротина в опыте была $0{,}8 \cdot 10^{-5}$ (коэффициент погашения (К) в максимуме был ~0,7). Нам не удалось заметить каких-либо изменений спектра поглощения каротина после освещения при комнатной температуре. Пиридиновый раствор каротина с аскорбиновой кислотой освещали также при —40°; фотовосстановления и в этом опыте не наблюдалось. Таким образом, β-каротин, по-видимому, не способен к фотохимическому восстановлению. Возможность необратимого окисления β-каротина при освещении растворов в присутствии воздуха была известна ранее.

Фотосенсибилизирующее действие. В работах нашей лаборатории было показано, что хлорофилл и его аналоги энергично фотосенсибилизируют окисление аскорбиновой кислоты [10]. Была проверена способность β-каротина в разных состояниях к этой реакции. Использовали истинные и коллоидные растворы β-каротина, взвеси кристаллов в буферном растворе и каротин в виде естественного белкового соединения (гомогенаты корней моркови).

Концентрация каротина в опытах с коллоидными растворами была $0{,}2 \cdot 10^{-5}$ *М* в опытах с ацетоновыми растворами — $0{,}3 \cdot 10^{-3}$ *М*. Окисление аскорбиновой кислоты измеряли в приборе Варбурга при *t* 25°. В центральную часть сосуда вводили 5 *мл* раствора каротина или 5 *мл* буферного раствора, содержащего 5 *мг* кристаллического каротина, в боковую часть — 10 *мг* аскорбиновой кислоты в 1 *мл* раствора.

После термостатирования в течение 10 мин. раствор аскорбиновой кислоты приливали к раствору пигмента и наблюдали ход реакции в темноте в течение 15 мин., затем производили освещение в течение 20—60 мин. Поглощение кислорода регистрировали каждые 3 мин.

Опыты с коллоидными растворами, со взвесью кристаллов и с гомогенатами моркови производили при разных pH (от 4 до 9). В кислой и нейтральной областях pH не было самопроизвольного окисления аскорбиновой кислоты, и каротин ни в виде коллоида, ни в виде взвеси кристаллов не оказывал фотосенсибилизирующего действия. При pH 9 наблюдалось окисление аскорбиновой кислоты, протекающее с одинаковой скоростью в темноте и на свету и не зависящее от присутствия каротина в реакционной смеси. Каротин в виде естественного белкового соединения (гомогенат из корней моркови) катализировал окисление аскорбиновой кислоты независимо от pH среды, но фотосенсибилизированного действия не наблюдалось. В опытах с ацетоновыми растворами каротина также не удалось наблюдать окисления аскорбиновой кислоты ни на свету, ни в темноте.

Мы испытали также способность каротина сенсибилизировать фотовосстановление метилового красного аскорбиновой кислотой. Окисленная форма этого красителя в кислой среде имеет максимум поглощения при 520 *ммк*, а восстановленная форма не поглощает в этой области спектра.

Реакцию проводили в трубках Тунберга в вакууме. Каротин брали в виде водного коллоидного раствора и в виде истинного раствора в ацетоне. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-4 непосредственно в трубках каждые 30 сек. в течение первых 2 мин., а затем через 60 сек. в течение 10 мин.

В условиях опыта происходило прямое фотовосстановление метилового красного, но каротин не оказывал влияния на скорость этого процесса. Таким образом, каротин не обладает фотосенсибилизирующим действием в реакциях окисления аскорбиновой кислоты и восстановления метилового красного.

Влияние каротина на фотохимические ствойства хлорофилла

Фотоокисление хлорофилла. Известно, что при освещении в присутствии кислорода растворы хлорофилла необратимо окисляются. На ми были поставлены опыты по выяснению действия каротина на фотоокисление хлорофилла в ацетоновом растворе. β-каротин и хлорофилл *а*+*в* растворяли в ацетоне. Концентрация хлорофилла в опытах была $0{,}6 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{хл}$ при 660 *ммк* был равен 0,525). Исследовали действие трех концентраций каротина: $0{,}15 \cdot 10^{-4}$, $0{,}15 \cdot 10^{-5}$ и $0{,}15 \cdot 10^{-6}$ *М*. О скорости реакции судили по падению К хлорофилла при 660 *ммк* после освещения. Измерения проводили каждые 5 мин. (рис. 1).

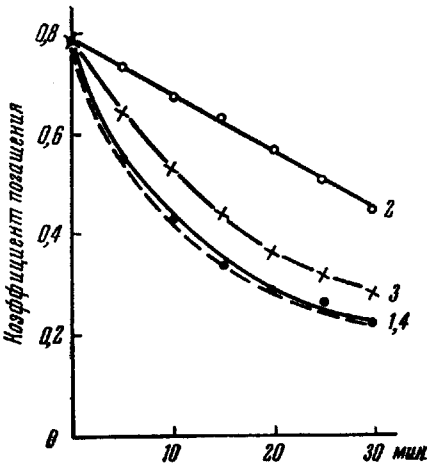


Рис. 1. Скорость фотохимического окисления хлорофилла в присутствии разных количеств каротина

Соотношение $K_{хл}:K_{кар}$: *1* — 1 : 0; *2* — 1 : 10; *3* — 1 : 1; *4* — 1 : 0,1

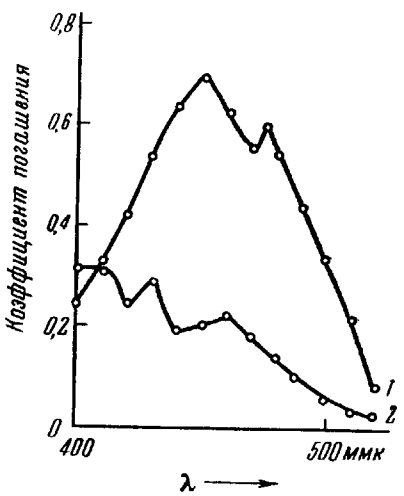


Рис. 2. Дифференциальный спектр при фотоокислении каротина (хлорофилл+каротин)

1 — до освещения; *2* — после освещения

Из рассмотрения хода кривых рис. 1 видно, что каротин при соотношении $K_{хл} : K_{кар} = 1 : 10$ существенно замедляет реакцию окисления хлорофилла; эффект действия каротина ослабевает по мере уменьшения его количества; при соотношении 10 : 1 действия не наблюдается. Таким образом, каротин защищает хлорофилл от окисления при освещении ацетоновых растворов в присутствии воздуха. Одновременно происходит сенсибилизированное хлорофиллом окисление каротина, которое было установлено по изменению спектра поглощения каротина до и после освещения опытных смесей (рис. 2). Эти результаты согласуются с данными вышеуказанных работ [3; 4].

Фотовосстановление хлорофилла и феофитина. Наблюдали ход восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в присутствии и отсутствии каротина.

Реакцию проводили с ацетоновыми и пиридиновыми растворами хлорофилла и каротина в трубке Тунберга в вакууме. Концентрация хлорофилла в опыте $0{,}3 \cdot 10^{-5}$ *М* (К при 660 *ммк* равно 0,53), концентрация каротина — $0{,}2 \cdot 10^{-5}$ *М* (К при 450 *ммк* равно 0,53). Содержание аскорбиновой кислоты — 10 *мг* на 5 *мл* раствора. Измерение спектров опытных смесей производили в области от 700 до 400 *ммк* до и после 30-минутного освещения.

В ацетоновом растворе отсутствие каротина имело место заметное восстановление хлорофилла (падение К при 660 *ммк* за 30 мин. освещения равнялось 0,265). В присутствии каротина изменения К практически не наблюдалось. Следовательно, каротин тормозит фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой. Существенно то, что измерение спектра поглощения до и после опыта не показало изменения в спектре каротина, который, таким образом, не подвергается сенсибилизированному восстановлению.

В другой серии опытов в вакуумную трубку Тунберга наливали раствор каротина в эфире, после испарения эфира к каротину добавляли 4 *мл* пиридинового раствора хлорофилла *а*+*в*, хлорофилла *а* или

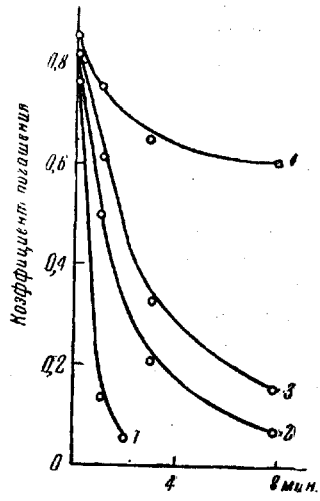


Рис. 3. Влияние концентрации каротина на кинетику фотовосстановления хлорофилла *а* аскорбиновой кислотой

Падение К в максимуме поглощения хлорофилла *а* (670 *ммк*) по мере фотовосстановления. *1* — в отсутствие каротина; при концентрациях каротина: *2* — $1{,}12 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{470} = 1$); *3* — $1{,}45 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{470} = 1{,}3$); *4* — $2{,}24 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{470} = 2$)

феофитина *а* и 10 *мг* аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя. Контролем служила та же реакционная смесь, только без каротина. После эвакуации воздуха производили освещение. О скорости фотовосстановления пигментов судили по падению К при 670 *ммк* при освещении раствора.

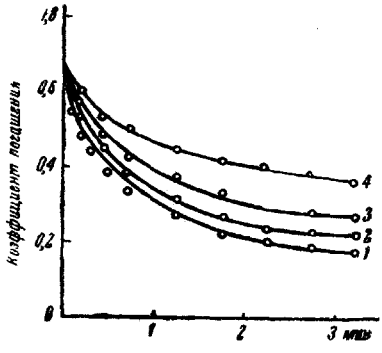


Рис. 4. Влияние концентрации каротина на скорость фотовосстановления феофитина *а* аскорбиновой кислотой

Падение К в максимуме поглощения феофитина *а* (670 *ммк*) по мере фотовосстановления. *1* — в отсутствие каротина; при концентрациях каротина: *2* — $1{,}12 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{470} = 1$); *3* — $2{,}24 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{470} = 2$); *4* — $6{,}72 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{470} = 6$)

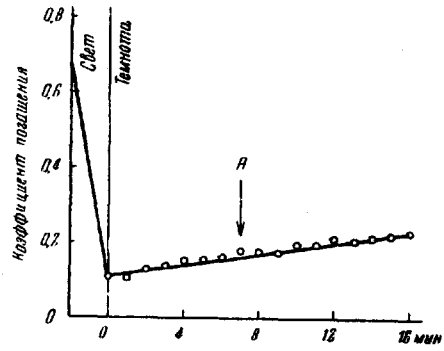


Рис. 5. Влияние каротина на скорость регенерации исходного хлорофилла *а* из его фотовосстановленной формы

Увеличение К в максимуме поглощения хлорофилла *а* (670 *ммк*) в темноте по мере его постепенной регенерации из фотовосстановленной формы. *А* — момент приливания каротина, растворенного в пиридине, из бокового отвода трубки Тунберга

Как видно из рис. 3, каротин замедляет скорость фотовосстановления хлорофилла *а*. По мере увеличения концентрации каротина в реакционной смеси этот эффект становится большим. Аналогичным образом каротин действовал и на фотовосстановление феофитина *а* (рис. 4), с той лишь разницей, что в данном случае для замедления реакции требовались относительно большие концентрации каротина. Чтобы установить влияние меньших концентраций каротина на фотовосстановление феофи-

тина *a*, реакцию проводили при меньшей интенсивности освещения (лампа накаливания 500 *вт*, напряжение 40 *в*), что замедляло процесс и делало измерения более точными. Поскольку каротин замедляет фотовосстановление, следовало предположить возможность его взаимодействия с фотовосстановленными формами пигментов.

Поэтому можно было бы ожидать, что раствор каротина, добавленный к восстановленной форме хлорофилла *a*, ускорил бы регенерацию исходного пигмента. Однако из рис. 5 видно, что приливание каротина из головки трубки Тунберга к фотовосстановленной форме хлорофилла *a* не ускоряет регенерацию исходного хлорофилла *a*. Каротин, таким образом, не взаимодействует с вторичной фотовосстановленной формой хлорофилла; однако на возможность обратимого взаимодействия каротина с первичной фотовосстановленной формой хлорофилла указывают опыты, проведенные в нашей лаборатории Евстигнеевым и Гавриловой [11]. Однако как показали наши опыты, «первичная» восстановленная форма феофитина *a* протофеофитина хорошо образуется и в присутствии каротина. По-видимому, хлорофилл образует более активные фотопродукты, обратимо реагирующие с каротином.

Действие каротина на фотосенсибилизированное хлорофиллом окисление аскорбиновой кислоты

Для того, чтобы проследить изменение действия каротина в зависимости от его состояния при переходе от истинного раствора к коллоидному, исследовали действие каротина в растворе ацетона и коллоидных растворах с разным содержанием воды (от 0 до 50%).

Пигменты растворяли в ацетоне. Концентрация каротина и хлорофилла в опыте была соответственно $0{,}28 \cdot 10^{-5}$ и $1{,}1 \cdot 10^{-5}$ *M* (при $K_{кар}$ (450 *ммк*) и $K_{хл}$ (660 *ммк*) равнялись 1). Опыты проводили на приборе Варбурга. В основной объем сосудика вводили растворы пигментов в ацетоне, ацетон и требуемое количество воды. В боковой отвод сосуда вводили раствор, содержащий 10 *мг* аскорбиновой кислоты. После термостатирования растворы сливали и наблюдали за поглощением кислорода в темноте 15 мин.) и при освещении (21 мин.).

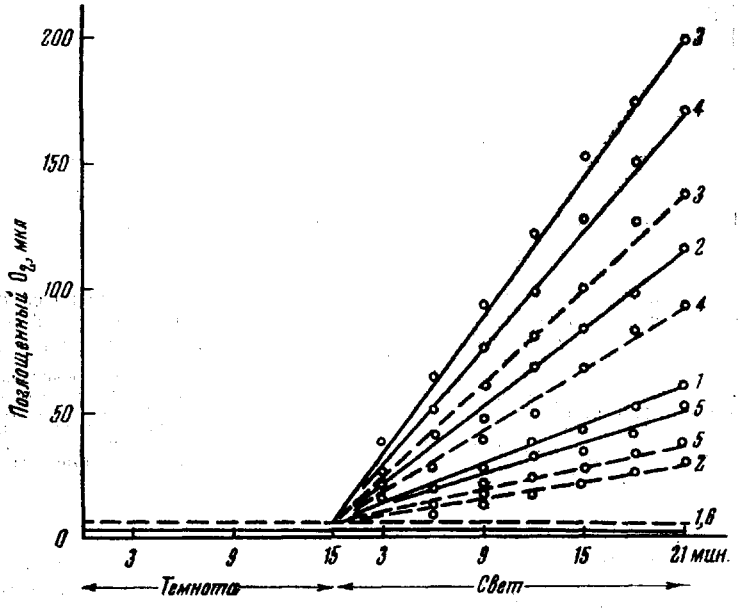


Рис. 6. Действие каротина на сенсибилизированное хлорофиллом фотоокисление аскорбиновой кислоты в системе ацетон — вода

1 — без H_2O; *2* — 10% H_2O; *3* — 30% H_2O; *4* — 40% H_2O; *5* — 45% H_2O; *6* — 50% H_2O. Сплошные линии — хлорофилл без каротина; пунктир — хлорофилл с каротином

Результаты этих опытов приведены на рис. 6. Из хода кривых видно, что каротин во всех случаях в той или иной степени тормозит сенсибилизирующее действие хлорофилла при фотоокислении аскорбиновой кислоты. Этот эффект уменьшается с увеличением количества воды в опытной смеси, т. е. с переходом от истинных растворов к коллоидным.

Действие каротина на сенсибилизированное хлорофиллом фотовосстановление метилового красного

Опыты проводили с истинными и коллоидными растворами пигментов. Концентрация хлорофилла в опытах с истинными растворами была $0{,}3 \cdot 10^{-5}$ *М* (К при 660 *ммк* = 0,28). Соотношение $K_{хл} : K_{кар}$ менялось от 0,1 до 10. Во все опыты брали равное количество аскорбиновой кислоты (10 *мг* в 0,5 *мл* H_2O) и одно и то же количество метилового красного. Общий объем опытной смеси — 5 *мл*. Реакцию проводили в вакууме в трубках Тунберга. Раствор освещали с интервалами в 30 сек. Непосредственно в трубке измеряли восстановление метилового красного по снижению коэффициента погашения при 520 *ммк*.

На рис. 7 представлены данные одного из опытов, где показано действие каротина на фотовосстановление метилового красного в ацетоновом растворе. Ход кривых показывает, что при соотношении $K_{хл} : K_{кар} = 1 : 10$ (кривые *1* и *2*) каротин существенно тормозит процесс; при соотношении 1 : 1 (кривая *3*) эффект значительно меньше и при соотношении 10 : 1 (кривая *4*) каротин уже не оказывает влияния на фотовосстановление метилового красного. Наличие индукционного периода, S-образная форма кривых может быть объяснена присутствием в среде кислорода, который удаляется путем сенсибилизированного его восстановления аскорбиновой кислотой. Сравнение спектров поглощения каротина до и после опыта свидетельствует о том, что каротин не претерпевает заметных изменений. В случае коллоидных растворов методика была несколько изменена.

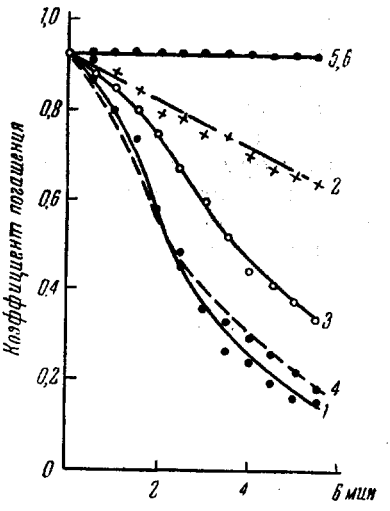


Рис. 7. Влияние концентраций каротина на фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилового красного

Падение К в максимуме поглощения метилового красного (520 *ммк*) по мере его фотовосстановления. *1* — в отсутствие каротина; при концентрациях каротина: *2* — $0{,}8 \cdot 10^{-5}$ *М* ($K_{450} = 2{,}8$); *3* — $0{,}8 \cdot 10^{-6}$ *М* ($K_{450} = 0{,}28$); *4* — $0{,}8 \cdot 10^{-7}$ *М* ($K_{450} = 0{,}028$); *5* — контрольный опыт в темноте с хлорофиллом; *6* — контрольный опыт в темноте в системе хлорофилл — каротин

В опыт брали коллоидные растворы пигментов, содержащие 20% ацетона и 80% воды, добавляли 10 *мг* аскорбиновой кислоты и равное количество метилового красного. Общий объем опытной смеси в вакуумной трубке во всех опытах — 5 *мл*.

Время эвакуирования — 3 мин. Концентрация хлорофилла во всех опытах была $0{,}6 \cdot 10^{-5}$ *М*. Исследовали действие трех концентраций каротина: $0{,}15 \cdot 10^{-4}$, $0{,}15 \cdot 10^{-5}$ и $0{,}15 \cdot 10^{-6}$ *М*. Освещение производили, как описано выше, 3, 5 и 7 мин. После освещения коллоидные растворы пигментов коагулировали добавлением 0,1 *мл* насыщенного раствора $MgCl_2$ и отфильтровывали через бумажный фильтр. После фильтрации измеряли К при 520 *ммк*. Предварительно было проверено, что при осаждении коллоидов не происходит изменения начальной величины К раствора, т. е. что метиловый красный не осаждается при коагуляции коллоидных растворов пигментов.

Проведенные опыты показали, что действие каротина на сенсибилизированное хлорофиллом фотовосстановление метилового красного отсутствует при переходе пигментов в коллоидное состояние, т. е. выцветание метилового красного протекает с одной и той же скоростью, независимо от присутствия разных количеств каротина в реакционной смеси. Следует отметить, что в данных условиях происходит падение величины К метилового красного также и в темновых контрольных опытах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение фотохимических свойств каротина показало его неактивность в испытанных реакциях фотовосстановления и сенсибилизации. В то же время каротин отчетливо тормозит следующие фотореакции хлорофилла: фотоокисление кислородом, фотовосстановление аскорбиновой кислотой и фотосенсибилизированные окислительно-восстановительные процессы. Это торможение наблюдается лишь тогда, когда хлорофилл и каротин находятся в одной фазе; коллоидный каротин не влияет на реакции коллоидного хлорофилла.

В свете изученного в нашей лаборатории механизма фотохимических реакций хлорофилла и его аналогов можно представить себе, что действие каротина реализуется при участии как физических, так и химических механизмов.

«Физические» механизмы. Взаимодействие каротина с хлорофиллом в возбужденном «синглетном» состоянии должно было бы проявиться эффектом тушения флуоресценции хлорофилла каротином. Однако нам не удалось наблюдать этого явления.

Возможность взаимодействия каротина с хлорофиллом в долгоживущем метастабильном «триплетном» состоянии рассматривается в работе Фуджимори и Ливингстона [6]. Однако как мы указали выше, в опытах этих авторов, по-видимому, происходит элементарное фотовосстановление, и каротин влияет на длительность жизни первичных фотовосстановленных форм. Таким образом остается открытым вопрос о возможности действия каротина на промежуточное образование долгоживущих возбужденных состояний хлорофилла.

«Химические» механизмы. В этом случае возможно обратимое взаимодействие с фотовосстановленными формами хлорофилла, например, следуя схеме: $X + AH \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH^+$ (элементарное фотовосстановление); $\cdot X^- + K \rightleftarrows X + \cdot K^-$ (перенос электрона на каротин); $\cdot K^- + \cdot AH^+ \rightarrow K + AH$ (регенерация каротина); где X — хлорофилл, AH — донатор электрона, K — каротин. Предполагаемое восприятие электрона обязательно обратимо, так как мы не обнаружили устойчивых изменений каротина после его освещения в вакууме в присутствии хлорофилла и аскорбиновой кислоты.

Такая возможность иллюстрируется нашими опытами, в которых было показано торможение фотовосстановления хлорофилла каротином [8] и опытами Евстигнеева и Гавриловой [11], показавших тормозящее действие каротина на образование первичной восстановленной формы хлорофилла. Правда, эти опыты не исключают возможности взаимодействия каротина с возбужденными молекулами хлорофилла. Дальнейшая работа должна послужить выяснению этого вопроса.

ВЫВОДЫ

Каротин не активен в реакциях фотовосстановления и фотосенсибилизации. Каротин тормозит все изученные фотохимические реакции хлорофилла: фотовосстановление, фотоокисление и фотосенсибилизацию окислительно-восстановительных процессов.

Явление торможения наблюдается лишь в том случае, если каротин и хлорофилл находятся в одной фазе — коллоидный каротин не влияет на фотореакции коллоидного хлорофилла.

Поступила в редакцию
18.VII.1959

ЛИТЕРАТУРА

1. Сапожников Д. И., Красовская Т. А. и Маевская А. Н., Докл. АН СССР **113**, 465, 1957.
2. Сапожников Д. И. и Бажанова Н. В., Докл. АН СССР **120**, 1141, 1958.
3. Aronoff S., Mackiney G., J. Amer. Chem. Soc. **65**, 956, 1943.
4. Pepkowitz L., J. Biol. Chem. **149**, 465, 1943.
5. Lynch V., French C., Arch. Biochem. and Biophys. **70**, 382, 1957.
6. Fujimori E., Livingston R., Nature **180**, 1936, 1957.
7. Красновский А. А., сб.: Проблемы химической кинетики, катализа и реакционной способности. Изд-во АН СССР, М., 1955; J. Chim. Phys., 968; 1958.
8. Красновский А. А., Биофизика **4**, 5, 1959.
9. Балаховский С. Д., Дроздова Н. Н. и Федорова В. Н., Биохимия **18**, 112, 1953.
10. Брин Г. П. и Красновский А. А., Биохимия **22**, 776, 1957.
11. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **127**, 198, 1959.

THE EFFECT OF CAROTENE ON THE PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CHLOROPHYLL

A. A. KRASNOVSKY, N. N. DROSDOVA and *E. V. PAKSHINA*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Carotene is inactive in the reactions of photoreduction and photosensitization. Carotene inhibits all the photochemical chlorophyll reactions studied, such as photoreduction, photooxidation and photosensitization of the oxidation-reduction processes. The inhibition is noted only on the condition that carotene and chlorophyll are in the same phase; colloid carotene does not affect the photoreactions of colloid chlorophyll.

Доклады Академии наук СССР
1960. Том 134, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Ю. Е. ЕРОХИН и И. Б. ФЕДОРОВИЧ

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ЗЕЛЕНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ И СОСТОЯНИЕ В НИХ БАКТЕРИОВИРИДИНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 21 V 1960)

Измерения спектров флуоресценции и поглощения пигментов непосредственно в живых фотосинтезирующих организмах, в процессе нарушения естественного состояния и в различных формах связи (растворы, коллоиды, твердые «пленки») позволяют получить данные относительно природы естественного состояния пигментов. Такие исследования ведутся в нашей лаборатории в течение ряда лет над разными организмами в филогенетическом аспекте.

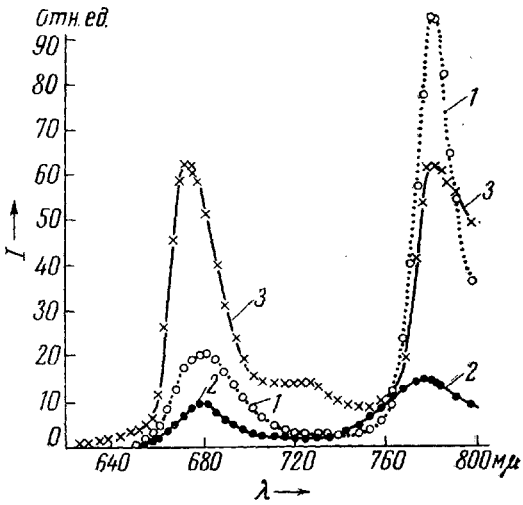


Рис. 1. Спектры флуоресценции суспензии зеленых бактерий при разных температурах: *1* — при —196°; *2* — при 20°, *3* — при —196° после нагревания до 100° (3 мин.)

Среди фотосинтезирующих бактерий чрезвычайно интересен род Chlorobium, являющийся по спектральным свойствам пигмента промежуточным между зелеными водорослями и пурпурными серными бактериями. Ранее мы уже сообщали (1) о спектральных и фотохимических свойствах пигмента зеленых бактерий (бактериовиридина). В настоящей работе детально изучались спектры флуоресценции этого пигмента непосредственно в живых бактериях и в модельных системах — пленках и истинных растворах. Хотя в литературе (2) имелись указания о флуоресценции зеленых бактерий, однако до наших измерений данные по спектрам флуоресценции, отсутствовали.

Работа велась с 7—10-дневными культурами зеленых бактерий Chlorobium thiosulfatophylum штамм С (3), любезно предоставленными нам кафедрой микробиологии Московского государственного университета. Чистый бактериовиридин получали с помощью хроматографии на сахарозе (1). Твердые пленки бактериовиридина получали путем испарения эфирных растворов в трубках Тунберга при откачивании вакуумным насосом.

Спектры поглощения бактерий, пленок и растворов измерялись на спектрофотометрах СФ-4 и регистрирующем СФ-2М. Обычно оптическая плотность суспензии бактерий в красном максимуме не превышала 1,5, а растворов и пленок 0,5.

Измерение флуоресценции велось в трубках Тунберга преимущественно при температуре —196°, с тем, чтобы избежать фотохимических измене-

ний. При записи спектров объекты помещались в прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом.

Флуоресценция объектов возбуждалась фокусированным светом ртутно-кварцевой лампы СВДШ-250, проходящим через комбинацию светофильтров СЗС-8, СЗС-9. Свет флуоресценции фокусировался на щель спектрографа ИСП-51 (обычно ширина щели 0,1 мм) и регистрировался с помощью фотоэлектрической приставки ПС-381 с фотоумножителем ФЭУ-22 и самопишущего потенциометра.

На основании спектральной чувствительности установки, измеренной путем фотометрирования ленточной лампы, в кривые спектров флуоресценции были внесены соответствующие поправки.

На рис. 1 и 2 представлены спектры поглощения и флуоресценции суспензии зеленых бактерий при комнатной и низкой температурах, а также суспензии, предварительно нагретой до 100° в течение 3 мин.

Спектр флуоресценции и поглощения чистого бактериовиридина в растворе сходен со спектром хлорофилла а. Низкая температура практически не влияла на положение максимумов флуоресценции (675 и 725 мμ), но увеличивала интенсивность свечения. Однако в живых бактериях вид спектра флуоресценции сильно отличается от зеленых растений и водорослей. Ранее уже указывалось [1], что спектры поглощения бактерий имели небольшой максимум при 670 мμ и основной максимум при 740 — 750 мμ (рис. 2), первый из которых мы приписываем мономерной, а второй — агрегированной формам пигмента. В спектрах флуоресценции бактерий также наблюдаются два максимума при 680 и 780 мμ, которые следует приписать соответственно мономерной и агрегированной формам пигмента. Следует обратить внимание на то, что при низкой температуре интенсивность максимума при 780 мμ в несколько раз больше, чем при 680 мμ, в то время как при комнатной оба максимума равны по интенсивности, а замораживание до —196° лишь незначительно увеличивало интенсивность «мономерной» формы при 680 мμ. Это согласуется с поведением растворов, где пигмент находится в мономерной форме. Вероятно, максимум при 780 мμ принадлежит флуоресцирующей агрегированной форме; при замораживании выход ее флуоресценции значительно возрастал.

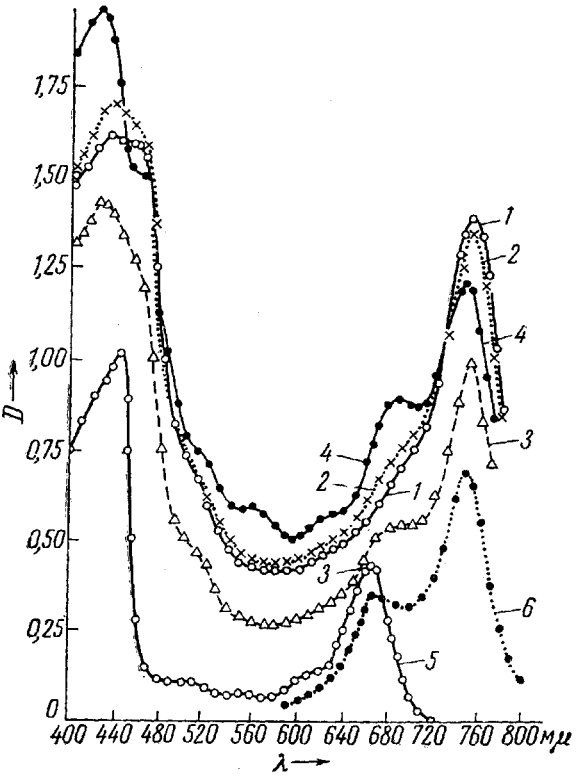


Рис. 2. Спектры поглощения зеленых бактерий, твердой пленки и раствора бактериовиридина. *1* — исходная суспензия, *2* — после добавления 5% пиридина, *3* — после добавления 30% спирта, *4* — после нагревания, *5* — раствор бактериовиридина в пиридине, *6* — твердая пленка пигмента, полученная испарением эфирного раствора

По-видимому, замораживание вызывало увеличение «жесткости» упорядоченной структуры и вело к более строгому отбору электронных пере-

ходов, что можно было наблюдать в наших опытах по сужению длинноволновых полос флуоресценции суспензии зеленых бактерий.

Для выяснения природы этих максимумов важно было установить, обладают ли флуоресценцией искусственно приготовленные агрегированные формы — твердые пленки чистого бактериовиридина. Действительно, наши измерения показали, что такие пленки обладали сильно сдвинутым в длинноволновую сторону, по сравнению с растворами, максимумом флуоресценции около 810 мμ (рис. 3).

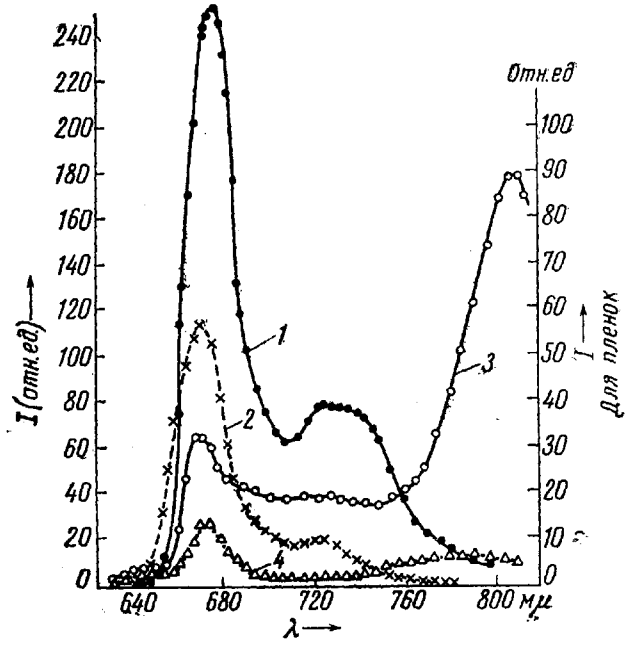


Рис. 3. Спектры флуоресценции раствора бактериовиридина в пиридине при —196° (*1*) и при 20° (*2*), твердой пленки при —196° (*3*) и 20° (*4*)

Интенсивность флуоресценции в этом максимуме при низкой температуре у пленок была (так же, как и у бактерий) значительно выше, чем при комнатной.

При наличии двух форм пигмента в бактериях представляло большой интерес исследовать их взаимопереходы при воздействии различных агентов. Так, нагревание до 100° вело к дезагрегации пигмента, что наблюдалось по увеличению максимума флуоресценции при 680 мμ и уменьшению максимума при 780 мμ. Аналогичная картина наблюдалась и в спектрах поглощения, где увеличивался «мономерный» максимум при 670 мμ и уменьшался «агрегированный» максимум при 740—750 мμ (рис. 1, *2*). Добавление к суспензии 5% пиридина или 30% этилового спирта, или 50% глицерина (после 2 час. стояния) вызывало нарушение организации упорядоченных агрегированных форм пигмента в естественном состоянии и приводило к значительным изменениям в спектрах флуоресценции. В спектрах поглощения в ряде случаев при этих воздействиях изменения были выражены крайне слабо (рис. 4, *2*).

По-видимому, в этих опытах извлечения пигмента в раствор не происходило, а наблюдалась лишь частичная дезагрегация. Мономерная форма была менее устойчива и (особенно при добавлении глицерина) быстро выцветала при освещении дневным светом при комнатной температуре. При увеличении концентрации растворителя (пиридина) в суспензии уже малые его количества вызывали резкое увеличение интенсивности «мономерной» флуоресценции.

Соотношение интенсивностей флуоресценции мономерной и агрегированной форм бактериовиридина при нарушении пиридином оказалось следующим:

Количество пиридина, %		$\frac{I_{680\ мμ}}{I_{780мμ}}$
Исходная суспензия	0	0,2
	5	2,7
	10	2,9
	50	6,6
	80	8,5
Пиридиновая вытяжка	~ 100	11,3

Таким образом, измерения спектров поглощения и флуоресценции указывают на то, что основная масса пигмента в зеленых бактериях, по-видимому, находится в агрегированном состоянии (пигмент — белково-липоидный комплекс), обладающем при низкой температуре интенсивной флуоресценцией при 780 мμ; меньшая часть — мономерна с флуоресценцией при 680 мμ. Соотношение между формами зависит от возраста культуры. Увеличение «мономерной» флуоресценции, наблюдавшееся у старых культур, вероятно, обусловлено разрушением упорядоченных структур при частичном автолизе клеток.

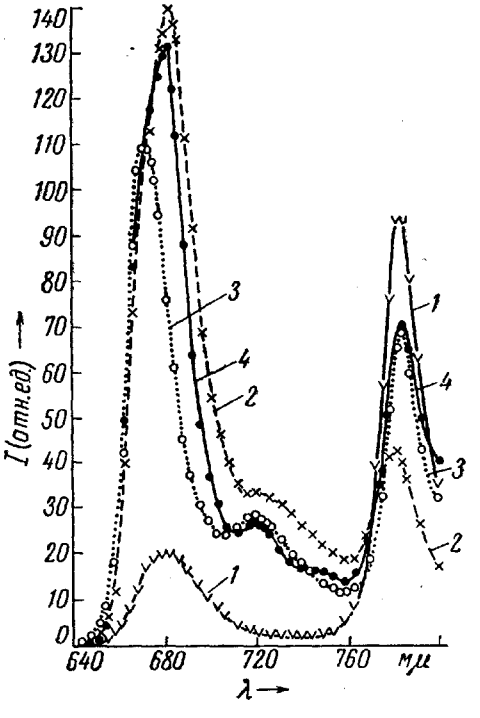


Рис. 4. Спектры флуоресценции зеленых бактерий при нарушении структуры: *1* — исходная суспензия, *2* — после добавления 5% пиридина, *3* — после добавления 30% спирта, *4* — после 2 час. стояния с 50% глицерина

Обнаруженное в данной работе влияние низкой температуры на увеличение интенсивности флуоресценции агрегированных форм по сравнению с мономерными может служить спектральным критерием наличия агрегированных форм в организмах.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. В. И. Шапошникову и Е. Н. Кондратьевой за предоставление культуры зеленых бактерий, с которой велась работа.

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

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 V 1960

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **127**, 913 (1959). [2] A. M. Williams, Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 571 (1956). [3] В. Н. Шапошников, Е. Н. Кондратьева, В. Д. Федоров, Микробиология, **27**, 529 (1958).

Доклады Академии наук СССР
1960. Том 135, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Е. В. ПАКШИНА

ОБРАТИМОЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ЕГО УЧАСТИЕ В ПРОЦЕССАХ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 6 VII 1960)

В 1951 г. в нашей лаборатории была обнаружена возможность обратимого фотохимического восстановления и окисления бактериохлорофилла и бактериофеофитина ([1]); недавно мы показали способность бактериовиридина к реакциям этого типа ([2]). В опытах Годхеера ([3]) были подтверждены наши данные об обратимом окислении бактериохлорофилла и была обнаружена возможность окисления пигмента системой Fe^{3+}/Fe^{2+}.

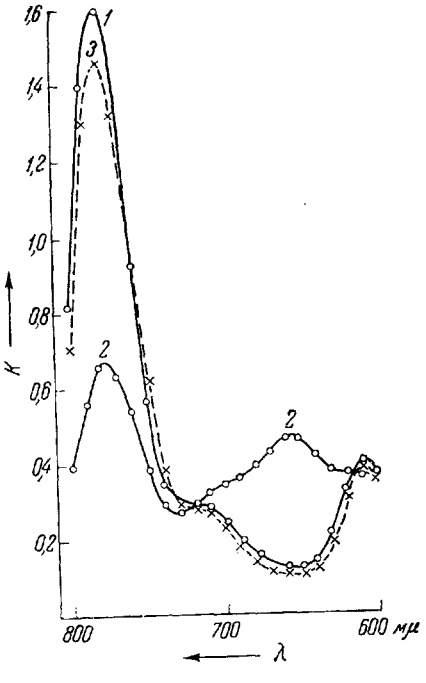


Рис. 1. Фотовосстановление бактериохлорофилла сернистым натрием (10 мг Na_2S в 0,1 мл воды на 4,5 мл пиридинового раствора). *1* — спектр поглощения до реакции; *2* — после освещения красным светом 10^5 эрг/см^2 · сек в течение 3 мин.; *3* — сразу после пуска кислорода воздуха

Для изучения природы первичных процессов бактериального фотосинтеза наиболее интересно исследование таких превращений бактериохлорофилла, которые сопровождаются «запасанием» энергии света в обратно реагирующих фотопродуктах. Это явление наблюдается при реакции фотовосстановления.

В настоящей работе описано образование активных фотопродуктов при фотовосстановлении бактериохлорофилла и их взаимодействие с молекулами — акцепторами электрона, участвующими в процессах биохимического переноса электрона при фотосинтезе.

Бактериохлорофилл мы выделяли из культуры Rhodopseudomonas palustris с конечной хроматографической очисткой ([4]). Фотореакции осуществляли в трубках Тунберга особой формы, допускающей измерение на спектрофотометрах Бекмана и СФ-4. В качестве донора электрона использовали характерный для бактериального фотосинтеза сернистый натрий.

В трубку Тунберга вводили 4,5 мл пиридинового раствора бактериохлорофилла ($10^{-5}M$), 0,1 мл воды и 10—20 мг сернистого натрия; эвакуировали при взбалтывании и освещали светом близкой инфракрасной области спектра (10^6 эрг/см^2 · сек; конденсированный свет лампы накаливания 500 вт, светофильтр RG-5). При освещении (30—60 сек.) наблюдалось резкое падение максимума поглощения бактериохлорофилла при 780 мμ и появление максимума фотовосстановленной формы при 660 мμ (рис. 1).

В темноте реакция идет самопроизвольно в обратном направлении с практически полной регенерацией бактериохлорофилла при комнатной температуре за несколько минут; при охлаждении до —15° обратная реакция замедлялась. Впуск воздуха в трубку приводил к мгновенной регенерации пигмента как при комнатной, так и при низкой температуре (рис. 2). Таким образом, в этих условиях образуется крайне активная фотовосстановленная форма пигмента и фотоокисленная форма донора электрона, вероятно, в согласии с элементарным процессом $X + SH^- \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot SH$ (где X — молекула бактериохлорофилла).

Потенциал инертного (платинового) электрода, помещенного в реагирующую систему пигмент — аскорбиновая кислота, при освещении изменяется в отрицательную сторону; в темноте восстанавливается исходное значение потенциала ([5], [6]). Появление фотопотенциала указывает на образование электродно-активных фотовосстановленных продуктов, отдающих свой электрон электроду.

Мы исследовали потенциал платинового электрода при освещении растворов пигментов с сернистым натрием; проведено сравнительное исследование хлорофилла а, бактериохлорофилла и бактериовиридина. Измерения проводились в пиридиновых растворах, против каломельного электрода,с помощью потенциометра ЛП-5, согласно схеме, принятой в нашей лаборатории ([6]).

Все исследованные пигменты показали сходную картину (рис. 3). При освещении потенциал электрода изменяется в отрицательную сторону приблизительно на 0,1 в; в темноте за 1—2 мин. происходит обратное изменение потенциала. Вероятно, все пигменты образуют электродно-активные фотовосстановленные продукты одного типа.

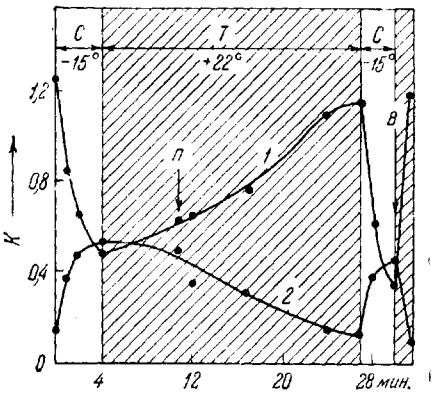


Рис. 2. Кинетика фотовосстановления и обратного окисления фотовосстановленной формы бактериохлорофилла. Изменение K : *1* — в максимуме поглощения бактериохлорофилла при 780 мμ; *2* — в максимуме поглощения восстановленной формы бактериохлорофилла при 660 мμ. *П*— приливание из головки вакуумной трубки 0,5 мл пиридина, *В* — пуск воздуха; *С* — свет, *Т* — темнота

Восприятие электрона от фотовосстановленной формы пигмента молекулами-акцепторами. В работах нашей лаборатории было показано, что в тройной системе (донор электрона — хлорофилл — акцептор электрона) не удается наблюдать накопления фотовосстановленных форм пигмента из-за их быстрой реакции с молекулами — акцепторами электрона ([7]). Когда молекулы-акцепторы «сенсибилизированно» восстановлены, начинается накопление фотовосстановленной формы пигмента-сенсибилизатора. Таким образом, отсутствие видимых фотохимических изменений пигмента-сенсибилизатора в тройной системе указывает на быструю реакцию молекул-акцепторов с фотовосстановленными формами пигментов. Этот «кинетический» метод часто более чувствителен, чем измерение количества «сенсибилизированно» восстановленных молекул, что бывает затруднительным из-за быстро идущих обратных реакций ([8]).

Мы испытали этим методом действие менадиона, феназинметасульфата и рибофлавина (флавинмононуклеотида), являющихся кофакторами фотосинтетического фосфорилирования.

В этом случае опыты ставили в трубках Тунберга с боковыми отводами. В центральную часть вводили пигмент с сернистым натрием в пиридине, в боковой отвод — раствор акцептора электрона в пиридине. После осве-

щения трубки проходила реакция с образованием синей фотовосстановленной формы бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 660 мμ; приливание (в вакууме, в темноте) акцептора из бокового отвода приводило к мгновенной регенерации бактериохлорофилла; это наблюдалось со всеми использованными соединениями.

При освещении этого раствора (тройной системы) обычно не удавалось наблюдать быстрого образования фотовосстановленной формы бактериохлорофилла за счет ее быстрого взаимодействия с присутствующими в растворе молекулами—акцепторами электрона: это отчетливо видно из рис. 4.

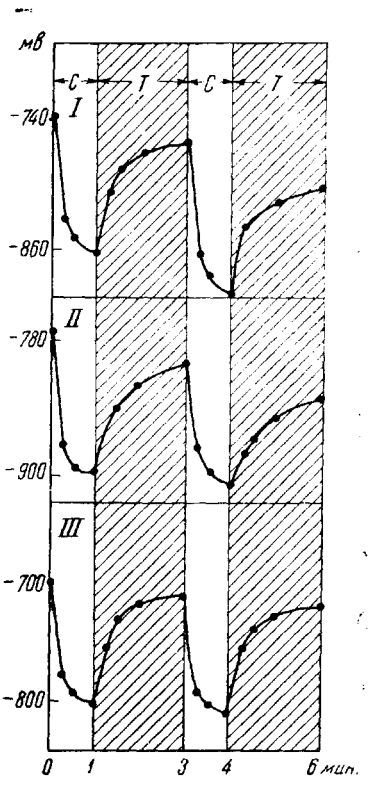


Рис. 3. Фотопотенциал Pt-электрода в пиридиновом растворе пигментов (10^{-5} *M*) с сернистым натрием ($3 \cdot 10^{-2}$ *M*): *I* —хлорофилла а, *II*— бактериохлорофилла, *III* — бактериовиридина; *C* — свет, *T* — темнота

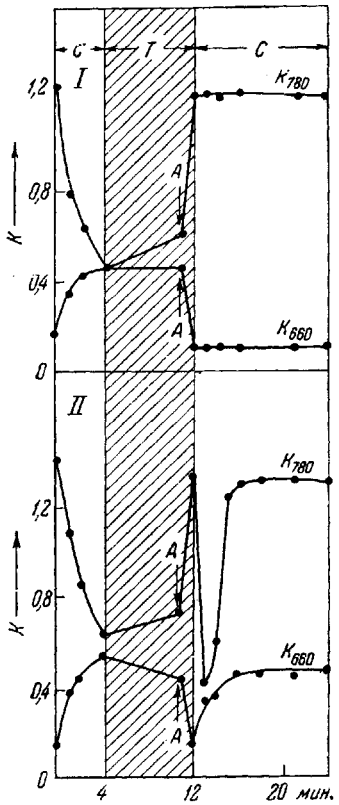


Рис. 4. Взаимодействие фотовосстановленной формы бактериохлорофилла с акцепторами электрона (—15°): *I* — рибофлавином, *II* — менадионом; *A* —приливание раствора акцептора (конечная концентрация 10^{-4} *M*), *C* — свет, *T* — темнота

Лишь после восстановления присутствующего акцептора электрона наступало восстановление бактериохлорофилла. Это явление наблюдалось наиболее отчетливо при относительно малой интенсивности освещения (10^3—10^4 эрг/см^2·сек). При очень интенсивном освещении (10^6 эрг/см^2·сек в присутствии феназинсульфата и менадиона этот период «задержки» фотовосстановления бактериохлорофилла трудно наблюдать, вероятно, из-за быстрого течения сенсибилизированной реакции. В отличие от этих соединений, в присутствии рибофлавина как при слабом, так и при интенсивном освещении наблюдается отчетливая задержка фотовосстановления бактериохлорофилла.

Следует указать на то, что при использовании феназинметасульфата его пиридиновый раствор при стоянии синеет, вероятно, из-за образования пиоцианина, который может играть роль более активного акцептора электрона

Приливание раствора менадиона к фотовосстановленной форме бактериохлорофилла ведет к мгновенной регенерации пигмента; при освещении полученной тройной системы наблюдается быстрое падение оптической плотности в максимуме бактериохлорофилла с последующим возвращением к прежнему положению в пределах 1 мин. освещения. Причины этого явления неясны; возможно, что при этом наблюдается фотовосстановление бактериохлорофилла восстановленной формой менадиона (за счет взаимодействия с Na_2S).

При взаимодействии менадиона с Na_2S образуется окрашенный продукт, поглощающий свет также в области 660 мμ; подъем оптической плотности в этой области (см. рис. 4) связан с образованием указанного продукта.

Таким образом рибофлавин, феназинметасульфат, менадион могут воспринимать электрон от фотовосстановленной формы бактериохлорофилла.

Эти опыты, проведенные в модельных системах, указывают на возможный путь участия кофакторов фотосинтетического фосфорилирования в цепи реакций переноса электрона, сенсилибизированных пигментной системой; об этом мы писали ранее ([9]). Следует выяснить течение элементарных процессов этого типа в живых фотосинтезирующих бактериях, где бактериохлорофилл находится главным образом в агрегированных упорядоченных формах ([10]).

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

Поступило
9 V 1960

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [2] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, 127, 913 (1959). [3] J. C. Goedheer, Biochim. et Biophys. Acta, 27, 478 (1958). [4] К. К. Войновская, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 626 (1953). [5] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 73, 1239 (1950). [6] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 92, 381 (1953). [7] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 87, 109 (1952). [8] А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948). [9] А. А. Красновский, Annual Rev. Plant Physiol., 11 (1960). [10] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952).

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Ф. Ф. Литвин, Ю. А. Владимиров, А. А. Красновский

Изучение люминесценции хлорофилла внесло существенный вклад в современные представления о первичных физических процессах, следующих непосредственно за актом поглощения света: о запасании, миграции и растрате энергии поглощенного кванта. Однако для фотосинтеза решающее значение имеет последующее превращение энергии кванта света в энергию химических соединений, которое осуществляется в процессе фотохимических реакций. Исследование хемилюминесценции в ходе реакций, обратных фотохимическим, представляется одним из наиболее перспективных путей познания природы и механизмов прямых фотохимических процессов фотосинтеза. Хемилюминесценция может быть обусловлена продуктами, возникающими на разных стадиях превращения энергии света в энергию химических соединений, поэтому ее всестороннее изучение открывает новые возможности исследования всей цепи последовательных процессов, связывающих первичный фотофизический акт с биохимическими ферментативными реакциями.

Хемилюминесценция хлорофилла и фталоцианина магния в растворах была обнаружена сравнительно давно, однако наблюдать ее удавалось лишь в жестких условиях (в кипящем тетралине, содержащем перекиси), в которых происходило разрушение молекулы пигмента [1,2]. Позднее хемилюминесценция хлорофилла была обнаружена в щелочном растворе, содержащем альдегиды. Явление также сопровождалось нарушением целостности молекулы и, по мнению самих авторов, вероятно, имеет интерес лишь с точки зрения химии хлорофилла [3].

Интерес биологов и физиков к явлению хемилюминесценции при фотосинтезе вызван появлением работ Стрелера и Арнольда и др., которые обнаружили и исследовали длительное послесвечение фотосинтезирующих организмов и суспензии хлоропластов [4,5]. В этих работах убедительно показана связь наблюдавшегося свечения с фотосинтезом, позволившая предположить, что это свечение было хемилюминесценцией [4,5]. Однако остаются невыясненными механизмы процессов наблюдаемого явления и прежде всего роль самого хлорофилла. Остается открытым основной вопрос, вызвана ли хемилюминесценция химическими превращениями хлорофилла и его фотопродуктов или же хлорофилл лишь высвечивает кванты, образующиеся в процессе рекомбинации других продуктов фотосинтеза [5]. В связи с этим нами была поставлена задача исследовать хемилюминесценцию при фотохимических реакциях в модельной системе, содержащей хлорофилл.

В качестве такой реакции была избрана реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла, которая, как известно, лежит в основе фотосенсибилизирующего действия хлорофилла в растворе [6]. Исследовалась также хемилюминесценция хлорофилла при фотоокислении в растворе, послесвечение и «термовысвечивание» пленок пигментов и хлоропластов.

При исследовании хемилюминесценции принципиальное значение приобретает чувствительность методов ее измерения, что обусловлено чрезвычайно низкой интенсивностью свечения. Поэтому измерения производились на установке для исследования сверхслабых свечений, собранной на основе фотоумножителя, охлаждаемого жидким азотом, и работающей в режиме счетчика фотонов [7].

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА

При реакциях обратимого окисления фотовосстановленных форм хлорофилла кислородом воздуха нами была обнаружена хемилюминесценция.

Фотовосстановление хлорофилла ($a+b$) в пиридиновом растворе в присутствии аскорбиновой кислоты производилось в вакуумной трубке Тунберга. Раствор эвакуировался с помощью масляного насоса и освещался в течение 5 минут при комнатной температуре фокусированным светом 500-ваттной лампы накаливания через водный (тепловой) и красный светофильтр (КС-2 или КС-10).

После освещения трубка Тунберга помещалась перед окном сосуда Дьюара с фотоумножителем, и в темноте, при сильном перемешивании, производился пуск воздуха и добавление раствора аммиака, ускорявшего обратные реакции [8]. Затухание хемилюминесценции регистрировалось в интервале от 5 сек. до 5 мин. от момента пуска кислорода.

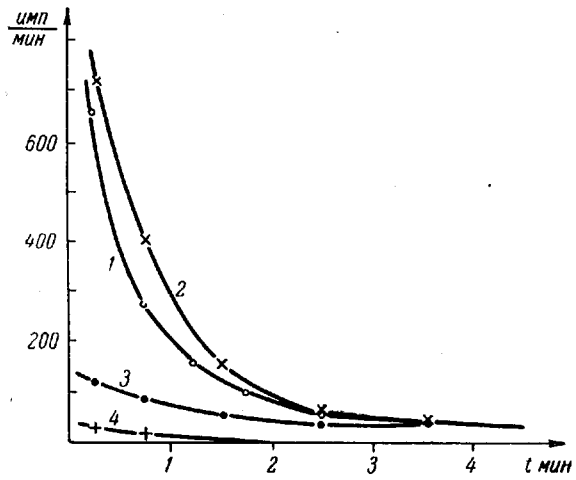


Рис. 1. Послесвечение листьев и хемилюминесценция раствора хлорофилла.

1—зеленый лист фасоли, *2*—хемилюминесценция при окислении фотовосстановленных форм хлорофилла (5 *мл* пиридинового раствора хлорофилла (D=1 при 668 *ммк*) +2,4 *мг* аскорбиновой кислоты, после освещения пуск O_2 и добавление 0,1 *мл* 10%-ного раствора аммиака), *3*—то же, но с 0,1 *мг* аскорбиновой кислоты, *4*—то же но без аскорбиновой кислоты. По ординате—относительная интенсивность свечения—число импульсов за 1 *мин*. Масштаб для кривой *1* уменьшен в 4 раза.

Кривая затухания хемилюминесценции при окислении фотовосстановленных форм приведена на рис. 1. Обращает внимание сходство этой кривой с кривой затухания хемилюминесценции листа фасоли, полученной в одинаковых условиях освещения и измерения, а также тот факт, что хемилюминесценция раствора лишь в 4 раза уступает по интенсивности свечению листа (при этом следует учитывать меньшую концентрацию хлорофилла в растворе).

Результаты более детальных исследований наблюдавшихся процессов можно свести к следующему:

1) Хемилюминесценция обусловливается обратными реакциями окисления фотовосстановленных форм хлорофилла. Для ее появления необходим каждый из факторов, существенных для фотовосстановления (хлорофилл, аскорбиновая кислота, освещение раствора в вакууме). В отсутствие фотовосстановления при освещении растворов в вакууме хемилюминесценция либо весьма слаба, либо не наблюдается. С увеличением количества аскорбиновой кислоты свечение усиливается. Хемилюминесценция появляется только при пуске кислорода после фотовосстановления хлорофилла и резко усиливается при добавлении аммиака, ускоряющего обратные реакции фотовосстановленных форм хлорофилла. Кривые кинетики хемилюминесценции при разных условиях проведения фотовосстановления и обратных реакций изображены на рис. 1 и 2.

Хемилюминесценция наблюдалась нами также в случае фотовосстановления чистого хлорофилла *а* и его аналога феофитина *а*.

Существенно, что эффект сохраняется при замене аскорбиновой кислоты другим донатором водорода—фенилгидразином. При использовании фенилгидразина (0,2 *мл* на пробу) интенсивность свечения значительно превышает описанные выше эффекты с аскорбиновой кислотой.

Добавление к раствору красителей (метиловый красный и нейтральный красный), которые, являясь акцепторами водорода, подавляют фотовосстановление [6], приводило к подавлению хемилюминесценции.

2) Квант хемилюминесценции, по-видимому, высвечивается молекулой хлорофилла. Измерения спектра хемилюминесценции в настоящее время не удалось осуществить ввиду ее низкой интенсивности. Однако опыты со светофильтрами показали, что спектр хемилюминесценции лежит в спектральной области люминесценции хлорофилла (665—800 *ммк*), пропускаемой светофильтром КС-13. Светофильтр СЗС-10, пропускающий в широкой спектральной области от 400 до 660 *ммк*, пропускал не более 1,5% света хемилюминесценции.

3) Ответственной за хемилюминесценцию, по-видимому, является не вторичная («красная») фотовосстановленная форма хлорофилла, а какие-то иные промежуточные

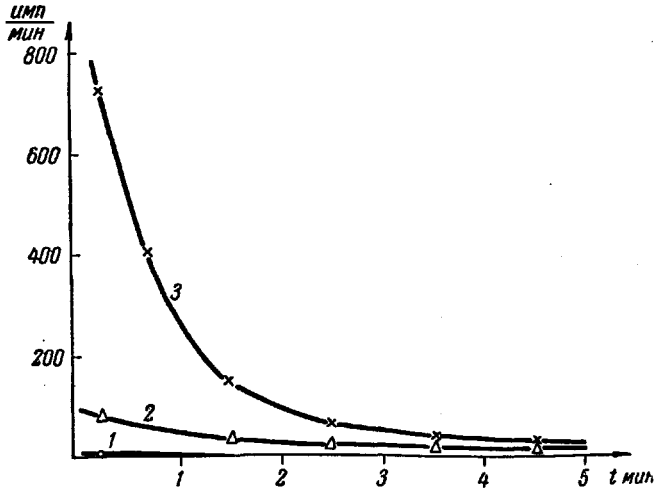


Рис. 2. Зависимость хемилюминесценции от кислорода и аммиака.

1—послесвечение раствора сразу после фотовосстановления без O_2, *2*—то же $+O_2$, *3*—то же $+O_2+0{,}1$ *мл* аммиака. Остальные условия те же, что на рис. 1, кривая *2*.

соединения, лежащие на пути окисления от вторичной формы к хлорофиллу. Прежде всего наблюдения показали отсутствие пропорциональности между глубиной фото-

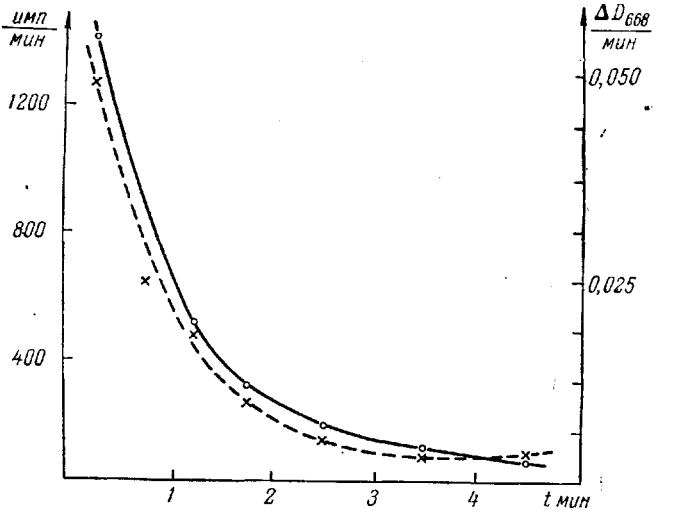


Рис. 3. Кинетика хемилюминесценции и скорость изменения оптической плотности ($D668$ *ммк*) при окислении фотовосстановленных форм хлорофилла.

Сплошная кривая—хемилюминесценция (условия те же, что на рис. 1 кривая *2*), пунктир—скорость изменения оптической плотности раствора при $\lambda=668$ *ммк* $\left(\frac{D668\ ммк}{\text{время}}\right)$.

восстановления и интенсивностью хемилюминесценции. Хемилюминесценция наблюдалась даже в тех опытах, где фотовосстановление феофитина *a* проводилось при температуре —40° С, т. е. в таких условиях, когда вторичная фотовосстановленная

форма пигмента вообще не образуется. Наконец, в пользу того, что хемилюминесценция обусловлена окислением промежуточных фотовосстановленных форм, свидетельствуют результаты сопоставления затухания хемилюминесценции с изменением оптической плотности раствора. Эти измерения в ходе обратных реакций окисления фотовосстановленных форм проводились на регистрирующем спектрофотометре СФ-2М в условиях опытов, идентичных с опытами по исследованию хемилюминесценции. Измерение оптической плотности раствора после пуска кислорода и аммиака проводилось в максимуме поглощения вторичной фотовосстановленной формы 525 *ммк* и в красном максимуме поглощения хлорофилла *a*.

Было обнаружено, что при пуске кислорода и аммиака происходит практически мгновенное (менее чем за 5 сек.) уменьшение поглощения при 525 *ммк*, которое не сопровождалось вспышкой хемилюминесценции. В дальнейшем ходе обратных реакций в интересующем нас интервале времени (от 5 сек. до 5 мин.) поглощение при 525 *ммк* остается неизменным (с точностью $\pm 0{,}002$).

В противоположность этому увеличение оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла при его регенерации из фотовосстановленных форм не заканчивается быстрой стадией (до 5 сек.), а продолжается с меньшей скоростью в течение всего интервала времени от 5 сек. до 5 мин. Кривая скорости изменения оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла и кривая затухания хемилюминесценции весьма близки по форме (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что хемилюминесценция обусловлена окислением промежуточных форм пигмента, лежащих на пути от вторично восстановленной формы к хлорофиллу.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ ФОТООКИСЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТВОРЕ

Исследовались пиридиновые растворы смеси хлорофиллов *a* и *b*, чистого хлорофилла *a* и феофитина *a*. Неэвакуированные растворы освещались так же, как описано выше, и затем (через 5 сек.) измерялось их свечение, пропускаемое красным светофильтром КС-13. На рис. 4 изображены кривые затухания хемилюминесценции

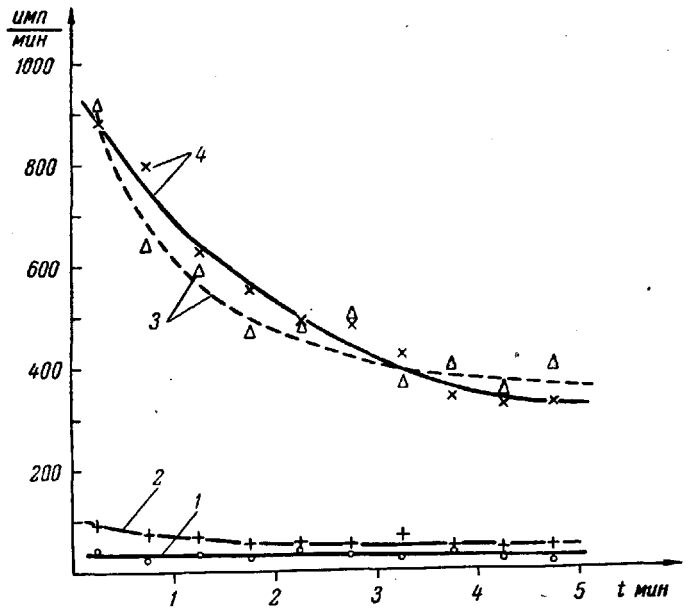


Рис. 4. Хемилюминесценция раствора хлорофилла в пиридине.

1—после освещения раствора в вакууме, *2*—после освещения раствора в вакууме с последующим пуском воздуха, *3*—после освещения неэвакуированного раствора, *4*—то же, но с добавлением олеиновой кислоты перед освещением.

после освещения растворов хлорофилла на воздухе. Обращает на себя внимание быстрое затухание свечения в первые минуты и наличие длительной, медленно затухающей компоненты.

Добавление олеиновой кислоты в освещаемые растворы не оказывало дополнительного эффекта. Растворы, освещенные в вакууме, и неосвещенные растворы на

воздухе давали незначительные эффекты, сравнимые с величиной фона. Слабая хемилюминесценция наблюдалась при освещении растворов в вакууме с последующим пуском воздуха. Интересно отметить, что в некоторых случаях добавление к раствору перед освещением таких веществ, как аскорбиновая кислота, красители и др., усиливало хемилюминесценцию.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ПЛЕНКАХ И ХЛОРОПЛАСТАХ

Известно, что в фотосинтезирующих клетках хлорофилл находится в состоянии, отличном от его состояния в растворе. Высокая концентрация пигмента, упорядоченность и наличие многокомпонентного химически разнородного окружения—все это, по-видимому, может сказаться на хемилюминесценции хлорофилла в этих условиях. В связи с этим представляет интерес исследовать хемилюминесценцию хлорофилла в таких модельных системах, как пленки чистых пигментов, пленки, полученные из экстрактов листьев, и пленки хлоропластов. Арнольд и Шервуд обнаружили свечение пленок хлоропластов, наблюдавшееся ими после освещения пленок с последующим нагреванием (термовысвечивание) [9]. Это явление объяснялось авторами запасанием электронов в полупроводниковых ловушках, с последующим высвечиванием энергии при нагревании. Один из нас указал на то, что этот эффект может быть связан с хемилюминесценцией хлорофилла в пленках [10]. В более поздней работе Арнольд и Шервуд допускали также возможность объяснения термовысвечивания хемилюминесценцией [11]. В связи с этим представляют интерес наблюдения этих авторов о том, что в присутствии кислорода (но не в атмосфере азота) пленки хлоропластов получают заряд, т. е. запасают энергию [11]. В целях выяснения природы явления представляло интерес исследовать наряду с послесвечением также и «термовысвечивание» пленок хлоропластов и пигментов.

Пленки хлорофилла ($a+b$) получались растворением кристаллического препарата в этиловом спирте с последующей отгонкой растворителя под вакуумом в трубке Тунберга. После получения достаточно равномерной пленки на внутренней поверхности трубки Тунберга в течение 15—20 мин. проводилась дополнительная эвакуация для удаления остатка растворителя. Описанный способ позволял исследовать свечение пленок в различной среде (вакууме, кислороде, азоте) и при разных температурах. Спиртовые экстракты получены из листьев сахарной свеклы и фасоли при растирании их в ступке с добавлением $CaCO_3$. Пленки из них приготавливались описанным выше способом.

Для получения пленок из гомогенатов листья сахарной свеклы или фасоли растирались в ступке на холоду при добавлении небольшого количества буферного раствора ($^1/_{15}M$ Na_2HPO_4). Гомогенат отжимался через полотно и переносился в трубку Тунберга для получения пленки. Отдельные опыты проводились с суспензией хлоропластов, отмытых дистиллированной водой. Полученные пленки освещались через водный (тепловой) и красный (КС-2) светофильтр фокусированным светом 500-ваттной лампы накаливания. Через 5—10 сек. образцы помещались перед окошком фотоумножителя, и их свечение при комнатной температуре регистрировалось через интервалы в 10 сек. в течение 3 мин. Затем трубка Тунберга нагревалась специальным нагревателем до температуры 80° С. Температура устанавливалась в течение 15 сек.,

Таблица I

Послесвечение и термовысвечивание пленок, освещавшихся при комнатной температуре

Материал для приготовления пленки	Газовая среда при освещении	Послесвечение, имп/3 мин.$\times 10^3$	Термовысвечивание, имп/6 мин.$\times 10^3$
Свежий гомогенат листьев сахарной свеклы	вакуум	1,00	5,64
Та же пленка после повторных освещений	»	0,09	0,71
Та же пленка	кислород	1,02	10,20
Спиртовый экстракт из листьев сахарной свеклы	вакуум	0,06	1,75
Та же пленка	кислород	1,30	4,87
Спиртовый раствор хлорофиллов $a+b$	вакуум	0,06	0,96
Та же пленка	кислород	0,14	0,97

после чего на 5—12-й минуте после освещения измерялось термовысвечивание пленок. Результаты опытов с пленками пигментов и хлоропластов можно свести к следующему:

1) На всех типах пленок обнаруживается как свечение при комнатной температуре, затухающее через 5 мин. после освещения, так и термовысвечивание, обнаруживающееся при последующем нагревании образца. Эффект незначителен у пленок чистых пигментов, более выражен для пленок, полученных из экстрактов, и максимален для пленок хлоропластов (см. таблицу I и рис. 5).

2) Послесвечение при комнатной температуре и в особенности термовысвечивание существенно зависят от наличия кислорода при освещении. В пленках хлоропластов и экстрактов, повторно освещавшихся в вакууме, послесвечение и термовысвечивание приобретают фоновый характер. При освещении в присутствии кисло-

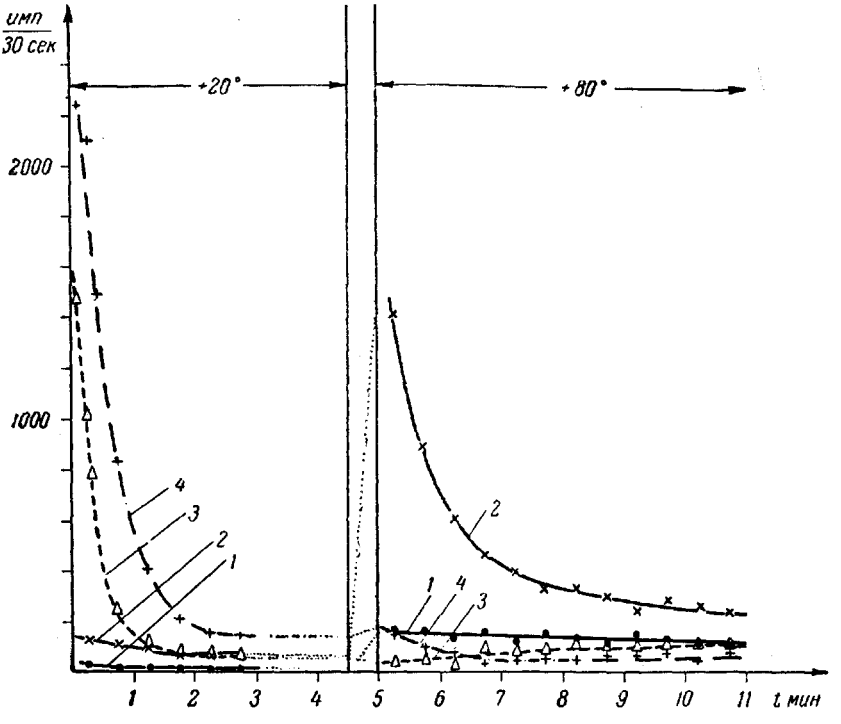


Рис. 5. Послесвечение и термовысвечивание пленок гомогенатов листьев сахарной свеклы.

1—пленка, освещавшаяся при комнатной температуре в вакууме, *2*—то же при освещении в кислороде, *3*—пленка, освещенная в кислороде при —196° С, *4*—пленка освещенная в вакууме при —196° С.

рода в этих пленках появляется интенсивное послесвечение и термовысвечивание. Это свечение не уменьшается при многократных повторениях опыта в кислороде. Последующая эвакуация трубки или замена кислорода азотом приводит снова к падению интенсивности свечения до уровня фона небольшого по величине и почти постоянного во времени.

3) Свежеприготовленные пленки хлоропластов, освещенные в первый раз, обнаруживают даже в вакууме интенсивное послесвечение при комнатной температуре и термовысвечивание, которые однако исчезают при последующих освещениях пленки в отсутствие кислорода. По-видимому, это явление объясняется тем, что свежеприготовленные пленки содержат некоторое количество окислителей, запас которых исчерпывается при повторных освещениях.

4) Термовысвечивание пленок хлоропластов наблюдалось, если образцы освещались в кислороде при температурах +20° С и —55° С, но отсутствовало, когда пленка освещалась при температуре жидкого азота, что соответствует наблюдениям Арнольда и Шервуда [9].

5) Если освещать пленки хлоропластов при температуре жидкого азота, то у них появляется очень интенсивное быстро затухающее послесвечение, которое в противоположность послесвечению при комнатной температуре не активировалось, а

по-видимому, даже угнеталось кислородом. Весьма вероятно, что это низкотемпературное послесвечение, протекающее по уравнению первого порядка, обусловлено высвечиванием энергии, запасенной на триплетных уровнях—возможность, на которую указывал А. Н. Теренин [12].

ОБСУЖДЕНИЕ

При обсуждении явления послесвечения фотосинтезирующих организмов Стрелером и сотрудниками была предложена схема, согласно которой высвечивание кванта света происходит при обратных реакциях гипотетических первичного восстановителя и первичного окислителя [5]. Хлорофилл, по мнению этих авторов, не ответственен за хемилюминесценцию, так как он не принимает прямого участия в химических реакциях фотосинтеза и выполняет лишь роль чисто физического сенсибилизатора, не изменяясь химически. Основной аргумент, приводимый авторами в подтверждение этих взглядов, основывается на результатах измерений дифференциальных спектров фотосинтезирующих организмов, при освещении которых не удавалось обнаружить падения поглощения в красном максимуме хлорофилла, которое бы соответствовало хорошо известному увеличению поглощения в области 520 *ммк*.

Однако в недавней работе [13] Колеман и Рабинович обнаружили наличие такого параллелизма между увеличением поглощения в области 520 *ммк* и падением его в максимумах хлорофилла при освещении фотосинтезирующих клеток (хлорелла). Эти эффекты рассматриваются авторами как результат фотовосстановления хлорофилла, осуществляющегося в живой клетке.

С точки зрения схемы Стрелера трудно объяснить также без дополнительных допущений тот весьма существенный факт, что длительное послесвечение при фотосинтезе по спектру совпадает с флуоресценцией хлорофилла. Обнаруженная нами хемилюминесценция при окислении фотовосстановленных форм также, по-видимому, принадлежит хлорофиллу.

Результаты, полученные нами в опытах с фотовосстановлением и с фотоокислением хлорофилла в растворе, позволяют, по нашему мнению, сделать вывод о том, что длительное послесвечение листьев, фотосинтезирующих организмов и суспензии хлоропластов, исследовавшееся Стрелером, Арнольдом и сотрудниками, может быть объяснено хемилюминесценцией хлорофилла и продуктов его фотовосстановления при их окислении в ходе обратных реакций фотосинтеза. Этот вывод согласуется с представлениями о непосредственном химическом участии молекул хлорофилла в реакциях, связанных с переносом электронов при фотосинтезе.

В опытах с пленками было обнаружено, что послесвечение и термовысвечивание пленок хлоропластов зависят от присутствия кислорода при освещении. Это обстоятельство, а также тот факт, что термовысвечивание отсутствует при освещении образца при температуре жидкого азота, свидетельствуют о химической природе процессов, вызывающих свечение. По-видимому, наблюдаемые факты лучше согласуются с представлением о запасании энергии квантов хлоропластами не в полупроводниковых ловушках электронов [9,11], а в виде богатых энергией продуктов фотохимических реакций. Существование нескольких значений энергии активации процесса термовысвечивания, свидетельствующее, по мнению Арнольда и Шервуда, в пользу полупроводникового механизма свечения (мультиплетность уровней ловушек), может быть объяснено с точки зрения хемилюминесценции наличием нескольких реакций, скорость которых в различной степени зависит от температуры.

Таким образом, длительное послесвечение фотосинтезирующих клеток и тканей гомогенатов, хлоропластов, и растворов пигментов, а также термовысвечивание хлоропластов имеет, вероятно, общую природу, т. е. обусловлено хемилюминесценцией хлорофилла, хотя конкретные механизмы процессов, по-видимому, различны в разных случаях.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена и исследована красная хемилюминесценция при обратном окислении промежуточных фотовосстановленных форм хлорофилла и хемилюминесценция при освещении растворов хлорофилла на воздухе.

2. Исследовано послесвечение и термовысвечивание пленок хлоропластов, экстрактов и чистых пигментов и зависимость этих эффектов от температуры и наличия кислорода при освещении. Затухающее термовысвечивание и послесвечение наблюдается только при наличии кислорода при освещении. Термовысвечивание не происходит, если пленки хлоропластов освещаются при температуре жидкого азота. В этих условиях возникает интенсивное послесвечение не активирующееся кислородом.

3. Можно полагать, что длительное послесвечение фотосинтезирующих клеток и тканей, суспензий хлоропластов и растворов пигментов, а также термовысвечивание хлоропластов имеют общую природу, т. е. обусловлены хемилюминесценцией фотопродуктов, хлорофилла, хотя конкретные механизмы, очевидно, различны в разных условиях.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. I. H. Helberger, Naturwissenschaften **26**, 316 (1938).
2. P. Rothemund, J. Amer. Chem. Soc. **60**, 2005 (1938).
3. A. G. Ferrari, B. L. Strehler, W. E. Arthur, Research in Photosynthesis, Inter. N. Y. 1957, p. 45.
4. B. L. Strehler, W. H. Arnold, J. Gen. Physiol **34**, 809 (1951).
5. B. L. Strehler, V. H. Lynch, Arch. Biochem. and Biophys. **70**, 527 (1957).
6. А. А. Красновский, Журн. физ. хим. **30**, 968 (1956); J. Phys. Chem. (1958), 968.
7. Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин, Биофизика **4**, 601 (1959).
8. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН СССР **120**, 58 (1958).
9. W. H. Arnold, H. K. Sherwood, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **43**, 105 (1957).
10. А. А. Красновский, Биофизика **4**, 3 (1959).
11. W. H. Arnold, H. K. Sherwood, J. Phys. Chem. **63**, 2 (1959).
12. А. Н. Теренин, Acta Physikochem. USSR (1943).
13. J. W. Coleman, E. Rabinowitch, J. Phys. Chem. **63**, 30 (1959).

Доклады Академии наук СССР
1960. Том 135, № 6

БИОХИМИЯ

Ф. Ф. ЛИТВИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. Т. РИХИРЕВА

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 27 VIII 1960)

Изучение спектральных свойств хлорофилла в растении дает возможность судить о специфике естественного состояния хлорофилла и его роли в процессах фотосинтеза. Исследованиями одного из нас с сотрудниками было установлено наличие в листьях растений нескольких форм хлорофилла, различающихся по фотохимической активности и спектральным свойствам (1). В последнее время данные о существовании нескольких форм хлорофилла в растениях нашли свое подтверждение в работах Френча при исследованиях живых объектов методом производной спектрофотометрии (2).

Для выяснения природы естественного состояния хлорофилла особое значение приобретают чувствительные методы флуоресцентной спектрофотометрии. При исследовании заключительных стадий образования хлорофилла по низкотемпературным спектрам флуоресценции наряду с максимумами, отмечавшимися ранее (675 и 680 мμ) (3), нами был обнаружен интенсивный максимум около 690 мμ, появляющийся в первые минуты освещения этиолированных листьев (4). Этот максимум свойствен также взрослым зеленым листьям и принадлежит, по-видимому, особой нативной форме пигмента (5). В недавних исследованиях спектров флуоресценции ряда водорослей (2) было установлено, что форма спектральных кривых указывает на существование нескольких компонентов, принадлежащих, по-видимому, различным формам хлорофилла. В сообщении Броди (6) был описан эффект резкого увеличения интенсивности флуоресценции хлорофилла в области 720 мμ при охлаждении объекта до температуры жидкого азота, что свидетельствует, по мнению автора, «о новом возбужденном состоянии» хлорофилла. К сожалению, автор не останавливается на методике измерений и не обсуждает вопроса о возможном влиянии эффекта реабсорбции флуоресценции на полученные результаты. В работах нашей группы было обнаружено сильное влияние охлаждения на величину максимумов флуоресценции агрегированных форм бактериовиридина (7).

В данной работе нами исследовались спектры флуоресценции листьев растений и их изменение в процессе зеленения и при действии агентов, нарушающих естественное состояние пигмента. Измерения проводились на установке, описанной ранее (5). Флуоресценция возбуждалась (со стороны передней стенки сосуда с объектом) ртутнокварцевой лампой в области 380—580 мμ и регистрировалась фотоумножителем с записывающим устройством. Объект помещался в прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом.

Действие низкой температуры на спектры флуоресценции листьев. Как видно из рис. 1 *а*, охлаждение до —196° приводит к резкому изменению спектра флуоресценции листьев. Наиболее существенные изменения происходят в длинноволновой области (730—740 мμ), где интенсивность флуоресценции увеличивается во много раз. Вместе с тем появляется новый максимум в области 693—696 мμ и отчетливо обнаруживается структура как в коротковолновой (см. рис. 1*б*), так и в длинноволновой области спектра, на что мы обратили внимание

раньше ([5]). Существенно отметить, что сходная структура (менее резкая) проявляется и в спектре, измеренном при комнатной температуре. Описанный эффект увеличения относительной интенсивности флуоресценции в области 730—740 мμ не может объясняться реабсорбцией флоуоресценции, так как он обнаруживается и на гомогенатах листьев в условиях измерения, практически исключающих реабсорбцию, в слоях толщиной 15 μ (см. рис. 1*в*).

Следует отметить, что при измерении спектров поглощения листьев на спектрофотометре со сферой Ульбрихта не было обнаружено сколько-нибудь значительных изменений спектра при охлаждении листа до —190° в области 600—750 мμ.

Таким образом, понижение температуры значительно увеличивает квантовый выход флуоресценции тех форм хлорофилла, которые обладают максимумами в области 693—696 и 730—740 мμ.

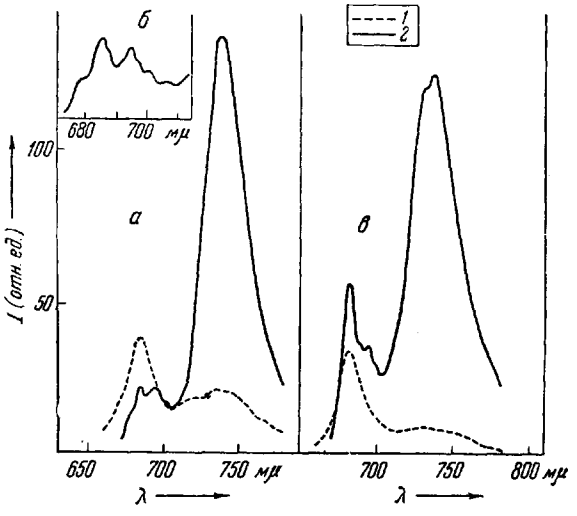


Рис. 1. Влияние низкой температуры на спектры флуоресценции листьев фасоли (*а*, *б*) и их гомогенатов (*в*). *1* — при комнатной температуре, *2* — при — 196°. Толщина слоя гомогената 15 μ

Влияние воздействий, нарушающих естественное состояние. Различные нативные формы хлорофилла могут отличаться по чувствительности в отношении дезагрегирующих воздействий и агентов, нарушающих связь с белками и липоидами. Поэтому данные о влиянии этих воздействий на спектры флуоресценции существенны как для изучения различных форм пигмента, так и для выяснения их природы. Как видно из рис. 2*а*, нагреваниедо 100° резко изменяет низкотемпературный спектр флуоресценции листа, приближая его к спектру, измеренному при комнатной температуре. При этом наблюдается значительное уменьшение флуоресценции при 730—740 мμ и исчезновение максимума в области 690 мμ. Сходные результаты получены при измерении спектров гомогенатов (рис. 2*б*). При инфильтрировании листа 10% раствором пиридина в воде изменения спектра менее выражены (рис. 2*а*), однако воздействие 5% пиридина на гомогенат приводит к падению интенсивности длинноволнового максимума и исчезновению структуры в коротковолновой области спектра (рис. 2*б*). Действие пиридина на спектры гомогенатов отчетливо проявляется и при значительно меньших концентрациях (0,5 — 1%). Таким образом, характерные особенности низкотемпературных спектров флуоресценции связаны с нативным состоянием пигмента. Существенно, что дезагрегирующие агенты приводят к резкому падению интенсивности флуоресценции в длинноволновой области спектра (690 и 730—740 мμ) и изменению его тонкой структуры.

Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции в процессе зеленения листьев. Различные формы хлорофилла могут возникнуть на разных этапах процесса образования хлорофилла ([1]). С целью изучения этого вопроса нами исследовались низкотемпературные спектры флуоресценции зеленеющих листьев фасоли в течение первых суток зеленения. Спектры регистрировались в идентичных условиях. Растения фасоли сорта Триумф выращивались в темноте в течение 7 или 12 дней и зеленели при освещении люминесцентными лампа-

ми дневного света. На ранних этапах накопления хлорофилла спектр флуоресценции при —196° весьма сходен с «обычным» спектром, измеренным при комнатной температуре и характерным для листьев с небольшим содержанием пигмента (рис. 3). По мере накопления хлорофилла происходит постепенное изменение спектра, при этом появляются и затем быстро увеличиваются длинноволновые максимумы флуоресценции (690, 730—740 мμ и др.), которые становятся преобладающими. Вместе с тем появляется структура, свойственная низкотемпературным спектрам зеленого листа. Можно отметить, что особенно резкие изменения наблюдаются в интервале 6—12 час. зеленения, однако скорость процесса сильно зависит от возраста этиолированных растений.

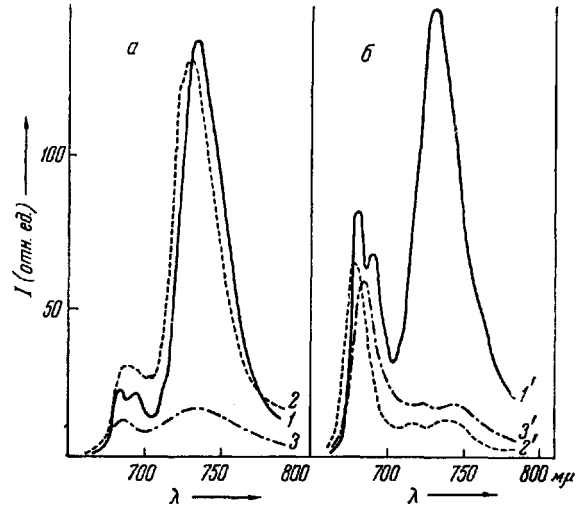


Рис. 2. Действие пиридина и нагревания на низкотемпературные спектры флуоресценции листьев фасоли (*а*) и их гомогенатов (*б*): *1* — спектр листа, инфильтрированного водой, *2* — тот же лист, инфильтрированный 10% пиридином, *3* — после нагревания до 100° в течение 5 мин. *1'* — спектр исходного гомогената листьев фасоли, *2'* — то же после добавления 5% пиридина (масштаб уменьшен в 10 раз), *3'* — после нагревания до 100° в течение 5 мин.

На рис. 4 представлены кривые изменения интенсивности двух максимумов флуоресценции зеленеющих листьев фасоли и их гомогенатов. Концентрация гомогенатов выравнивалась по оптической плотности экстрактов. При сопоставлении листьев и гомогенатов (рис. 4 *А*) кривые приравнены в начальной точке по интенсивности в первом максимуме флуоресценции. Как видно из рисунка, ход кривых для разных максимумов резко различен. Если предположить, что в исследуемом процессе не происходит значительных изменений спектров поглощения и квантовый выход флуоресценции «формы 682 мμ» (не зависящий от температуры) не изменяется в ходе процесса, то анализ кривых дает следующее: 1) относительная концентрация «формы 682 мμ» вначале увеличивается, а затем остается почти постоянной (возможно, несколько убывает); 2) квантовый выход флуоресценции «формы 730 мμ» значительно изменяется в первые сутки накопления хлорофилла, резко возрастая в первые часы и несколько убывая к концу суток у семидневных растений фасоли. Следовательно, образование этих двух форм, по-видимому, происходит в разное время, при этом в процессе образования «формы 730 мμ» происходят значительные изменения люминесцентных свойств, что, возможно, свидетельствует об изменении характера агрегации и связи молекул пигмента. В более молодых растениях эти процессы идут со значительно большей скоростью (ср. рис. 4*А* и *Б*).

Действие света. При освещении листьев светом ртутно-кварцевой лампы в области 380—580 мμ или красным светом в течение 5—10 мин. при температуре жидкого азота нами наблюдалось обратимое уменьшение интенсивности флуоресценции (до 40%) листьев в максимумах 682; 690 и 730 мμ. При этом наибольшие изменения претерпевал максимум 682 мμ, а наименьшее — максимум 730 мμ.

Описанные выше результаты свидетельствуют о наличии в растении нескольких максимумов хлуоресценции хлорофилла: 675; 682; 690—696 и 730 мμ, по-видимому принадлежащих разным формам пигмента. Характер зависи-

мости вида спектров флуоресценции от температуры, действия дезагрегирующих агентов, количества хлорофилла позволяет предположить, что длинноволновые максимумы флуоресценции 693—696 и 730 мμ принадлежат агрегированным формам пигмента с особым типом упаковки молекул. В этой связи интересно отметить, что в исследованных нами спектрах водно-спиртовых коллоидных растворов хлорофилла максимум флуоресценции сдви-

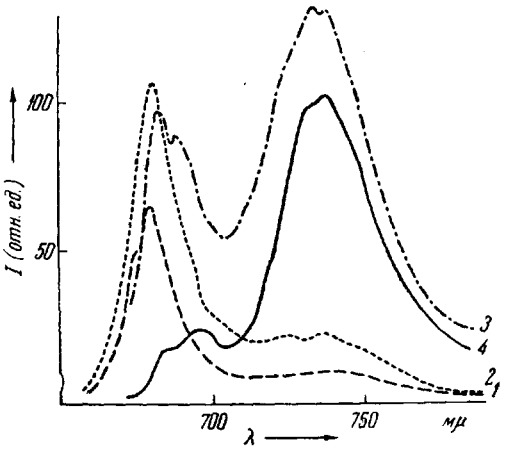


Рис. 3. Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции в процессе зеленения этиолированных листьев 12-дневных растений фасоли. Сроки освещения: *1*—3 часа, *2*—6 час., *3*—12 час., *4*—24 часа (масштаб уменьшен в 4 раза)

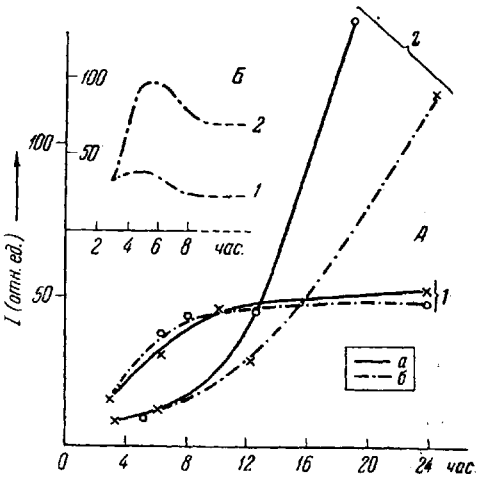


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции при —196° в процессе зеленения этиолированных листьев фасоли (*а*) и их гомогенатов (*б*). *А* — 12-дневные и *Б* — 7-дневные растения. *1* — при 682 мμ, *2* — при 730 мμ

нут в инфракрасную область (до 760 мμ) и при —196° доминирует над «мономерным» максимумом, тогда как спектры флуоресценции коллоидов хлорофилла, полученных с помощью детергентов, соответствуют «мономерным» формам хлорофилла.

Таким образом, в работе обнаружено, что различные формы хлорофилла в листьях растений обладают различной структурой спектров флуоресценции при комнатной и низкой температуре; это дало возможность изучить смену форм при образовании и накоплении хлорофилла в растениях.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

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

Поступило
20 VIII 1960

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, А. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952); ДАН, **91**, 343 (1953); Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, **18**, 340 (1943). [2] C. S. French, J. S. Brown, M. Allen, R. Eliot, Carnegie Inst. Jear. Book, Washington, 1959. [3] C. S. French, Luminescence of Biological Systems, Waschington, 1955, p. 51. [4] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **117**, 106 (1957). [5] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева, ДАН, **127**, 699 (1959). [6] S. S. Brody, Science, **128**, 838 (1958). [7] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, ДАН, **134**, № 5 (1960).

THE PRIMARY PROCESSES OF PHOTOSYNTHESIS IN PLANTS[1,2,3]

By A. A. Krasnovsky

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

In this review an attempt is made to consider the main lines of investigation in the field of the mechanism of photosynthesis.

The sequence of the presentation corresponds approximately to that of elementary processes in photosynthesis. The state of pigments in the organisms and photophysical convergences of the energy of a light quantum absorbed by the pigment system are considered first, followed by a study of the nature of the primary photochemical act. This is closely connected with the study of reversible chlorophyll transformations in solutions and in living photosynthetic organisms.

Subsequent reactions of primary photoproducts lead to the formation of more stable compounds that store the energy of light quanta; these reactions are discussed in the sections "Photosensitizing action of chlorophyll in hydrogen transfer" and "Involvement of photoproducts in the system of biochemical processes." Active compounds thus formed become involved in the system of dark enzymic reactions leading to carbon dioxide assimilation; a very brief presentation of the results of the study of intermediates by means of tracers closes the paper. Most attention in the review is given to the state and photochemical transformations of the pigments.

Different Forms of Pigments in Organisms

A study of the state of pigments in photosynthetic organisms is necessary in order to understand the nature of their participation in the reactions of photosynthesis.

The investigation of chloroplasts, grana, and chromatophores in bacteria by means of electron microscopy leads to a conclusion regarding their lamellar structure. These experiments, however, have not yet provided definite information on the arrangement and packing of pigment molecules.

[1] This review is based mainly on the papers that were available to the reviewer up to July 1, 1959, and had been issued between 1955 and 1959; therefore, the literature cited is not exhaustive.

[2] The following abbreviations will be used: DNP, dinitrophenol; DPN, diphosphopyridine nucleotide; DPNH, diphosphopyridine nucleotide (reduced form); ESR, electron spin resonance; FMN, flavin mononucleotide; TPNH, triphosphopyridine nucleotide (reduced form).

[3] In many cases, referring to the works of the laboratory to which this reviewer belongs, the expressions "in our laboratory" and "in our group" will be used to avoid repeating the same names.

This area of investigation is covered in Wolken's review (1). Use of spectral technique enabled us to draw the conclusion that chlorophyll in plants can be present in various forms of aggregation and linkage with proteins and lipids. The present discussion will be directed to comparing spectral properties of pigments in the organisms with those of individual pigments in different known states.

Bacteriochlorophyll.—Wassink, Katz & Dorrenstein (2) and French (3) have found, in various strains of purple bacteria, three absorption maxima of bacteriochlorophyll in the near infrared at 800, 850, and 890mμ, but the pigment extracted from the cell with organic solvents has only one maximum at 770 to 780 mμ. The fluorescence maximum of purple bacteria lies between 910 to 920 mμ (4, 5), while that of bacteriochlorophyll in a solution lies at about 780 to 790 mμ. Exposure to 60°C. (which leads to protein denaturation) and the action of proteolytic enzymes do not markedly affect the shape of the absorption spectrum. Heating up to 80 to 90°C. results in the decrease of the maximum at 890 mμ, the peak representing the least stable form. Prolonged exposure to 100°C. leads to a gradual shift of the maximum to 760 to 770 mμ (6). When pyridine is gradually added to a water suspension of bacteria, the maximum at 890 mμ is the first to disappear, followed by that at 850 mμ (7). Centrifugation of a bacterial homogenate at 150,000 g after treatment with a 0.5 per cent detergent solution brings about a prevailing sedimentation of the form with the maximum at 890 mμ (8).

To judge the properties of different forms, we studied the kinetics of their irreversible (destructive) bleaching. (A discussion of the reversible bleaching is presented below.)

Upon intensive illumination in the air, the form of bacteriochlorophyll with the maximum at 890 mμ is the first to bleach (7). This is in accordance with the observations of Duysens (9, 9a) and Goedheer (10).

Absorption spectra of bacteriochlorophyll isolated in pure state from cultures of photosynthetic bacteria by means of sugar chromatography were studied in our laboratory (11, 11a), as well as by Weigl (12), and by Holt & Jacobs (13). Bacteriochlorophyll solutions (extracts) have the absorption maximum in the region of 770 to 780 mμ. Thus, the interaction with polar molecules of the solvent does not affect the spectral shifts found in living cells. Our group (6) pointed out that aggregated forms of bacteriochlorophyll in solid films (obtained by evaporating pure bacteriochlorophyll solutions in vacuum) and in aqueous colloidal solutions show a far shift to the infrared (with absorption maxima at 790, 800, and 850 to 880 mμ) as found in living bacteria (6). Similar results were obtained in the experiments of Jacobs, Vatter & Holt (14) which showed crystalline bacteriochlorophyll to have its absorption maximum at 865 mμ. The experiments of Komen (15) reproduced our data on the absorption spectra of bacteriochlorophyll colloidal solutions. Bacteriopheophytin, unlike bacteriochlorophyll, gives one type of packing with the maximum at 850 mμ (6).

Effective interaction between π-electron systems of closely arranged pigment molecules results in a considerable distortion of the absorption spectrum. Different types of packing, with different absorption maxima, seem to be associated with a different orientation of pigment molecules and with the formation of solvent molecule "bridges" probably linking pigment magnesium atoms in aggregated structures.

A weak fluorescence of bacteriochlorophyll solid films at minus 150°C. was noticed in our experiments in the region of 910 to 920 mμ (16). It is the form "890" which seems to fluoresce.

Bacterioviridin (chlorobium-chlorophyll).—Katz & Wassink (17) and Larsen (18) noticed that green sulfur bacteria have their absorption maximum at 740 mμ while the pigment extracted in a solution has one at 660 to 670 mμ.

In water-glycerine mixtures, green bacteria show also a weak maximum at 670 mμ which probably corresponds to the "monomeric" form of the pigment (19, 19a). A weak maximum at 680 mμ and an intensive one at 760 to 780 mμ are to be found in the fluorescence spectrum of a green bacteria suspension. The "monomeric" maximum at 680 mμ increases in the presence of glycerine.

The absorption of bacterioviridin, both in solutions extracted from bacteria and in a purified state, is similar to that of chlorophyll-*a*. Our experiments (19) showed that bacterioviridin solid films, obtained by the evaporation of ether solutions in vacuum, have their maximum at 730 to 740 mμ, which corresponds to pigment absorption in living bacteria. The pigment seems to be easily crystallized. Aqueous colloidal solutions of bacterioviridin give two types of packing with the maxima at 710 to 720 mμ and 670 to 680 mμ, respectively. Our experiments revealed fluorescence of solid films of pure bacterioviridin with the maximum at 760 to 780 mμ, i.e., in the same region as that of living bacteria (19). All the data obtained show most of the pigment in green sulfur bacteria to be present in regularly arranged aggregated forms, while a small part occurs in "monomeric" forms.

Protochlorophyll.—It is necessary to study the state of the chlorophyll precursor in order to understand the state of chlorophyll-*a* in plants. Monteverde and Lyubimenko, at the start of this century, made the observation that protochlorophyll in the inner coats of Cucurbitaceae seeds could not be transformed to chlorophyll upon illumination and thus differed from protochlorophyll of etiolated leaves.

Smith, *et al.* (20) and Shibata (21), by measuring absorption spectra of etiolated leaves, found two protochlorophyll forms with the maxima at 635 and 648 mμ, respectively. The latter active form rapidly undergoes transformation to chlorophyll when illuminated. Our group (22), by measuring fluorescence spectra of etiolated leaves frozen to minus 150°C., revealed two forms of protochlorophyll with fluorescence maxima at 635 and 655 mμ. Upon illumination, the 655 mμ form was rapidly transformed to the

chlorophyll precursor. If the form with maximum absorption at 648 mμ corresponds to that fluorescing at 655 mμ, the fluorescence at 635 mμ may correspond to another fluorescent form of protochlorophyll with the absorption at 625 to 630 mμ, which peak would seem to be concealed by the general shape of the maximum observed at 635 mμ. Thus, the results of these independent experiments of both laboratories show the existence of pigment forms that differ in their photobiological activity.

When grinding etiolated bean leaves in a phosphate buffer at a pH of 8.5, protochlorophyll that is bound with proteins preserves its ability to be transformed to chlorophyll upon illumination (23, 24). While measuring the fluorescence spectra of homogenates of bean leaves grown in the dark, our group found both an active and an inactive form of protochlorophyll (25). Upon illumination of homogenates of etiolated leaves, a form of chlorophyll with a fluorescence maximum at 690 mμ and then at 680 mμ is formed. This form does not, however, transit to the maximum of 686 mμ (characteristic of green leaves), as no chlorophyll accumulation occurs under these conditions. Protochlorophyll formation was observed by our group (26) not only in etiolated but in green leaves as well, by means of measuring fluorescence spectra at low temperatures. Having kept green sugar beet leaves in the dark, we succeeded in observing the appearance of fluorescence spectra of protochlorophyll that is transformed to chlorophyll upon illumination of green leaves (26). Smith *et al.* obtained active preparations extracting "protochlorophyll-holochrome" with glycerine (27) and made attempts to isolate it by precipitation with ammonium sulfate and centrifugation. Purified preparations with their absorption maxima at 636 mμ seemed to be a mixture of active and inactive forms (28). Their molecular weight was within the range of 1.2×10^6 to 2.1×10^6.

Measuring the quantum yield of chlorophyll formation from protochlorophyll gave the value of 0.6 (29). Measuring fluorescence polarization in protochlorophyll-holochrome led to the conclusion that polarization in bound protochlorophyll is equal to that of protochlorophyll dissolved in castor oil (30); thus "holochrome" is the "monomeric" form.

Godnev & Shlyck investigated the nature of the primary products of the photochemical reaction occurring upon illumination of etiolated leaves (31). Participation of enzymic processes was eliminated by means of preliminary cooling. Besides the pigment resembling chlorophyllid by its spectrum and solubility in alkali previously found by Wolf & Price (32), and Löeffler (33), chlorophyll-*a* was observed to appear at the very beginning of the process. Godnev and Shlyck reached the conclusion that there are pigments both with and without phytol in the protochlorophyll of etiolated leaves.

Chlorophyll: changes of state in the course of its formation upon greening of etiolated leaves.—Chlorophyll freshly formed from protochlorophyll was found by our group to have its absorption maximum at 670 mμ in leaf homogenates, while this maximum gradually shifted up to 678 mμ during

greening (23, 24). Bleaching of chlorophyll in homogenates of both greening and green leaves decreases with its accumulation; primarily formed chlorophyll bleaches rapidly in the presence of air. With chlorophyll accumulation, the absolute amount of the bleaching part slowly increases, being close to the initial value (34).

Further study of intermediate stages of chlorophyll formation from protochlorophyll was carried out by Shibata (21). He observed, in greening etiolated leaves, intermediate chlorophyll with the maximum at 684 mμ formed from protochlorophyll, which rapidly underwent conversion to chlorophyll "670," and then to chlorophyll "677."

Fluorescence spectra measurements at low temperature, carried out in our laboratory (22), revealed the formation of an intermediate chlorophyll form with a fluorescence maximum at 687 to 690 mμ that rapidly undergoes conversion to a chlorophyll with a fluorescence maximum at 680 mμ. Then, with chlorophyll accumulation, the maximum shifts to 686 mμ, the shift being, presumably, determined by the reabsorption of fluorescence.

Thus, forms of the pigment with absorption maxima at 670, 684, and 677 mμ, and with corresponding fluorescence maxima at 680, 690, and 686 mμ were revealed in the course of chlorophyll formation in greening etiolated leaves. Upon extraction with organic solvents, only one form, chlorophyll-*a*, was revealed at all stages. Thus these forms seem to differ in the type of linkage with proteins and lipids, though their exact chemical differences are in need of elucidation.

Chlorophyll states in photosynthetic organisms: absorption spectra.—Long ago in leaves and chloroplasts absorption bands were observed that corresponded to chlorophyll-*a* (at 675 to 680 mμ) and chlorophyll-*b* (about 650 mμ). In organisms containing only chlorophyll-*a* the maximum was found within the range of 675 to 680 mμ; only in the deep-water red alga *Phyllophora,* were maxima found at 690, 675, and 670 mμ (35). Under peculiar conditions French observed absorption in *Euglena* at 690 to 695 mμ (36, 36a).

The position of the chlorophyll absorption maximum in homogenates of sugar beet leaves undergoes alteration in relation to pH of the buffer solution (37, 38). In more alkaline media, the absorption maximum shifts to the shorter region corresponding to the greatest disaggregation (672 mμ at pH of 10). In more acid media it shifts to the long-wave side (678 mμ at pH of 4). In certain conditions of homogenate preparation (pH of 8.6) a part of the chlorophyll lipoprotein seems to disaggregate.

Under the usual spectrophotometric procedure there is expressed the relation of optical density to the wave length [$D = f(\lambda)$]. French & Church (39) made an apparatus of a new type for "derivative spectrophotometry" in which $dD/d\lambda = f(\lambda)$ is recorded. This mode of measurement reveals those maxima that under the usual mode of measurement are concealed by the asymmetrical contour of the main absorption band. Application of this technique enabled French & Huang (40) to observe in

absorption spectra of *Chlorella* and other organisms 2 to 3 maxima in the region of 670 to 690 mμ. These seem to correspond to different forms of chlorophyll-*a*.

State of chlorophyll: fluorescence spectra.—When measuring fluorescence spectra of green organs of high chlorophyll concentration, the position of the true main "red" fluorescence maximum of chlorophyll is distorted as a result of reabsorption (41); the second and third fluorescence maxima (about 730 mμ and 815 mμ) do not undergo this distortion. These errors diminish with decrease of the optical path of fluorescence light from the interior of the leaf. Therefore, reabsorption is less in the case of leaves infiltrated by water and also with fluorescence excitation by more strongly absorbed light which penetrates less into the tissue. With the use of tissues containing little chlorophyll (mutants, *aurea* forms) there always exists the possibility that the state of this pigment differs from its state in the dark green tissue.

In fluorescence spectra of leaves and algae one usually finds maxima at 686, 730 to 735, and 812 to 815 mμ. In a number of cases, along with these common bands, our group could observe in green leaves a maximum at 690 mμ, which probably corresponds to an intermediate form of chlorophyll (22). In leaves frozen to liquid nitrogen temperature there are clearly seen maxima at 686 and 690 mμ which have a fine structure (26). It is likely that the ratio of the forms of chlorophyll depends on a number of physiological conditions, as well as on temperature. Perhaps, this may account for the Emerson effect (42, 42a) on the shift of the long wavelength limit of photosynthesis. Illumination of organisms with red or blue light is also likely to bring about the appearance of newly formed chlorophyll participating in photosynthesis. This fact has to be taken into consideration when interpreting the results of quantum yield measurements of photosynthesis in red algae as in the experiments of Yocum & Blinks (43), and Brody (44).

Action of heat and solvents.—Heating usually leads to an absorption shift to the short region of the spectrum and to a corresponding shift of the fluorescence. Addition of organic solvents (alcohol, acetone, pyridine) to aqueous homogenates of chloroplasts or grana in amounts exceeding 50 per cent, usually results in the extraction of pigments into the solution. Small amounts of solvents (from 1 to 10 per cent), without extracting pigments, bring about a disturbance of the natural state of pigments that is manifested in the shift of absorption spectrum maximum from 678 mμ to 670 to 672 mμ and in a corresponding change of fluorescence. The action of pyridine is the most efficient (45). The works of Godnev and collaborators showed that a part of the chlorophyll can be extracted from leaves and isolated chloroplasts with petroleum ether (46, 47). When gradually extracting chlorophyll from the preparations of dried chloroplasts with the use of polar and nonpolar solvents, Ossipova found that 15 to 20 per cent of the pigments are extracted with petroleum ether (48). The author suggests that the extractable part of chlorophyll is unbound to protein, being dissolved

in lipids. The amount of the form of chlorophyll extracted with nonpolar solvents depended on the plant species (46, 47), increasing both with the age of the plant and with tripsin digesting the protein stroma of chloroplasts (48).

As mentioned above, different forms of pigments possess different resistances to destructive photochemical oxidation. The kinetics of chlorophyll bleaching in tissue homogenates of various plants were taken under study by our group (37, 38, 49).

A small part of chlorophyll bleaches particularly rapidly; the size of the rapidly bleaching fraction depends on the plant species, its physiological condition, and age; the largest amount of photochemically active (rapidly bleaching) form was found in sugar beet, *Chenopodium,* etc., while a very small amount was found in cereals (49). It is likely that this effect characterizes the disaggregation of chlorophyll-lipoprotein compounds in a buffer solution. Brown & French (50) studied bleaching of *Chlorella* homogenates by means of derivative spectrophotometry (50). Sapozhnikov & Maslova (51) showed that the thermolability of the chlorophyll-protein complex differed in different plants and underwent changes during the process of vegetation. Godnev & Akulovich (52), studying spectral changes upon exposing leaves to heat, found that these changes arise from protein denaturation and differ in plants of different types and ages.

Our group made a suggestion that different forms of pigments might be associated with different cell structures and tried to separate them by means of centrifugation at 25,000 g after cooling. It turned out that in leaf homogenates containing a considerable amount of the rapidly bleaching form, the absorption maximum shifted after centrifugation (in supernatant) from 677 mμ to 672 mμ, towards more disaggregated forms.

Different forms of pure chlorophyll.—It is known that no shift of the absorption maximum observed in plants can be found in chlorophyll solutions in organic solvents, or under the action of mild acids and bases. In strong bases however, the cyclopentanone ring becomes disrupted leading to an absorption shift to the short wavelength region; in strong acid media magnesium is replaced by hydrogen.

The study of chlorophyll monolayers on water, undertaken by Rabinowitch's group (53), showed the position of the absorption maximum to depend on the monolayer density, the degree of "bidimensional aggregation." The absorption maximum of "liquid," irregular chlorophyll monolayers was found at 675 mμ, while those of dense crystalline ones occurred at 730 mμ. Trurnit & Colmano (54) showed that at the water-oil boundary, the chlorophyll absorption maximum shifted from 672 to 680 mμ, depending on the density of monolayer packing from 8.10^3 to 16.10^3 mol./cm.^{2}. In dense layers the ratio of optical density in blue to that in red absorption maxima corresponds to the ratio observed in aqueous colloidal solutions of chlorophyll.

It was known long ago that colloids were formed upon adding chlorophyll solutions in organic solvents (which are miscible with water) to an excess of water. Freshly formed colloids have an absorption maximum at 670 mμ, which

shifts ever farther to infrared with ageing and further aggregation. When adding acetone solutions of chlorophyll to alkaline phosphate buffer solutions, disaggregated forms with a maximum at 670 mμ are formed, and in more acid media larger particles (maximum about 690 mμ at pH of 4.3) are formed that seem to possess crystalline structures (38, 55). Rabinowitch *et al.* (56) showed with ethylchlorophyllid-*a* that, with increase of particle size, the maximum reaches up to 740 mμ, corresponding to the crystalline form of the pigment (14, 56, 57). Crystalline chlorophyll-*a* with an absorption maximum at 730 mμ was obtained under peculiar conditions, in the presence of water, and was studied by means of x-ray diffraction (57 to 59). Under similar conditions, crystalline chlorophyll with the absorption maximum at 740 mμ was obtained by Zill, Colmano & Trurnit (60).

Our group obtained one more form of crystalline chlorophyll-*a* and -*b* with absorption maxima at 675 and 690 mμ respectively (55). Electron-diffraction study showed crystalline structure of aggregated forms of chlorophyll with the absorption maxima at 690 and 740 mμ. [The crystals have acicular form under the electron microscope (55).] The forms with the maximum at 670 to 675 mμ showed a weak regularity. It should be noted that crystallization of chlorophyll from the mixture of pyridine and dioxane [under the conditions suggested by Takashima (61) for the isolation of chlorophyll-lipoprotein] leads to the formation of crystals with "dioxane" packing and with the absorption maximum at 690 mμ. Brody (61a) observed that some types of aggregated forms of chlorophyll could possess fluorescence in the region of 715 to 720 mμ at liquid nitrogen temperature; perhaps this phenomenon is partly due to red fluorescence maximum reabsorption in frozen media having high scattering.

Chlorophyll-protein compounds.—Thus far the attempts to isolate a chlorophyll-protein compound of a definite composition have been unsuccessful. Only a paper of Takashima (61) described the isolation of crystals of "chlorophyll-lipoprotein" from a solvent mixture of α-picoline and dioxane. In view of its importance, this work attracted attention and was reproduced. Our group concluded that Takashima's crystals were chlorophyll crystals with "dioxane" packing which precipitated, together with proteins and lipids, under the conditions of the experiments (62). This is proved by the following observations: (*a*) under described conditions of crystallization, the "pure" chlorophyll gives the same crystals with the same absorption maximum as the "chlorophyll-lipoprotein"; (*b*) upon subsequent repeated crystallization the crystals are gradually depleted in protein without losing their form; (*c*) upon ultracentrifugation of chloroplast substance in 50 per cent pyridine, most of the chlorophyll remains in the low molecular weight fraction.

Formation and destruction of chlorophyll.—In this review we can not cover the extensive material devoted to chlorophyll biosynthesis, though the question of the rate of its formation and destruction in the organism is

closely related to the problem of the state of the pigment and its participation in photosynthesis.

Godnev & Shlyck observed a chlorophyll radioactivity decrease in plants previously given $C^{14}O_2$ and then carried to a label-free medium. These experiments proved the renovation of chlorophyll and, in particular, the destruction of some of its molecules even during the pigment accumulation in growing plants (63). Specific activity of chlorophyll-*a* during the renovation process is considerably higher than that of chlorophyll-*b*. This is true for both the phorbinic and phytolic parts of the molecule. Having studied the character of the process in time the above authors think it most likely that during biosynthesis in green leaves, chlorophyll-*a* precedes chlorophyll-*b* (64). Shlyck (65) showed the rate of chlorophyll metabolism in plants to be of the order of 5 per cent of renovated molecules per 24 hr. Turchin and collaborators (66) give a higher value, up to 30 per cent, in the experiments with labelled nitrogen. Kutyurin (67) gives the value of 8 per cent from the experiments with chlorophyll labelled with deuterium.

Gubbenet & Bazhanova (67a.) noticed changes of 20 to 30 per cent by measuring chlorophyll content in potato leaves in day time and at night.

In spectral measurements carried out by our group the rate of the accumulation and conversion of protochlorophyll in green bean leaves was evaluated (26). The results obtained are close to those of Shlyck *et al.* (63, 65). The biosynthesis replenishes chlorophyll partially destroyed during photosynthesis mainly through oxidation.

Sironval & Kandler (68), studying kinetics of chlorophyll bleaching in living *Chlorella* cells under high light intensity, showed the existence of an induction period which seems to be determined by the presence of protective substances. Carotene is the first to bleach, followed by chlorophyll-*a*, -*b*, and xanthophyll. Wolken & Mellon studied chlorophyll bleaching in *Euglena* chloroplasts in light and in the dark (69).

Thus, the data presented above allow one to perceive the following picture of the states of pigments in organisms.

Most bacterioviridin of green bacteria and bacteriochlorophyll of purple bacteria, is present in aggregated, regularly arranged forms of various types; it is this phenomenon which determines the peculiar absorption spectra of these pigments in living bacteria. Chlorophyll of green plants is present in aggregated and monomeric forms coupled and uncoupled with proteins and lipids. The equilibrium between different forms undergoes alterations in the process of chlorophyll formation and depends on the type of the organism and on physiological conditions. The nature of the bonds with proteins and lipids and that of the participation mechanism of different forms of pigments in photosynthesis has not been elucidated thus far. It may be that different forms of pigments participate in different stages of photochemical processes.

How can these ideas be coordinated with the lamellar structure of

chloroplasts as revealed by means of electron microscopy? The term "aggregation" refers not only to the interaction between the pigment molecules in "tridimensional" particles but also to the bidimensional arrangement of the pigment in monolayers. Different density of packing of chlorophyll molecules in different zones of grana may correspond to aggregated and monomeric forms; and last, a part of the pigment can probably be present beyond the lamellar structure.

Light Quantum Absorption and Luminescence

The process of photosynthesis begins from the absorption of a light quantum by plant pigments. The energy of quanta is utilized for the photochemical process, degrades to heat, and is emitted in the form of luminescence of various kinds. This phenomenon is of great importance for the comprehension of the nature of elementary processes following the absorption of a light quantum.

Singlet excited states.—It is generally assumed (70) that the chlorophyll absorption spectrum with two large absorption maxima in the visible region indicates the presence of two electronic excitation levels and of some vibrational sublevels.

Beside $\pi \rightarrow \pi$ transition of delocalised electrons of the system of conjugated double bonds under excitation, there was recently pointed out the possibility of $n \rightarrow \pi$ transitions from unshared electron pairs of nitrogen or oxygen atoms in the chlorophyll molecule. Franck (71) forwarded a hypothesis that both transition types are possible in the main chlorophyll absorption bands, whereas a different probability of triplet state formation exists in different transition types.

Gurinovich *et al.* (72), studying absorption spectra, polarization, and luminescence of chlorophyll and its derivatives reached the conclusion that characteristic electron transitions correspond to each absorption band. These results are in accordance with previous measurements (72a, 112). The study of luminescence polarization of chlorophyll and pheophytin in solution brought Kravtsov & Gruzinsky (73) to the conclusion that both maxima observed at about 680 and 730 mμ belong not to vibrational sublevels, but to different electron excitation levels.

Lifetime (τ) of excited singlet (S) states of chlorophyll and its derivatives were measured in three different laboratories (74 to 76), and the results obtained were in agreement. The τ value of excited chlorophyll in solution lies within the range of 5.10^{-9} to 8.10^{-9} sec., while in green leaves it is 2 to 3 times less. To interpret this phenomenon, a number of hypotheses were put forward: (*a*) only a part of chlorophyll in green leaves exists in the fluorescing form, and there is some outflow of energy to the nonfluorescing phase; (*b*) the value of τ decreases owing to high concentration of chlorophyll molecules in chloroplasts and to the energy exchange between the molecules (75).

Metastable (triplet) excited states.—In agreement with generally ac-

cepted ideas, an excited pigment molecule in the singlet state can, having lost some of its energy, transit to the metastable, long-lived excited state. The ideas on the participation of metastable chlorophyll molecules in the photochemical reactions of chlorophyll were put forward in the works of Franck & Livingston (77), who supposed the tautomeric nature of these states. In their independent works, Terenin (78) and Lewis & Kasha (79) based the contemporary, generally accepted idea on the triplet nature of metastable excited states of the molecules of aromatic organic compounds. Let us analyse the data on the possibility of the triplet (T) state formation of chlorophyll.

Delayed fluorescence.—Tollin *et al.* (80), studying the spectrum of delayed luminescence of chloroplasts at low temperatures, noted its resemblance to the fluorescence spectrum. This luminescence is probably emitted upon the transition $S^* \rightarrow S$ perhaps via $T \rightarrow S^* \rightarrow S$ because of a certain amount of heat energy at minus 150°C.

Phosphorescence.—Becker & Kasha (81) noticed chlorophyll phosphorescence in the near infrared, at low temperature. These data were confirmed by Terenin (82) with the use of a photoelectric method. No phosphorescence of chlorophyll-*a* in frozen solution could be asserted thus far.

Flash-spectroscopy.—A number of works showed that a transition of molecules to the triplet state takes place under the effect of a high energy flash of light. Thereafter, owing to the accumulation of triplet molecules, the main absorption band became weaker and the appearance of a new band corresponding to the transition $T \rightarrow T^*$ was observed. A suggestion was made by the present author (see below) that in such experiments spectra of photoreduced forms of chlorophyll were observed as a result of electron (hydrogen) acceptance from molecules of the solvent or admixture, considering the ready ability of cholorophyll to undergo a reversible photoreduction (83, 114).

All the experimental material available shows the probability of the formation of the triplet states of chlorophyll. However, the participation of these states in the process of photosynthesis requires further investigation.

Chemoluminescence.—Beside fluorescence and phosphorescence, due to the singlet and triplet excited states of chlorophyll molecules, new types of delayed luminescence of chlorophyll were found in organisms. Strehler & Arnold (84) discovered a weak afterglow in plants lasting some seconds after the light was turned off. This afterglow, by its spectrum, was close to chlorophyll fluorescence. The action spectrum of afterglow excitation showed its correspondance to that of photosynthesis (absorption spectrum of chlorophyll). This luminescence, which has to be considered as chemoluminescence, is sensitive to enzymic poisons and temperature and seems to be associated with the elementary processes of photosynthesis. Further study of this phenomenon lead Strehler *et al.* (85, 86) to the conclusion that this luminescence consisted of three components: a short one lasting 10^{-3} sec.; a long-lived one lasting minutes; and an intermediate one.

Enzymic toxins, such as hydroxylamine and dinitrophenol, depress the long-lived component in *Chlorella* cells; exposure to 50°C. does not affect the short-lived luminescence but inhibits the long-lived one which seems to be connected with biochemical events. In these works, correlation between luminescence and light absorption change by *Chlorella* cells was studied by the method of differential spectroscopy. Thereby a qualitative relation between the long-lived luminescence and the absorption change in leaves at 525 and 648 mμ was observed. Luminescence may be related to back reactions of photoproducts that possess absorption in the mentioned spectral region. Attention is drawn to the fact that the maximum at 525 mμ corresponds to the maximum of the photoreduced form of chlorophyll (see below). It should be noted that a weak chemoluminescence in back reactions (oxidation) of the photoreduced form of chlorophyll was found by our group (87). Its intensity greatly increased under the action of ammonia in accordance with its action on back reactions of photoreduced chlorophyll [see below and (129)].

Tollin *et al.* (88, 88a) studied luminescence of spinach chloroplasts at different temperatures. At room temperature, three kinds of afterglow with half-times of 0.15, 2, and 15 sec. were found. As the temperature dropped down to minus 35°C., only the short-lived luminescence component remained. At minus 90°C. a new type of luminescence with the half-time of 0.3 sec. is observed. This half-time increases with further cooling to minus 196°C.

Chloroplasts dried in a flow of nitrogen give, upon heating, two maxima of thermoluminescence at 50° and 150°C. in accordance with the work of Arnold & Sherwood (89). Freshly isolated moist chloroplasts did not show this effect. Calvin *et al.* (90, 91) point out a qualitative correlation of the observed luminescence of chloroplasts with results of measurement of electron spin resonance (ESR) of the same objects. Thus, both the luminescence and ESR are induced by the light absorbed by chlorophyll. The periods of time for extinction of luminescence and ESR are close at room temperature (lasting seconds). At minus 140°C. and in dry chloroplasts, ESR is preserved for hours and, in correspondence, no luminescence is found within the region of 700 to 900 mμ; at 60°C., ESR of dry chloroplasts lasts a few seconds only, and at this temperature a peak of thermoluminescence is also found. The luminescence observed is ascribed by the authors to the recombination of unpaired electrons and "holes" in the quasicrystalline lattice of chlorophyll in grana.

A different luminescence period is interpreted in this work by the different depths of holes trapping electrons mobilized by light. Low temperature luminescence may be ascribed either to the emission of a quantum from the lower triplet level, or to the transition to the excited singlet state at the expense of some reserve of heat energy.

It seems to us that the use of a semiconductor model simplifies the actual pattern of the process without taking into consideration its biochemical specificity. Instead of electron traps one may conceive the formation of

intermediate ion radicals of different lifetimes. Different types of luminescence may be interpreted by the recombination of free radicals having different lifetimes formed in the way of photochemical electron transfer (with the participation of chlorophyll) in the chain of intermediate enzymatic and redox systems.

Thermoluminescence.—Arnold & Sherwood (89) found luminescence arising upon heating dry chloroplast films after their preillumination with the visible light. A luminescence maximum was observed when exposing dry chloroplasts to 100 to 130°C. Luminescence was preserved during four cycles (illumination-heating-cooling), though the band became weaker with each subsequent cycle. The luminescence was found in the region of 630 to 800 mμ. Illumination at the liquid nitrogen temperature did not bring about any measurable luminescence effect after heating. Chloroplast conductivity was temperature dependent; upon heating illuminated chloroplasts, a minimum was observed at 60 to 70°C., while the cooled preparation showed a monotonous resistance decline upon heating. A conclusion is drawn by the authors that these phenomena resemble the well known thermoluminescence of crystalline semiconductors upon excitation with ultraviolet or x-rays and that therefore, the pattern characteristic of semiconductors is applicable to chloroplasts; in the process of light absorption, electrons move to the zone of conductivity and are trapped in the traps of various depths. Heating releases the electrons and brings about afterglows of different lifetimes.

In these experiments preparations were used similar to chlorophyll solid films, since the biological organization of the system and the native state of protein were destroyed upon heating chloroplast preparations up to 140°C.

It was necessary to clarify whether this phenomenon is characteristic of the peculiar state of chlorophyll or a common property of the solid films of chlorophyll and other pigments investigated by a number of workers (87).

In another paper (92), Arnold & Sherwood studied thermoluminescence of dry chloroplasts in relation to temperature. Analysis of the broad luminescence band made the authors conclude that there existed not only the possibility of electron trapping but also that of chemical compound formation. Of interest are the observations that this effect was obtained only in the presence of oxygen, while CO_2, H_2O, and N_2 were not necessary for the reaction. These observations show that the nature of these effects is probably connected with chlorophyll chemiluminescence, maybe under the effect of lipid peroxides formed as a result of chlorophyll sensitized photoxidation, rather than with the "physical" mechanism of thermoluminescence. This interpretation eliminates the necessity of the semiconductor model to explain this phenomenon (87).

Energy (electron) migration.—Much attention is given in the literature to possible mechanisms of the migration of energy of light quanta between chlorophyll molecules in grana and from the molecules of phycobilins and carotenoids to chlorophyll [cf. the reviews of Terenin (93, 93a) and Rabinowitch (94)].

The possibility of energy transfer between chlorophyll molecules in the chloroplasts in the singlet excited state is illustrated by the observations of Arnold & Meek (95) on fluorescence depolarization. Konev (96), by measuring phycoerythrin fluorescence polarization at room and low temperatures, showed that an energy exchange was likely to take place between many erythrobilin residues bound to protein in the chromoprotein molecule.

The phenomenon of energy transfer at the triplet level between different organic molecules was discovered by Terenin & Ermolaev (97); it was already pointed out that there existed a possibility of energy transfer in this way between different forms of chlorophyll in the chloroplasts (34). Franck (71) supposed the possibility of energy transfer in chloroplasts from chlorophyll molecules in the singlet state to those in the triplet state. In the case of a close interaction between chlorophyll molecules upon bi- or tridimensional aggregation in grana there is possible a migration of "the exiton" or in the extreme case, of electron and "hole," which leads to the appearance of photoconductivity.

Terenin & Putzeiko (98), Putzeiko (99), and Terenin (152) have actually observed photoconductivity of chlorophyll-*a* and chlorophyllids in the state of solid films. They have determined the "hole" type of photoconductivity and stated that the maxima of photoelectric sensitivity coincided with the absorption maxima of the crystalline chlorophyll.

Nelson (100) and Calvin (101) described experiments in which photoconductivity was observed in solid chlorophyll films, while Arnold & Maclay (102) noted photoconductivity of dry chloroplast films and of the films of chlorophyll and carotene. All these effects, however, are not specific to chlorophyll: in the experiments of Vartanyan (103) most organic dyestuffs were shown to possess photoconductivity in solid films. Besides, chlorophyll in chloroplasts is not in the crystalline state, which is shown by the differences in absorption maxima of chlorophyll in grana (678 mμ) when compared to crystalline forms (690 and 730 mμ). Photoconductivity at the level of the triplet state may be associated with the appearance of unpaired electrons upon illumination of chloroplasts; this fact is proved by the measurement of the electron spin resonance (ESR).

Commoner (104, 105) noted the appearance of an ESR signal upon illumination of chloroplasts and living cells of *Chlorella*. Calvin and coworkers (106) asserted that upon freezing chloroplasts and photosynthetic bacteria down to minus 150°C., illumination also led to the appearance of the ESR signal which disappeared after the light was switched off. An evaluation of the number of unpaired electrons was made, which amounted to from 1/100 to 1/500 of the total amount of chlorophyll molecules. A conclusion is drawn by the author that the appearance of the signal at minus 150°C. bears witness only to the shift of the electron, which is regarded as a photophysical process. The appearance of the ESR signal can be ascribed either to the formation of triplet states, or to the electron acceptance by the excited chlorophyll molecule, with the formation of a pair of

ion radicals. It is unclear, thus far, whether unpaired electrons measured by the ESR method are determined by photoconductivity or if these two phenomena are independent.

Thus, during recent years there were revealed all possible types of chlorophyll luminescence in chloroplasts, which are associated with the formation of excited states (fluorescence and phosphorescence) and with the reactions of primary photoproducts (chemoluminescence). The study of these phenomena produced important data on the primary acts of light energy conversion and on the pathways of electrons in photosynthesis, though the nature of the primary photoprocess is not convincingly proved in these experiments.

Primary Photochemical Process and "Storage" of Light Energy

Photochemistry of chlorophyll and its analogues.—In photosynthesis oxido-reduction takes place—the utilization of water hydrogen for CO_2 reduction. If chlorophyll is actually involved in the chain of reactions of hydrogen transfer from water to carbon dioxide, one has to look for the possibility of a reversible photochemical oxidation or reduction of this pigment accompanied by the "storage" of light energy in unstable, reversibly reacting, photoproducts of chlorophyll.

Reversible oxidation.—In 1937 Rabinowitch & Weiss (107) revealed the possibility of a reversible photochemical oxidation of chlorophyll by ferric ions. The present author showed the possibility of a partial reversible photooxidation of chlorophyll and bacteriochlorophyll by oxygen and benzoyl peroxide (108, 109). Dain & co-workers (110) studied the reversible chlorophyll photooxidation in its complexes with $FeCl_3$ and presented arguments in favor of the possibility of electron transfer in the complex with the formation of unstable chlorophyll oxidation products. It was suggested by the authors that the primary oxidation product with the absorption maximum at 510 mμ represented chlorophyll oxidized at the position 7–8 of its structure. Dilung (111) noted formation of unstable oxidation products upon the interaction between chlorophyll and oxygen.

Goedheer (112) confirmed our data on the reversible bacteriochlorophyll photooxidation with the partial regeneration of the pigment from oxidized products by ascorbic acid (109) and asserted the possibility of pigment oxidation by ferric ions and some other compounds.

Reversible photoreduction.—As early as in the end of the 19th century Timiriazev discovered the ability of chlorophyll reversible reduction by zinc.

The ability of chlorophyll to undergo reversible photochemical reduction accompanied by light energy storage in photoproducts thus formed was revealed in 1948 (113). Many works have been devoted since to the study of this reaction. It is now timely to review briefly these results [see also summarizing papers of the reviewer (114)].

Chlorophyll.—A short, red-light illumination of chlorophyll solutions in pyridine in the presence of a reductant (ascorbic acid or phenylhydrazine) under anaerobic conditions leads to the formation of a red photoreduction product with the absorption maximum at 523 mμ. The light being switched off, a back reaction occurs with the regeneration of chlorophyll, being accelerated by the admission of oxidants. As a side process, a partial pheophytinization was observed, in particular in the presence of an excess of ascorbic acid and upon prolonged illumination (113). The reaction could also be measured in alcohol in the presence of organic bases, pyridine, nicotine, phenylhydrazine, and hexamethylen-tetramine, and in pyridine in the presence of up to 50 per cent of water (115).

Continuing the study of photoreduction in our laboratory, Evstigneev & Gavrilova (116) noticed that chlorophyll solution in toluene is also photoreduced by phenylhydrazine. Under these conditions there was asserted the possibility of photochemical chlorophyll-*b* reduction with a good reversibility. At a temperature lowered down to minus 40°C. the appearance of the red photoreduced form of chlorophyll was extremely slow.

Holt & Rabinowitch (117) noticed that the "photochemical reduction—back reaction" cycle could be repeated many times with an ever increasing amount of the irreversibly changed chlorophyll. Linschitz & Weissman (118) observed the appearance of the red photoreduced form of chlorophyll in phenylhydrazine. Lynch & French (119) reproduced photochemical chlorophyll reduction in pyridine and pointed out that this reaction could be observed upon addition of 50 per cent pyridine to the aqueous chloroplast suspension. Rackow & König (120), studying photochemical chlorophyll reduction, showed that upon cleavage of the cyclopentanone ring of the chlorophyll molecule they failed to notice photoreduction, a fact which, in their opinion, proved that this group of the molecule was indispensable for the reaction to occur.

This conclusion seems to be an erroneous one, since a number of other chlorophyll analogues lacking the cyclopentanone ring (such as porphyrins, magnesium phthalocyanin) are completely able to undergo photochemical reduction.

When studying the reaction of reversible photochemical chlorophyll reduction, Bannister (121) reached the conclusion that the reaction occurred only upon the addition of either alcohol or water to pyridine, which promoted the formation of ascorbate ion, an active electron donor. The quantum yield of the formation of the "red" reduced form attained 0.05 at 40 per cent of water in pyridine. Pheophytinization is observed during the reaction. In ether solutions, freed of oxygen, chlorophyll is photochemically reduced by phenylhydrazine; the reduced form has maxima at 410 and 520 mμ.

In accordance with the results of our laboratory, Bannister suggested participation in the reaction of the triplet but not of the singlet excited state of chlorophyll.

Pheophytin.—We noticed a reversible photochemical pheophytin reduction (115) with the appearance of the "red" form resembling in its spectrum the corresponding form of chlorophyll. Comparative studies of chlorophyll and pheophytin were carried out in the work of Evstigneev & Gavrilova who found a more rapid pheophytin reduction. In pyridine solution at minus 40°C., a brown coloured intermediate is formed, which upon heating undergoes transformation to the "red form" (122). A detailed study of this primary reduced form of pheophytin and other pigments was made by Evstigneev (123).

Ethylchlorophyllid.—This substance behaves similarly to chlorophyll, forming the "red" reduced form. A reversible photochemical chlorophyllid reduction in the presence of versene was noted by Holt (124).

Protochlorophyll.—When protochlorophyll is photochemically reduced by ascorbic acid it forms a brown photoproduct with the absorption maximum at 470 mμ and reversibly reacts back (oxidized) to form the green protochlorophyll (125). However no chlorophyll formation could be observed, though prolonged illumination gave a small amount of a product with the maximum at 675 mμ. Protopheophytin is also able to undergo reversible photochemical reduction.

At minus 40°C., absorption spectra were measured of the primary photochemically reduced form of protopheophytin which, by its properties, was analogous to the primary form of pheophytin (126, 126a).

Bacteriochlorophyll.—Photochemical reduction by ascorbic acid in pyridine leads to the formation of photoproducts lacking characteristic absorption spectra in the visible (109). The reaction goes further and is more readily reversible in more basic media as in the presence of piperidine, ammonium, or phenylhydrazine as the reductant. With sodium sulfide, the reaction is rapidly reversible. Under these conditions bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin form a green product of photoreduction (109).

Bacterioviridin (127).—There was observed the "red" photochemically reduced form resembling the product of chlorophyll-*a* photoreduction. Pheophytin obtained from bacterioviridin also resembles, by its properties, the pheophytin-*a*, giving the primary and secondary photoreduced forms. Bacterioviridin differs from chlorophyll in a higher rate of photooxidation in solution, which brings it closer to bacteriochlorophyll in its behavior.

Porphyrins.—Behaviour of protoporphyrin, hematoporphyrin, porphyrin of photosynthetic bacteria, and the porphyrin obtained from protochlorophyll turned out to be similar; differences were found only in the rate of photo- and back reactions (128 to 130).

Our group studied photoreduction of these compounds in organic solvents, in aqueous acid and alkaline solutions. In the bases, piperidine and pyridine, the reaction with ascorbic acid usually gives a green photoproduct with the absorption maximum at 640 to 660 mμ which, on admission of air, undergoes reversible conversion to porphyrin. In water, in the presence of 10 per cent pyridine, a photoproduct is formed with an absorption maxi-

mum at 740 to 750 mμ (128). Both compounds are determined by the conditions of the acid-basic equilibrium (129).

In aqueous acid solutions the absorption spectra of porphyrins undergo marked alterations owing to the addition of protons by nitrogen atoms of pyrrol nuclei, and an intermediate photoreduced product with the absorption maximum at 520 mμ is formed (130). At minus 40°C. there was observed the appearance of the "primary" form of hematoporphyrin and protoporphyrin with the maximum at 450 mμ; upon heating, this form partially transits to the "green" photoreduced form with an absorption maximum at 650 mμ (126).

Complexes of chlorophyll with metals.—A detailed study of the photoreduction of chlorophyll ferric ion complexes was undertaken by the Dain group (131, 132); they suggested that in the reaction there takes place electron transfer in the complex of Fe-chlorophyll with OH ions, water molecules, and metal ions which serve as a reductant. Dain & Ashkinazi (132) made a suggestion that in the excited state the electronic system of these pigments is unstable. This instability leads to the subsequent electron transfer after the act of a light quantum absorption within the complex from the organic skeleton of the molecule to the central ferric ion, which is thereby reduced. The electron deficiency thus formed is replenished at the expense of the solvent molecule oxidation. As the act of electron transfer immediately follows the act of light absorption, a significant reduction of the lifetime of the excited state takes place. It is manifested in a certain broadening of absorption bands, in the disappearance of vibrational structure and fluorescence (132). No photoreduction could be noticed of cupric-complexes of pheophytin, but a fluorescing zinc complex was able to undergo photoreduction. In the experiments of Vostrilova & Dulova (132a) and Rackow & König (120) a good reversibility of the photoreduction of this compound was observed. A very slow photoreduction of cytochrome-*c* under the action of the visible light was observed by our group (133, 133a).

Phthalocyanins.—Upon illumination of magnesium phthalocyanin solution in pyridine with ascorbic acid, along with the formation of irreversibly reduced products (113), there was noticed a process rapidly reversible in the dark (134). Carrying out this reaction at low temperature, Evstigneev & Gavrilova (135) found a rapid formation of the "red" photoreduced form with the maximum at 550 mμ, which quickly underwent a back reaction upon the admission of air. Just as in the case of chlorophyll, they were unable to measure the spectrum of the extremely unstable "primary" photoreduced form of this compound.

Carotenoids.—An attempt was made to carry out photoreduction of carotene and xanthophyll in different media with different reductants but no formation of reversibly reacting products of these compounds could be noticed (136).

Phycobilins.—Our experiments showed phycoerythrin and phycocyanin

to be lacking both the ability to undergo this reaction, and the photosensitizing action in solutions (137). Attempts were made to photoreduce erythrobilin obtained under acidic hydrolysis of phycoerythrin, but this compound was also unable to undergo this reaction. Experiments on bilirubin also gave negative results (126).

The role of the pigment structure.—The reaction of photoreduction could be noticed with all derivatives and analogues of chlorophyll possessing the structure of chlorin, bacteriochlorin and porphin with central atoms of hydrogen, magnesium, or zinc. Different pigments differ in spectral properties and in the reactivity of their reduced forms in different media. Magnesium complexes usually form more active (rapidly back-reacting) reduced forms than pheophytins. The main feature determining the ability of pigments to undergo reversible photoreduction is the presence of a circularly conjugated system of double bonds embracing four pyrrol rings of pigment molecules.

Change of the redox potential (E_o) in photoreaction.—If the chlorophyll-ascorbic acid system in pyridine was able to reduce compounds with E_o up to 0.05 (methylene blue) prior to illumination, a reduction of compounds with E_o up to minus 0.35 (safranin T, pyridine-nucleotides) was noticed after illumination (138). These data received confirmation by measurement of the potential of the inert electrode in photoreacting systems. A sharp potential change of such an electrode was observed upon illumination of the chlorophyll-ascorbic acid system (138), similar to that of the Rabinowitch experiments (139) for the thionine-ferrous ion system.

The photopotential of a platinum electrode was studied in detail by Evstigneev & Gavrilova, following illumination of the reacting solution (140). It was shown that the photopotential was determined not by the illumination of the electrode itself but by the formation of photoproducts in the solution. Upon lowering the temperature, an increase of the E_o value was noticed at the expense of diminishing the back-reaction rate and increasing the stationary concentration of the photoproduct. The change of potential was followed at minus 40°C. (i.e., under conditions when no "red" form of chlorophyll was formed); these observations led Evstigneev to the conclusion that the potential was determined by the formation of the primary "electrode-active" reduced form of pigment. This conclusion was confirmed in the work of Bannister (121) who investigated the quantum yield of the reaction of chlorophyll photoreduction in relation to reductant concentration.

Upon illumination of the solutions of chlorophyll and its analogues with ascorbic acid, the value of E_o attained minus 0.35 v. which is in agreement with the experiments with the use of redox indicators (138). Thus the "electrode-active" and the "red" reduced forms have similar E_o values.

Hendrich (141) noted a change of photopotential upon illumination of the chlorophyll-ascorbic acid system and studied the action of a number of

inorganic ions on this process. He noted that Cu^{++} and Ni^{++} ions which were able to react with ascorbic acid prevented the appearance of photopotential.

When illuminating a chlorophyll-phenylhydrazine system in vacuum, Evstigneev & Gavrilova found an increase of photoconductivity (142). With the light turned off, the electroconductivity returned to its previous level, thus bearing witness to the formation of photoproducts of ionic nature. Comparison of the kinetics of photoconductivity, appearance of photopotential, and spectral data on pheophytins at various temperatures, show that just the primary electrode-active products determine the appearance of photoconductivity. The shift of platinum electrode potential after illumination of the chlorophyll-ascorbic acid system in pyridine to the negative side bears witness to the formation of electrode-active products (photoreduced form of pigments) that give up their electron to the electrode in accord with the scheme of the primary photoprocess: $Chl + AH \rightleftarrows \cdot Chl^- + \cdot AH^+$.

Thereby a question arises why a platinum electrode, becoming negatively charged, accepts the charge of the reduced form of the pigment but does not give up the electron to the oxidized form of the hydrogen donor.

It would be interesting to compare this phenomenon in the case of a reductant of some other chemical nature. The photopotential of a platinum electrode in acidic aqueous solutions in the porphyrin-ascorbic acid system was taken under study (130); in this system the photopotential shifted to the negative side, just as the case of the chlorophyll-ascorbate system in pyridine. However, on application of ferrous oxalate as an electron donor, the photopotential shifted to the positive side, as in this case ferric ions (probably formed in the elementary photoprocess; $Chl + Fe^{++} \rightleftarrows \cdot Chl^- + Fe^{+++}$) were apparently more electrode active. Kinetics of the changes of electrode photopotentials in the systems under study require further investigation.

Reductants.—Reaction in its most pronounced form was observed with pyridine as the medium, in the presence of ascorbic acid and other dienols, phenylhydrazine, hydrogen sulfide, and cysteine (114). To analyse a rapidly reversible, "latent" formation of primary photoproducts, methods should be applied that permit following up the formation of these compounds during the period of illumination. Most sensitive in this case were methods of photopotential measurement, sensitized photopolymerization, or sensitized reduction of irreversibly reduced electron acceptors.

In Evstigneev's experiments, an E_o change to the negative side on reaction with chlorophyll was shown by hydroquinone, pyrocatechine, thiosinamine, and a number of other compounds (123). Oster (143) used ethylenediamine tetracetic acid in the reactions of this type. The polymerization method (144, 144a) also showed activity of ferrous compounds. Sensitized cytochrome oxidation in the presence of chlorophyll (133) suggests the possibility of a reversible process in this case as well. Thus electron acceptance by excited chlorophyll molecules is possible with the

participation of systems possessing an E_0 from minus 0.3v. up to plus 0.3v. However, the possibility of electron acceptance by the excited pigment molecule from a water molecule remains, as yet, uncertain.

Deuterated electron donors.—Application of deuterated ascorbic acid leads to the retardation of chlorophyll photoreduction with the formation of the "red" form; the back, dark reaction also runs more slowly (145). The Hill reaction is also slowed down upon the increase of D_2O amount in the water medium (145). Thereby, D_2O, slowing down the formation of the "red" form of pheophytin, does not affect the formation rate of the "primary" photoreduced form. At low temperature the formation rate of the primary form of pheophytin is the same with the use of both deuterated and nondeuterated ascorbic acid (146). These experiments also prove the electron transfer during the formation of the "primary" reduced form and proton participation in the formation of the more stable "red" form.

Reaction with the solvent.—Porret & Rabinowitch (147) were the first to observe the effect of reversible chlorophyll bleaching in methanol. Livingston (148, 148a, 148b) studied reversible spectral changes of chlorophyll solutions by means of flash spectroscopy and found an absorption increase at 525 mμ upon illumination, which corresponded to the maximum of the photoreduced form of chlorophyll. Linschitz & Rennert (149) noticed reversible changes of the chlorophyll absorption spectrum upon its illumination in vitreous media at low temperature.

Applying the technique of flash photolysis, Linschitz & Abrahamson (150) found in pyridine solutions of chlorophyll a reversible decrease of the chlorophyll absorption maximum in the red and the appearance of a maximum in the green at 525 mμ, as well as a certain absorption increase at 700 mμ. The authors note that the lifetime of the product with the absorption at 525 mμ was greater in pyridine than in other solvents and the reversibility of the process in pyridine was better than in purified methanol.

By means of the flash photolysis technique, Terenin and co-workers (151) found a reversible decrease of the absorption maximum in the solutions of magnesium phthalocyanin, as well as the appearance of new maxima in haematoporphyrin (152).

A suggestion was made earlier by the present author (83, 114) that effects observed in the described flash spectroscopy experiments were due to the reversible chlorophyll photoreduction when the solvent molecules served as electron (hydrogen) donors. Reversible effects in this kind of experiments were actually inhibited by oxygen, which was in agreement with the rapid reaction of oxidants with the photoreduced form of chlorophyll.

In the experiments of Livingston & Fujimori (153) the action of various compounds on τ-lifetime of metastable excited states of chlorophyll was studied. Oxidant molecules were found to reduce the τ value, while reductants (ascorbic acid) did not affect it. These results are understandable when one assumes that a photoreduced form of chlorophyll is formed by

light flashes. Naturally, this form does not react with the reductant (ascorbic acid), but it does react with the oxidant (quinone). Carotene action in these experiments corresponds to its effect on the photoreduction of chlorophyll revealed in our experiments (154).

The spectrum of the "triplet" state in the papers of Livingston & Linschitz resembles that of the "primary" photoreduced form of pheophytin measured by Evstigneev (123, 126). It also has the absorption region corresponding to the "red" form of chlorophyll. The effect of the electron (hydrogen) acceptance is apparently the main feature of these experiments, while the possible intermediate formation of the triplet state, with shorter lifetime, overlaps the main effect, thus being hardly distinguishable by the registration technique applied. [See also 152].

Acid-base properties of the medium.—A distinct formation of relatively stable photoreduced forms of pigments may be noticed in pyridine. This stability seems to be related to the conditions of the acid-base equilibrium, when a proton is situated "between" the pigment molecule, which has accepted an electron, and the molecule of the base (the medium).

$$\cdot X^- \ldots\ldots H^+ \ldots\ldots N\lessdot$$

Formation of these relatively stable compounds is possible only if certain values for the affinity of the pigment molecule to the proton and the medium (the base) are kept. The optimum of the basicity at which stable reduced forms are formed, varies in different pigments. It should be expected that in a medium of higher basicity than pyridine, the formation of negative ion radicals $\cdot Chl^-$ rapidly reacting back, will dominate. In more acidic media one might expect a formation of radicals $\cdot ChlH$ upon the acceptance of one proton, and a formation of positively charged ion-radicals $\cdot ChlH_2^+$ upon the acceptance of two protons.

When adding some drops of a strong base, such as piperidine or ammonium, to the solution of the "red" reduced form of chlorophyll in pyridine, a rapid back-reaction occurs (at the expense of the reduced form ionization). Corresponding to this, piperidine or ammonium, added to chlorophyll solution in pyridine inhibit the formation of the "red" reduced form in photoreactions (129). If the reaction is run in pyridine carefully dried with calcium hydride then the formation of the "red" form proceeds much more slowly than in the case of usual reactive moist pyridine, due to a deficiency of "hydrogen ions" in the dry pyridine, which are necessary for the formation of the "red" form.

In the case of hematoporphyrin, in strongly basic media (piperidine), a reduced form with the absorption maximum at 650 mμ appears while in more "acid" media (alcohol-pyridine mixtures) the one with the absorption maximum at 740 mμ is formed. By altering the basicity of the medium one can repeatedly and reversibly change the position of the absorption maximum of reduced forms (129).

It should be pointed out that when reducing pigments by zinc, by

Timiriazev's method, an acidity optimum is observed for the formation of reduced forms of various pigments (155).

Formation of free radicals.—Molecules serving as oxidants (quinones, nitro-compounds) quench chlorophyll fluorescence but do not react with it photochemically, while the reductants, reacting, do not cause "physical" quenching of pigment fluorescence (156). These observations show the possibility for the participation in the reaction of just the metastable (triplet) pigment molecules. The reversal of an electron spin during the formation of the triplet state determines the long life of the "hole," i.e., of the vacant electron level.

In the elementary act of photoreduction electron acceptance takes place by the excited chlorophyll molecule; therefore formation of an ion-radical pair must take place. The subsequent act of proton transfer may lead to the formation of a radical pair in the non-ionic form.

$$Chl + AH \rightarrow \cdot Chl^- + \cdot AH^+ \rightarrow \cdot ChlH + \cdot A$$

Uri (157) noticed that chlorophyll induces methyl-metacrilate polymerization in the presence of ascorbic acid. A detailed study of sensitized photopolymerization by the pigment-hydrogen donor system in pyridine solutions and aqueous emulsions was undertaken in our laboratory (144, 144a). Polymerization is induced by chlorophyll, and all its analogues and derivatives. Phycobilins, in accordance with their inability for photoreduction, do not affect polymerization. Dienols, cysteine, and ferrous compounds proved to be the most active as electron donors. Reaction was inhibited by those compounds (safranin, riboflavin) that easily react with photoreduced forms of pigments.

Under anaerobic conditions, polymerization appears to be induced by ion radicals—primary reduced forms of pigments—while in the presence of oxygen it is induced by peroxide radicals, the products of the oxygen sensitized photoreduction (OH, HO_2). As to the Rosenberg comment (158) concerning the possible action of the triplet state of pigments in these experiments, it should be noted that active polymerization was observed only in the presence of molecules that served as electron donors. Linschitz & Weissman (118) were unable to find paramagnetic resonance absorption in the "red" reduced form of chlorophyll, and it is, as yet, unclear whether this form is a radical or a product of dismutation, $ChlH_2$. The second possibility should be regarded as a more likely one. Illumination of chlorophyll-ascorbic acid and pheophytin-ascorbic acid systems in vacuum, directly in a resonator, led in our experiments (144a) to the appearance of the ESR signal, which disappeared instantaneously after the light was turned off. No effect could be observed without a reductant.

Commoner (159) noted at the 4th International Congress of Biochemistry held in Vienna in 1958 that the structure of the ESR signal observed in chlorophyll photoreduction corresponded to the structure found after ascorbic acid oxidation and it appeared to belong to monodehydroascorbic

acid. This compound probably had a greater lifetime than the radical of chlorophyll. These conclusions are in agreement with the work of Bubnov *et al.* (159a) who measured ESR by photoreduction of chlorophyll and other pigments, and in green leaves.

Mechanism of photoreduction.—Using the ideas of Michaelis on the "one-electron mechanism" of oxido-reductive reactions, the following scheme of the reaction was suggested (113).

(*a*) Electron acceptance by the excited (probably, triplet) pigment molecule (Chl) from the hydrogen donor molecule (AH_2) with the formation of an ion-radical pair. We have pointed out the possibility of electron acceptance by the system of circularly conjugated double bonds of the pigment molecule.

$$Chl + AH_2 \rightleftarrows \cdot Chl^- + \cdot AH_2^+$$

(*b*) Transfer of the proton (linked to the molecules of the base-medium) with the formation of a radical pair and subsequent formation of compounds with saturated valences as a result of dismutation:

$$\cdot Chl + \cdot AH_2^+ \rightarrow \cdot ChlH + \cdot AH \rightarrow ChlH_2 + A$$

Experimental material obtained in our laboratory confirmed this general scheme of the process.

Thus, to sum up this section; under the effect of light, reversible oxido-reductive transformations of chlorophyll occur, whereby the reversible photoreduction is accompanied by a "storage" of light energy in photo-products. This conclusion justifies looking for these types of reactions in living organisms.

Photochemical Pigment Transformations in Organisms

The study of isolated pigments revealed their reversible photochemical changes; the use of suitable media and electron donors and acceptors permitted the accumulation of products storing light energy and facilitated the study of their properties. Revelation of photochemical pigment conversions directly in organisms is a much more difficult task, since pigments occur in different states and their transformations are coupled with the chain of subsequent enzymic processes, so that one can hardly expect to find any considerable accumulation of transformed pigment forms under normal physiological conditions.

Measurements of fluorescence and light absorption are particularly suitable for studying rapid processes in living intact organisms.

Some twenty years ago, in the experiments carried out in the laboratories of Kautsky, Wassink, and Franck, fluorescence of leaves after the periods of light and darkness was studied under different conditions. The results were usually interpreted in physical terms. We have already mentioned that these changes of fluorescence upon illumination were probably related to the change of the state and photostationary concentration of the fluorescent

form of chlorophyll (34, 38). Thus the usual intensity decline of fluorescence upon illumination and its reappearance after a dark period had to be explained by the accumulation of photochemically changed (photoreduced?) forms of chlorophyll and by their reversible regeneration. Analogous fluorescence changes are observed, for example, upon chlorophyll photoreduction in model systems.

Our group (26) was able to show reversible changes in the chlorophyll fluorescence spectrum of leaves upon illumination not only at 20°C. but at the liquid nitrogen temperature as well, apparently at the expense of the primary photochemical process.

In recent years, with the improvement of spectroscopic technique, there was opened the possibility of studying small and rapid changes of optical density (ΔD) taking place in living organisms upon illumination.

Differential spectra that demonstrate the difference in absorption spectra between an illuminated and non-illuminated object are characterized by a number of maxima indicating the increase (positive maxima) or decline (negative maxima) of the optical density in different spectral regions. Analysis of these spectra and their comparison with differential spectra of known compounds (e.g., of the oxidized or reduced cytochrome) allow their interpretation in certain cases.

One should consider therefore that the change of the optical density in maxima seen in these experiments is usually of the order of some tenths of a per cent, so that the possibility of change of selective light scattering, as well as that of absorption can not be ruled out [Latimer & Rabinowitch (160), and Latimer (161)]. Interpretation of the results obtained is contradictory. Some authors ascribe the differential absorption spectra obtained by them to the change of cytochromes, flavins, carotenoids and other pigments present in plants. We shall be considering here only the possibility of chlorophyll transformations.

Duysens (162) was the first to obtain a positive maximum at 515 to 520 mμ after illumination of *Chlorella;* these results received confirmation in the works of Witt (163), Bell (164), Strehler & Lynch (85), and others. Attention was drawn to the fact that this maximum corresponded to the photoreduced form of chlorophyll (133). In all these works, however, measurements were carried out in the region of 350 to 600 mμ. To solve the problem of the chlorophyll changes and their nature, the range of measurements had to be extended to the red spectral region. This was actually done by Coleman, Holt & Rabinowitch (165, 166). They showed that a negative chlorophyll maximum at 680 mμ corresponded to the positive one at 520 mμ.

Kok (167) when investigating a number of organisms, found, along with the maxima in the red region, a new negative band in the region of 700 to 705 mμ, which was ascribed to a hitherto unknown pigment. Comparing differential spectra after illuminating *Chlorella* and after the reaction of chlorophyll photoreduction, Coleman & Rabinowitch (166) pointed out their similarity. A richer set of maxima in *Chlorella* shows the possibility

of simultaneously ocurring changes of cytochromes, carotenoids, and flavins.

However, the fact must be explained that upon chlorophyll photoreduction the ratio of $\Delta D_{670m\mu}$ to $\Delta D_{520m\mu}$ usually is 2 to 3, while in *Chlorella* cells it hardly reaches unity.

Witt *et al.* (168) noted that the absorption decline at 430 mμ, in the blue absorption maximum of chlorophyll, corresponded to an increase of the maximum at 515 mμ. The red chlorophyll fluorescence simultaneously undergoes reversible changes.

Of importance is kinetic measurement of these transformations. Different authors pointed out the presence of both rapid and slow stages of ΔD changes in different maxima (Witt, Bell, and Strehler). In works of our laboratory slow changes of D (lasting seconds) in the red chlorophyll maxima were observed in homogenates of sugar beet leaves (169).

Study of the kinetics of ΔD changes at 515 mμ showed the process to be composed of a rapid stage (the order of 10^{-5} sec.), temperature independent, and a slow one (10^{-2} sec.), temperature dependent, and associated with the dark stage of the process [Witt *et al.* (163, 170, 170a)]. Different stages of the process, as in the case of photosynthetic luminescence, may be possibly connected with different types of photochemical processes: with rapid ones of electron transfer and slower ones of hydrogen (proton) transfer and dismutation of primary formed radicals.

Bell (164, 171, 171a) made a suggestion that the ΔD change at 515 mμ was an accessory effect of photosynthesis, on the basis of the following observations: the presence of the effect in air devoid of CO_2, and in a leaf in which photosynthesis was suppressed by phenylurethane. The effect was saturated at light intensities much lower than those required for the saturation of photosynthesis. A sharp decrease of the value of the effect under the conditions close to anaerobiosis and under the continued action of exciting light during 5 to 10 min. only was observed.

Differential spectra measurements were carried out on photosynthetic bacteria also. Duysens (9, 172) noticed reversible absorption changes of bacteriochlorophyll maxima in purple bacteria. Goedheer (10) found marked bacteriochlorophyll changes in bacteria chromatophores in the presence of ferric ions and associated these changes with bacteriochlorophyll photooxidation. Similar results were obtained in the work of Smith & Ramirez (173).

The above described experiments show the onset of the development of a very important region of investigations: pigment transformations in living organisms. A definite conclusion can hardly be made at this time, but the experiments show rather definitely the possibility of reversible photochemical chlorophyll changes.

Further investigation must reveal whether these changes are related to chlorophyll participation in the process of photosynthesis.

Joint action of two light quanta during photosynthesis.—In recent years

data appeared showing that simultaneous action of light of different wavelengths could favour the course of photosynthesis.

Warburg *et al.* (174) noticed that the action of blue-green light of a very low intensity (maximum of the action spectrum at 460 mμ) greatly increased the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis under the action of red light. Emerson (175) stated that upon the action of blue light, the long wave limit of *Chlorella* photosynthesis shifted to the extreme red region. Myers & French (176) measuring the action spectrum of the Emerson effect showed its similarity to the absorption spectrum of chlorophyll-*b*. A suggestion was made that blue light could also activate photocatalytic systems different from chlorophyll.

Voskresenskaya (177) noticed that in the region of 450 to 580 mμ oxygen uptake was increased in a number of plant organs containing no chlorophyll; the activity of flavin and cytochrome systems was shown. We found some acceleration of cytochrome-*c* reduction and oxidation upon illumination (133).

Light can also affect the activity of intermediate (photoreduced) forms of chlorophyll and its analogues, accelerating back reactions. There are some experimental data in this respect (178). We have already mentioned the hypothesis of Franck (71) on the joint action of excited chlorophyll molecules in the singlet and triplet states.

It should be said that the joint action of red and blue quanta seems to be not indispensable for photosynthesis, as the plants may apparently grow in the red light only.

Photosensitizing Action of Chlorophyll in the Processes of Hydrogen (Electron) Transfer

This type of reaction was studied in systems of different organization, such as pigment solutions, leaf homogenates, and chloroplast suspensions. These reactions may be regarded as separate links—"fragments"—of the photosynthetic chain, and therefore the elucidation of their mechanisms will contribute to the understanding of the course of the entire process occurring in living organisms.

Reactions in model systems.—Long ago in the experiments carried out in the laboratories of Baur, Gaffron, and others, chlorophyll in solution was shown to be able to sensitize oxidation of some organic compounds by oxygen and certain azo-dyes.

In our experiments upon illumination of the system chlorophyll-electron donor—electron acceptor with the red light we noticed a sensitized reduction of the electron acceptors at the expense of light quanta absorbed by chlorophyll (179 to 181). All chlorophyll analogues studied that were capable of photoreduction were found to possess this sensitizing action. In the case of bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin, reactions were excited in the near infrared (182).

With ascorbic acid as the electron donor, we found photoreduction of

safranin, riboflavin (179), and pyridine-nucleotides (180, 181). The light being switched off, these reactions go back at different rates, sometimes requiring oxygen to regenerate the dye from the leucoform.

In these reactions, light energy "storage," i.e., an increase of the free energy of the system, takes place and is characterized by the value of the difference between redox potentials of the hydrogen donor (ascorbic acid $E_o = 0.05$ v.) and hydrogen acceptor (pyridine nucleotides $E_o = -0.32$ v.).

In aqueous medium, chlorophyll absorbed by cytochrome-*c* sensitizes oxidation-reduction of this compound (133). In cytochrome photoreduction it is probably the proteins that serve as electron donors. Photosensitized oxidation of cytochrome was observed in the presence of air (133). With the use of azo-dyes as electron acceptors, their irreversible reduction takes place. The azo-dye, methyl red, was long ago applied in this type of reaction (e.g., 183). In some sensitized reactions that are irreversible under aerobic conditions, oxygen is the final electron acceptor.

Photosensitized oxidation of a number of hydrogen donors that were able to photoreduce chlorophyll and pheophytin, and photosensitized oxidation of reduced forms of cytochrome-*c* and pyridine-nucleotides were noticed by our group (181, 182, 184, 184a). It is most likely that in this case the dark stage of the reaction comes to chlorophyll regeneration from the intermediate photoreduced form at the expense of its oxidation by oxygen. An alternative mechanism of the primary photoformation of chlorophyll peroxide with the dark act of its reduction by a hydrogen donor is less likely, though labile products of the photooxidation of chlorophyll and bacteriochlorophyll interacting (slowly) with ascorbic acid to regenerate the pigment were found (108, 109); the reaction of chlorophyll photoreduction by hydrogen donors proceeds much faster than the photoreaction with oxygen. High quantum yield of sensitized photooxidation seems to be determined by very rapidly occurring irreversible oxidation of photoreduced forms of chlorophyll by oxygen.

The fact that the sensitized reactions studied do actually pass the stage of the reversible photoreduction of chlorophyll is confirmed by the following observations:

(*a*) Sensitized reduction of the hydrogen acceptors is noticed only in a system which contains hydrogen donors capable of participation in the reaction of chlorophyll photoreduction.

(*b*) In the three-component system containing electron donor, pigment, and electron acceptor no accumulation of photoreduced forms of pigments is found due to their rapid reaction with the electron acceptors. The whole acceptor molecules having been "sensitizingly" reduced, only then the formation of a photoreduced form of the pigment sensitizer takes place. This is displayed in the form of the induction period in kinetic studies of the sensitized reaction (130).

(*c*) At last, it is possible to carry out separately the photostage of the

reaction (formation of photoreduced forms of the pigment) and the reaction in the dark with the electron acceptors (138). In the case of chlorophyll this is illustrated by the experiments on the "red" photoreduced form; the "primary" photoreduced forms, however, react much faster with the acceptors, as was shown in the experiments of Evstigneev. The action of acceptors on the electrode photopotential in the chlorophyll-ascorbic acid system is significant (140), as is the "quenching" action of these compounds on the photoconductivity of the chlorophyll-ascorbic acid system (185) owing to their rapid reaction with the primary photoreduced form of chlorophyll. The mechanism of these reactions is the following:

(*a*) Photoreduction:

$$\mathrm{Chl} + \mathrm{AH_2} \rightleftarrows \cdot\,\mathrm{Chl^-} + \cdot\,\mathrm{AH_2^+} \rightleftarrows \cdot\,\mathrm{ChlH} + \cdot\,\mathrm{AH}$$

(*b*) Dark reactions of the photoreduced form with the hydrogen (electron) acceptor B; chlorophyll regeneration:

$$\cdot\,\mathrm{Chl^-} + \mathrm{B} \rightarrow \mathrm{Chl} + \cdot\,\mathrm{B^-}$$

$$\cdot\,\mathrm{ChlH} + \mathrm{B} \rightarrow \mathrm{Chl} + \cdot\,\mathrm{BH}$$

(*c*) Dismutation of semiquinone forms:

$$\cdot\,\mathrm{B^-} + \mathrm{H^+} \rightarrow \cdot\,\mathrm{BH};\ 2\mathrm{BH} \rightarrow \mathrm{B} + \mathrm{BH_2}$$

This mechanism of chlorophyll sensitization experimentally shown in our laboratory is similar to the Weiss scheme (186) proposed for the dyes-sensitizers that are able to form leuco-compounds.

Such a reaction mechanism is proved by direct experiments in solutions. However, in the case of heterogenous sensitization on pigment crystals and in colloidal solutions it is very difficult to separate individual stages of the reactions occurring at the phase boundary. One may think that the elementary acts of the electron transfer from the acceptor to the pigment molecule ("hole") at the phase boundary and the compensating act of giving back the electron to the acceptor molecule are retained here too. The possibility of such a mechanism was suggested in the experiments studying photocatalytic action of heterogenous sensitizers (187).

This possibility is also shown by the experiments of Evstigneev & Terenin (188) on measuring photopotentials of solid films of chlorophyll and its analogues in electrolyte solutions and by the recent experiments on chlorophyll sensitization in heterogenous systems (189).

Thus, "simple" reactions of hydrogen transfer occur with chlorophyll intermediate photoreduction in model systems; probably, reactions of this type are a link of photobiological processes in leaf homogenates and chloroplast suspensions where the primary photoproducts are metabolized with the participation of enzymic systems.

Involvement of Photoproducts in the System of Biochemical Processes

Chloroplast enzymes.—It was known long ago that a combination of photochemical and dark biochemical enzymic stages took place in photosynthesis.

One of the ways leading to the elucidation of these stages is the study of enzymic activity of pigment-bearing structures, i.e., of plant chloroplasts and bacterial chromatophores. This problem was given a close attention in recent years.

A comprehensive review of this problem was recently given by Sissakian (190). His studies showed that chloroplasts have a set of various enzymes present in different states, differing in the strength of their bonds with the plastid protein complex. The character of these bonds depends on the physiological state of the plant; it alters in its developmental cycle and can be disrupted upon the isolation of protoplasmatic structures and upon chloroplast destruction to grana. In chloroplasts enzymes are present that participate in oxido-reductive, hydrolytic, and various synthetic reactions (190). Frenkel's review (191) covers the data on chromatophore enzymic activity of photosynthetic bacteria.

The presence of various enzymes bound within the chloroplast structure is a prerequisite of their possible conjugation with photochemical pigment reactions; we are most interested in the systems able to catalyze reactions of the donor or acceptor molecules with electrons (hydrogen) mobilized in photochemical pigment reactions.

In the works of Hill (192), suggestions were made on the participation of a cytochrome system in the photosynthetic path of the electron. The works of Sissakian *et al.* (193) showed conjugation of cytochrome oxidase with photochemical chlorophyll reactions to be possible. Pyridine-nucleotides and flavins can be used as systems accepting electrons from chlorophyll. Participation of corresponding enzymes in this type of reactions is determined by dehydrogenase activity of plastids as revealed in the works of Sissakian *et al.* (194) and by the relation of this activity to the photochemical activity of chloroplasts studied with the use of the method of reversible inhibition (195). Apparently the "proteinic factor"—pyridine-nucleotide-reductase—mentioned below is an enzyme of this type. Boichenko & Zakharova (196) pointed out the hydrogenase activity of chloroplasts and probable role of the bound Fe and Mn in the reactions of CO_2 reduction. Particular attention is given at present to the conjugation of enzymes and photochemical reactions in phosphorylation.

Photochemical oxido-reductive reactions in homogenates of green leaves and chloroplasts.—Homogenates of leaves, as well as chloroplast suspensions are capable of the Hill reaction, as discussed in the extensive literature recently summarized, for example, in a review of Clendenning (197). In recent years attention has been drawn to simpler hydrogen transfer reactions in homogenates and chloroplasts. Sometimes the systems which have lost the

ability for the Hill reaction as a result of being kept at room temperature can undergo those simpler reactions (169). Apparently the sensitive enzymic systems participating in the liberation of the molecular oxygen are inactivated thereby.

Good & Hill (198) noticed photoreduction of FMN and benzylviologen by chloroplasts under strictly anaerobic conditions. A reversible photoreduction of safranin and an irreversible one of methyl red in homogenates of green leaves that contained sodium ascorbate was studied by our group (169). A reversible change of optical density in the chlorophyll absorption maximum in the presence of ascorbate was noticed in the same work; this change has to be ascribed to photoreduction.

Vernon & Hobbs (199) noted the photoreduction of FMN and indigocarmine in the presence of dichlorphenolindophenol, and ascorbate by homogenates of green sugar beet leaves. The authors associate this process with the Hill reaction, but in our opinion, in these reactions a chlorophyll-sensitized hydrogen transfer takes place with ascorbic acid playing the role of hydrogen donor.

Amidst compounds participating in these relatively simple reactions, it is cytochromes and pyridine nucleotides that attract a peculiar attention. Cytochrome transformations sensitized by chlorophyll were observed both in simple model systems (133), and in homogenates, chloroplast suspensions and living organisms. Extensive literature is devoted to this problem which was analyzed in recent reviews of Kamen (200), and Smith & Chance (201). Cytochromes can play the part of both the donor and acceptor of electrons in sensitized reactions in different systems. In relation to oxido-reductive properties of the medium, either photochemical reduction or oxidation of cytochromes is possible, both processes of which could be a step on the path of electron transfer in photosynthesis. When analyzing the mechanism of these reactions, suggestions were made on the transmission of the excitation energy from Mg to Fe-porphyrins; however, electron transfer is more likely in these cases (133).

Photoreduction of pyridine-nucleotides.—These reactions have drawn much attention, since reduced pyridine-nucleotides can participate in carbon dioxide assimilation.

In 1949 we have experimentally shown the possibility of photosensitized reduction of diphosphopyridine-nucleotide in solution, at the expense of light energy absorbed by chlorophyll (180, 181). In 1951 the papers of Vishniac & Ochoa (202), Tolmach (203), and Arnon (204) were published and showed the possibility of the reduction of pyridine-nucleotides in leaf homogenates or chloroplasts in the presence of enzymic preparations. San Pietro (205) and San Pietro & Lang (205a) with the use of spectrophotometric technique demonstrated pyridine-nucleotide reduction in homogenates and found a protein factor catalyzing the light reaction. The same conclusions were reached by Arnon *et al.* (206). Vernon *et al.* noticed photoreduction of pyridine-nucleotides in homogenates of photosynthetic bacteria

(207) and upon prolonged illumination of chloroplast suspension (199). Frenkel found the reduction of pyridine-nucleotides with the use of reduced FMN in the chromatophores of photosynthetic bacteria (208).

It was already mentioned that in the works of Sissakian *et al.* a correlation was revealed between the inhibition of pyridine-nucleotide dehydrogenases by nicotinamide and photochemical activity of chloroplasts (195).

In a number of the above mentioned papers the reduction of pyridine-nucleotides was judged by the increase of the extinction coeffcient at 340 mμ after illumination and by the drop of its value upon the addition of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde as oxidation substrates. No measuring of absorption spectra of the reduced forms of pyridine-nucleotides could be done in this work, apparently, due to the strong light absorption by homogenates in this spectral region. Duysens & Amesz (209) observed pyridine-nucleotide reduction directly in living leaves with the application of differential spectroscopy and fluorescence measurement. Measuring fluorescence spectra of leaves at different temperatures, our group was able (22) to find maxima probably corresponding to bound and free forms of reduced pyridine-nucleotides.

The Tamyia group (210) did not find correlation between the reduced pyridine-nucleotides and the accumulation of the "reducing power" after the illumination of *Chlorella* cells (measured by $C^{14}O_2$ incorporation). An increase of TPN and a decrease of DPN were found upon illumination. The authors reach the important conclusion that in the experiments with preillumination the primary reducing agent is formed prior to the reduction of pyridine-nucleotides.

The elementary mechanism of the reduction of pyridine-nucleotides in chloroplasts seems to be connected to chlorophyll participation in the processes of electron transfer. However, the existence of this mechanism in biologically organized systems requires direct experiments.

*Photophosphorylation.**—It was often supposed that the primary photoproducts associated with pigment transformation led to the formation of substances participating in the dark biochemical reactions of photosynthesis. In papers of Warburg (213, 213a) ideas are developed on the formation of primary photoproducts that undergo back reactions connected with oxygen liberation and CO_2 assimilation; an analysis of these works is presented in the paper of Gaffron & Rosenberg (214). Experimental material now available suggests that the intermediates that store light energy after the photochemical stage are compounds well known to biochemists, such as reduced forms of pyridine-nucleotides, and high energy phosphates. It is, however, very likely that further investigations will lead to the discovery of new intermediate compounds [cf. works of Tamyia group (210)].

* Recent reviews of Arnon (211, 212) and a paper of Kandler in this issue were devoted to this problem. Therefore in the present review this question is considered very briefly.

Ideas concerning possible formation of high energy phosphates in photosynthesis were forwarded as early as in 1943 in the papers of Ruben (215) and Emerson *et al.* (216).

Wassink *et al.* (217) observed alterations in the amount of phosphate in suspensions of *Chromatium* and *Chlorella* with alternating dark and light. Kandler (218) found changes in phosphate amounts in *Chlorella* in the dark and upon illumination. Frenkel (219) noticed that illumination of photosynthetic bacteria under anaerobic conditions results in the storing of high energy phosphates. The works of Sissakian (190) and of others showed chloroplasts to be the focus not only of pigments but of various enzyme systems able to perform many biochemical syntheses as well.

Arnon, Allen & Whatley (220, 220a) discovered the ability of isolated chloroplasts to synthesize ATP in the light. The fact that washed chloroplasts have a very low respiration makes it easier to study formation of active compounds in question upon illumination. Detailed study of this phenomenon in Arnon's laboratory led to the following results: Upon chloroplast illumination, incorporation of inorganic phosphate (P) into ATP took place under conditions in which neither liberation nor uptake of oxygen was ever observed. Arnon called this reaction the "cyclic phosphorylation":

$$\text{light} + n\text{P} + n\text{ADP} \rightarrow n\text{ATP}$$

The rate of the process increased greatly if cofactors, such as ascorbic acid, FMN, derivatives of vitamin K (221), phenazine methosulfate (222), or some other oxido-reductive systems, capable of electron transfer were added. Hill & Walker (223) showed that phenazine methosulfate activity is due to its fast conversion into pyocyanine in light.

Presumably, cofactors become involved in the system of electron transfer between the photochemically active, reduced and oxidized compounds formed thereby. Further works of the Arnon group showed that the conditions of conjugation of the phosphorylation and the Hill reaction could be found according to the following summary equation:

$$2\text{FeCy}^{+3} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{ADP} + \text{P} \rightarrow 2\text{FeCy}^{+2} + 1/2\text{O}_2 + \text{ATP}$$

and with the reaction of TPN reduction:

$$\text{TPN} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{ADP} + \text{P} \rightarrow \text{TPNH}_2 + \text{ATP} + 1/2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$$

Here the extrinsically introduced electron acceptor reacts with the photochemically formed reductant, while oxygen is liberated in the "usual" photosynthetic way. Jagendorf analysed conditions of the involvement of electron carriers in reactions of different types (224). As a result of the second reaction given above, compounds are formed that are required for the cycle of CO_2 assimilation. This reaction occurs with small amounts of cofactors, such as FMN, vitamin K, ascorbic acid, or without them. With the addition of

cofactors, ATP accumulation sharply increased, due to cyclic phosphorylation, while oxygen liberation and TPN reduction were eliminated.

ATP formation when using the Hill oxidants as electron acceptors is readily understandable, as in this case the "energy overfall" is large; the E_0' of primary photoreduced compounds does not exceed the potential of the hydrogen electrode (−0.42v. at pH 7); their interaction with the system Fe^{+++}/Fe^{++} (+0.78v.) is accompanied with a considerable decrease of ΔF of the system.

The situation is different when TPN or DPN ($E_0' - 0.32$v.) are electron acceptors; the "energy overfall" is small here and ATP formation can hardly be perceived on the way of electrons from the primary reductant to TPN, according to Arnon's scheme. Perhaps ATP is still formed in this case at the expense of the oxidation of the photoreduced TPN. It should be noted in this connection that an energetic TPNH and DPNH photooxidation, sensitized by chlorophyll in solutions and suspensions of chloroplasts and grana, was recently observed in our laboratory (181).

The Arnon group (211, 212) was able to separate the light and dark stages of the reaction: formation of the "assimilatory power," (the TPNH and ATP) upon illumination of green "grana" in the absence of oxygen; and the assimilation of labelled CO_2 upon interaction of the illuminated suspension with the stroma of chloroplasts in the dark. In the presence of catalytic amounts of glucose phosphate, phosphate esters of sugars and other compounds were obtained that were identified by means of chromatography and radioautography. These results were proved by experiments in which artificially obtained ATP and TPN were added to homogenates of green leaves with labelled CO_2.

These works serve as a basis for the pattern of photosynthesis that is now generally accepted: formation of reduced pyridine-nucleotides and high energy phosphates in light, and dark reactions of CO_2 assimilation with the participation of these compounds. However, the conjugation mechanism of these reactions with the primary photochemical process occurring with chlorophyll is, thus far, not clear.

One may forward the following hypothesis based on the study of the photochemical properties of chlorophyll (225). As a result of the primary photochemical process the acceptance of an electron by the excited chlorophyll molecule from the donor molecule (in the end, from a water molecule) takes place. The primary reductant (photoreduced chlorophyll?) and the oxidized hydrogen donor are formed in the midst of the lipid phase or at the phase boundary. Biochemical electron carriers, FMN, and vitamin K, can participate in back reactions with these active compounds.

It should be noted that the compounds of these types (riboflavins, quinones) readily react with the photoreduced form of chlorophyll, being reduced with the regeneration of the "green" chlorophyll. Introduction of an "irreversible" electron acceptor (the Hill oxidant or pyridine-nucleotides) directs the process towards the conjugation of the Hill reaction with ATP

formation while various "reversible" redox-systems "short-circuit" the cycle leading only to ATP formation. Thus, in all variants, phosphorylation is conjugated with photochemical electron labilization in the chloroplast grana and depends on the nature of intermediate systems transferring the electron.

Study of Intermediates by Means of Tracers

To study subsequently formed intermediates, tracers are widely applied. The organism photosynthesizes in the medium containing labelled molecules of CO_2, H_2O or other compounds; varying the periods of the darkness and illumination the organism is fixed (killed), and the distribution of isotope in the products formed and in atomic groups of labelled molecules is studied. An important stage in this procedure is the method of fixation in the process of which a distortion of the true isotope distribution is possible as a result of the destruction of unstable labelled compounds upon heating under the action of solvents, etc. Thereby the isotope can pass into more stable compounds detected analytically which are not really formed in living plants and are artifacts. The "mild" fixation methods of plant material were given great attention in recent works with labelled carbon in which primary products of photosynthesis were investigated (*226* to *228*).

The path of carbon.—The long-lived radioactive isotope of carbon, C^{14}, in the form of labelled carbon dioxide is now widely applied to the study of the products of carbon dioxide assimilation by plants. Only a few works were carried out using the heavy isotope C^{13}; the short-lived radioactive isotope C^{11} is not used at all at present.

A vast amount of study was devoted to the intermediates of photosynthesis, using $C^{14}O_2$. Our survey is not aimed to review these works, the more so, as there are modern monographs on this subject (*229*, *230*). We would like to make only some brief comments. The process begins with the preliminary unstable binding of carbon dioxide [see Doman (*231*); Metzner *et al.* (*232*)]. Widely known works of Calvin, and Benson *et al.* showed that carbon dioxide reduction by plants is a multi-step cyclic process. In this cycle a compound is regenerated that binds carbon dioxide. According to Calvin's works, this compound is ribulose diphosphate which is then converted to phosphoglyceric acid. These results received confirmation in Doman's experiments (*228*) with low temperature fixation and chromatography of the primary products of carbon dioxide binding. The intermediates of the cycle and the nature of enzyme systems that regulate separate stages of the reaction become ever more clarified.

When studying the paths of carbon in photosynthesis, Boichenko & Zakharova (*226*) found iron to be present in the composition of primary products of $C^{14}O_2$ reduction.

The works of Nichiporovich *et al.* (*233* to *235*) showed that the relative rapidity of the entry and distribution of labelled carbon, assimilated in the process of photosynthesis, in various products (carbohydrates, amino acids, organic acids, proteins) varies strongly with the type and species of plant,

its age, the character of root and nitrogen nutrition, and the intensity and spectral composition of light.

Thus, red light promotes increased carbohydrate formation, while blue promotes formation of amino acids and proteins. Having noticed that blue light activates cytochrome, flavin systems, and respiration in light, the Nichiporovich group supposed that one of the causes altering the ratio of carbon transformations was the alteration of the ratio of oxidative to reductive reactions of photosynthesis.

The problems of the relation between photosynthesis and respiration are analysed in the recent review of Kolesnikov (236).

Unlike photosynthesis in plants, no sugars are stored as the final products during bacterial photosynthesis. Fuller (237) showed that in *Chromatium,* fixed carbon is primary accumulated in aspartic acid. This paper analyses the paths of carbon in bacterial photosynthesis.

The working of carbon cycles requires a supply of active products formed as a result of photochemical reactions. According to the above mentioned investigations, these are the reduced pyridine-nucleotides and ATP. Having given up their hydrogen in the carbon cycle, TPN and DPN return to the system of photochemical reactions; in a similar manner, ADP returns to the cycle of photosynthetic phosophorylation.

The path of hydrogen.—The heavy isotope of hydrogen (deuterium) and the radioactive one (tritium) were used in the form of heavy water and T_2O. Due to great differences in atomic weight of these isotopes from hydrogen, the value of isotopic discrimination is great here.

Moses & Calvin (238) showed that during *Chlorella* photosynthesis in the presence of T_2O and $C^{14}O_2$, T appeared in the same photosynthetic products as C^{14}. Since T of high specific activity was used, action of radioactivity was evaluated by the character of T distribution in assimilation products in these experiments as compared to control ones. It was noticed that T entered in light with an intensity three times that in the experiments in the dark. Primary T accumulation was noticed in glycolic, phosphoglyceric, and glutamic acid. In the dark experiments, T is accumulated to a greater extent in amino acids. The authors stress the difficulties in the interpretation of the results obtained due to hydrogen exchange and isotopic effect.

In other work, the Calvin group (239) studied the influence of high concentrations of D_2O in water (up to 9 per cent) on *Chlorella* photosynthesis). With the diminution of photosynthetic activity in this medium, the amount of the alcohol-insoluble fraction (proteins, polysaccharides, nucleic acids) diminished, and $C^{14}O_2$ distribution resembled carbon dioxide assimilation in the dark.

In order to elucidate the possibilities of a photochemical exchange of hydrogen atoms in the chlorophyll molecules in the process of photosynthesis, Kutyurin (67, 240) carried out his work on *Elodea canadensis* with a D_2O concentration in the nutritive medium from 5 to 20 per cent. N^{15} was used

simultaneously to determine the intensity of chlorophyll biosynthesis under the conditions of prolonged experiments. Chlorophyll extracted from plants was carefully purified by means of chromatography and dried to constant weight. Dry chlorophyll samples were burned and the water thus obtained was analysed by means of a mass spectrometer. In short-term experiments (2.4 hr.) no D was found in chlorophyll, while in 68-hour experiments the content of D corresponded to the equilibrium exchange of 1.3 hydrogen atoms per chlorophyll molecule.

The absence of a rapid photochemical exchange of hydrogen atoms in chlorophyll proved the lack of reversible dehydration of its molecule as a stage in photosynthesis. The possibility of deuterium storage in chlorophyll at the expense of pigment exchange and biosynthesis during the experiment is discussed in the paper (240). Vishniac & Rose (241) studied tritium incorporation in chlorophyll upon illumination of *Chlorella* and *Scenedesmus* in water containing T_2O. Experiments showed chlorophyll to contain only a minor part of tritium when compared to the total exchange (one hydrogen atom per one chlorophyll molecule). Thus, these results are in general conformity with previous experiments of Norris, Ruben & Allen (242).

However, Vishniac found that upon pigment extraction from chloroplast fragments by acetone at minus 5°C., some nonextracted chlorophyll remains in the residue. In these preparations chlorophyll easily exchanges hydrogen for tritium after illumination of algae. If these preparations are treated with alkali, the whole of the radioactivity passes to water. Thus, in the minor part of chlorophyll, which is present in some different form, the hydrogen is readily exchangeable. It is thus far not clear whether the incorporation of tritium proceeds at the expense of oxido-reductive, or acid-base processes. The latter seems more likely, as in model experiments, (chlorophyll in a mixture of pyridine with ethers and T_2O) incorporation of a certain amount of tritium into chlorophyll was observed. In pyridine, a labilization of the hydrogen atom at C_{10} of the chlorophyll molecule seems to take place. Vishniac (243) pointed out that upon paper chromatography of pigments from acetone powder, most tritium is revealed not in the zone of chlorophyll-*a*, but in the zone of another, as yet undetermined, pigment. It might be a chlorophyll derivative containing free carboxyl groups (without phytol).

Thus, the known experimental material obtained with the use of hydrogen isotopes shows the impossibility of chlorophyll participation in photosynthesis by means of the primary reversible dehydrogenization.

The path of oxygen.—Water labelled with the heavy oxygen isotope O^{18} was used by Ulubekova (244) to reveal the differences in oxygen metabolism during photosynthesis and photoreduction. The algae, after illumination in H_2O^{18} (in some cases $CO_2{}^{18}$ was used), were killed with liquid nitrogen and dried in vacuum. Dry cells were burned and the oxygen of the water thus obtained was analysed by mass spectrometry. Intensity of O^{18} incorporation in the organic matter of cells was in proportion to light in-

tensity; at 2 to 3 thousand lux no difference was found in the level of oxygen enrichment in photosynthesis and photoreduction.

The employment of the activation technique in the experiments of Calvin *et al.* (245) with O^{18} is very promising. This method is based on the irradiation of the preparations containing O^{18} with protons of the energy of 4.5 Mev. Thereby a radioactive isotope of fluorine, F^{18}, is formed. An experiment was carried out on eliminating the radioactive background, as a result of which conditions were found for the exact determination of products containing O^{18} after the illumination of algae in H_2O^{18}. The method, by its sensitivity, exceeds that of mass spectrometry, allowing determination of down to 0.1γ of O^{18} in the product upon incubation of algae in 20 per cent H_2O^{18}.

The heavy oxygen was shown to be accumulated during photosynthesis first in sugar-phosphates: mono- and diphosphate and phosphoglyceric acid. As yet, however, no intermediates were found prior to molecular oxygen liberation.

The improvement of the mass-spectrometric technique allowed it to be used for the registration of natural deviations in isotopic composition of oxygen and for the gas exchange evaluation (CO_2 uptake, O_2 liberation). Vinogradov *et al.* (246) measured the precise isotopic composition of the oxygen liberated in photosynthesis of *Elodea canadensis* and diatoms.

It was stated that respiration affects the isotopic composition of oxygen in photosynthesis. This phenomenon, which is due to the prevailing uptake of the isotope O^{16} in respiration, was studied in general form by Lane & Dole (247). Vinogradov *et al.* suggest that this effect can account for the difference in the isotopic composition of oxygen in photosynthesis and that of water, which attained as much as 10 to 20 per cent towards the enrichment of photosynthetic oxygen by O^{18} isotope in their experiments.

To sum up, the use of the isotope C^{14} allowed the general pattern of the path of carbon in photosynthesis to be stated; the use of the isotopes of hydrogen and oxygen for the study of intermediates of water photooxidation has given, thus far, no decisive results. One of the main problems of photosynthesis, the mechanism of molecular oxygen liberation, remains unsolved. Presumably, the intermediates of water oxidation are exceedingly short-lived, and the stage of molecular oxygen formation proceeds at a very high velocity. There are but few data on the participation of manganese in the system of these reactions (248).

Conclusion

Extensive experimental material obtained in the study of photosynthesis during the last five years gave further support to the following general pattern of the process of photosynthesis.

As a result of light quantum absorption by the pigment system of the plant, there takes place the primary photophysical act—formation of chlorophyll excited states of different lifetimes—and the appearance of unpaired

electrons, probably at the expense of the formation of the triplet states, and of the reversible electron acceptance by the excited chlorophyll molecules.

In the primary photochemical process, the excitation energy is changed into potential chemical energy of primary photoproducts. It is most likely that the primary photoprocess consists in the uplifting (in the terms of energy) of electrons (hydrogen) from donor molecules to acceptor molecules. Thereby the excited chlorophyll molecule can play the part of an intermediate electron (hydrogen) carrier, undergoing reversible photoreduction and regeneration in the cycle. It is not clear as yet whether the water molecule is involved in the primary photochemical process or in subsequent dark stages. No intermediates of water photooxidation have been found up to the present time.

Chlorophyll can pass the electron (hydrogen) from the donor molecule to those of the acceptor up to the level of reduced pyridine-nucleotides, while back reactions of primary photoproducts can be associated with the formation of high energy phosphates. Chloroplast enzymes participate, probably, in these reactions.

Thus, as a result of photochemical reactions coupled with the dark stages, intermediates of longer lifetimes are accumulated that "store" the light energy—reduced pyridine-nucleotides and high energy phosphates consumed in the further biochemical reactions of carbon dioxide reduction.

CO_2 assimilation in photosynthesis is a multi-stage cyclic enzymic process in which the compounds primarily binding CO_2 undergo regeneration. This cycle is closely coupled with other paths of plant metabolism, such as respiration, nitrogen assimilation, etc.

The above is only a vague outline of the most probable and accepted working hypothesis; the ultimate elucidation of the mechanism of photosynthesis requires much more effort.

LITERATURE CITED

1. Wolken, J., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **10**, 71 (1959)
2. Wassink, E. C., Katz, E., and Dorrenstein, R., *Enzymologia*, **7**, 113 (1939)
3. French, C. S., *J. Gen. Physiol.*, **23**, 483 (1940)
4. Vermeulen, D., Wassink, E. C., and Reman, H., *Enzymologia*, **4**, 254 (1937)
5. Duysens, L. N. M., *Nature*, **168**, 548 (1951)
6. Krasnovsky, A. A., Voinovskaya, K. K., and Kossobutskaya, L. M., *Dokla. dy Akad. Nauk S.S.S.R.*, **85**, 389 (1952)
7. Krasnovsky, A. A., Kossobutskaya, L. M., and Voinovskaya, K. K., *Dokla. dy Akad. Nauk S.S.S.R.*, **92**, 1201 (1953)
8. Brill, C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **29**, 458 (1958)
9. Duysens, L. N. M., Huiskamp, W. J., Vos, J. J., and van der Hart, J. M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **19**, 188 (1956)
9a. Duysens, L. N. M., *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **52**, 157 (1952–53)
10. Goedheer, J. C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **57**, 295 (1957–1958)
11. Voinovskaya, K. K., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimya*, **18**, 1626 (1953)

11a. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **81,** 879 (1951)
12. Weigl, J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **75,** 999 (1952)
13. Holt, A. S., and Jacobs, E. E., *Am. J. Botany,* **41,** 718 (1954)
14. Jacobs, E. E., Vatter, A. E., and Holt, A. S., *Arch. Biochem. Biophys.,* **53,** 228 (1954)
15. Komen, J. G., *Biochim. et Biophys. Acta,* **22,** 9 (1956)
16. Krasnovsky, A. A., *Biofizika,* **4,** 3 (1959)
17. Katz, E., and Wassink, E. C., *Enzymologia,* **7,** 108 (1939)
18. Larsen, H., *Kgl. Norske, Videnskab. Selskabs, Forh. Skrifter 1, 1953* (Trondheim 1954)
19. Krasnovsky, A. A., and Pakshina, E. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **127,** 913 (1959)
19a. Shaposhnikov, V. N., Kondratyeva, E. N., and Fedorov, V. D., *Mikrobiologia,* **27,** 529, 1958
20. Smith, J. H. C., and Benitez, A., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **52,** 149, 153 (1952–53)
21. Shibata, K., *J. Biochem. (Tokyo),* **44,** 147 (1957)
22. Litvin, F. F., and Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **117,** 106 (1957); *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **120,** 764 (1958); *Izvest. Akad. Nauk S.S.S.R., Ser. fizicheskaia,* **23,** 82 (1959)
23. Krasnovsky, A. A., and Kossobutskaya, L. M., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **85,** 177 (1952)
24. Kossobutskaya, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimja,* **19,** 37 (1954)
25. Krasnovsky, A. A., and Bystrova, M. I., *Biokhimja,* **25,** 1 (1960)
26. Litvin, F. F., Krasnovsky, A. A., and Rikhireva, G. T., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **127,** 699 (1959)
27. Smith, J. H. C., and Benitez, A., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **52,** 148 (1952–53)
28. Smith, J. H. C., and Kupke, D. W., *Nature,* **178,** 751 (1956)
29. Smith, J. H. C., and French, C. S., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **57,** 190 190 (1957–58)
30. Latimer, P., and Smith, J. H. C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **57,** 293 (1957–58)
31. Godnev, T. N., Shlyck, A. A., and Liakhnovich, J. P., *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S.S.S.R.,* **4,** 393 (1957)
32. Wolf, J., and Price, L., *Plant Physiol.,* **30,** Suppl. 31 (1956); *Arch. Biochem. Biophys.,* **72,** 293 (1957)
33. Löeffler, J. E., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **54,** 159 (1954–55)
34. Krasnovsky, A. A., and Kossobutskaya, L. M., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **91,** 343 (1953)
35. Krasnovsky, A. A., Nesterovskaya, E. A., and Goldenberg, A. B., *Biofizika,* **1,** 328 (1956)
36. French, C. S., and Elliott, R. F., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **57,** 278 (1957–58)
36a. French, C. S., *Photobiology,* 52 (Proc. Ann. Biol. Colloq., 19th Meeting, Oregon State College, Corvallis, Ore., April 1958)
37. Krasnovsky, A. A., and Kossobutskaya, L. M., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **104,** 440 (1955)

38. Vorobieva, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimja,* **21,** 126 (1956)
39. French, C. S., and Church, A. B., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **54,** 162 (1954–55)
40. French, C. S., and Huang, H. S., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **56,** 266 (1956–57)
41. French, C. S., and Young, V. K., *J. Gen. Physiol.,* **35,** 873 (1952)
42. Emerson, R., Chalmers, R., and Cederstrand, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,* **43,** 133 (1957)
42a. Emerson, R., Chalmers, R., Cederstrand, C., and Brody, M., *Science,* **123,** 673 (1956)
43. Yocum, C. S., and Blinks, L. R., *J. Gen. Physiol.,* **41,** 1113 (1958)
44. Brody, S. S., and Brody, M., *Arch. Biochem. Biophys.,* **82,** 161 (1959)
45. Kossobutskaya, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimya,* **18,** 340 (1953)
46. Godnev, T. N., Terentieva, M. V., and Parmon, K. N., *Izvest. Akad. Nauk Belorus. S.S.R.,* **1,** 93 (1949)
47. Godnev, T. N., and Akulovich, N. A., *Referaty nauchno-issled. rabot Instituta Biologii Akad. Nauk Belorus. S.S.R. za 1955,* str. 49 (Izdat. Akad. Nauk Belorus. S.S.R., Minsk, 1956)
48. Ossipova, O. P., *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S.S.S.R.,* **4,** 28 (1957)
49. Krasnovsky, A. A., Vorobieva, L. M., and Pakshina, E. V., *Fiziol Rastennii Akad. Nauk S.S.S.R.,* **4,** 124 (1957)
50. Brown, J. S., and French, C. S., *Plant Physiol.,* **34,** 305 (1959)
51. Maslova, T. G., and Sapozhnikov, D. I., *Problemy fotosinteza. Sbornik trudov II. Vsesoyuznoi Konferentsii po fotosintezu, Moskwa, 1957* (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
52. Godnev, T. N., and Akulovich, N. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **120,** 1307 (1958)
53. Jacobs, E. E., Holt, A. S., and Rabinowitch, E., *J. Chem. Phys.,* **22,** 142 (1954)
54. Trurnit, H. J., and Colmano, G., *Biochim. et Biophys. Acta,* **31,** 434 (1959)
55. Belavtseva, E. M., Vorobieva, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biofizika,* **4,** 521 (1959)
56. Rabinowitch, E., Jacobs, E. E., Holt, A. S., and Kromhout, R., *Z. Physik,* **133,** 261 (1952)
57. Jacobs, E. E., Holt, A. S., Kromhout, R., and Rabinowitch, E., *Arch. Biochem. Biophys.,* **72,** 495 (1957)
58. Jacobs, E. E., Vatter, A. E., and Holt, A. S., *J. Chem. Phys.,* **21,** 2246 (1953)
59. Donnay, G., *Arch. Biochem. Biophys.,* **80,** 80 (1959)
60. Zill, L. P., Colmano, G., and Trurnit, H. J., *Science,* **128,** 478 (1958)
61. Takashima, S., *Nature,* **169,** 182 (1952)
61a. Brody, S. S., *Science,* **128,** 838 (1958)
62. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **95,** 611 (1954)
63. Shlyck, A. A., Lyakhnovich, J. P., Kaler, V. L., and Lipskaya, G. A., *Doklady Akad. Nauk Belorus. S.S.R.,* **2,** 349 (1958)
64. Godnev, T. N., and Shlyck, A. A., *Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva 1955,* **12,** 358 (1956)
65. Shlyck, A. A., *Metod mechenykh atomov v izuchenii biosinteza khlorofilla,* Minsk (1956); *Doklady Akad. Nauk Belorus. S.S.R.,* **1,** 121 (1957)*

66. Turchin, F. V., Guminskaya, M. A., and Plyshevskaya, E. G., *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S.S.S.R.*, **2**, 3 (1955)
67. Kutyurin, V. M., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **106**, 355 (1956)
67a. Gubbenet, E. R., and Bazhanova, N. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **105**, 586 (1955)
68. Sironval, C., and Kandler, O., *Biochim. et Biophys. Acta*, **29**, 359 (1958)
69. Wolken, J. J., and Mellon, A. D., *Biochim. et Biophys. Acta*, **25**, 267 (1957)
70. Rabinowitch, E., *Photosynthesis*, VII, part 1 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1951)
71. Franck, J., *Research in Photosynthesis*, 142 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **44**, 941 (1958)
72. Gurinovich, T. P., Ermolenko, I. N., Sevchenko, A. N., and Solovyev, K. N., *Optika i Spektroskopia*, **3**, 237 (1957); *Problemy Fotosinteza*, str. 107 (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
72a. Stupp, R., and Kuhn, H., *Helv. Chim. Acta*, **35**, 2469 (1952)
73. Kravtsov, L. A., and Gruzinsky, V. V., *Doklady Akad. Nauk Belorus. S.S.R.*, **1**, 103 (1957)*
74. Dmitrievsky, O. D., Ermolaev, V. L., and Terenin, A. N., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **114**, 751 (1957)
75. Brody, S. S., and Rabinowitch E., *Science*, **125**, 555 (1957)
76. Tumerman, L. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **117**, 605 (1957)
77. Franck, J., and Livingston, R., *J. Chem. Phys.*, **9**, 184 (1941)
78. Terenin, A. N., *Acta Physicochimica, U.R.S.S.*, **18**, 210 (1943)
79. Lewis, G. N., and Kasha, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 2100 (1944)
80. Tollin, G., Fujimori, E., and Calvin, M., *Nature*, **181**, 1266 (1958)
81. Becker, R. S., and Kasha, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3669 (1955)
82. Terenin, A. N., *Problemy Fotosinteza*, str. 9 (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
83. Krasnovsky, A. A., *Voprosi khimich. kinetiki, kataliza i reaktsion. sposobnosti*, str. 92 (Izd. Akad. Nauk, S.S.S.R., 1955)
84. Strehler, B. L., and Arnold, W., *J. Gen. Physiol.*, **34**, 809 (1951)
85. Strehler, B. L., and Lynch, V., *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 527 (1957)
86. Arthur, W. E., and Strehler, B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 507 (1957)
87. Litvin, F. F., Vladimirov, G. A., and Krasnovsky, A. A., *Uspekhi Fiz. Nauk*, **71**, No. 1 (1960)
88. Tollin, G., Fujimori, E., and Calvin, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **44**, 1035 (1958)
88a. Tollin, G., and Calvin, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **43**, 895 (1957)
89. Arnold, W. A., and Sherwood, H. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **43**, 105 (1957)
90. Calvin, M., and Sogo, P. B., *Science*, **125**, 499 (1957)
91. Sogo, P. B., Pon, N. G., and Calvin, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **43**, 387 (1957)
92. Arnold, W. A., and Sherwood, H. K., *J. Phys. Chem.*, **63**, 2 (1959)
93. Terenin, A. N., and Ermolaev, V. L., *Uspekhi Fiz. Nauk*, **58**, 37 (1956)
93a. Terenin, A. N., *Uspekhi Fiz. Nauk*, **43**, 347 (1951)
94. Rabinowitch, E., *J. Phys. Chem.*, **61**, 870 (1957)
95. Arnold, W., and Meek, E. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 82 (1956)

96. Konev, S. V., *Problemy Fotosinteza,* str. 94 (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
97. Terenin, A. N., and Ermolaev, V. L., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **85,** 547 (1952)
98. Terenin, A. N., and Putzeiko, E. K., *J. chim. phys.,* **55,** 681 (1958)
99. Putzeiko, E. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **124,** 796 (1959)
100. Nelson, R. C., *J. Chem. Phys.,* **27,** 864 (1957)
101. Calvin, M., "The photochemical apparatus; its structure and function," *Brookhaven Symposia in Biol., No. 11,* 160 (1959)
102. Arnold, W., and Maclay, H. K., *Brookhaven Symposia in Biol.,* No. 11, 1 (1959)
103. Vartanyan, A. T., and Karpovich, I. A., *Zhur. Fiz. Khim.,* **32,** 178 (1958)
104. Commoner, B., Heise, J. J., and Townsend, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,* **42,** 710 (1956)
105. Commoner, B., Heise, J. J., Lippicott, B. B., Norberg, R. E., Passonneau, J. V., and Townsend, J., *Science,* **126,** 57 (1957)
106. Sogo, P. B., Jost, M., and Calvin, M., *Rad. Research,* **1,** 511 (1959)
107. Rabinowitch, E., and Weiss, J., *Proc. Royal Soc. (London) A,* **162,** 251 (1937)
108. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **58,** 617, 835 (1947)
109. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **81,** 879 (1951)
110. Butsko, S. S., and Dain, B. J., *Zhur. Obshchei Khim.,* **28,** 2603 (1958); *Dopovidi Akad. Nauk Ukr. R.S.R.,* No. 11, 1221 (1958)
111. Dilung, I. I., *Ukrain. Khim. Zhur.,* **24,** 202 (1958)
112. Goedheer, J. C. (Doctoral thesis, Univ. of Utrecht, 1957); *Biochim. et Biophys. Acta,* **27,** 478 (1958)
113. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **60,** 421 (1948)
114. Krasnovsky, A. A., *Zhur. Fiz. Khim.,* **30,** 968 (1956); *J. chim. phys.,* **55,** 968 (1958); *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chemistry,* Tokyo and Kyoto, Japan, 1957, p. 355 (1958); "The Origin of Life on the Earth," 351, *Repts. on the International Symposium,* August 1957, Moscow, U.S.S.R. (The Publishing House of the Acad. Sci. U.S.S.R., Moscow, U.S.S.R., 1957)
115. Krasnovsky, A. A., Brin, G. P., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **69,** 393 (1949); **89,** 527 (1953)
116. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **91,** 899 (1953)
117. Rabinowitch, E., *Photosynthesis,* **II,** part 2, 1519 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1951)
118. Linschitz, H., and Weissman, S. I., *Arch. Biochem. Biophys.,* **67,** 491 (1957)
119. Lynch, V. H., and French, C. S., *Carnegie Inst. Wash. Year Book,* **54,** 166 (1954–55)
120. Rackow, B., and König, H., *Z. Elektrochem.,* **62,** 482 (1958)
121. Bannister, T. T., *Dissertation Abstr.,* **19,** No. 10, 2438 (1959)
122. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **74,** 781 (1950); **96,** 1201 (1954)
123. Evstigneev, V. B., *Zhur. Fiz. Khim.,* **32,** 969 (1958)
124. Holt, A. S., *Research in Photosynthesis,* 55 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)

125. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **64,** 663 (1949)
126. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **118,** 1146 (1958); **124,** 691 (1959)
126a. Evstigneev, V. B., and Savkina, I. G., *Biofizika,* **4,** 290 (1959)
127. Krasnovsky, A. A., and Pakshina, E. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **127,** 913 (1959)
128. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **96,** 1209 (1954)
129. Krasnovsky, A. A., and Pakshina, E. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **120,** 581 (1958)
130. Krasnovsky, A. A., and Umrikhina, A. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **122,** 1061 (1958)
131. Ashkinazi, M. S., and Dain, B. J., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **80,** 385 (1951); **102,** 767 (1955)
132. Dain, B. J., and Ashkinazi, M. S., *Problemy Fotosinteza,* str. 55 (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
132a. Vostrilova, N. V., and Dulova, V. I., *Doklady Akad. Nauk Uzbekskoi S.S.R.*, No. 5, 19 (1958)
133. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Biofizika,* **1,** 120 (1956)
133a. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **103,** 283 (1955)
134. Krasnovsky, A. A., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **81,** 1105 (1951)
135. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **98,** 1017 (1954)
136. Krasnovsky, A. A., Drozdova, N. N., and Pakshina, E. V., *Biokhimya,* **25,** No. 2 (1960)
137. Krasnovsky, A. A., Evstigneev, V. B., Brin, G. P., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **82,** 947 (1952)
138. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **73,** 1239 (1950)
139. Rabinowitch, E., *J. Chem. Phys.*, **8,** 551, 560 (1940)
140. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **92,** 381 (1953)
141. Hendrich, W., *Roczniki chemii,* **32,** 107 (1958)
142. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **103,** 97 (1955)
143. Oster, G., *Research in Photosynthesis,* 50 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
144. Krasnovsky, A. A., and Umrikhina, A. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **104,** 882 (1955)
144a. Krasnovsky, A. A., and Umrikhina, A. V., *Biofizika,* **3,** 547 (1958)
145. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **96,** 1025 (1954)
146. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **115,** 530 (1957)
147. Porret, D., and Rabinowitch, E., *Nature,* **140,** 321 (1937)
148. Livingston, R., *J. Phys. Chem.*, **45,** 312 (1941); **52,** 622 (1948)

148a. Livingston, R., and Ryan, V., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2176 (1953)
148b. Livingston, R., *Research in Photosynthesis*, 3 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
149. Linschitz, H., and Rennert, J., *Nature*, **169**, 193 (1952)
150. Linschitz, H., and Abrahamson, E. W., *Research in Photosynthesis*, 31 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
151. Terenin, A. N., Karyakin, A. V., Lyubomudrov, E. B., Sushinsky, P. E., and Dmitrievsky, O. D., *Optika i spektroskopia*, **1**, 456 (1956)
152. Terenin, A. N., *Gen. Discussions of Faraday Soc.*, April 1959
153. Fujimori, E., and Livingston, R., *Nature*, **180**, 1036 (1957)
154. Krasnovsky, A. A., *Biofizika*, **4**, 3 (1959)
155. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **108**, 507 (1956)
156. Evstigneev, V. B., Gavrilova, V. A., and Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **74**, 315 (1950)
157. Uri, N., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5808 (1952)
158. Rosenberg, I. L., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **8**, 115 (1957)
159. Commoner, B., Personal Communication at the 4th Intern. Congr. of Biochem. (Vienna, Austria, 1958)
159a. Bubnov, N. N., Tsepalov, V. F., Umrikhina, A. V., and Shlyapintokh, V. J., *Biofizika*, No. 2 (1960)
160. Latimer, P., and Rabinowitch, E., *Research in Photosynthesis*, 100 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
161. Latimer, P., *Plant Physiol.*, **34**, 193 (1959)
162. Duysens, L. N. M., *Science*, **120**, 353 (1954); *Research in Photosynthesis*, 59 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
163. Witt, H. T., *Z. Elektrochem.*, **59**, 981 (1955)
164. Bell, L. N., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **107**, 329 (1956)
165. Coleman, J. W., Holt, A. S., and Rabinowitch, E., *Science*, **123**, 795 (1956); *Research in Photosynthesis*, 68 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
166. Coleman, J. W., and Rabinowitch, E., *J. Phys. Chem.*, **63**, 30 (1959)
167. Kok, B., *Plant Physiol.*, **34**, 184 (1959); *Nature*, **179**, 583 (1957); *Acta Botan. Neerl.*, **6**, 316 (1957); *Biochim. et Biophys. Acta*, **22**, 399 (1956)
168. Witt, H. T., Moraw, R., and Müller, A., *Z. Naturforsch.*, **13b**, 822 (1958)
169. Vorobieva, L. M., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimya*, **23**, 760 (1958)
170. Witt, H. T., *Research in Photosynthesis*, 75 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
170a. Witt, H. T., Moraw, R., and Müller, A., *Z. Phys. Chem.*, **12**, 393 (1957); **13**, 113 (1957)
171. Bell, L. N., and Chmora, S. N., *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S.S.S.R.*, **6**, 91 (1959)
171a. Bell, L. N., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **113**, 695 (1957)
172. Duysens, L. N. M., *Research in Photosynthesis*, 164 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
173. Smith, L., and Ramírez, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 233 (1959)
174. Warburg, O., Krippahl, G., and Schröder, W., *Z. Naturforsch.*, **10b**, 631 (1955)

175. Emerson, R., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 1 (1958)
176. French, C. S., and Myers, J., *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **58**, 318 (1958–59)
177. Voskresenskaya, N. P., and Zak, E. G., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **114**, 375 (1957)
178. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **112**, 911 (1957)
179. Krasnovsky, A. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **61**, 91 (1948)
180. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **67**, 325 (1949)
181. Brin, G. P., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimya*, **24**, No. 6 (1959)
182. Krasnovsky, A. A., and Voinovskaya, K. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **87**, 109 (1952)
183. Livingston, R., and Pariser, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1510 (1948)
184. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **58**, 1087 (1947)
184a. Brin, G. P., and Krasnovsky, A. A., *Biokhimya*, **22**, 776 (1957)
185. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **127**, 198 (1959)
186. Weiss, T., *Trans. Faraday Soc.*, **32**, 1331 (1936)
187. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **53**, 447 (1946)
188. Evstigneev, V. B., and Terenin, A. N., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **81**, 223 (1951)
189. Evstigneev, V. B., and Gavrilova, V. A., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **126**, 410 (1959)
190. Sissakian, N. M., *Advances in Enzymol.*, **20**, 201 (1958); *Izvest. Akad. Nauk S.S.S.R., Ser. Biol.*, No. 5, 32 (1956)
191. Frenkel, A. W., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **10**, 53 (1959)
192. Hill, R., *Advances in Enzymol.*, **12**, 1 (1951)
193. Sissakian, N. M., Krasnovsky, A. A., Mikhailova, E. S., and Brin, G. P., *Biokhimya*, **24**, 3 (1959)
194. Sissakian, N. M., and Chamova, K. G., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **67**, 337 (1949)
195. Sissakian, N. M., Krasnovsky, A. A., Mikhailova, E. S., and Brin, G. P., *Biokhimya*, **18**, 725 (1953)
196. Boichenko, E. A., and Zakharova, N. N., *Fiziol. Rastenii, Akad. Nauk S.S.S.R.*, **6**, 88 (1959)
197. Clendenning, K. A., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **8**, 137 (1957)
198. Good, N., and Hill, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 355 (1955)
199. Vernon, L. P., and Hobbs, M. O., *Arch. Biochem. Biophys.*, **72**, 25 (1957)
200. Kamen, M., *Research in Photosynthesis*, 149 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)
201. Smith, L., and Chance, B., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 449 (1958)
202. Vishniak, W., and Ochoa, S., *Nature*, **167**, 768 (1951); *J. Biol. Chem.*, **195**, 75 (1952)
203. Tolmach, L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 120 (1951); *Nature*, **167**, 946 (1951)

204. Arnon, D. I., *Nature,* **167,** 1008 (1951)
205. San Pietro, A., *Science,* **124,** 118 (1956)
205a. San Pietro, A., and Lang, N. M., *J. Biol. Chem.,* **231,** 211 (1958)
206. Arnon, D. I., Whatley, F. R., and Allen, M. B., *Nature,* **180,** 182 (1957); *Science,* **177,** 1026 (1958)
207. Vernon, L. P., and Ihnen, E. D., *Biochim. et Biophys. Acta,* **24,** 115 (1957)
208. Frenkel, A. W., *J. Am. Chem. Soc.,* **80,** 3479 (1958)
209. Duysens, L. N. M., and Amesz, J., *Biochim. et Biophys. Acta,* **24,** 19 (1957)
210. Tamiko-oh-Hama, M. S., and Tamyia, H., *Proc. Intern. Botan. Congr. 9th Congr., Montreal, Canada, 1959,* 886 (University of Toronto Press, Canada 1959); *Biochim. et Biophys. Acta,* **34,** 202 (1959)
211. Arnon, D. I., Whatley, F. R., and Allen, M. B., *Science,* **127,** 3305 (1958)
212. Arnon, D. I., *Brookhaven Symposia in Biol.,* No. 11, 181 (1959)
213. Warburg, O., *Naturwissenschaften,* **42,** 449 (1955)
213a. Warburg, O., and Krippahl, G., *Z. Naturforsch.,* **10b,** 301 (1955)
214. Gaffron, H., and Rosenberg, J., *Naturwissenschaften,* **42,** 354 (1955)
215. Ruben, S., *J. Am. Chem. Soc.,* **65,** 279 (1943)
216. Emerson, R. L., Stanffer, J. F., and Umbreit, W. W., *Am. J. Botany,* **31,** 107 (1944)
217. Wassink, E. C., Wintermans, I. F., and Tjia, I. E., *Proc. Acad. Sci. Amsterdam,* **52,** 412 (1949); **54,** 41 (1951)
218. Kandler, O., *Z. Naturforsch.,* **5b,** 423 (1950)
219. Frenkel, A. W., *J. Am. Chem. Soc.,* **76,** 6324 (1954); *J. Biol. Chem.,* **222,** 823 (1956)
220. Arnon, D. I., Whatley, F. R., and Allen, M. B., *J. Am. Chem. Soc.* **76,** 6324 (1954)
220a. Arnon, D. I., Allen, M. B., and Whatley, F. R., *Nature,* **174,** 394 (1954)
221. Wessels, J. S. C., *Biochim. et Biophys. Acta,* **25,** 97 (1957); **29,** 113 (1958)
222. Jagendorf, A. T., and Avron, M., *J. Biol. Chem.,* **231,** 227 (1958)
223. Hill, R., and Walker, D. A., *Plant Physiol.,* **34,** 240 (1959)
224. Jagendorf, A. T., *Brookhaven Symposia in Biol., No. 11,* 236 (1959)
225. Krasnovsky, A. A., *Problemy Fotosinteza* (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
226. Boichenko, E. A., and Zakharova, N. I., *Biokhimya,* **21,** 374, 623 (1956)
227. Metzner, H., Simon, H., Metzner, B., and Calvin, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,* **43,** 892 (1957)
228. Doman, N. G., *Proc. Intern. Botan. Congr., 9th Congr. Montreal, Canada, 1958,* 94 (University of Toronto Press, Canada, 1959)
229. Bassham, J. A., and Calvin, M., *The Path of Carbon in Photosynthesis* (Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.Y., 1957)
230. Zalensky, O. V., Semikhatova, O. A., and Voznesensky, V. L., *Metodi primenenia radioaktivnogo ugleroda C^{14} dlia izuchenia fotosinteza* (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, Leningrad, 1955)
231. Doman, N. G., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **85,** 607 (1952); *Problemy Fotosinteza,* str. 394 (Izdat. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
232. Metzner, H., Simon, H., and Metzner, B., *Z. Naturforsch.,* **13b,** 366 (1958)
233. Nichiporovich, A. A., *Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva, 1955,* **12,** 340 (1956)

234. Nichiporovich, A. A., Andreeva, T. F., Voskresenskaya, N. P., Nezgovorova, L. A., and Novitzky, U. I., *Radioisotopes in Scientific Research,* **4,** 411; *Proc. UNESCO Intern. Conf., Paris, 1957, 1st Conf.* (Pergamon Press, London, England, New York, N.Y., and Paris, France, 690 pp., 1958)
235. Nichiporovich, A. A., and Voskresenskaya, N. P., *Proc. Intern. Botan. Congr. 9th Congr. Montreal, Canada, 1959,* 281 (University of Toronto Press, Canada, 1959)
236. Kolesnikov, P. A., *Uspekhi Sovremennoĭ Biol.,* **47,** 362 (1959)*
237. Fuller, R. C., *Proc. Intern. Botan. Congr., 9th Congr., Montreal, Canada, 1959,* 125 (University of Toronto Press, Canada, 1959)
238. Moses, V., and Calvin, M., *Biochem. J.,* **71,** 18 (1959)
239. Moses, V., Holm-Hansen, O., and Calvin, M., *Biochim. et Biophys. Acta,* **28,** 62 (1958)
240. Kutyurin, V. M., *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S.S.S.R.,* **7,** No. 2 (1960)
241. Vishniac, W., and Rose, J. A., *Nature,* **182,** 1089 (1958)
242. Norris, T. H., Ruben, S., and Allen, M. B., *J. Am. Chem. Soc.,* **64,** 3037 (1942)
243. Vishniac, W., *Proc. Intern. Botan Congr., 9th Congr., Montreal, Canada, 1959,* 417 (University of Toronto Press, Canada, 1959)
244. Ulubekova, M. V., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **112,** 772 (1957); *Problemy Fotosinteza,* str. 14 (Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskwa, 1959)
245. Fogelstrom-Fineman, J., Holm-Hansen, O., Folbert, M. B., and Calvin, M., *Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes,* **2,** 280 (1957)
246. Vinogradov, A. P., Kutyurin, V. M., Ulubekova, M. V., and Zadorozhny, I. K., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.,* **125,** 1151 (1959)
247. Lane, G. A., and Dole, M., *Science,* **123,** 574 (1956)
248. Kessler, E., *Research in Photosynthesis,* 243 (Interscience Publ. Inc., New York, N.Y., 1957)

* English translation will be announced in Technical Translations, issued by the Office of Technical Services, U.S. Dept. of Commerce, and will be made available by the Photoduplication Service, Library of Congress and by the SLA Translation Center at the John Crear Library, Chicago, Illinois.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 8, вып. 1 1961 г.

СИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА И ФИКСАЦИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ ПРИ ИХ ОСВЕЩЕНИИ

Н. Г. ДОМАН, А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. К. РОМАНОВА, Л. М. ВОРОБЬЕВА, Е. В. ПАКШИНА, З. А. ТЕРЕНТЬЕВА

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

Изучение связи между появлением и накоплением хлорофилла в этиолированных проростках растений и началом фотосинтеза уже давно привлекало внимание исследователей.

Первые попытки определить выделение кислорода этиолированными листьями растений при их освещении не привели к определенным результатам, вероятно, из-за несовершенства применявшихся методов. В работах последнего десятилетия [1—3] показано, что этиолированные листья злаков с первых же минут освещения приобретают вполне измеримую способность выделять кислород. Одновременно наблюдается также и начало накопления хлорофилла *a*, тогда как хлорофилл *b* появляется значительно позднее [3].

Разноречивы также старые данные, полученные при попытке сопоставить начало накопления хлорофилла в зеленеющих листьях растений с началом фиксации CO_2. Так, имеются данные о том, что фотосинтетическое усвоение углекислоты этиолированными листьями ячменя и бобов начинается лишь после того, как в них образуется значительное количество хлорофилла [4]. Однако Вильштеттер и Штоль [5] показали, что зеленеющие этиолированные листья обладают бóльшим ассимиляционным числом, а следовательно, и большей ассимилирующей способностью, чем незатемнявшиеся листья.

Обстоятельное исследование с применением меченой углекислоты проведено в работе [6], в которой была сопоставлена скорость накопления хлорофилла с интенсивностью фиксации $C^{14}O_2$ в процессе позеленения этиолированных проростков пшеницы. Помимо этого, изучались также меченые продукты, образующиеся в листьях по прошествии разных промежутков времени с начала освещения. По данным авторов [6], усиленное образование хлорофилла в этиолированных проростках пшеницы начинается через 2—3 часа после начало освещения и продолжается на протяжении последующих 20 час. со все уменьшающейся скоростью. Интенсивность фиксации CO_2 остается очень низкой еще в течение 1—2 час. после начала усиленного образования хлорофилла и через 5 час. после начала освещения составляет лишь 0,1% радиоактивности, ассимилируемой полностью позеленевшими листьями. При дальнейшем освещении скорость фиксации $C^{14}O_2$ увеличивается пропорционально продолжительности освещения по крайней мере на протяжении 32 час. с начала освещения. Авторы считают, что слабую способность к фотосинтетической фиксации $C^{14}O_2$ растение приобретает лишь после 5 час. освещения. Низкое содержание сахаров на этой стадии авторы объясняют недостатком «восстановителей» или активных ферментов для быстрого восстановления фосфоглицериновой кислоты до гексоз. В интервале от 1—2 до 5 час. зеленения создаются условия, необходимые для осуществления фотосинтеза и состоящие в накоплении фосфоглицериновой кислоты и аланина, в результате чего происходит сдвиг равновесия реакций обмена веществ в сторону синтеза сахарозы.

Исследование спектральных свойств хлорофилла при его образовании и накоплении в этиолированных проростках фасоли на свету показало, что состояние пигмента изменяется по мере зеленения проростков [7, 8]. Хлорофилл, образующийся в первые минуты зеленения, обладает максимумом поглощения при 670 *мμ*. По мере зеленения и накопления хлорофилла максимум постепенно перемещается в длинноволновую сторону спектра до 677—678 *мμ* — обычного положения максимума поглощения хлорофилла в зеленых листьях.

В задачу нашего исследования входило более детальное изучение связи между интенсивностью фиксации $C^{14}O_2$ на свету и в темноте и накопления хлорофилла, с одновременными наблюдениями за сменой его форм, происходящей при позеленении этиолированных листьев. Мы хотели также проследить за тем, как изменяется состав продуктов фиксации углекислоты при переходе от гетеротрофного обмена в этиолированных листьях к автотрофному фотосинтетическому обмену.

МЕТОДИКА

8-дневные этиолированные проростки ячменя освещались лампой накаливания (150 *вт*), расположенной на расстоянии 1,3 *м*. Пробы для определения содержания хлорофилла отбирались через определенные промежутки времени после начала зеленения. Исследовались также этиолированные проростки. Одновременно ставились опыты по фиксации $C^{14}O_2$ на свету и в темноте. В качестве дополнительного контроля взяты пробы листьев ячменя, выращенного на свету.

Содержание хлорофилла определялось спектрофотометрическим методом [7]

О состоянии хлорофилла на данном этапе зеленения судили по положению красного максимума поглощения хлорофилла в гомогенате — коллоидном растворе вещества этиолированных и зеленеющих листьев. Коллоидный раствор готовился следующим образом: навеска листьев 0,5 *г* растиралась с 6 *мл* 1/15 *M* Na_2HPO_4 (pH 8,5). Кашица отжималась через полотно и центрифугировалась 5 мин. при 3500 *g*. Все описанные операции производились в затемненном помещении. Спектр поглощения полученного коллоидного раствора снимался на спектрофотометре Бекмана. Точность измерения положения максимума ± 1 *мμ*.

Интенсивность фиксации $C^{14}O_2$ зеленеющими листьями ячменя на свету и в темноте исследовалась в камере, плавающей над ртутью [9]. Объем газового пространства камеры 200 $см^3$, содержание углекислоты газа в камере 0,5%.

При изучении интенсивности фотосинтеза камера освещалась лампой накаливания мощностью в 500 *вт*, расположенной на расстоянии 70 *см* от камеры. Для исключения возможности действия желтых пигментов световой поток пропускался через красный светофильтр КС-11.

При определении интенсивности темновой фиксации $C^{14}O_2$ зеленеющие листья предварительно в течение 10 мин. выдерживались в темноте. Окружающая температура во время проведения опыта была 24—26°.

Экспозиция листьев в атмосфере, содержащей $C^{14}O_2$—5 мин. На каждую экспозицию бралось по шесть листьев общим весом в 200 *мг*.

Фиксация листьев осуществлялась погружением в кипящий подкисленный этанол (10 *мл* 0,1 *N* HCl на 90 *мл* 96%-ного спирта). Спирторастворимые вещества экстрагировались шестикратной обработкой горячим подкисленным спиртом. Объединенные спиртовые экстракты упаривались досуха в вакуум-эксикаторе над сухой щелочью. Сухие остатки растворялись в определенном объеме подкисленного спирта, и в части раствора определялась радиоактивность с по мощью торцового счетчика Гейгера — Мюллера.

Разделение опытных растворов на фракции производилось с применением катионита КУ-1 в статических условиях. Вещества, адсорбированные катионитом, элюировались 6 *N* раствором аммиака.

Продукты фиксации $C^{14}O_2$ исследовались методом хроматографии на бумаге в сочетании с радиоавтографией.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, полученные при определении скорости накопления хлорофилла, положения красного максимума поглощения, а также радиоактивность опытных образцов при фиксации $C^{14}O_2$ на свету и в темноте, приведены на рис. 1. Накопление хлорофилла в зеленеющих листьях ячменя происходит равномерно на протяжении первых двух суток с начала освещения, возрастая за этот период с 0,03 до 1,3 *мг* в пересчете на 1 *г* сырого материала, тогда как в зеленых, не затемнявшихся листьях ячменя того же возраста содержится 1,7 *мг* хлорофилла на 1 *г* сырых листьев.

Максимум поглощения хлорофилла, расположенный в начале зеленения при 670 *мμ*, по прошествии 2 час. зеленения сдвигается до 672 *мμ* и через 20 час. достигает 675 *мμ*. У зеленых листьев максимум расположен при 676 *мμ*. Начальные изменения максимумов поглощения хлорофилла при данной методике опыта не наблюдаются; они про-

исходят в интервале времени до образования формы с максимумом 672 *мμ*. Таким образом, общая картина накопления хлорофилла и перемещения красного максимума его поглощения у ячменя и фасоли [8, 9] оказалась весьма сходной.

На рис. 1 представлена также суммарная радиоактивность образцов при темновой фиксации $C^{14}O_2$ и фотосинтезе в красном свете. На протяжении первого часа освещения этиолированных листьев ячменя световая и темновая фиксации меченой углекислоты представлены величинами одного порядка от $1{,}2\times10^5$ до $2{,}3\times10^5$ расп/мин. в пересчете на 1 *г* сырых листьев.

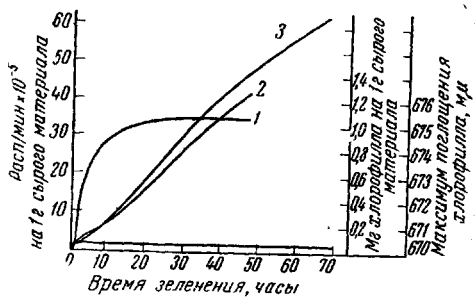


Рис. 1. Скорость накопления хлорофилла, изменение положения красного максимума его поглощения и интенсивность фиксации $C^{14}O_2$ на свету и в темноте в процессе позеленения этиолированных листьев ячменя

1 — изменение положения максимума поглощения хлорофилла; *2* — содержание хлорофилла; *3* — интенсивность световой фиксации $C^{14}O_2$; линия, параллельная оси абсцисс — интенсивность темновой фиксации $C^{14}O_2$

Через два часа после начала освещения намечается возрастание интенсивности фиксации $C^{14}O_2$ на свету, продолжающееся пропорционально продолжительности зеленения по крайней мере на протяжении последующих 60—70 час. По прошествии 69 час. зеленения интенсивность фотосинтеза листьев достигает уровня световой фиксации $C^{14}O_2$ проростками ячменя, выращенными на свету, равной 7×10^6 расп/мин. на 1 *г* сырых листьев при пятиминутной экспозиции в меченой углекислоте.

Интенсивность темновой фиксации $C^{14}O_2$ этиолированными листьями ячменя существенно не изменяется в процессе их зеленения и, как правило, не превышает 2% интенсивности фотосинтеза вполне зеленых листьев.

Необходимо отметить, что несколько серий аналогичных опытов было поставлено с восьмидневными этиолированными проростками фасоли. В этих опытах наблюдались те же закономерности накопления и изменения состояния хлорофилла, как во всех предыдущих опытах с фасолью и ячменем. Что касается фиксации $C^{14}O_2$, то характерным оказалось сравнительно слабое увеличение ее на свету в процессе зеленения листьев. Поэтому у проростков фасоли можно заметить лишь небольшое превышение фотосинтетической фиксации $C^{14}O_2$ по сравнению с темновой, составляющее после 6 час. зеленения величину порядка 7%, а после 10 час. зеленения — 24%.

Можно полагать, что обнаруженное различие в нарастании интенсивности фотосинтеза у ячменя и фасоли связано с замедленным развитием фотосинтетического аппарата и общим нарушением обмена веществ у этиолированной фасоли, что внешне выражается в резком угнетении развития этого растения. Поэтому в дальнейших опытах пришлось отказаться от такого объекта.

В табл. 1 приведены сравнительные данные, полученные при обработке опытных растворов катионитом КУ-1 и отражающие распределение радиоактивности по фракциям в едва начавших зеленеть (после 30 мин. освещения) и во вполне зеленых (после 69 час. освещения) листьях ячменя при фиксации меченой углекислоты в течение 5 мин. в темноте и на свету.

Из данных табл. 1 видно, что уже после 30 мин. зеленения в этиолированных листьях ячменя намечается определенное различие в количественном распределении радиоактивности между продуктами фиксации

меченой углекислоты на свету и в темноте. Это различие усиливается по мере зеленения листьев.

При темновой фиксации $C^{14}O_2$ этиолированными листьями ячменя после 30 мин. их зеленения более половины меченых продуктов (53%) обнаруживается в аммиачном элюате с катионита КУ-1, в основном состоящем из аминокислот.

При фиксации $C^{14}O_2$ этими же листьями на свету в аммиачном элюате обнаруживается меньшая, но все же значительная часть общей радиоактивности водной вытяжки (около 38%).

При темновой фиксации $C^{14}O_2$ зелеными листьями эта фракция составляет лишь 30% общей радиоактивности экстракта. Наименьший процент (11%) общей радиоактивности фракция аминокислот составляет при фотосинтезе зеленых листьев.

Вообще в пределах одной продолжительности зеленения в темноте при данной экспозиции с $C^{14}O_2$ вещества фракции, адсорбируемой катионитом КУ-1, метятся относительно интенсивнее, чем на свету.

Процент радиоактивности, обнаруживаемой в растворе после удаления аминокислот и других оснований катионитом, наоборот, при фотосинтезе зеленых листьев является наибольшим из всех четырех вариан-

Таблица 1

Распределение радиоактивности по фракциям при обработке водных экстрактов из зеленеющих этиолированных листьев ячменя катионитом КУ-1

(в % от радиоактивности водорастворимой фракции)

Листья ячменя после зеленения	Условия фиксации $C^{14}O_2$	Фракция веществ, неадсорбируемых катионитом КУ-1	Аммиачный элюат с катионита КУ-1	Потеря радиоактивности при обработке катионитом
30 мин.	В темноте	35,0	53,0	12,0
	На свету	41,8	37,9	20,3
69 час.	В темноте	55,6	30,1	14,3
	На свету	66,6	11,0	22,4

тов, приведенных в табл. 1, и составляет при фотосинтезе зеленых листьев 66,6%, при темновой фиксации $C^{14}O_2$ зелеными листьями — 55,6% и в этиолированных листьях после 30 мин. их зеленения — 42% при фиксации $C^{14}O_2$ на свету и 35% при темновой фиксации.

Необходимо отметить, что при обработке радиоактивных растворов катионитом КУ-1 известную часть радиоактивности обнаружить не удается. Потеря может объясниться, с одной стороны, необратимой адсорбцией некоторых веществ на ионообменнике и, с другой — частичным разложением продуктов, не стойких по отношению к сильным кислотам с выделением C^{14} в виде газообразных продуктов, так как известно, что сильнокислые сульфоугли, к которым относится и ионообменник марки КУ-1, обладают свойствами крепкой серной кислоты [10].

Из данных табл. 1 видно, что относительная потеря радиоактивности, происходящая при обработке радиоактивных растворов катионитом при темновой фиксации $C^{14}O_2$, значительно ниже, чем соответствующая потеря при фотосинтезе зеленеющих проростков ячменя.

С целью обнаружения возможных различий в качественном составе или количественном соотношении индивидуальных радиоактивных веществ были получены хроматограммы фракции аминокислот, элюированных с катионита. При хроматографировании был применен растворитель фенол — 0,1 *М* муравьиная кислота, который для лучшего разделения веществ пропускался по бумаге три раза. Пятна, соответствующие расположению метчиков аминокислот, вырезались с хроматограмм, и их радиоактивность определялась в газопроточном счетчике типа 4-л.

Таблица 2

Распределение радиоактивности между продуктами, содержащимися в аммиачных элюатах с катионита КУ-1 в зависимости от продолжительности зеленения листьев ячменя

(в % от радиоактивности аммиачного элюата)

Листья ячменя после зеленения	Условия фиксации $C^{14}O_2$	Неизвестные вещества у точки нанесения	Зона аспарагиновой кислоты	Зона серина	Зона глютаминовой кислоты	Зона гликокола и аспарагина	Зона α-аланина	Группа продуктов, быстро продвигающихся в феноле
30 мин.	В темноте	6,7	22,4	11,5	20,5	4,4	2,2	32,1
	На свету	7,9	23,5	13,1	19,7	3,8	2,4	29,5
69 час.	В темноте	13,5	15,2	6,9	8,0	1,5	4,6	50,3
	На свету	28,6	6,8	24,7		8,6	6,3	28,0

Из данных, представленных в табл. 2, видно, что относительное распределение радиоактивности в пределах аммиачного элюата в листьях ячменя после 30 мин. их зеленения примерно одинаково при фиксации $C^{14}O_2$ в темноте и на свету, тогда как в зеленых листьях ячменя при темновой фиксации заметно снижается относительное содержание меченых веществ в зонах аспарагиновой и глютаминовой кислот, несколько увеличивается метка в зоне расположения аланина и вблизи точки нанесения (возможно, пептиды).

При фиксации $C^{14}O_2$ зелеными листьями на свету эти изменения выражены еще более ясно: содержание меченых веществ у точки нанесения достигает 28,6% суммарной радиоактивности элюата с ионообменника, процент радиоактивности в районе расположения аспарагиновой кислоты падает до 7, тогда как относительное содержание меченого α-аланина достигает более 6%.

Необходимо указать, что состав группы меченых продуктов, быстро продвигающихся в феноле, насыщенном 0,1 *М* муравьиной кислотой, изменяется в зависимости от условий фиксации $C^{14}O_2$.

При получении радиоавтографов с хроматограмм водных вытяжек из этиолированных листьев ячменя, фиксировавших $C^{14}O_2$ в темноте, на рентгеновской пленке появляется отпечаток шести-семи наиболее интенсивно меченых веществ. Для темновой фиксации меченой углекислоты характерна значительная радиоактивность аспарагиновой кислоты по сравнению с другими мечеными продуктами, содержащимися в экстракте. Удается также отчетливо обнаружить радиоактивность в яблочной и янтарной кислотах (рис. 2). Дальнейшее уточнение состава меченых аминокислот путем адсорбции фракции веществ, содержащих основные группировки, катионитом КУ-1 с последующей элюцией их аммиаком позволило обнаружить до десяти меченых продуктов темновой фиксации $C^{14}O_2$. В их числе аспарагиновая кислота, два не идентифицированные нами вещества, глютаминовая кислота. Характерно, что при темновой фиксации $C^{14}O_2$ относительно слабо метится α-аланин.

Таким образом, хотя в процессе позеленения листьев ячменя качественный состав продуктов темновой фиксации $C^{14}O_2$ принципиально не меняется, однако происходит определенное изменение в их количественных соотношениях. Прежде всего несколько повышается относительное содержание радиоактивности в зоне расположения фосфорных эфиров и уменьшается процентное содержание меченых аминокислот (см. табл. 1 и рис. 2 и 3).

Характерным также является относительное уменьшение радиоактивности в зонах аспарагиновой и глютаминовой кислот и увеличение в

зонах расположения аланина и пептидов. Однако относительное содержание аспарагиновой кислоты при темновой фиксации углекислоты во всех случаях остается значительным. Уже на самых ранних этапах позеленения проростков ячменя можно обнаружить очень слабую, но вполне заметную радиоактивность в зоне расположения на хроматограммах фосфорных эфиров сахаров.

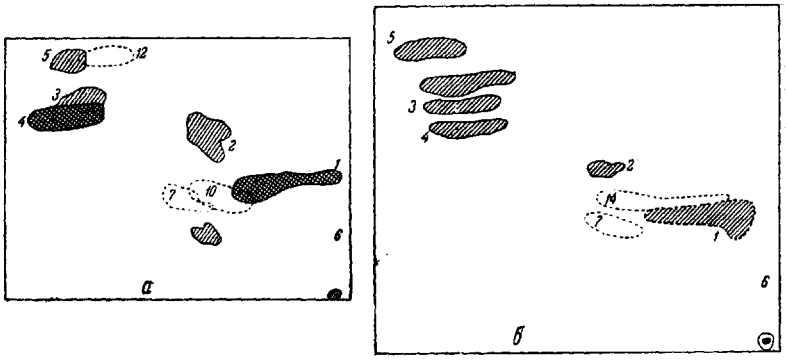


Рис. 2. Продукты темновой фиксации $C^{14}O_2$ зеленеющими листьями ячменя

Продолжительность зеленения: *а* — 1 час, *б* — 2 часа

Обозначения к рисункам 2—5:

1 — аспарагиновая кислота, *2* — яблочная кислота, *3*, *4* — неизвестные аминокислоты, *5* — янтарная кислота, *6* — зона фосфорных эфиров сахаров и фосфоглицериновой кислоты, *7* — сахароза, *8* — α-аланин, *9* — валин, *10* —серин, *11* — лимонная кислота, *12* — α-кетоглютаровая кислота, *13* — фумаровая кислота, *14* — глютаминовая кислота, *15* — γ-аминомасляная кислота, *16* — глюкоза, *17* — фруктоза, *18* — β-аланин, *19* — фенилаланин, *20* — пролин. Экспозиция в $C^{14}O_2$ — 5 мин.

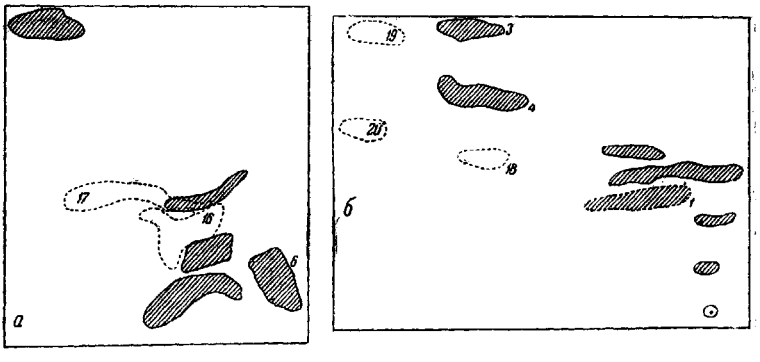


Рис. 3. Распределение по фракциям меченых продуктов темновой фиксации $C^{14}O_2$ зеленеющими листьями ячменя

Продолжительность зеленения 6—8 час.; *а* — нейтральные и кислые продукты, не адсорбированные катионитом КУ-1; *б* — основные продукты, элюированные с катионита 6 *N* аммиаком

Возможность появления радиоактивных фосфорных эфиров при темновой фиксации меченой углекислоты, особенно в экстрактах из зеленых листьев, вряд ли можно оспаривать. В литературе отмечены случаи появления небольшой радиоактивности при темновой фиксации $C^{14}O_2$ не только в фосфорных эфирах сахаров, но и в свободных сахарах [11, 12]. Появление радиоактивности в фосфорных эфирах углеводов может быть объяснено наличием остатков светового типа обмена веществ, причем чем дольше период зеленения, а следовательно, чем интенсивнее световое включение углекислоты, тем клетки богаче суб-

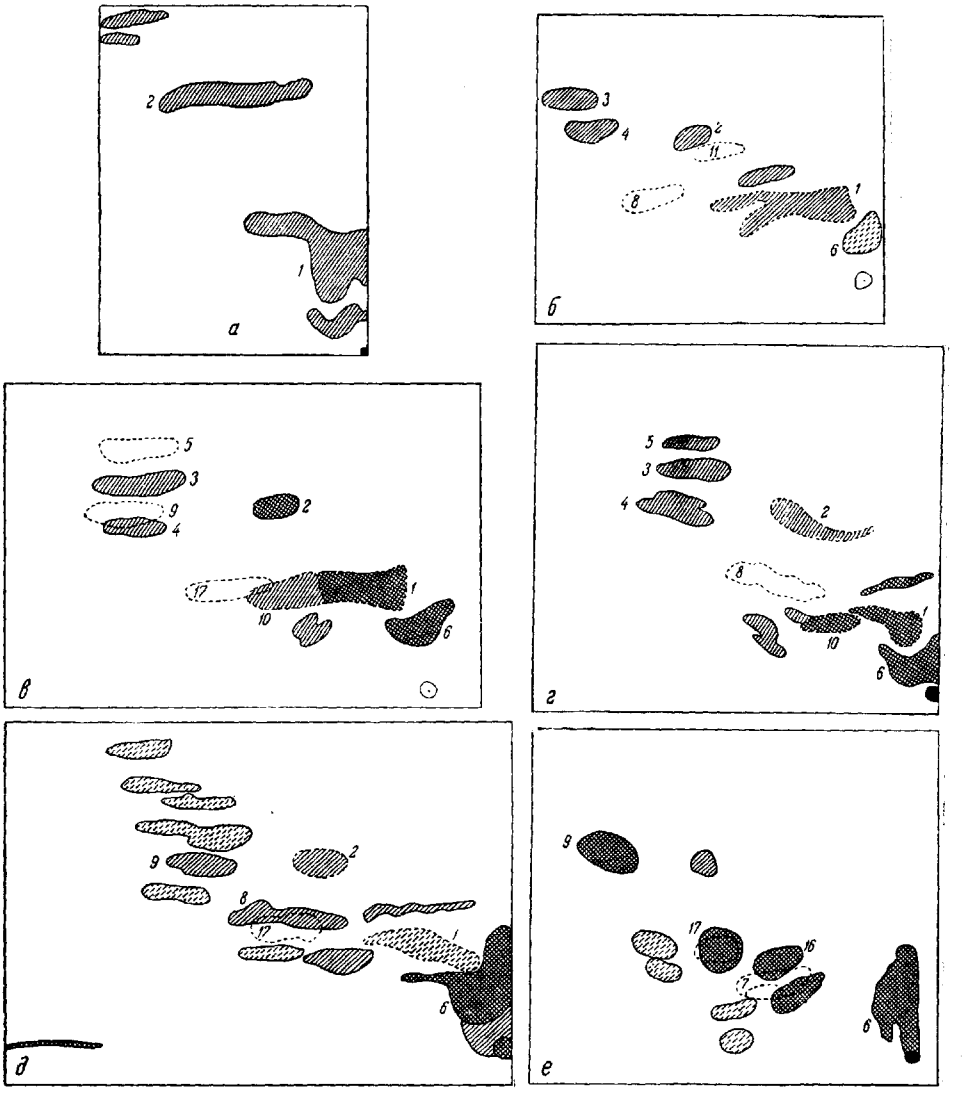


Рис. 4. Изменение состава продуктов фотосинтеза в процессе позеленения этиолированных листьев ячменя

а — этиолированные листья; *б* — они же после 1 часа зеленения; *в* — после 2 час.; *г* — после 6 час.; *д* — после 25 час.; *е* — после 69 час.

стратами и «восстановителями» и тем дольше сохраняются в темноте следы автотрофного обмена веществ.

С другой стороны, в интенсивно растущих проростках радиоактивность в фосфорных эфирах может появляться в результате обратимости реакций гликолиза, хотя характерная для растений направленность процессов в сторону интенсивного расходования углеводов в темноте делает этот путь менее вероятным. При темновой фиксации $C^{14}O_2$ в условиях наших опытов радиоактивности не обнаружено в сахарозе, глюкозе, фруктозе, валине, пролине, гистидине, серине, гликоколе, тирозине, лейцине, γ-оксимасляной кислоте, изолейцине, в кислотах — лимонной, фумаровой, аконитовой, α-кетоглютаровой, гликолевой и в свободных органических основаниях — аденине, гуанине, урациле, тимине, цитозине.

Рассмотрение серии радиохроматограмм экстрактов из зеленеющих листьев ячменя позволяет сделать некоторые заключения о порядке по-

явления меченых продуктов, характерных для автотрофного пути усвоения углерода.

Характер продуктов «фотосинтеза» этиолированных листьев ячменя (рис. 4, *а*) не отличается от состава меченых веществ, образующихся при темновой фиксации $C^{14}O_2$. На протяжении первых суток зеленения в листьях ячменя заметно возрастает способность к образованию меченых фосфорных эфиров, при одновременном снижении содержания меченой аспарагиновой и яблочной кислот (4, *б*). После 2 час. освещения листьев (4, *в*) появляется меченое вещество, весьма характерное для световой фиксации меченой углекислоты ячменем, расположенное

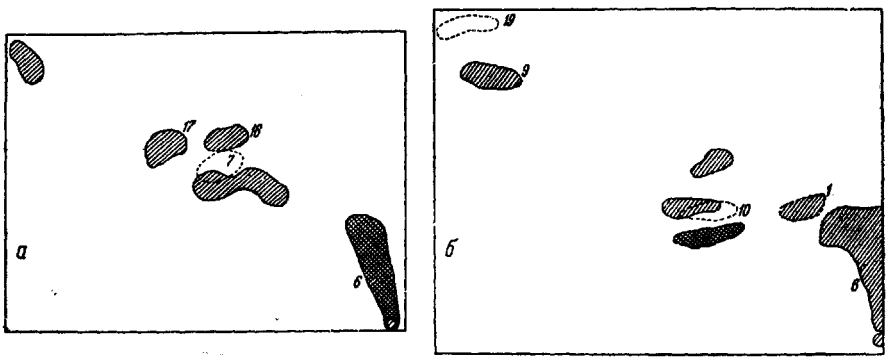


Рис. 5. Распределение по фракциям меченых продуктов фотосинтеза листьями ячменя после 69 час. зеленения

а — нейтральные и кислые продукты, не адсорбированные катионитом КУ-1; *б* — основные продукты, элюированные с катионита 6 *N* аммиаком

в зоне сахарозы, но пока не идентифицированное нами. Возможно, что это радиоактивное пятно соответствует нескольким меченым продуктам. После 6 час. зеленения листьев (рис. 4, *г*) становится более заметной метка серина и α-аланина и валина. Меченые сахара — глюкоза и фруктоза — появляются в заметных размерах лишь по прошествии 69 час. после начала освещения этиолированных листьев ячменя (рис. 4, *е*).

Во вполне позеленевших листьях ячменя, помимо глюкозы и фруктозы, можно обнаружить большое число меченых соединений: фосфорные эфиры сахаров (глюкозы, фруктозы, рибозы и, возможно, сахарозы), фосфоглицериновую и аспарагиновую кислоты, серин, α-аланин, валин, яблочную кислоту в соотношениях, характерных для фотосинтезирующих листьев, т. е. преобладающая часть радиоактивности заключается в фосфорных эфирах и сахарах, тогда как на долю аминокислот приходится лишь небольшая часть общей радиоактивности экстракта (см. табл. 1 и рис. 4, *е*, а также рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение состава продуктов усвоения углекислоты отражает картину смены гетеротрофного типа питания автотрофным в зеленеющих этиолированных проростках растений. С этой точки зрения появление в числе меченых продуктов фиксации $C^{14}O_2$ сахарозы или другого сахара могло бы являться критерием начала фотосинтетической деятельности. Однако к экспериментальным результатам такого рода следует относиться с большой осторожностью, так как в этом случае решающую роль может сыграть продолжительность экспозиции в меченной по углероду углекислоте, избираемая исследователем произвольно. При общей замедленности процессов обмена веществ у зеленеющих листьев, выражающейся, в частности, в пониженной скорости фотосинтеза, задержка появления метки в сахарах может быть ошибочно принята за неспособность листовой ткани к фотосинтезу.

Для получения сравнимых результатов при работе с разными объектами необходима точная стандартизация условий постановки опытов (интенсивность освещения в процессе позеленения и в момент фиксации меченой углекислоты, окружающая температура, концентрация $C^{14}O_2$ и продолжительность экспозиции в нем и т. д.).

По всей вероятности, элементарная способность к автотрофному усвоению углекислого газа присуща уже едва начинающим зеленеть росткам. Новейшие литературные данные о начале выделения кислорода и накопления хлорофилла сразу же после начала освещения этиолированных листьев [2, 3] и о раннем нахождении следов радиоактивности в фосфорных эфирах после подкармливания листьев рибозой [6], так же как и наши данные о различиях в распределении метки по фракциям после 30 мин. освещения, свидетельствуют о том, что уже при наличии ничтожного количества хлорофилла происходит частичное переключение с темнового режима усвоения углерода на световой. Следовательно, необходимо ставить вопрос не о начале специфически фотосинтетической деятельности, а о количественном соотношении автотрофного (фотосинтетического) и гетеротрофного (темнового) типов обмена веществ и об определяющей роли того или иного из них.

ВЫВОДЫ

1. Накопление хлорофилла начинается с первых же минут освещения этиолированых листьев ячменя и продолжается при оптимальном режиме освещения на протяжении двух суток с начала освещения; максимум спектра поглощения хлорофилла в гомогенатах в процессе зеленения листьев ячменя постепенно сдвигается с 670 до 676 *мμ*.

2. Заметная разница между количеством фиксированного $C^{14}O_2$ на свету и в темноте появляется после двухчасового освещения этиолированных листьев ячменя, т. е. при образовании формы хлорофилла с максимумом поглощения при 670 —672 *мμ*.

Интенсивность темновой фиксации $C^{14}O_2$ практически не зависит от степени позеленения листьев ячменя. Фиксация $C^{14}O_2$ на свету усиливается по мере зеленения листьев ячменя и по прошествии 70 час. достигает интенсивности фотосинтеза зеленых листьев.

3. По мере позеленения листьев происходят изменения в количественном соотношении продуктов темновой фиксации $C^{14}O_2$, хотя качественный состав их существенно не изменяется.

4. Различия в соотношении продуктов фиксации $C^{14}O_2$ на свету и в темноте можно заметить уже после 30 мин. зеленения листьев ячменя. Процесс перехода от гетеротрофного типа обмена веществ к доминирующему автотрофному в листьях ячменя в процессе их зеленения происходит постепенно на протяжении двух-трех суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith J. H. S., French C. S., Koski V. M. Plant Physiol., **27**, 212, 1952.
2. Blaauw-Jansen G., Komen J. G., Thomas J. Biochim. et biophys. acta, **5**, 179, 1950.
3. Smith J. H. S. Plant Physiol., **29**, 143, 1954.
4. Irving A. A. Ann. Bot., **24**, 805, 1910.
5. Willstätter R., Stoll A. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin, 1918.
6. Tolbert H. E., Gailey F. B. Plant Physiol., **30**, 291, 1955.
7. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. Докл. АН СССР, **85**, №1, 177, 1952.
8. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. Докл. АН СССР, **91**, № 2, 343, 1953.
9. Доман Н. Г. Сб. Физиология растений, агрохимия и почвоведение, **5**, 65, 1958.
10. Самуэльсон О. Применение ионного обмена в аналитической химии. Изд-во иностр. лит., 1955.
11. Champigny M. L. Compt. rend. Acad. sci. colon., **243**, № 1, 83, 1956.
12. Bradbeer C. Nature, **182**, No. 4647, 1429, 1958.

Поступила в редакцию
4.II.1960

SYNTHESIS OF CHLOROPHYLL AND FIXATION OF CARBON DIOXIDE IN ETIOLATED BARLEY SEEDLINGS UNDER ILLUMINATION

N. G. DOMAN, A. A. KRASNOVSKY, A. K ROMANOVA, L. M VOROBYOVA E. V. PAKSHINA, Z. A. TERENTIEVA

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The uptake of $C^{14}O_2$ and formation of labelled products in connection with the accumulation of chlorophyll during illumination of etiolated barley leaves was studied.

Accumulation of chlorophyll commences during the first minutes of illumination of etiolated barley leaves and continues under optimal illumination conditions during two days after the beginning of illumination. The peak in the absorption spectrum of chlorophyll in homogenates during greening of the leaves gradually shifts from 670 mμ to 676 mμ.

An appreciable difference between the amount of $C^{14}O_2$ fixed in the dark and light appears after two hours of illumination of etiolated barley leaves, that is, after formation of the form of chlorophyll with an absorption peak at 670—672 mμ.

The dark rate of $C^{14}O_2$ fixation is practically independent of the degree of greening of the barley leaves. Fixation of $C^{14}O_2$ in light increases as the leaves become green and after 70 hours it reaches the photosynthetic rate of green leaves. Appreciable changes in the quantitative relation between the products of dark formation of $C^{14}O_2$ occur although no qualitative change in their composition takes place.

Differences between the relative amounts of $C^{14}O_2$ fixation products in light and in the dark can be noted after 30 minutes of greening of the barley leaves. Transition from a heterotrophic type of metabolism to the dominant autotrophic type in barley leaves during their greening occurs slowly during 2—3 days.

БИОФИЗИКА

Том VI, вып. 4 1961

СПЕКТРЫ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И АНАЛОГОВ

Ю. Е. ЕРОХИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биолого-почвенный факультет МГУ,
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР

За последние годы среди исследований по обратимым фотохимическим превращениям хлорофилла привлекает внимание реакция обратимого фотовосстановления [1]. Возможность запасания энергии света в продуктах фотовосстановления, способность к сопряжению с энзиматическими системами, участвующими в переносе электрона при фотосинтезе, сходство в спектральных изменениях хлорофилла при фотовосстановлении и освещении живых фотосинтезирующих организмов [2] определяют интерес к исследованию этой реакции в связи с изучением механизма участия хлорофилла в фотосинтезе.

Многочисленные исследования последних лет позволили установить способность различных пигментов к этой реакции, выяснить условия ее протекания, изучить характер спектральных и других изменений, установить ее механизм [1; 3]. Однако в то время как спектры поглощения фотовосстановленных форм были измерены для большинства пигментов, люминесценция этих форм изучалась мало [4; 5]. Оранжевая флуоресценция фотовосстановленной формы хлорофилла при 620—640 *ммк* была отчетливо видна и отмечена уже при первых попытках осуществления этой реакции. Евстигнеев [3; 4], проводя фотовосстановление хлорофилла фенилгидразином в толуоловом растворе, наблюдал при температуре жидкого азота полосы люминесценции восстановленных форм при 525—540 и 550—570 *ммк* *. Гачковский [4] получил спектры флуоресценции фотовосстановленных форм хлорофилла и феофитина при помощи фотографической методики. Для фотовосстановленного хлорофилла им указываются максимумы при 620, 651 и 733 *ммк*, а для феофитина — при 643, 664 и 731 *ммк*. Наиболее интенсивным был пик около 730 *ммк*.

Целью настоящей работы было изучение спектров люминесценции фотовосстановленных форм следующих пигментов: хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, хлорофиллов *a*+*b*, феофитина *a*, феофитинов *a*+*b*, протохлорофилла, протофеофитина, бактериохлорофилла, бактериофеофитина, бактериовиридина, феофитина, бактериовиридина и гематопорфирина.

---

* После того, как работа была закончена и сдана в печать, мы смогли ознакомиться со статьей Броди [6], посвященной исследованию люминесценции промежуточных продуктов фотовосстановления хлорофилла *a*. В отличие от нашей работы, Броди применял в качестве восстановителя фенилгидразин и провел измерения спектров возбуждения флуоресценции, позволяющие установить спектры поглощения отдельных флуоресцирующих фотовосстановленных форм, похожих по спектру на те, которые наблюдались Евстигнеевым и Гавриловой при фотовосстановлении хлорофилла в толуоле фенилгидразином. Тот факт, что реакция хлорофилла с фенилгидразином наблюдалась Броди и при — 193° С, свидетельствует о том, что элементарный акт фотовосстановления может происходить в комплексе хлорофилл — фенилгидразин, спектр поглощения которого, однако, измерить не удалось.

Методика

Фотовосстановление проводили в вакуумных трубках Тунберга, содержавших эвакуированные пиридиновые растворы пигментов (10^{-6} *M*) с аскорбиновой кислотой (10^{-2}), в фокусе 500-ваттной лампы накаливания при освещении ~ 10^{-6} *эрг/см²сек* через красный светофильтр в течение 3—5 мин. Образование восстановленных форм контролировали по появлению пика поглощения, характерного для каждого пигмента. Спектры поглощения исходных пегментов, их фотовосстановленных форм и пигментов после обратной реакции измеряли в трубках Тунберга на спектрофотометре СФ-2М.

При измерении спектров люминесценции образцы помещали в прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом, что устраняло побочное фотохимическое действие возбуждающего света и препятствовало протеканию обратной реакции.

Люминесценцию возбуждали со стороны передней стенки сосуда участком спектра ртутной лампы СВДШ-250-3, выделяемым комбинацией светофильтров УФС-3 и ЗС-3. Фильтр ЗС-3 ставили для устранения пропускаемого фильтром УФС-3 красного света. Отсутствие рассеянного света в выбранном участке измерения контролировали при записи в тех же условиях чистого растворителя. Люминесценцию измеряли в широкой области 450—810 *ммк*.

Спектр люминесценции регистрировали на спектрографе ИСП-51 с выходным коллиматором ПС-381, в котором фотоумножитель ФЭУ-17 был заменен на чувствительный в красной области ФЭУ-22. Высокое напряжение на ФЭУ подавали от отдельного высоковольтного стабилизатора. Запись спектров вели на самопищущем потенциометре типа КБ 1600^{c} РР. Поправки на спектральную чувствительность установки были внесены на основании кривой спектральной чувствительности, полученной фотометрированием ленточной лампы.

Пигменты выделяли из фотосинтезирующих организмов с окончательной хроматографической очисткой по методикам, принятым в Лаборатории фотобиохимии Института биохимии АН СССР.

С хроматографической зоны на сахаре пигмент снимали эфиром, затем раствор испаряли в вакууме в трубках Тунберга, добавляли нужное количество пиридина, аскорбиновой кислоты и проводили реакцию.

Результаты опытов

Уменьшение количества исходной формы пигмента в результате фотовосстановления во всех средах вело к значительному уменьшению интенсивности флуоресценции. У ряда пигментов при низкой температуре появлялись дополнительные полосы люминесценции измененных форм, которые по положению соответствовали максимумам поглощения фотовосстановленных форм этих пигментов. Регенерация пигмента при обратной реакции (пуске воздуха) приводила к восстановлению флуоресценции исходного пигмента и исчезновению люминесценции фотовосстановленных форм. Обратимость реакции, исходя из наших данных по флуоресценции, была наибольшей у хлорофилла *a* (до ~95—97%) и наименьшей — у хлорофилла *b* и бактериохлорофилла (30—40%), что наблюдалось и раньше при спектрофотометрических измерениях [7]. Измерить спектры флуоресценции фотовосстановленных форм при комнатной температуре на нашей установке было трудно из-за низкой интенсивности флуоресценции этих форм у исследованных пигментов, а довольно быстро протекавшая обратная реакция вела к нестабильности измерений. Поэтому результаты, описанные ниже, относятся в основном к измерениям при низкой (—196°С) температуре.

Хлорофилл. При температуре жидкого азота (—196° С) фотовосстановленная форма хлорофилла *а* в пиридине обладала интенсивным пиком при 530 *ммк*, соответствовавшим максимуму поглощения этой формы при 520 *ммк*. Кроме того, можно было заметить небольшие добавочные максимумы при 590 и очень слабые — при 620 и 640 *ммк* (рис. 1). Увеличение интенсивности в этих максимумах наблюдалось при проведении фотовосстановления в среде толуола с использованием фенилгидразина в качестве восстановителя. В этих условиях Евстигнеев и Гаврилова [4] наблюдали образование фотовосстановленных форм с максимумами поглощения при 518 и 585 *ммк*. Соотношение их менялось в зависимости от условий освещения и добавления небольших количеств ве-

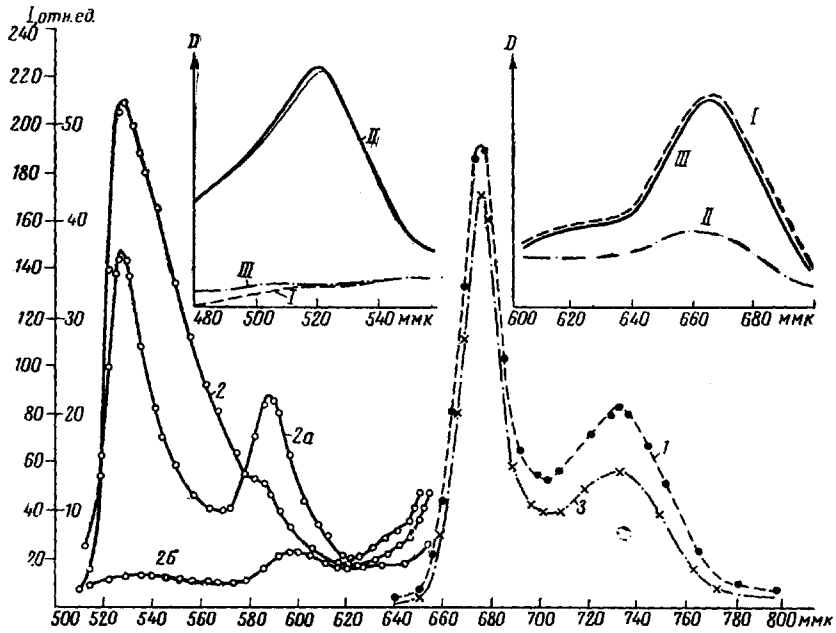


Рис. 1. Спектры люминесценции *1*, *2* и *3* и поглощения *I*, *II*, *III* хлорофилла *а* в пиридине.

1 — до реакции фотовосстановления *I*; *2* — после освещения красным светом *II*; *2* — —196° С; *2а* — —80° С; *2б* — —35° С; *3* — после 2 час. стояния в присутствии воздуха *III*. Цифры интенсивности люминесценции справа на всех рисунках относятся только к фотовосстановленным формам пигментов

ществ, влияющих на кислотно-основное равновесие (аммиак, пиридин, уксусная кислота). Перераспределение интенсивности люминесценции в максимумах 590, 620 и 640 *ммк* наблюдалось и в наших опытах в случае избытка восстановителя (аскорбиновой кислоты), продолжительности и режима освещения, температуры. Измерение спектров люминесценции фотовосстановленного хлорофилла *а* при разных температурах в интервале от —196° до +20° С давало следующую картину: при —196° преобладала форма с максимумом люминесценции 530 *ммк*; при более высоких температурах отчетливее проявлялся максимум при 590 *ммк*, который был наибольшим при —90÷—70° С; соответственно уменьшался выход люминесценции при 530 *ммк*. Дальнейшее повышение температуры вызывало падение интенсивности свечения и при 590 *ммк* (рис. 1, кривые 2*а*, 2*б*). В интервале от —20° до +20° фотовосстановленный хлорофилл *а* обладал лишь очень слабым максимумом флуоресценции при 640 *ммк*. По-видимому, эти изменения связаны с различными условиями кислотно-основного равновесия восстановленных форм хлорофилла: при низких температурах происходит более прочная фиксация водородных связей

между фотовосстановленным пигментом и молекулой растворителя — основания.

У фотовосстановленной формы хлорофилла *b* основной максимум при —196° находился около 529 *ммк*, а слабый дополнительный — при 578 *ммк*. Однако интенсивность люминесценции была значительно ниже, чем у хлорофилла *a* (рис. 2). После проведения обратной реакции некоторая люминесценция в средней части спектра оставалась, а в красной части наблюдался небольшой сдвиг в длинноволновую сторону (до 675 *ммк*). Сдвиг максимума в длинноволновую сторону после обратной реакции был отмечен и раньше, в спектре поглощения у хлорофилла *b* [8].

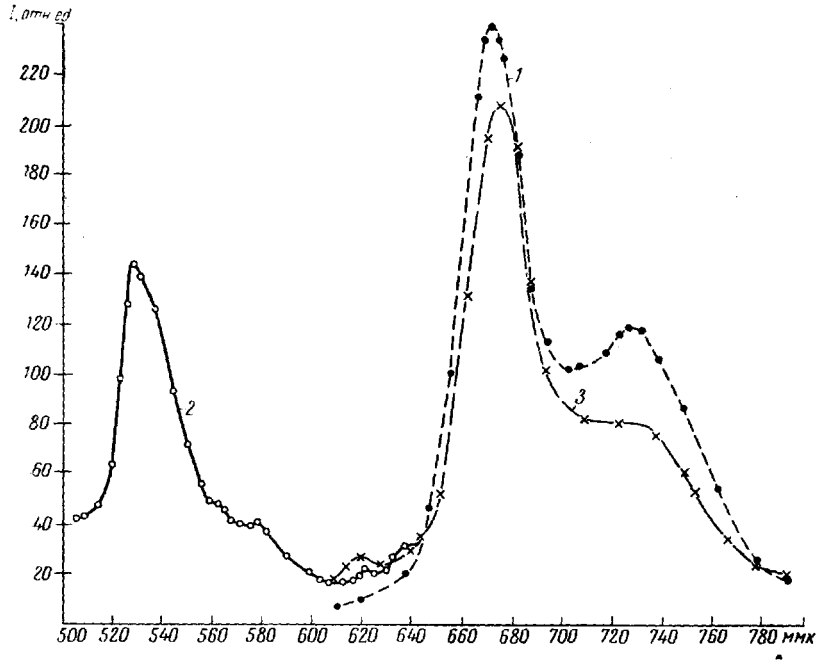


Рис. 2. Спектры люминесценции хлорофилла *b* в пиридине *1*, после фотовосстановления *2* и после обратной реакции *3*

Фотовосстановленные формы смеси хлорофиллов *a* и *b* имели спектр люминесценции, очень близкий к спектру фотовосстановленного хлорофилла *a* (максимумы при 530, 590, 620 и 642 *ммк*). Учитывая, что фотовосстановленный хлорофилл *b* обладал люминесценцией с довольно низким выходом, а относительное его количество в смеси *a*+*b* невелико (30%), можно думать, что у фотовосстановленных форм хлорофиллов *a* и *b* флуоресценция целиком обусловлена хлорофиллом *a*.

Следует отметить, что в спектрах люминесценции замороженных зеленых листьев [9] наблюдались максимумы при 515—520, 555, 595 *ммк*. т. е. в области, близкой к люминесценции фотовосстановленных форм хлорофилла. Конечно, преждевременно делать заключения о возможном образовании таких форм хлорофилла в листьях, но наблюдаемое соответствие указывает на необходимость более детальных измерений спектров флуоресценции листьев.

Протохлорофилл. Продукты фотовосстановления протохлорофилла имели максимум поглощения около 470 *ммк* [10], однако мы наблюдали у них лишь чрезвычайно слабую люминесценцию в средней части спектра (рис. 3). После обратной реакции эта люминесценция полностью исчезала. Возможно, она вызывалась наличием примесей, в

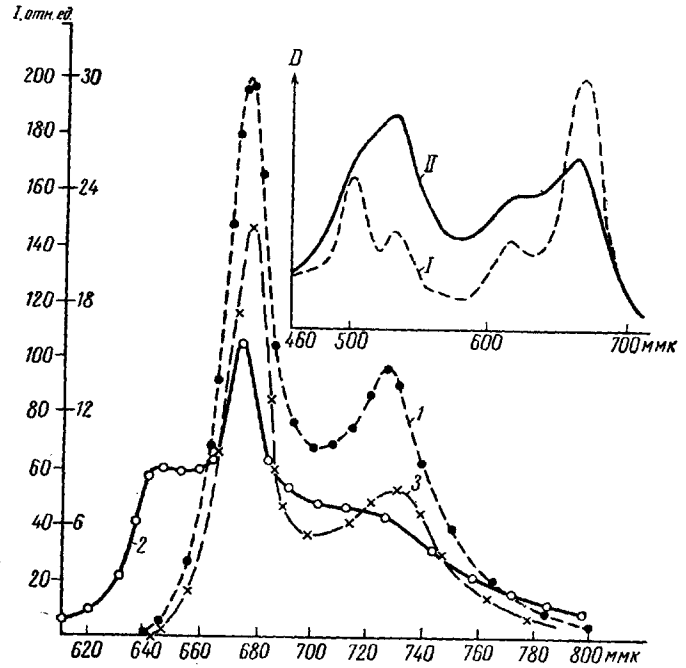


Рис. 3. Спектры люминесценции *I*, *2*, *3* и поглощения *I*, *II* смеси феофитинов *a* и *b* в пиридине.

1 — до реакции *I*; *2* — после фотовосстановления *II*; *3* — после 2 час. стояния на воздухе

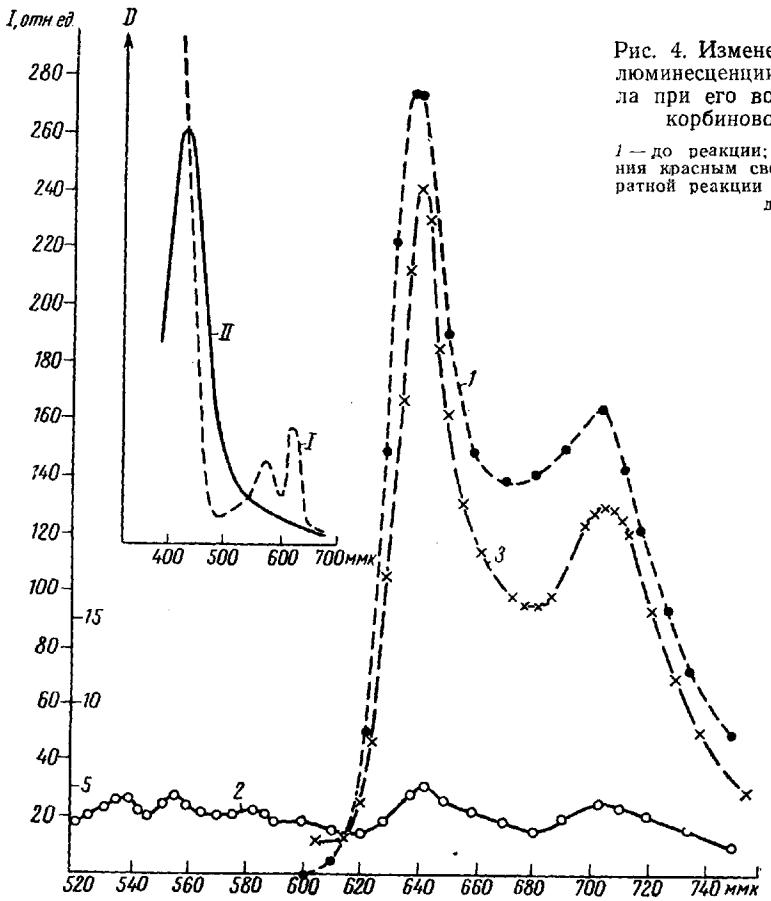


Рис. 4. Изменения в спектрах люминесценции протохлорофилла при его восстановлении аскорбиновой кислотой.

1 — до реакции; *2* — после освещения красным светом; *3* — после обратной реакции в присутствии воздуха

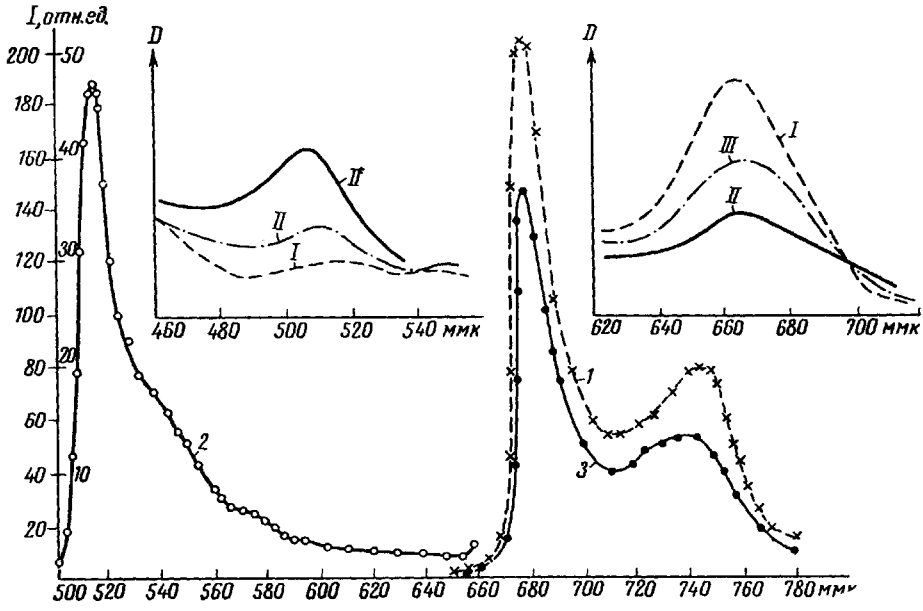


Рис. 5. Спектры люминесценции *1*, *2*, *3* и поглощения *I*, *II*, *III* бактериовиридина в пиридине.

1 — исходный раствор пигмента *I*; *2* — после реакции *II*; *3* — после 2 час. стояния в присутствии воздуха *III*

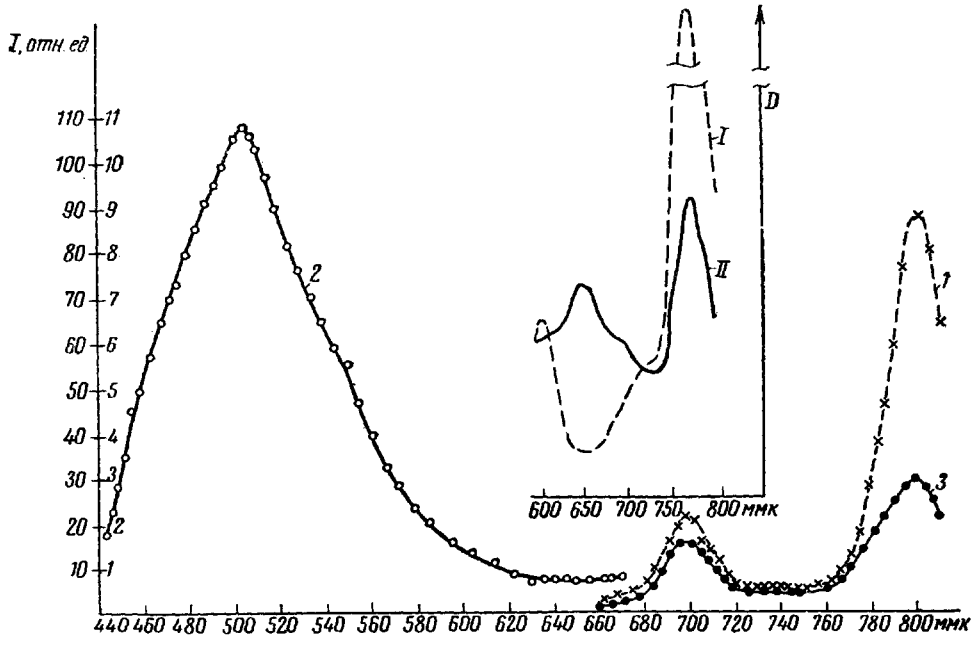


Рис. 6. Изменения в спектрах люминесценции бактериохлорофилла при фотовосстановлении Na_2S.

1 — до реакции; *2* — после освещения красным светом; *3* — после 2 час. стояния в присутствии воздуха. Для сравнения даны спектры поглощения исходного раствора и фотовосстановленной формы

пользу чего свидетельствует низкий ее выход и несоответствие поглощению восстановленного протохлорофилла.

Феофитин. Феофитин *а* и смесь *а*+*b* при фотовосстановлении давали продукты с очень слабой люминесценцией в области 620—650 *ммк*

(максимум около 642 *ммк*), которая исчезала после обратной реакции (рис. 4). У первичных фотовосстановленных форм феофитинов, которые накапливаются в случае проведения фотовосстановления при —40° С [11], люминесценции не наблюдалось. По-видимому, первичные ион-радикальные фотовосстановленные формы пигментов не способны к люминесценции, и только последующая за присоединением протона фиксация электрона в определенном месте молекулы приводит к способности молекулы люминесцировать.

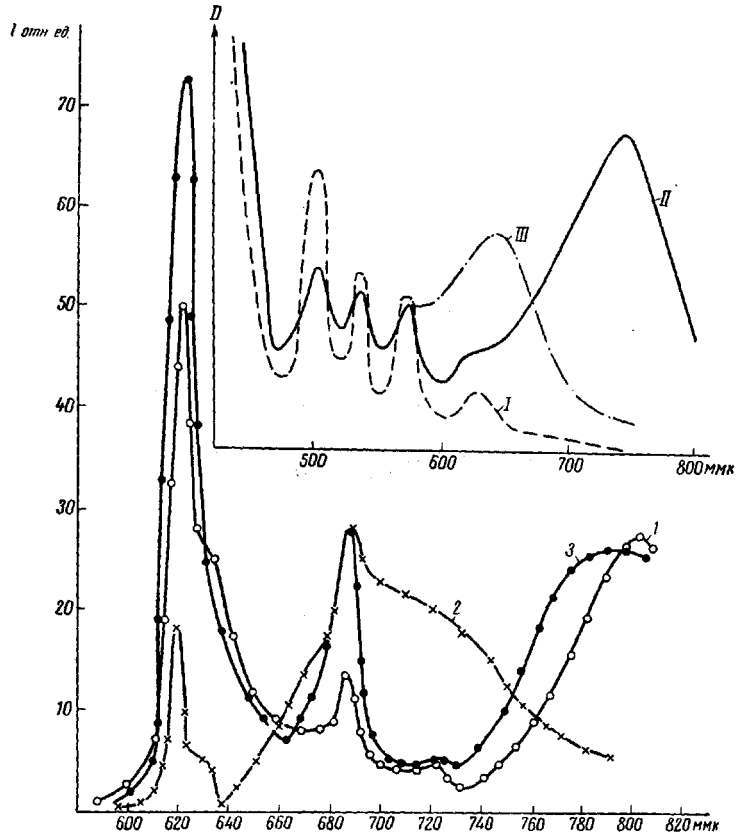


Рис. 7. Спектры люминесценции фотовосстановленных форм гематопорфирина.

1 — при фотовосстановлении в спирте; *2* — при фотовосстановлении в пиридине; *3* — после добавления 0,02 *мл* уксусной кислоты к фотовосстановленной в пиридине форме. Вверху даны спектры поглощения гематопорфирина *I* в пиридине и его фотовосстановленных форм в спирте *II* и пиридине *III*

Мы не смогли подтвердить данных, приводимых в работе [5], о наличии максимума около 730 *ммк* в спектрах фотовосстановленных хлорофиллов и феофитинов. Можно предполагать, что в этих опытах рассеянный красный свет ртутной лампы (линия 733 *ммк*) мог проходить через примененную в работе комбинацию светофильтров.

Бактериовиридин. Фотовосстановленная форма этого пигмента зеленых бактерий имела узкий интенсивный пик при 515 *ммк*, который соответствовал максимуму поглощения около 510 *ммк* [7]. Небольшие добавочные максимумы наблюдались при 570, 620 и 640 *ммк* (рис. 5). У фотовосстановленных форм феофитинов этого пигмента люминесценция не обнаружена.

Обратная реакция приводила к почти полному исчезновению люминесценции в средней части, хотя в красной области наблюдалось непол-

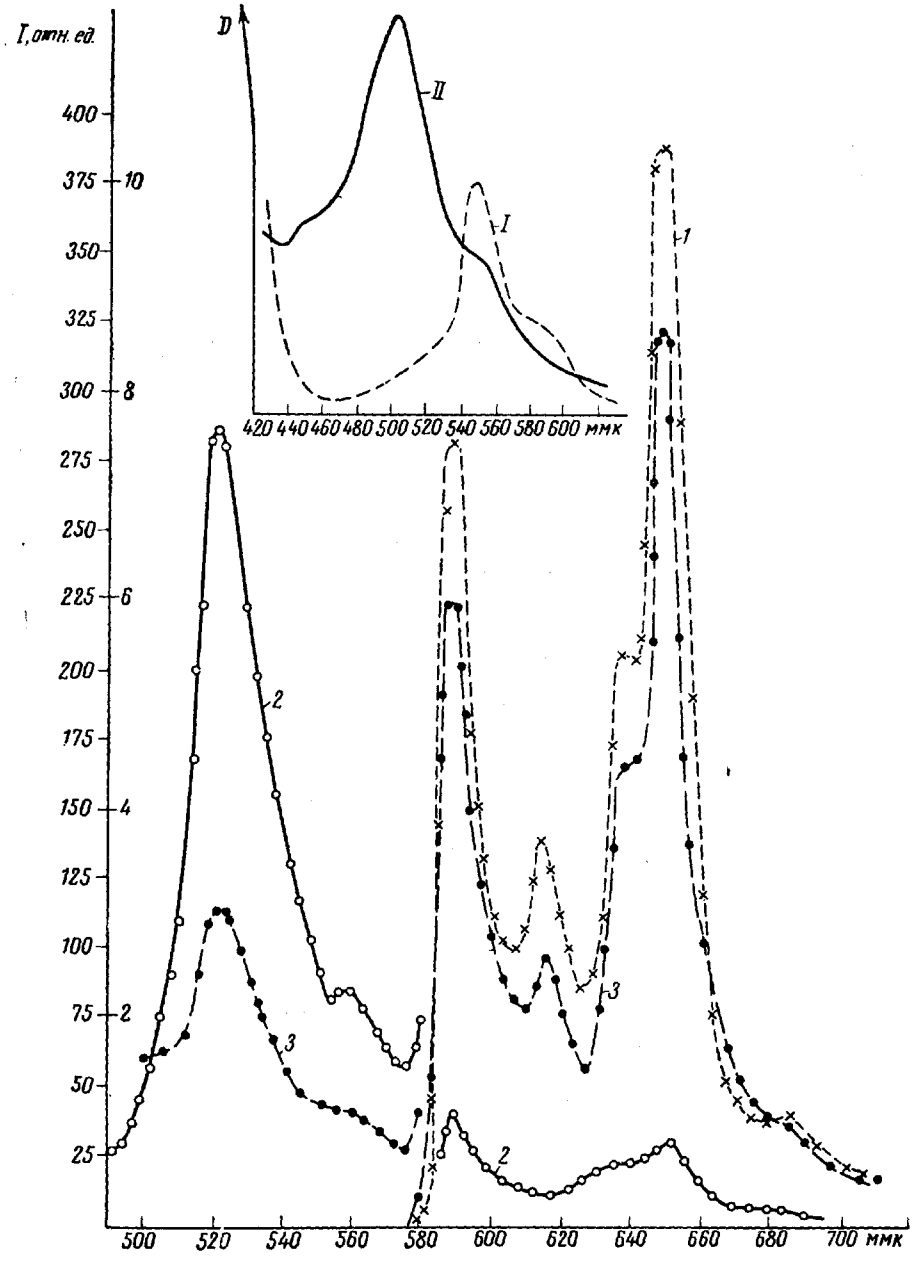


Рис. 8. Изменения в спектрах люминесценции при фотовосстановлении гематопорфирина в 2*н*. H_2SO_4 аскорбиновой кислотой:

1 — исходный раствор; *2* — после освещения белым светом 500; *3* — после 2 час. стояния в присутствии воздуха. Вверху спектр поглощения исходного *I* и фотовосстановленного *II* гематопорфирина

ное восстановление в максимуме флуоресценции исходного бактериовиридина. Некоторое расширение красной полосы при 677 *ммк*, особенно со стороны более коротких длин волн, указывает на частичную феофитинизацию и подтверждает прежние данные о сравнительно меньшей устойчивости бактериовиридина [8].

Бактериохлорофилл. При фотовосстановлении бактериохлорофилла Na_2S были получены продукты с максимумом поглощения около

660 *ммк*. Однако в случае применения Na_2S или аскорбиновой кислоты продукты фотовосстановления имели довольно интенсивную флуоресценцию с размытым спектром в области 450—650 *ммк* (максимум около 505 *ммк*), которая, вероятно, принадлежала побочным продуктам реакции. Действительно, после обратной реакции эта люминесценция не исчезала, а происходил лишь сдвиг максимума до 483 *ммк* (рис. 6). Продукты фотовосстановления бактериофеофитина также обладали размытым спектром с максимумом при 483 *ммк*, и обратная реакция не приводила к исчезновению этой люминесценции, хотя после пуска воздуах или выдерживания в темноте наблюдалось некоторое уменьшение ее интенсивности.

Порфирины. Как было установлено [13], гематопорфирин способен в различных средах давать продукты фотовосстановления, обладающие различными спектрами поглощения. Так, при фотовосстановлении в смеси спирта с 10% пиридина продукты обладали максимумом поглощения при 740—750 *ммк*, тогда как в пиридине — при 640—650 *ммк*. Эти два максимума принадлежали двум формам, которые переходили одна в другую в зависимости от условий кислотно-основного равновесия. Обе формы в наших условиях обладали флуоресценцией соответственно при 780—800 *ммк* в спирто-пиридиновой смеси и более слабой — при 700—720 *ммк* в пиридине. Добавление одной капли аммиака к спирто-пиридиновому раствору или капли уксусной кислоты к пиридиновому раствору фотовосстановленных форм гематопорфирина вызывало соответствующие переходы характера люминесценции из «кислого» в «основной», и наоборот (рис. 7).

Продукты фотовосстановления гематопорфирина в 2 н. H_2SO_4 обладали слабой люминесценцией с максимумами при 525—560 *ммк*, хотя в спектрах поглощения наблюдалось появление интенсивного максимума поглощения при 515 *ммк* (рис. 8). При пуске воздуха наблюдалось медленное восстановление исходной флуоресценции гематопорфирина в кислоте и падение люминесценции в средней части спектра. Обратная реакция в этом случае шла значительно дольше, чем в пиридиновых или спиртовых средах.

Обсуждение

Опыты, описанные выше, показывают, что люминесценция не является универсальным свойством продуктов фотовосстановления пигментов.

Так, хлорофилл и близкий к нему по строению бактериовиридин дают продукты фотовосстановления с характерным спектром люминесценции в области 515—540 *ммк* (при —196°С). Наличие у фотовосстановленных форм этих пигментов еще добавочных максимумов в области 600—640 *ммк* можно объяснить по-разному. Однако нам кажется, что наиболее правильным будет допустить образование нескольких продуктов фотовосстановления. Действительно, в литературе [1; 3] имеются указания, что процесс фотовосстановления идет, по крайней мере, в две стадии. Но пока остается неясным, принадлежат ли эти максимумы первичным фотовосстановленным формам или формам, зависящим от кислотно-основного равновесия. При этом мы не смогли обнаружить люминесценции у первичных форм феофитинов, хотя вторичные устойчивые формы обладали люминесценцией в области 600—640 *ммк*. Возможно, что люминесценция в этой области у фотовосстановленного хлорофилла принадлежала фотовосстановленному феофитину. Действительно, некоторое количество феофитинов образуется при проведении реакции фотовосстановления. Это особенно заметно при многократном повторении реакции с одной и той же порцией пигмента или при избытке восстановителя и сильном освещении.

Фотовосстановленные формы протохлорофилла, бактериохлорофилла, обладающие отчетливыми и характерными спектрами поглощения, не показали в условиях наших опытов обратимого и характерного спектра люминесценции. Пока нельзя считать ясными причины этого явления. Возможно, что в данных условиях при фотовосстановлении наблюдалось образование только ион-радикальных форм этих пигментов (по типу $\cdot X^-$). Наконец, из нескольких известных восстановленных форм гематопорфирина лишь одна — с максимумом поглощения около 740—750 *ммк* — обладала большей интенсивностью люминесценции. Эта форма получается в спиртово-пиридиновых смесях и соответствует промежуточному типу кислотно-основного равновесия.

Особенности строения фотовосстановленных форм пигментов определяют длительность жизни синглетных возбужденных состояний пигментов. Мы давно высказывали предположение, что воспринятый при фотовосстановлении порфириновых пигментов электрон делокализуется в системе сопряженных двойных связей. Непарный электрон в системе сопряженных связей молекулы пигмента в сильной степени влияет на свойства электронной оболочки, приводя, по-видимому, к резкому сокращению длительности жизни оптически-возбужденных состояний. Устранение делокализации электрона, которая, вероятно, происходит в результате подтягивания протона и образования вторичных «красных» форм пигмента, приводит к появлению характерной люминесценции у фотовосстановленной формы некоторых пигментов. По-видимому, в этом случае способность к люминесценции будет определяться структурой самого пигмента. Возможно, что отсутствие люминесценции промежуточных фотовосстановленных форм может быть критерием их ион-радикальной природы. При поисках ион-радикальных форм хлорофилла в живых организмах следует учесть это обстоятельство, тогда как превращения этих промежуточных форм при комнатной температуре ведет к длительному послесвечению — хемилюминесценции [14].

Выводы

Измерены спектры люминесценции фотовосстановленных форм хлорофилла, его аналогов и производных. Характерные спектры обнаружены у фотовосстановленных флорофиллов *a* и *b*, феофитина, бактериовиридина и гематопорфирина; у фотовосстановленных форм протохлорофилла, бактериохлорофилла и первичной фотовосстановленной формы феофитина характерной флуоресценции не удалось обнаружить. Высказывается предположение, что наличие добавочного неспаренного электрона в системе сопряженных связей молекулы пигмента ведет к сокращению длительности жизни возбужденных состояний.

Поступила в редакцию
30.IX.1960

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А.А., Успехи химии, **29**, 736, 1960.
2. Coleman J.W., Rabinowitch E., J. Phys. Chem., **63**, 30, 1959.
3. Евстигнеев В.Б., Ж. физ. химии **32**, 969, 1958.
4. Евстигнеев В.Б., Гаврилова В.А., Докл. АН СССР, **91**, 899, 1953.
5. Гачковский В.Ф., Биофизика, **4**, 19, 1959.
6. Brody S.S., J. Amer. Chem. Soc., **82**, 1570, 1960.
7. Красновский А.А., Брин Г.П., Войниковская К.К., Докл. АН СССР, **69**, 393, 1949.
8. Красновский А.А., Пакшина Е.В., Докл. АН СССР, **127**, 913, 1959.
9. Литвин Ф.Ф., Красновский А.А., Изв. АН СССР. Сер. физ., **23**, 82, 1959.
10. Красновский А.А., Войновская К.К., Докл. АН СССР, **66**, 663, 1949.
11. Евстигнеев В.Б., Гаврилова В.А., Докл. АН СССР, **96**, 1201, 1954.
12. Красновский А.А., Войновская К.К., Докл. АН СССР, **81**, 879, 1951.

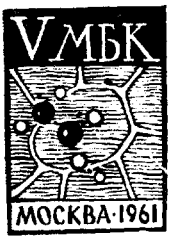
13. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР, **120**, 581, 1958.
14. Литвин Ф. Ф., Владимиров Ю. А., Красновский А. А., Успехи физ. наук **71**, 1960.

LUMINISCENCE SPECTRA OF PHOTOREDUCED FORMS OF CHLOROPHYLL, ITS DERIVATIVES AND ANALOGUES

Yu. E. EROKHIN, A. A. KRASNOVSKY

We have measured luminescence spectra of photoreduced chlorophyll, its analogues and derivatives at room and liquid nitrogen temperature. The characteristic spectra are revealed in photoreduced chlorophylls «*a*» and «*b*», pheophytin, bacterioviridin and hematoporphyrin. In the case of photoreduced protochlorophyll, bacteriochlorophyll and the primary photoreduced form of pheophytin we could not see characteristic fluorescence spectra. It is supposed that the presence of the additional unpaired electron in the system of conjugated bonds of the pigment molecule leads to the decrease of the mean life of electronically excited states.

Received: 30.IX.1960



V МЕЖДУНАРОДНЫЙ
БИОХИМИЧЕСКИЙ
КОНГРЕСС

VI. 2

МЕХАНИЗМ ФОТОСИНТЕЗА

Симпозиум VI

МОСКВА

1 9 6 1

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

А. А. Красновский. Фотохимия хлорофилла, состояние и превращения пигментов фотосинтезирующих организмов 3

К. С. Френч, Д. К. Фок (C. S. French, D. C. Fork). Две первичные фотохимические реакции фотосинтеза, осуществляемые разными пигментами . 11

Дж. Смит (J. Smith). Образование хлорофилла и фотосинтез 23

А. А. Красновский

ФОТОХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА, СОСТОЯНИЕ И ПРЕВРАЩЕНИЯ ПИГМЕНТОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва, СССР

В докладе кратко излагаются результаты работ лаборатории автора, посвященных изучению фотохимических превращений хлорофилла и его аналогов, сопровождающихся запасанием энергии света в продуктах реакции. Наибольшее внимание уделено обратимому фотохимическому восстановлению. Показано, что в основе фотосенсибилизирующего действия хлорофилла и его аналогов в реакциях переноса электрона (водорода) лежит способность пигментов этого класса к обратимому фотовосстановлению. Перенос электрона по этому механизму может быть связан с цепью реакций фотосинтетического фосфорилирования.

Изучалось состояние и превращения хлорофилла и его аналогов непосредственно в фотосинтезирующих организмах и в модельных системах с измерением спектров поглощения и флуоресценции при низких температурах. Обнаружены и изучены разные типы мономерных и агрегированных форм бактериовиридина, бактериохлорофилла и хлорофилла в зеленых и пурпурных бактериях, зеленых водорослях и высших растениях, а также разные формы протохлорофилла в этиолированных и зеленых листьях. Опыты указывают на различную фотохимическую активность этих форм и на их вероятное участие в разных стадиях фотохимического переноса электрона при фотосинтезе.

Изучение фотохимических свойств хлорофилла в связи с его участием в процессе фотосинтеза давно привлекает внимание исследователей. Уже давно высказывались предположения, что хлорофилл при действии света может подвергаться обратимым превращениям, включаясь при фотосинтезе в процесс переноса электрона (водорода) от воды к углекислоте. Это побуждало к поискам обратимых фотохимических превращений хлорофилла, сопровождающихся запасанием энергии света в фотопродуктах. Обнаруженная нами в 1948 г. способность возбужденной молекулы хлорофилла к обратимому фотохимическому восстановлению (восприятию электрона и протона от молекулы-донора) характерна для реакций такого типа. Работы нашей лаборатории показали, что участие хлорофилла в фотосенсибилизированных процессах переноса водорода (электрона) определяется его способностью к обратимому фотовосстановлению. Изучение этой реакции привлекло внимание ряда лабораторий в СССР и за рубежом; литература по этому вопросу собрана в недавних обзорах автора [1]. В первой части доклада нам хотелось бы очень кратко резюмировать результаты этих работ.

Обратимое фотовосстановление

При освещении растворов хлорофилла в вакууме в присутствии молекул-доноров электрона и органических оснований наблюдается образование продуктов фотовосстановления (наиболее отчетливое в присутствии

органических оснований), отличающихся по своим спектральным свойствам от хлорофилла; при выключении света происходит обратная реакция фотопродуктов с регенерацией хлорофилла. Таким образом, при фотовосстановлении происходит запасание энергии света в продуктах реакции. В реакции участвуют доноры водорода, которые неспособны восстанавливать пигменты в темноте (мы использовали преимущественно аскорбиновую кислоту). Дальнейшее изучение показало, что обратимая фотореакция возбужденной молекулы пигмента с восстановителем характерна для всех пигментов, имеющих в центре порфиринового кольца атомы водорода, магния или цинка; образуемые фотопродукты различаются по своей реакционноспособности и спектральным свойствам. В наших опытах способность к фотовосстановлению показали хлорофилл *a* и *b*, бактериохлорофилл, бактериовиридин, протохлорофилл, соответствующие феофитины, этилхлорофиллид, разнообразные порфирины и синтетические пигменты — фталоцианины. Для осуществления реакции фотовосстановления необходимо наличие сопряженной по кругу системы двойных связей, охватывающей четыре пиррольных кольца молекулы пигмента. Нарушение этого сопряжения по кругу ведет к потере способности к фотовосстановлению; к реакции неспособны фикобилины и каротиноиды. Вероятно, в первичном акте фотовосстановления электрон воспринимается всей системой сопряженных связей возбужденной молекулы пигмента. В нашей первой работе мы предположили, что реакция следует одноэлектронному механизму по Михаэлису со ступенчатым образованием ионной и неионной формы свободных радикалов — семихинонов. Евстигнеев и Гаврилова, которые продолжали в нашей лаборатории изучение механизма фотовосстановления [2], экспериментально установили ступенчатый характер реакции: при использовании низких температур им удалось разделить стадию переноса электрона (обнаружив при этом образование «первичной» фотовосстановленной формы пигмента, спектр поглощения которой удалось измерить у феофитинов) и стадию переноса протона, ведущую к образованию более устойчивых фотопродуктов.

Спектральные свойства и реакционноспособность фотовосстановленных форм пигментов тесно связаны с условиями кислотно-основного равновесия, с основностью среды, в которой идет реакция. Это наблюдается наиболее отчетливо у порфиринов, допускающих исследование как в сильных основаниях (пиперидин), так и в водных растворах сильных кислот.

О том, что при реакции фотовосстановления действительно образуются продукты, имеющие природу свободных радикалов, свидетельствуют опыты, проведенные в нашей лаборатории по инициированию фотополимеризации, а также измерения электронного парамагнитного резонанса реагирующей системы при ее освещении непосредственно в резонаторе прибора [3].

Используя счетчик фотонов, удалось наблюдать хемилюминесценцию при темновом окислении фотовосстановленного хлорофилла [4], наиболее сильную при введении аммиака, вероятно, способствующего ионизации более устойчивых фотовосстановленных форм. Возможно, что это свечение соответствует одному из компонентов фотосинтетической люминесценции, открытой Стрелером и Арнольдом в 1951 г. [5].

Механизм фотовосстановления может быть описан следующим образом (P — возбужденная молекула пигмента, реагирующая, вероятно, в триплетном состоянии, AH_2 — донор, водорода; вероятно образование промежуточного комплекса $P \cdot AH_2$, в котором происходит перенос электрона):

$$\text{световая стадия} \cdot \quad P + AH_2 \rightarrow P \cdot AH_2 \rightarrow \cdot P^- + \cdot AH_2^+$$

темновые стадии: $\cdot P^- + \cdot AH_2^+ \rightarrow \cdot PH + \cdot AH$; $2 \cdot PH \rightarrow P + PH_2$; $2 \cdot AH \rightarrow A + AH_2$

Мы уже высказывали [1] предположение, что результаты опытов Ливингстона, Линшитца и др. в 1955—1958 гг. с применением импульсной спектроскопии указывают не только на образование триплетных возбужденных состояний, но и на образование продуктов фотовосстановления хлорофилла молекулами растворителя или содержащихся в нем примесей. В своей последней работе Ливингстон и Пью [6] указывают, что импульсная техника дает возможность наблюдать образование фотовосстановленных форм в присутствии воды и аскорбиновой кислоты. Действие каротина и окислителей на длительность жизни «триплетных состояний» в опытах Ливингстона и Фужимори [7] соответствует действию этих соединений на реакцию фотовосстановления в опытах нашей лаборатории [8].

В поисках возможности обратимого фотоокисления мы обнаружили в присутствии воздуха образование лабильных окисленных продуктов бактериохлорофилла и хлорофилла. Введение аскорбиновой кислоты приводило к частичной регенерации пигментов из окисленных форм; однако мы не наблюдали запасания энергии света при этих реакциях. Мы не могли обнаружить обратимого фотоокисления с применением других окислителей (например, хинонов) в разных средах и при различных условиях ведения опытов.

Фотосенсибилизация

Изучая фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в растворах, мы нашли, что хлорофилл и его аналоги способны участвовать в реакциях переноса водорода — от аскорбиновой кислоты к рибофлавину, пиридиннуклеотидам, ряду красителей и др. Эти реакции сопровождаются запасанием энергии света в конечных продуктах. В присутствии донора водорода в вакууме происходит сенсибилизированное фотовосстановление молекул-акцепторов, тогда как в аэробных условиях хлорофилл сенсибилизирует окисление восстановленных форм. Это весьма отчетливо наблюдалось, например, в опытах с цитохромом С и пиридиннуклеотидами [9]. Опыты показали, что в основе фотосенсибилизирующего действия хлорофилла в реакциях переноса водорода лежит реакция обратимого фотовосстановления. Так, при световой стадии реакции хлорофилл, реагируя с молекулой-донором водорода, дает фотовосстановленные формы, которые в темновой стадии процесса восстанавливают молекулу-акцептор с регенерацией исходной молекулы хлорофилла. Сравнительное исследование строения молекул-акцепторов электрона в нашей лаборатории показало, что линейные и циклические сопряженные системы, обладающие цепью углеродных атомов, не дают устойчивых продуктов сенсибилизированного восстановления при восприятии электрона от фотовосстановленного хлорофилла; условием, позволяющим наблюдать образование продуктов сенсибилизированного восстановления, является наличие гетероатома в цепи сопряжения молекулы (азот, кислород), к которому может присоединиться протон с последующей дисмутацией и образованием наблюдаемых валентнонасыщенных продуктов.

В системе донор электрона — хлорофилл — необратимый акцептор электрона образование фотовосстановленной формы пигмента наблюдается лишь после окончания сенсибилизированного восстановления конечного акцептора водорода, присутствующего в среде. Опыты Евстигнеева показали, что наиболее активным промежуточным продуктом при этих реакциях является «первичная» фотовосстановленная форма

хлорофилла и его аналогов [2]. Этот механизм сенсибилизированной реакции, установленный в нашей лаборатории, соответствует механизму фотосенсибилизации, предложенному Вейссом (1936 г.) для красителей, способных образовывать лейкосоединения и одной из альтернативных схем Франка и Ливингстона (1941 г.).

Агрегированные коллоидные формы хлорофилла обладают фотосенсибилизирующим действием, которое удается наблюдать в случае реакции необратимого окисления аскорбиновой кислоты кислородом или метиловым красным. Гораздо более активны коллоиды, полученные с помощью детергентов [10]. В нашей лаборатории была показана способность гомогенатов зеленых листьев растений наряду с реакцией Хилла сенсибилизировать простые реакции переноса водорода, также сопровождающиеся запасанием энергии света [11]. Следует указать, что мы наблюдали сенсибилизированное хлорофиллом восстановление кофакторов фотосинтетического фосфорилирования: феназина, флавинмононуклеотида. Опыты показали, что эти соединения и менадион быстро реагируют с фотовосстановленными формами хлорофилла и бактериохлорофилла, воспринимая от них водород (электрон) с регенерацией молекулы пигмента [12]. Арнон [13] в своей схеме, связывающей фотохимический перенос электрона в хлоропластах с цепью реакций фотосинтетического фосфорилирования, предположил, что происходит элементарный фотоэффект — отдача электрона молекулой хлорофилла; однако наши опыты указывают на то, что возбужденная молекула хлорофилла приобретает способность к восприятию электрона и поэтому более вероятен «обратный» ход электрона при фотопроцессе, от цитохрома к хлорофиллу. Действительно, Ченс [14], освещая при низкой температуре бактерии, наблюдал фотоокисление цитохрома, что может соответствовать переходу электрона к бактериохлорофиллу, т. е. элементарному фотовосстановлению этого пигмента.

Таким образом, изложенные опыты дают основание для рабочей гипотезы, согласно которой при фотосинтезе хлорофилл участвует в реакциях переноса электрона, сопряженных с энзиматическими стадиями процесса.

Однако чтобы понять природу участия пигментов в фотосинтетических реакциях непосредственно в организмах, нужно изучить природу состояния пигментов в гранулах хлоропластов. Электронно-микроскопические исследования тонких срезов, указывая на слоистую структуру гранул, пока не дают возможности установить тип упаковки в них молекул пигментов. В нашей лаборатории изучалось состояние пигментов в различных организмах и в процессе образования хлорофилла в листьях.

Состояние и образование пигментов в фотосинтезирующих организмах

Спектры поглощения бактериохлорофилла и бактериовиридина в живых фотосинтезирующих бактериях сильно отличаются от поглощения этих пигментов, извлеченных органическими растворителями. Так, Вассинк и Катц, а также и Френч более двадцати лет тому назад наблюдали, что в пурпурных бактериях бактериохлорофилл обладает максимумами поглощения при 890, 850 и 800 мμ, тогда как пигмент, экстрагированный растворителями, имеет один максимум поглощения при 770—780 мμ. В зеленых бактериях бактериовиридин имеет максимум поглощения при 740 мμ, тогда как в растворе — при 665 мμ. Наши опыты показали, что агрегация этих пигментов в твердых пленках и коллоидных частицах ведет к сдвигу максимума поглощения в инфракрасную область спектра. Агрегация сопровождается появлением разных типов упаковок пигмента, с максимумами поглощения, близкими к поглощению пигментов в живых клет-

ках бактерий [15]. Действие нагревания и растворителей на суспензии бактерий и коллоидные растворы пигментов приводит к сходным эффектам. Изучение спектров поглощения и флуоресценции зеленых серобактерий указывает на то, что часть пигмента может находиться также в мономерных формах, вероятно связанных с белками и липоидами.

Существенно то, что агрегированные формы бактериохлорофилла и бактериовиридина обладают отчетливой флуоресценцией в инфракрасной области спектра; в спектре флуоресценции зеленых серобактерий обнаруживаются максимумы, соответствующие мономерным и агрегированным формам пигмента (при 680 и 770 *мμ*) [16].

Соотношение между максимумами меняется в процессе развития бактериальной культуры.

Широкое применение терминов «мономерный» и «агрегированный» требует более точного определения. Под термином «мономерный» мы разумеем состояние, наблюдаемое в разбавленных растворах хлорофилла в полярных растворителях и в разреженных монослоях, когда практически нет взаимодействия между молекулами пигмента. Мономерный хлорофилл может быть связан с липопротеином, растворен в липоидной фазе, а также может находиться в виде монослоя на белково-липоидных фазовых границах в гранулах. Термин «агрегированный» относится к формам, где наблюдается взаимодействие между молекулами хлорофилла — в твердых пленках, коллоидных частицах, кристаллах, плотно упакованных монослоях на фазовых границах.

Электронографическое исследование хлорофилла в агрегированных формах показало возможность двух различных типов упаковки в кристаллической решетке [17]. Форма с максимумом поглощения при 740 *мμ* была известна ранее из работ Рабиновича, Якобса и Холта [18], в нашей лаборатории обнаружена форма с максимумом при 690 *мμ* [17]. Этот тип упаковки наблюдается в водных коллоидах и пленках хлорофилла *а* и *а* + *в*, полученных из диоксана и в кислых средах. В зеленых растениях, как известно, максимум поглощения хлорофилла лежит при 676—678 *мμ*, что соответствует структурам с малой упорядоченностью; лишь у глубоководных красных водорослей мы наблюдали максимум поглощения при 690 *мμ* [19].

Мы изучали состояние хлорофилла в процессе его образования из протохлорофилла в листьях этиолированных и зеленых растений. Измерения спектров поглощения гомогенатов из листьев в процессе зеленения показало, что хлорофилл, свежеобразованный из протохлорофилла, отличается по своему спектру поглощения от хлорофилла во «взрослых» зеленых листьях. В опытах, проведенных нами совместно с Воробьевой в 1952 г. [20], было показано, что в листьях первично образуются мономерные формы с максимумом поглощения при 670 *мμ*, быстро выцветающие при сильном освещении. Дальнейшее накопление хлорофилла при зеленении листьев приводило к сдвигу максимума поглощения до 678 *мμ* с образованием агрегированных форм. Соотношение между мономерными и агрегированными формами хлорофилла в листьях изменялось в процессе развития и различалось у разных типов растений. Изучение спектров действия образования хлорофилла в работах Франк, Смита и Коски (1946—1951 гг.) показало наличие максимума при 650 *мμ*, что говорит о присутствии предшественника с максимумом поглощения в этой области. Действительно, измерения поглощения этиолированных листьев в работах Смита и Шибата [21] показали наличие активной формы протохлорофилла с максимумом поглощения при 645 *мμ* наряду с инертной формой этого пигмента. В опытах, проведенных нами совместно с Литвиным [22] производились измерения спектров флуоресценции этиолированных и

зеленеющих листьев при —150° С. Эти измерения обнаружили детальную картину промежуточных стадий, согласующуюся с данными Смита и Шибата. Протохлорофилл находится в двух формах — неактивной, с максимумом флуоресценции при 633 *мμ*, и активной с максимумом при 655 *мμ*. При освещении последняя форма быстро переходит в хлорофилл с максимумом при 690 *мμ* и затем последовательно переходит через стадии с максимумами при 675, 680 и 686 *мμ*. Последний сдвиг обязан реабсорбции флуоресценции, обусловленной накоплением хлорофилла. Активные формы протохлорофилла (655 *мμ*) и хлорофилла (690 *мμ*), по-видимому, принадлежат белковолипоидным соединениям бесфитольных форм этих пигментов [23—25]. Эти формы обнаружены также и при освещении гомогенатов этиолированных листьев [26]. В гомогенатах, однако, процесс заканчивается на стадии, соответствующей мономерной форме хлорофилла с максимумом флуоресценции при 680 *мμ*.

Используя метод измерения спектров флуоресценции листьев и экстрактов при низких температурах удалось обнаружить протохлорофилл в зеленых листьях, его накопление при помещении листьев в темноту и быстрое превращение этого активного протохлорофилла при последующем освещении зеленых листьев [27]. В опытах Литвина [28] измерялись спектры флуоресценции листьев и тонких слоев гомогенатов в условиях, практически исключающих реабсорбцию, при комнатной и низкой (—196°) температурах, в процессе зеленения этиолированных листьев. Свежеобразованный хлорофилл имел спектр флуоресценции, характерный для мономерных форм: интенсивный красный максимум и менее интенсивный инфракрасный (около 730 *мμ*), при этом охлаждение до —196° мало влияло на соотношение между максимумами. По мере зеленения листьев и накопления хлорофилла в гранулах сильно возрастала интенсивность максимума при 730—750 *мμ* при охлаждении, который следует приписать агрегированным формам хлорофилла. Подобные явления наблюдались у зеленых серных бактерий [16]. Броди [29] наблюдал максимум флуоресценции при 710—720 *мμ* в растворах хлорофилла, в условиях, способствующих агрегации. Изменение соотношения интенсивности красного и синего максимумов поглощения хлорофилла также может быть экспериментальным критерием агрегации. Вюрмзер еще в 1921 г. заметил различия в соотношении максимумов поглощения хлорофилла в синей и красной области спектра у растворов хлорофилла и в листьях; это соотношение в листьях (около 1) соответствует агрегированным формам хлорофилла в твердых пленках и коллоидных растворах.

Френч, применив метод «производной» спектрофотометрии обнаружил в красной области поглощения водорослей, ряд максимумов, принадлежащих разным формам хлорофилла [30]. Недавно Френч [31] осуществил важные измерения структуры «спектра действия» фотосинтеза в красной области поглощения хлорофилла в растениях с тем, чтобы установить пока неясные функции разных форм хлорофилла. Вероятно, соотношение между разными формами и в особенности образование промежуточной „формы 690" играет решающую роль в проявлении эффекта Эмерсона (перемещение спектра действия фотосинтеза в более далекую красную область при дополнительном освещении растения в более коротковолновой области спектра). В связи с этим интересны недавние наблюдения, проведенные в лаборатории Рабиновича [32], при которых были обнаружены новые максимумы спектра действия эффекта Эмерсона при 650 и 670 *мμ*, соответствующие, как нам кажется, активной форме протохлорофилла и мономерной форме хлорофилла.

Наличие разных форм пигментов указывает на чрезмерную упрощенность представлений о «полупроводниковом» механизме участия хлорофилла в фотосинтезе.

Возможность обратимых превращений хлорофилла в живых организмах

Эта возможность исследовалась методами дифференциальной и импульсной спектроскопии; Дюйсенс [31] обнаружил обратимое появление максимума при 515—520 *мμ*. В нашей лаборатории [11] наблюдались обратимые изменения в красном максимуме поглощения хлорофилла при освещении гомогенатов зеленых листьев. Рабинович с сотрудниками [34] показали, что обратимое падение красного максимума поглощения хлорофилла в хлорелле соответствует увеличению поглощения при 520 *мμ*. Витт [35] наблюдал подобные явления для второго максимума поглощения хлорофилла при 430 *мμ*. Давно известны изменения флуоресценции листьев при чередующихся периодах света и темноты и под влиянием различных внешних условий и воздействий. Мы полагаем, что эти эффекты следует приписать изменению фотостационарной концентрации флуоресцирующей формы хлорофилла и изменению его состояния. В зеленых листьях растений обнаружены максимумы, близкие к флуоресценции фотовосстановленной формы хлорофилла, однако пока неясны условия их образования [22]. Спектр флуоресценции зеленых листьев фасоли при —196° характеризуется отчетливыми максимумами при 682—686 и 690—696 *мμ*, обладающими структурой [27, 28]; это явление не наблюдается у замороженных растворов хлорофилла в пиридине и спирте. В этих опытах наблюдались изменения интенсивности максимумов флуоресценции при освещении зеленых листьев даже при —196°, что, по-видимому, связано с элементарным фотопроцессом переноса электрона (водорода) в хлорофилл-белково-липоидном комплексе. Это согласуется с недавними опытами Арнольда и Клейтона [36], обнаруживших изменения поглощения пигмента при освещении бактерий, замороженных до +1° К, в условиях, когда исключены энзиматические стадии. На очереди экспериментальное решение вопроса о том, в какой мере связаны обратимые изменения хлорофилла в листьях с его участием в элементарных процессах фотосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Красновский.—Успехи химии, 1960, **29**, 736. Ann. Rev. Plant. Physiol. 1960, **11**, 363, J. Chem. Phys., 1958, **55**, 968.
2. В. Б. Евстигнеев.— Журнал физ. хим., 1958, **32**, 969.
3. Н. Н. Бубнов, А. А. Красновский, А. В. Умрихина, В. Ф. Цепалов, В. Я. Шляпинтох.— Биофизика, 1960, **5**, 121. А. А. Красновский, А. В. Умрихина.— Биофизика, 1958, **3**, 547.
4. Ф. Ф. Литвин, Ю. А. Владимиров, А. А. Красновский.— Усп. физических наук 1960, **71**, 148.
5. B. L. Strehler, W. H. Arnold.— J. Gen. physiol. 1951, **34**, 809.
6. R. Livingston, A. C. Pugh.— Nature, 1960, **186**, 969.
7. F. Fujimori, R. Livingston.— Nature, 1957, **180**, 1036.
8. А. А. Красновский.— Биофизика, 1959, **4**, **5**. А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. В. Пакшина.— Биохимия, 1960, **25**, 288. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.— Докл. АН СССР, 1959, **127**, 198.
9. Г. П. Брин, А. А. Красновский.— Биохимия, 1959, **24**, 1085
10. Г. П. Брин, А. А. Красновский.— Биохимия, 1957, **22**, 776. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.— Биофизика, 1959, **4**, 641; 1960, **5**, 599.
11. Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.— Биохимия, 1958, **23**, 760.
12. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина.— Докл. АН СССР, 1960, **135**, № 5.
13. D. I. Arnon.— Nature, 1959, **184**, 10.
14. B. Chance.— Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1960, **46**, 19.
15. А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая.— Докл. АН СССР, 1952, **85**, 389; 1953, **92**, 1201.
16. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина.— Докл. АН СССР, 1959, **127**, 913. А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, И. Федорович.—Докл. АН СССР, 1960. **134**, 1232.
17. Е. В. Белавцева, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.— Биофизика, 1959, **4**, 521.

18. E. Rabinowitch, E. E. Jacobs, A. S. Holt, R. Kromhaut.— Zeit. Phys., 1952, **133**, 261.
19. А. А. Красновский, Е. А. Нестеровская. А. Б. Гольденберг.— Биофизика, 1956, **1**, 328.
20. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая.— Докл. АН СССР, 1952, **85**, 177; 1953, **91**, 343; Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.— Биохимия, 1954, **19**, 37; 1956, **21**, 126; А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина.— Физиол. растений, 1957, **4**, 124.
21. J. H. C. Smith, A. Benitez.— Carnegie Inst. Wash., Year Book, 1952—53, **52**, 149, 153. K. Shibata.— J. Biochem. (Tokyo), 1957, **44**, 147.
22. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский.— Докл. АН СССР, 1957, **117**, 106; 1958, **120**, 764.
23. Т. Н. Годнев, А. А. Шлык, Р. П. Ляхнович.— Физиол. растений, 1957, **4**, 393.
24. J. B. Wolff, L. Price.— Arch. Biochem. Biophys., 1957, **72**, 293.
25. H. J. Virgin.— Physiol. Plantarum, 1960, **13**, 155.
26. А. А. Красновский, М. И. Быстрова.— Биохимия, 1960, **25**, 168.
27. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева.— Докл. АН СССР, 1959, **127**, 699.
28. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева.— Докл. АН СССР, 1960, **135**, № 6.
29. S. S. Brody.— Science, 1958, **128**, 838.
30. C. S. French, H. S. Huang.— Carnegie Inst., Year Book, 1956—57, **56**, 266.
31. C. S. French.— Carnegie Inst., Year Book, 1958—59, **57**, 323.
32. R. Govindjee, E. Rabinowitch.— Science, 1960, **132**, 355.
33. L. N. M. Duysence.— Science, 1954, **120**, 353.
34. J. W. Coleman, E. Rabinowitch.— J. Phys. Chem., 1959, **63**, 30.
35. H. T. Witt. Research in Photosynthesis, p. 75 (Intersc. Publ. Inc., 1957).
36. W. H. Arnold, Clayton.— Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1960, **46**, 769.

Доклады Академии наук СССР
1961. Том 139, № 1

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ZnO и TiO_2 В РЕАКЦИЯХ, ИДУЩИХ С ВЫДЕЛЕНИЕМ КИСЛОРОДА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 20 II 1961)

Изучение реакций, при которых происходит фотохимическое выделение кислорода, представляет интерес на пути поисков искусственных моделей отдельных стадий фотосинтеза. Изолированные хлоропласты и гомогенаты листьев сохраняют способность к реакции Хилла — фотохимическому выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением окисного железа, хинона и других соединений. Однако реакции такого типа до сих пор не удавалось воспроизвести в искусственных системах. В настоящем сообщении описаны некоторые типы окислительно-восстановительных реакций, фотосенсибилизированных окисью цинка и двуокисью титана, при которых наблюдается выделение кислорода, в присутствии ряда окислителей — перманганата калия, хинона, соединений окисного железа. Опыты проводились при 20° в манометрических сосудах Варбурга из кварца и стекла, освещаемых со стороны дна сосуда ртутно-кварцевой лампой ПРК-4, заключенной в кварцевую трубку диаметром 5 см. Сосуды и источник света находились в водяной ванне прибора Варбурга. При ведении опытов в кварцевых манометрических сосудах действовал весь спектр лампы ПРК-4, в том числе линии ртути 256 и 313 мμ, в стеклянных сосудах эти линии задерживались стеклом и действовали группы ртутных линий 365 и 404 мμ.

Как известно, окись цинка и двуокись титана обладают поглощением в ультрафиолетовой части спектра (длинноволновая граница поглощения около 400 мμ). В исследованных реакциях компоненты также поглощают в этой области спектра, поэтому во всех случаях сопоставлялось прямое фотохимическое действие (без сенсибилизатора) и в присутствии окиси цинка и двуокиси титана. Опыты, в которых освещение вели в отсутствие окислителя в водных средах, приводили к незначительному поглощению кислорода в случае окиси цинка (которая сенсибилизирует образование перекиси водорода из воды и кислорода ([1])). В присутствии двуокиси титана газообмен не изменялся. Чтобы проверить возможность наличия нестехиометрического кислорода в окиси цинка был поставлен следующий опыт: суспензия окиси цинка в воде помещалась в сосуд, в боковом отводе которого была 10% серная кислота. После термостатирования кислота приливалась и следили за газообменом, при этом в течение часа выделения газа отмечено не было. Возможность выделения CO_2 была устранена тем, что в сосуд вставляли стаканчик со щелочью. Опыт, проведенный с свежепрокаленным углекислым цинком, также показал отсутствие нестехиометрического кислорода.

Большинство опытов проводили в атмосфере азота, освобожденного от следов кислорода пропусканием через систему поглотителей со щелочным гидросульфитом. В некоторых опытах варьировали pH путем использования воды, подкисленной и подщелоченной до определенного pH серной кислотой и раствором едкого натра. Буферные соли (фосфаты) тормозили реакцию.

Фотокаталитическое разложение перманганата калия. Выделение кислорода при действии ультрафиолетового света на растворы перманганата калия открыли в 1913 г. Мэтьюс и Деви ([2]). Эта реакция была исследована в работе Райдила и Норриша ([3]). Циммер-

ман ([4]) изучил изотопный состав выделяющегося кислорода и установил, что фотохимически выделяющийся кислород происходит из ионов MnO_4^-, а не из молекулы воды, и фотохимический акт поэтому заключается во внутримолекулярном переносе электрона от кислорода к иону марганца. Максимальный квантовый выход реакции наблюдался при 313 мμ.

Мы нашли, что введение окиси цинка и двуокиси титана в водные растворы перманганата калия сенсибилизируют реакцию выделения кислорода в сторону длинных волн в область собственного поглощения сенсибилизатора (до 400 мμ). Прямое фотохимическое выделение кислорода из $KMnO_4$ в стекле было незначительным. В присутствии сенсибилизаторов (ZnO и TiO_2) в стеклянных сосудах наблюдалось интенсивное выделение кислорода (рис. 1), в кварцевых — значительное ускорение реакции, вообще идущей и в отсутствие сенсибилизаторов (рис. 2).

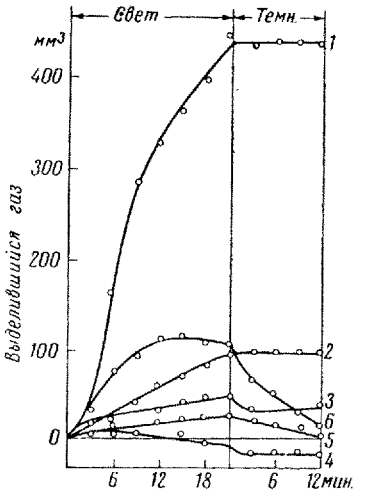


Рис. 1. Фотосенсибилизированное ZnO и TiO_2 выделение кислорода из растворов перманганата калия при освещении лампой ПРК-4 в стеклянных сосудах при 20° (5 мг $KMnO_4$, 30 мг ZnO или TiO_2 и 10 мл воды). *1*— $KMnO_4$ + ZnO; *2* — $KMnO_4$ + TiO_2; *3* — $KMnO_4$; *4* — ZnO, *5* — TiO_2; *6* — $KMnO_4$ + ZnO раствор, щелочного пирогаллола в боковом отводе

Изменение pH в пределах от 4 до 10 мало влияло на фотохимическое выделение кислорода в растворах перманганата калия в кварцевых сосудах в отсутствие сенсибилизаторов, что согласуется с представлением о внутримолекулярном переносе электрона. Однако на сенсибилизированное ZnO и TiO_2 выделение кислорода несколько влияет величина pH, что связано, вероятно, с условиями блокирования активных центров на поверхности фотокатализатора.

О том, что выделяющийся газ действительно кислород, свидетельствовали опыты, проведенные в атмосфере азота в присутствии поглотителя кислорода — 2% раствора пирогаллола в 10% растворе NaOH (1 мл такого раствора в токе азота помещали в боковой отвод сосуда). В процессе опыта кислород поглощался, результаты показаны на рис. 1. Контрольные опыты с ZnO и TiO_2 в воде без $KMnO_4$ калия не показали выделения кислорода.

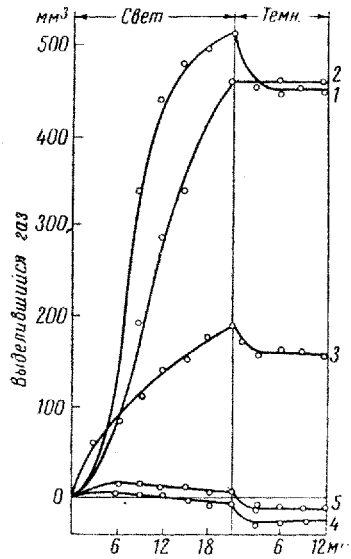


Рис. 2. То же, что на рис. 1, в кварцевых сосудах

Основываясь на опытах А. Н. Теренина и Е. К. Пуцейко ([5]), показавших сенсибилизацию фотопроводимости ZnO адсорбированными красителями, мы пытались использовать подобные адсорбаты с тем, чтобы сенсибилизировать реакцию к видимой области спектра. Эти опыты, однако, не привели к положительным результатам. Мы пытались также сенсибилизировать к красной области спектра разложение $KMnO_4$ в ацетоновых и пиридиновых растворах хлорофилла, но и эти опыты не увенчались успехом, так же как попытка сенсибилизировать разложение водных растворов $KMnO_4$ коллоидным хлорофиллом и кристаллами фталоцианинов магния и меди, которые обладают фотосенсибилизирующим действием при окислении аскорбиновой кислоты ([6]).

Так как ZnO сенсибилизирует образование перекиси водорода ([1]), то казалось бы, что выделение кислорода могло бы идти «в объеме» за счет взаимодействия H_2O_2 с $KMnO_4$. Однако против этого механизма говорит тот факт, что реакция идет и в отсутствие кислорода не менее, а более эффективно и что двуокись титана, которая не способна сенсибилизировать образование H_2O_2, тем не менее активна в случае разложения перманганата калия.

Фотосенсибилизированное выделение кислорода в присутствии феррицианида калия. Опыты проводили в стеклянных сосудах в атмосфере азота. Соотношение между ZnO и $K_3Fe(CN)_6$ сильно влияет на эффективность процесса. При большой концентрации $K_3Fe(CN)_6$ происходит экранирование ZnO от действия света. Оптимальные соотношения в наших условиях опытов 500 мг ZnO и 15 мг $K_3Fe(CN)_6$ в 10 мл воды. Опыты проводили также в присутствии поглотителей — щелочи и щелочного пирогаллола. В присутствии одной щелочи газообмен не изменялся.

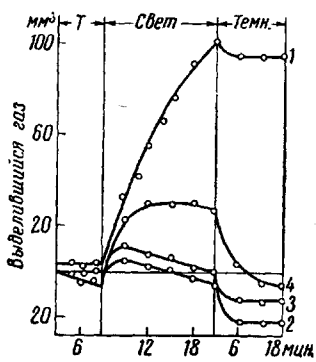


Рис. 3. Фотосенсибилизированное ZnO выделение кислорода из растворов $K_3Fe(CN)_6$ при освещении лампой ПРК-4 в стеклянных сосудах при 20° в атмосфере азота (15 мг $K_3Fe(CN)_6$, 500 мг ZnO и 10 мл воды). *1* — $K_3Fe(CN)_6$ + ZnO; *2* — $K_3Fe(CN)_6$; *3* — ZnO; *4* — $K_3Fe(CN)_6$ + ZnO (1 мл раствора 2% пирогаллола в 10% NaOH, в боковом отводе), в сосуде в этом случае 9 мл воды

Из рис. 3 видно, что выделяющийся газ поглощается пирогаллолом и поэтому является кислородом. За 30 мин. освещения выделяется до 100 мм³ кислорода, что составляет около 0,1 мол. на 1 мол. $K_3Fe(CN)_6$. В присутствии двуокиси титана в этих условиях не удалось наблюдать выделения кислорода.

Фотосенсибилизированное выделение кислорода в присутствии хинона. При освещении водных растворов хинона в стеклянных и кварцевых сосудах мы не смогли наблюдать прямого фотохимического выделения кислорода. Введение окиси цинка или двуокиси титана в стеклянные сосуды приводило к образованию газа при освещении в атмосфере азота. Однако значительная часть газа поглощалась раствором щелочи, тогда как щелочной пирогаллол поглощал на 20—30% больше газа (рис. 4). Таким образом, при фотореакции выделяется смесь углекислоты и кислорода приблизительно в отношении 2 : 1. В контрольных опытах с одной окисью цинка, одним хиноном и одними поглотительными растворами не наблюдалось выделения газа. Введение гидрохинона в хинон подавляло выделение кислорода. В присутствии воздуха наблюдалось фотосенсибилизированное окисление хинона и гидрохинона. Вероятно, при реакции без воздуха первично образующиеся радикалы OH приводят к частичному деструктивному окислению хинона или промежуточно образуемых семихинонов. Эта побочная реакция весьма эффективна, и, по-видимому, лишь меньшая часть радикалов OH успевает рекомбинировать с выделением кислорода на поверхности окиси цинка.

О механизме реакции. В области возбуждения поглощают как фотокатализаторы, так и окислители. Поэтому в изученных системах нет сенсибилизации в «чистом» виде и следует говорить о фотокаталитическом действии окиси цинка и двуокиси титана, хотя в контрольных опытах в стеклянных сосудах прямое фотохимическое действие было незначительным. Можно представить себе следующие типы механизма этих реакций: 1) элементарный процесс идет в объеме, и фотокатализатор «выбирает» фотопродукты, предотвращая быструю обратимость первичных стадий; 2) фотореагируют молекулы, адсорбированные на поверхности катализатора при возбуждении в области их собственного поглощения; 3) фотокатализатор

поглощает свет и приводит к фотосенсибилизированному окислению — восстановлению реагирующих молекул, адсорбированных на его поверхности. Для решения этих вопросов нужно измерить «спектр действия» изученных реакций. По нашему мнению, наиболее вероятен механизм, согласно которому фотохимический перенос электрона идет через катализатор-полупроводник, так как реакции этого типа идут и с веществами, не обладающими поглощением в области возбуждающего света ([1]).

Окись цинка и двуокись титана представляют собой полупроводники, при освещении которых происходит разделение зарядов — электрона и дырки. При действии света на поверхности сенсибилизатора возможно образование электронодонорных и электроноакцепторных центров ([7]). Вероятные элементарные стадии реакции заключаются в восприятии электрона электроноакцепторным компонентом (MnO_4^-, хинон, Fe^{+++}) и отдаче электрона электронодонорным компонентом (OH—H_2O) в «дырку» с промежуточным образованием гидроксильных радикалов. В опытах Г. А. Корсуновского ([8]) было показано, что при освещении водной суспензии окиси цинка в вакууме в присутствии бензола и электроноакцепторного красителя — метиленового голубого образуется фенол. Это свидетельствует об образовании гидроксильных радикалов, реагирующих с бензолом ([9]).

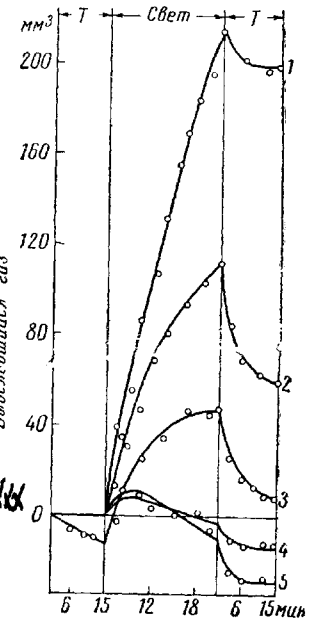


Рис. 4. Фотосенсибилизированное ZnO выделение кислорода из растворов хинона в стеклянных сосудах при освещении лампой ПРК-4 при 20° в атмосфере азота (15 мг хинона, 500 мг ZnO и 10 мл воды). *1* — хинон + ZnO; *2* — хинон + ZnO + KOH в боковом отводе; *3* — хинон + ZnO, раствор щелочного пирогаллола в боковом отводе; *4* — хинон; *5* — ZnO

На основании наших опытов следует предположить, что первичные фотопродукты (вероятно, гидроксильные радикалы) могут рекомбинировать на поверхности фотокатализатора с выделением кислорода. Механизм описанных нами реакций нуждается в углубленном изучении.

В заключение следует указать на то, что фотокаталитическое действие окиси цинка и двуокиси титана отличалось у различных препаратов этих соединений. Известно, что активность фотокатализаторов этого типа зависит от удельной поверхности, структуры, микропримесей тяжелых металлов ([7]).

В опытах использовалась окись цинка pro anal. от Мерка ([1]), четыре образца муфельных цинковых белил (II) и ZnO, полученное прокаливанием х. ч. $ZnCO_3$ при 700° (III), двуокись титана чистая Шеринг-Кальбаум (IV), титановые белила со структурой анатаза (V). В реакции выделения кислорода из $KMnO_4$ активность была большой у всех изученных препаратов фотокатализаторов. В реакции с $K_3Fe(CN)_6$ наиболее активны были образцы ZnO (I), менее активны (II) и неактивны (III). На рисунках приведены опыты с ZnO (I) и TiO_2 (IV).

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

Поступило
2 II 1961

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] E. Baur, C. Neuweiler, Helv. Chim. Acta, **10**, 901 (1927). [2] J. H. Mathews, L. H. Dewey, J. Phys. Chem., **17**, 211 (1913). [3] E. Rideal, R. Norrish, Proc. Roy. Soc. London, **103**, 336 (1923). [4] G. Zimmerman, J. Chem. Phys., **23**, 825 (1955). [5] Е. К. Пуцейко, А. Н. Теренин, ЖФХ, **23**, 676 (1949); ДАН; **90**, 1005 (1953). [6] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **53**, 447 (1946). [7] А. А. Красновский, Диссертация, Моск. хим-технолог. инст. им. Д. И. Менделеева, 1940; Проблемы кинетики и катализа, 8, Изд. АН СССР, 1955, стр. 40. [8] Г. А. Корсуновский, Проблемы фотосинтеза, Изд. АН СССР, 1959, стр. 87; ЖФХ, **34**, 510 (1960). [9] F. Framer, G. Stein, J. Weiss, J. Chem. Soc., **1949** 3241.

Доклады Академии наук СССР
1961. Том 136, № 5

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. И. БЫСТРОВА и А. Д. СОРОКИНА

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПИГМЕНТНЫХ ФОРМ В ГОМОГЕНАТАХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ОСВЕЩЕННЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 26 VIII 1960)

В работах нашей лаборатории с помощью спектральных и фотохимических методов были обнаружены в листьях растений различные формы хлорофилла, отличающиеся по спектрам поглощения и флуоресценции и скорости деструктивного фотоокисления ([1-3]). Путем длительного центрифугирования при 25 000 *g* гомогенатов из листьев сахарной свеклы и других растений удалось частично фракционировать формы хлорофилла, различающиеся максимумами поглощения и связанные, по-видимому, с различными клеточными структурами ([4]).

В этиолированных листьях растений содержатся формы протохлорофилла, различающиеся по своей фотохимической активности: активная форма с максимумом флуоресценции при 655 мμ и малоактивная с максимумом при 635 мμ ([5]). Им соответствуют формы с максимумами поглощения при 650 и 630 мμ ([6]).

Эти формы протохлорофилла мы наблюдали также в гомогенатах этиолированных листьев, приготовленных в темноте; такие гомогенаты сохраняют способность к образованию хлорофилла при освещении ([7]).

Смит ([8]) сделал попытку выделить индивидуальное протохлорофилл-белковое соединение — «протохлорофилл-голохром» из гомогенатов этиолированных листьев путем ступенчатого осаждения сульфатом аммония и дробного центрифугирования. Полученный в его работе «голохром» имел молекулярный вес порядка 10^6 (являясь сильно агрегированным белком), обладал максимумом поглощения около 640 мμ и содержал, по-видимому, как активную, так и неактивную формы протохлорофилла.

С целью изучения природы разных форм протохлорофилла и первично образованного хлорофилла в этиолированных и освещенных листьях мы сделали попытку их фракционирования путем скоростного центрифугирования. Для суждения о химических различиях пигментных форм изучалась кинетика их превращения при освещении параллельно с хроматографированием на бумаге пигментных экстрактов.

Фракционирование. Этиолированные листья (0,5 г) 10—12-дневных растений фасоли сорта Северная Звезда тщательно растирали в ступке с 20 мл охлажденного до 0° фосфатного буфера (pH 8,5), отжимали через полотно и центрифугировали 3000 *g* 5 мин. Надосадочную жидкость центрифугировали нужное время (от 5 до 60 мин.) при 25 000 *g* на центрифуге MSE с охлаждением (около 0°), после чего надосадочный слой разбавляли глицерином в отношении 2 : 3 и замораживали погружением в жидкий азот с целью фиксации.

Все описанные операции производились в полной темноте, что требовало особой техники опытов. Спектры флуоресценции замороженных буферно-глицериновых растворов фотографировали на установке, описанной ранее ([5]), при температуре ниже —100° с тем, чтобы избежать превращения пигментов при действии возбуждающего света.

Измерение кинетики осаждения разных форм протохлорофилла проводилось в опытах с разной продолжительностью центрифугирования с фотоэлектрической регистрацией флуоресценции.

Опыты показали, что форма протохлорофилла с флуоресценцией при 655 мμ оседает скорее, будучи связанной с более крупными клеточными структурами, чем форма, флуоресцирующая при 635 мμ (рис. 1).

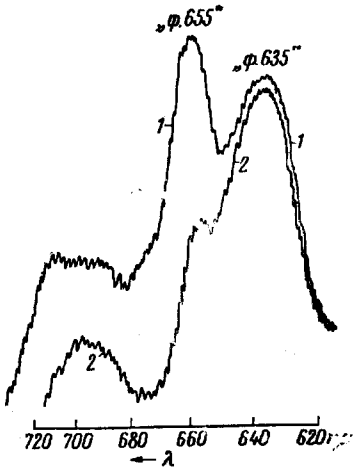


Рис. 1. Микрофотограммы спектров флуоресценции гомогената этиолированных листьев до (*1*) и после (*2*) часового центрифугирования, pH 8,5

Взмучивание осадка в отцентрифугированном гомогенате приводило к воспроизведению исходного соотношения форм, что являлось контролем на возможность превращения активной формы в процессе подготовки препарата и центрифугирования.

Кинетика изменения максимумов флуоресценции в надосадочной жидкости в процессе центрифугирования (см. рис. 2) дает представление о большей скорости оседания активной формы протохлорофилла («форма 655») по сравнению с малоактивной формой («форма 635»).

Скорость оседания сильно зависит от pH буферного раствора, увеличиваясь при приближении к изоэлектрической точке белка. Так, при pH 4,5 обе пигментные фракции осаждаются почти полностью уже за 20 мин. центрифугирования.

Было найдено, что при скоростном центрифугировании освещенных гомогенатов, содержащих различные формы первичнообразованного хлорофилла (с максимумами флуоресценции при 688; 684 и 680 мμ), эти формы оседают скорее, чем оставшаяся непревращенной малоактивная форма протохлорофилла (рис. 3). Собственно, этого и следовало ожидать, так как из активной формы протохлорофилла («форма 655»), связанной с быстро оседающими фракциями, образуется первичный хлорофилл.

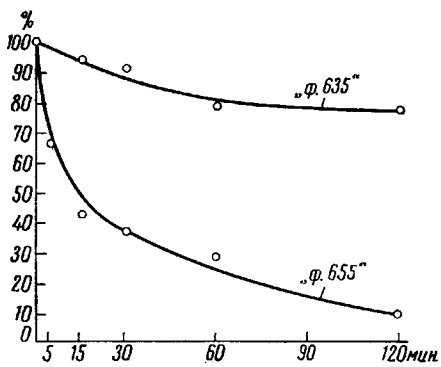


Рис. 2. Кинетика оседания «формы 655» и «формы 635» в гомогенате этиолированных листьев при скоростном центрифугировании (25 000 *g*)

Оставался неясным вопрос, чем определяются различия в формах протохлорофилла и первичного хлорофилла — разной химической природой (например, фитольные и бесфитольные формы) или способом связи с липопротеином.

Чтобы судить об этом, мы провели последовательные измерения спектров флуоресценции этиолированных листьев по мере их освещения, проводя параллельно этому хроматографирование на бумаге пигментов, выделяемых из листьев на разных стадиях освещения.

В общей схеме опыта интервалы освещения этиолированных листьев были 5 и 15 сек.; 5, 15 и 30 мин.; 1, 2 и 4 часа (лампы дневного света, интенсивность около 1500 лк).

0,2 г листьев использовали для приготовления гомогената и фотографирования спектра флуоресценции. Навеску в 0,4 г тех же листьев растирали с ацетоном для полного извлечения пигментов; пигменты переводили в серный эфир добавлением насыщенного водного раствора NaCl. После

концентрации путем выпаривания эфирный раствор наносили узкой полоской на бумагу (ленинградская быстрая) и хроматографировали в двух вариантах растворителей — смеси Годнева и Акулович ([9,10]) (бензин с температурой кипения 80—115° 85 частей; петролейный эфир 25; ацетон 35 и изопропанол 4 части) или Лефлера ([11]) (петролейный эфир 30, серный эфир 30 и этиловый спирт 0,5 части). Красную флуоресценцию полос наблюдали при возбуждении линиями ртутного спектра при 365 мμ. О количестве пигмента и кинетике его превращений судили по интенсивности флуоресценции (измеренной фотоэлектрически) ацетоновых элюатов хроматографических зон, выделяемых из листьев на разных стадиях освещения. При фиксировании этиолированных листьев кратковременным нагреванием в кипящей воде или охлаждением в жидком азоте были получены сходные результаты.

В экстрактах этиолированных листьев наблюдались две ярко флуоресцирующие хроматографические зоны: нижняя, располагающаяся непосредственно над линией нанесения, и верхняя, более компактная, вблизи фронта растворителя. Спектрально обе зоны идентичны. На рис. 4 представлены спектры флуоресценции ацетоновых элюатов указанных зон.

При обработке хроматограмм 0,02 *N* КОН нижняя зона (принадлежащая, по-видимому, протохлорофиллиду — бесфитольной форме со свободным карбоксилом ([12-15])) вымывалась — флуоресценция этой зоны исчезала, тогда как флуоресценция верхней зоны оставалась неизменной. Также вымывается щелочью образующаяся впоследствии зона хлорофиллида.

В спектре флуоресценции этиолированных листьев максимум 655 мμ, принадлежащий активной форме пигмента, является основным; количество протохлорофиллида в неосвещенных этиолированных листьях в несколько раз превышает количество протохлорофилла. После 5 сек. освещения максимум 655 мμ в спектре заметно уменьшается, количество протохлорофилла остается без изменения, количество протохлорофиллида также несколько уменьшается. За это время освещения в листьях хроматографически обнаруживается хлорофиллид, располагающийся выше зоны протохлорофиллида. Это соответствует появлению в спектре флуоресценции листьев максимума при 690 мμ.

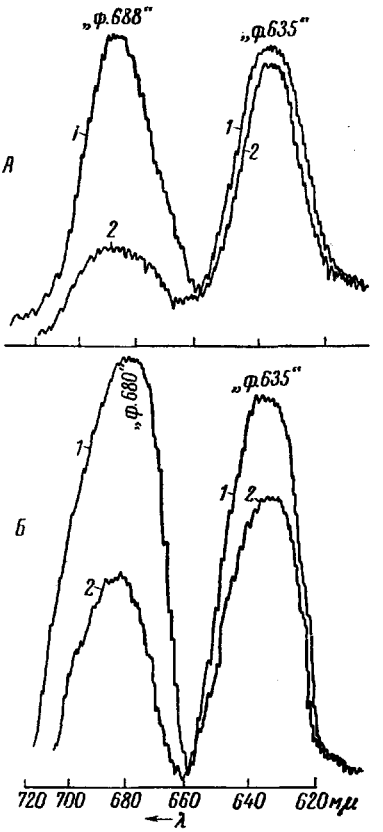


Рис. 3. Микрофотограммы спектров флуоресценции освещенных гомогенатов листьев. *А* — гомогенат, содержащий первичный хлорофилл с максимумом флуоресценции 688 мμ (после 3 сек. освещения); *Б* — гомогенат, содержащий первичный хлорофилл с максимумом 680 мμ (после 1 мин. освещения); *1* — до и *2* — после центрифугирования при 25 000 *g*

После 15 сек. освещения зона протохлорофиллида уменьшается приблизительно вдвое, количество хлорофиллида увеличивается, содержание протохлорофилла остается без видимых изменений. В то же время в спектре флуоресценции листьев максимум 655 мμ за 15 сек. освещения целиком исчезает, а максимум при 690 мμ возрастает.

В течение 5 мин. освещения происходит дальнейшее понижение содержания протохлорофиллида и соответственно этому значительное возрастание количества хлорофиллида. В спектре флуоресценции листьев за это

время освещения обнаруживается интенсивный максимумом при 690 мμ.

Более длительное освещение приводит к дальнейшему уменьшению и почти полному исчезновению на хроматограммах полос, принадлежащих протохлорофиллиду, протохлорофиллу, хлорофиллиду, и к увеличению количества хлорофилла, что соответствует сдвигу максимума флуоресценции в коротковолновую сторону — до 684 мμ (после 1 часа освещения листьев) и 682—680 мμ (после 4 час. освещения листьев).

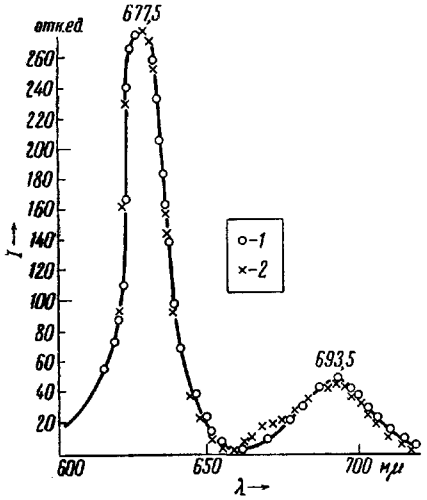


Рис. 4. Спектры флуоресценции ацетоновых растворов протохлорофиллида (*1*) и протохлорофилла (*2*), хроматографически выделенных из этиолированных листьев

Эти результаты соответствуют данным Вольфа и Прейс ([12]), Годнева, Шлыка с сотр. ([13], [14]), Виргина ([15]) о том, что быстропревращающаяся форма протохлорофилла и первично образованный хлорофилл являются бесфитольными соединениями.

В дальнейшем требуются уточненные количественные измерения кинетики флуоресценции листьев и зон на хроматограммах в процессе зеленения.

Результаты исследования можно резюмировать следующим образом. Активная форма протохлорофилла («форма 655») и свежеобразованного хлорофилла («форма 690») в гомогенатах этиолированных и освещенных листьев связаны с более тяжелыми клеточными структурами, чем малоактивная форма протохлорофилла («форма 635»). Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения, что «активная форма» с максимумом флуоресценции 655 мμ принадлежит белково-липоидному соединению протохлорофиллида, тогда как малоактивная форма с максимумом при 635 мμ, вероятно, представляет собой смесь протохлорофилла и протохлорофиллида. Первичная форма хлорофилла с максимумом при 690 мμ, по-видимому, принадлежит неэтерифицированному продукту, тогда как «форма 680» является «обычным» хлорофиллом.

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

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
20 VIII 1960

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952); **91**, 343 (1953). [2] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **104**, 440 (1955). [3] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, **19**, 37 (1954). [4] А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина, Физиол. раст., **4**, 124 (1957). [5] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, **117**, 106 (1957). [6] K. Shibata, J. Biochem., **44**, 147 (1957). [7] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, Биохимия, **25**, 168 (1960). [8] J. H. C. Smith, Carn. Inst. Wash. Y. B., **57**, 287 (1957—1958). [9] Т. Н. Годнев, Н. К. Акулович, Спектральные особенности протохлорофилла различных растений, Сборн. физиол. и биохим. раст., 1958. [10] Н. К. Акулович, Докл. АН БССР, **3**, № 4 (1959). [11] J. E. Loeffler, Carn. Inst. Wash. Y. B., **54**, 159 (1954—1955). [12] J. B. Wolff, L. Price, Arch. Biochem. and Biophys., **72**, 293 (1957). [13] Т. Н. Годнев, А. А. Шлык, Я. П. Лях нович, Физиол. раст., **4**, в. 5, 393 (1957). [14] Т. Н. Годнев, Н. К. Акулович, Э. Ф. Шабельская, Бюлл. Инст. биол. АН БССР за 1957 г., в. 3, 89 (1958). [15] H. I. Virgin, Physiol. Plant, **13**, 155 (1960).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ПРИСУТСТВИИ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНА

А. А. КРАСНОВСКИЙ и *Н. Н. ДРОЗДОВА*

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

Работы нашей лаборатории показали, что фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в реакциях переноса электрона (водорода) от молекул-доноров к молекулам-акцепторам связано со способностью хлорофилла к обратимому фотохимическому восстановлению [1; 2]. В системе хлорофилл — донор водорода (в качестве которого мы часто применяем аскорбиновую кислоту) при освещении образуются фотовосстановленные формы, в темноте реакция идет обратно. В тройной системе хлорофилл — донор электрона — акцептор электрона не удается наблюдать накопление фотовосстановленных форм хлорофилла на начальных стадиях реакции [3; 4].

Это явление мы объясняли быстрой обратимой реакцией фотовосстановленного хлорофилла с молекулами-акцепторами электрона, ведущей к регенерации хлорофилла. Таким образом, торможение реакции фотовосстановления хлорофилла в присутствии молекул-акцепторов электрона свидетельствовало об их взаимодействии с восстановленными формами хлорофилла. В качестве молекул-акцепторов изучалось действие сафранина, рибофлавина, метилового красного и фосфопиридиннуклеотидов, причем в особых опытах удалось наблюдать взаимодействие этих соединений с фотовосстановленными формами хлорофилла [5] и бактериохлорофилла [6], с первичной фотовосстановленной формой феофитина [7] и влияние этих соединений на фотопотенциал инертного электрона и фотопроводимость реагирующей системы [8]. В ряде случаев удалось наблюдать индукционный период, определяющийся сенсибилизированным фотовосстановлением молекул-акцепторов, после которого происходило восстановление пигмента [9].

Обнаруженное нами резкое торможение фотовосстановления хлорофилла каротином [10; 11], по-видимому, не укладывалось в описанную схему, поскольку нам не удалось обнаружить продуктов фотосенсибилизированного восстановления каротина. Эти опыты привели нас к систематическому изучению влияния полиенов и циклических соединений с различной структурой на фотовосстановление хлорофилла. Мы изучали влияние соединений следующих классов: каротиноидов и их аналогов с различной длиной сопряженных двойных связей; молекул полиметиновых красителей, в которых полиеновая цепь сочетается с гетероциклом; полициклических углеводородов (нафталин, антрацен, тетрацен); гетероциклических соединений, содержащих в цепи сопряжения атомы азота и кислорода (эти соединения лежат в основе структуры обратимо восстанавливающихся красителей).

Ряд исследованных нами соединений представляет собой кофакторы переноса электрона (водорода) при темновых стадиях фотосинтеза и при фотосинтетическом фосфорилировании. Следовало проанализировать возможность взаимодействия этих соединений с возбужденными состояниями хлорофилла, учитывая опыты Ливингстона и Фужимори [12] о действии каротина на длительность жизни триплетного состояния хлорофилла.

МЕТОДИКА

Опыты по выяснению действия исследуемых соединений на кинетику фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой проводили в трубках Тунберга в вакууме с пиридиновыми растворами, содержащими 5% воды (4 *мл*). Концентрация хлорофилла обычно была $1 \cdot 10^{-5}$ *M*, аскорбиновой кислоты $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *M*; концентрацию исследуемых веществ меняли от $1 \cdot 10^{-1}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ *M*. Трубку освещали (в фокусе конденсора) кинолампой в 300 *в* через светофильтры КС-13 или СЗС-9 в специальном устройстве, соединенном с ультратермостатом, позволяющим проводить опыты при постоянной температуре (20°). Часть опытов проводили при температуре —50°. Это достигалось погружением трубки Тунберга в охладительную смесь (спирт + сухой лед), находящуюся в прозрачном сосуде Дюара. Интенсивность освещения красным светом (600—700 *ммк*) — от 10^4 до 10^6 *эрг/см²/сек;* освещение синим светом (светофильтр СЗС-9) — около 10^5 *эрг/см²/сек*. Интенсивность освещения изменяли введением нейтрального светофильтра НС-3. Следует отметить, что при наименьшей интенсивности света лучше проявляется тормозящее действие изучаемых соединений. Производили сравнительное измерение кинетики фотовосстановления хлорофилла при наличии и в отсутствие исследуемых веществ на спектрофотометре СФ-4 в специальной колодке, допускающей измерения непосредственно в трубках Тунберга.

В работе использовали хлорофиллы *a*+*b* и *a*, выделенные из крапивы и очищенные хроматографическим методом, принятым в нашей лаборатории, кристаллический каротин краснодарского витаминного завода (перекристаллизованный из бензола) эфирные растворы лютеина и виолаксантина, кристаллический тетрацен, кристаллические полиметиновые красители * и кристаллические х. ч. гетероциклические соединения (акридин, фаназин, менадион, рибофлавин, антрахион) и др.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Влияние каротиноидов и «осколков» их молекулы с различной длиной сопряженных двойных связей. Представляло интерес провести сравнительное исследование действия каротиноидов и некоторых полиенов, имеющих разное число сопряженных двойных связей. Для этого использовали следующие вещества (в скобках номера формул в таблице, группа 1): каротин — 11 сопряженных двойных связей (*I*), лютеин — 10 (*II*), виолаксантин — 9 (*III*), витамин А-ацетат — 5 (*IV*), метиловый эфир 1,1,3-триметил-циклогексанил 3-метил-1,3,5-гептатриен кислота — 4 (*V*), аллоцимен — 3 (*VI*), β-ионон — 2 (*VII*) и кротоновая кислота — 1 (*VIII*).

В трубку Тунберга вносили определенное количество исследуемого вещества в виде раствора в эфире или ацетоне и после испарения растворителя в вакууме добавляли хлорофилл (в виде 0,1 *мл* пиридинового раствора), аскорбиновую кислоту, пиридин и воду в количествах, указанных выше. После откачивания воздуха в течение 3 мин. раствор в трубке освещали при 20° через светофильтр КС-13 и НС-3 и следили за изменением коэффициента погашения (*K*) хлорофилла при 670 *ммк* во времени. На рис. 1 приведены результаты опытов, в которых измерено действие перечисленных выше соединений на кинетику фотовосстановления хлорофилла. Из рассмотрения кривых видно, что уменьшение числа сопряженных двойных связей в молекуле вещества ведет к ослаблению эффекта действия. Так, каротин, лютеин и виолаксантин, имеющие соответственно 11, 10 и 9 сопряженных двойных связей, существенно тормозят фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой в концентрации 10^{-5} *M* (рис. 1, *A*); соединения с более короткой полиеновой цепочкой (витамин А-ацетат и метиловый эфир триметил циклогексанил метилгептатриен кислоты) обладают меньшим тормозящим эффектом, их действие при тех же условиях появляется только в концентрации 10^{-3} *M*, а аллоцимен, имеющий три сопряженные двойные

* Приносим глубокую благодарность за предоставление нам препаратов И. И. Левкоеву (Всесоюзный научно-исследовательский кинофотоинститут — полиметиновые красители), В. К. Матвееву (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР — тетрацен), Д. И. Сапожникову (Ботанический институт им. В. Л. Комарова АН СССР — растворы лютеина и виолаксантина).

связи в молекуле, не оказывает заметного действия даже в концентрации 10^{-1} *М*.

Некоторый тормозящий эффект в опыте с β-иононом, имеющим две сопряженные двойные связи, по-видимому, объясняется наличием в молекуле альдегидной кето группы (рис. 1, *Б*). Таким образом, чем больше число двойных связей в молекуле вещества, тем сильнее его тормозящее действие на фотовосстановление. Аналогичная зависимость защит-

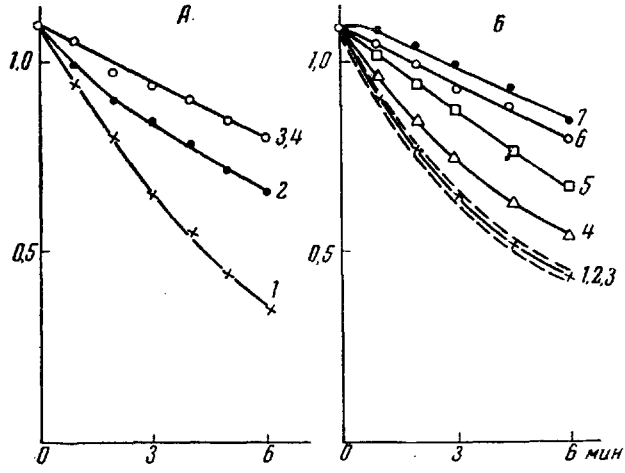


Рис. 1. Влияние каротиноидов и некоторых полиенов на кинетику фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой

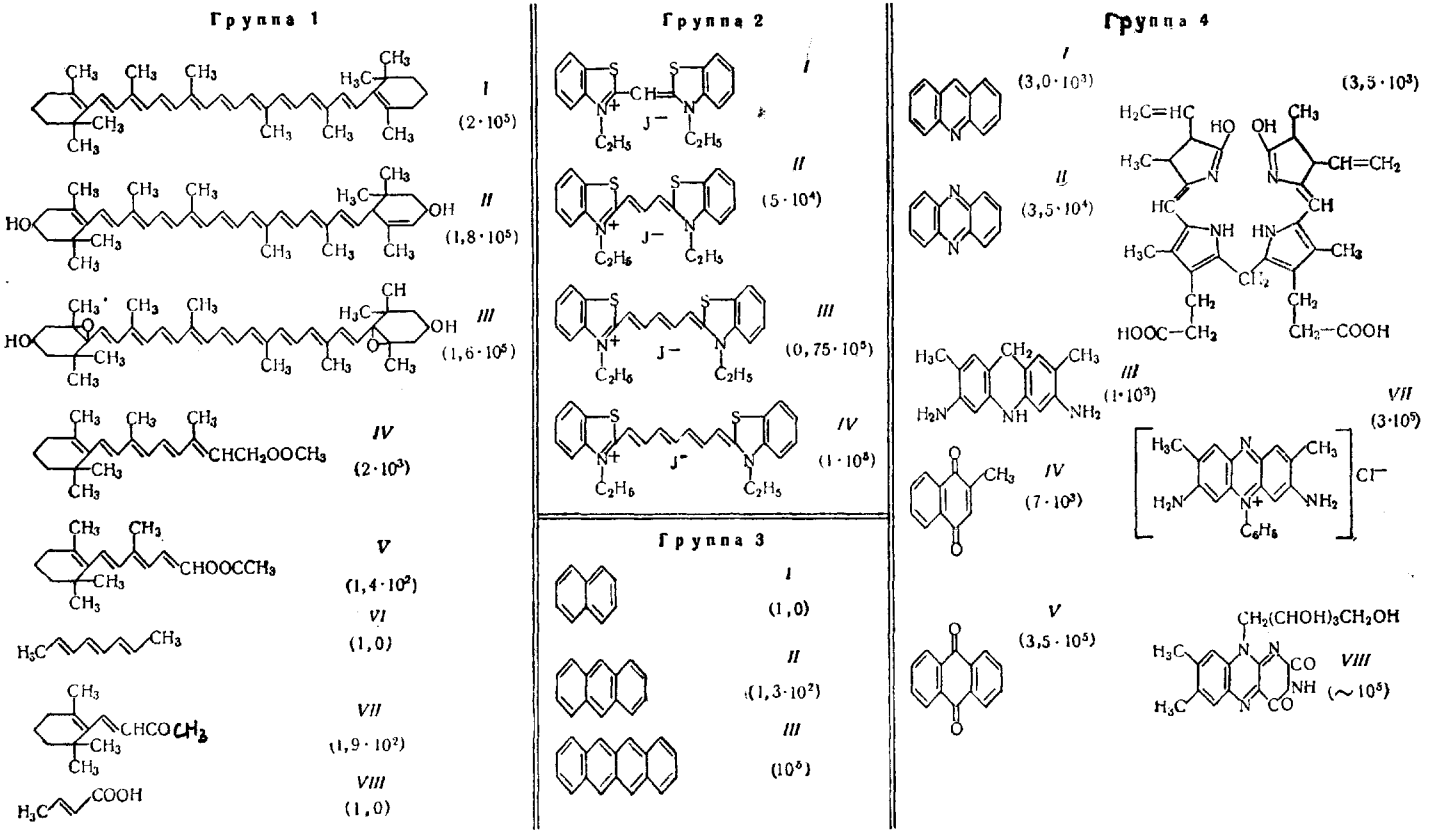
Падение оптической плотности (*К*) в максимуме поглощения хлорофилла (670 *ммк*) по мере его восстановления при +20°. Концентрации: хлорофилл — 10^{-5} *М*, аскорбиновая кислота — $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М*,каротин, лютеин, виолаксантин — 10^{-5} *М*, витамин А-ацетат, соединение *V* — 10^{-3} *М*, β-ионон, аллоцимен, кротоновая кислота — 10^{-1} *М*. *А*: *1* — без каротиноидов; *2* — в присутствии виолаксантина; *3* — лютеина; *4* — каротина. *Б*: *1* — без изучаемых веществ; *2* — в присутствии кротоновой кислоты; *3* — аллоцимена; *4* — соединения *V*; *5* — β-ионона; *6* — каротина; *7* — витамин А-ацетата

ного действия каротиноидов с различным числом сопряженных двойных связей на фотоокисление хлорофилла наблюдалась в недавней работе Клесса и Накаяма [13]. *

Полиметиновые красители. Эти соединения характеризуются наличием в молекуле сочетания гетероцикла с полиеновой цепью. Мы сравнительно изучили производные диэтилтиоцианинйодида, отличающиеся друг от друга длиной полиеновой цепи (таблица, группа 2). В опыт брали определенные количества спиртовых растворов этих веществ, спирт отгоняли в вакууме и после этого вносили в трубку хлорофилл (в виде пиридинового раствора), аскорбиновую кислоту, пиридин и воду. Опытные смеси с соединениями *I* и *II* освещали через светофильтр КС-13 при 20° и судили о восстановлении хлорофилла по падению *К* при 670 *ммк*. В опытах с соединениями *III* и *IV*, максимумы поглощения которых в пиридине соответственно 660 *ммк* и 760 *ммк*, освещение производили через светофильтр СЗС-9 и следили за изменением *К* хлорофилла при 440 *ммк*. На рис. 2 представлены результаты этих опытов. Из

* В последней работе Клесса, которая стала известна нам после окончания настоящего исследования, подтверждены наши опыты об ингибирующем действии каротина на фотовосстановление хлорофилла и приводится материал об активности соединений с более короткой полиеновой цепью. Описанные нами результаты о действии «осколков» молекулы каротина полностью согласуются с опытами Клесса [22].

Структура различных соединений, исследованных в качестве акцепторов электрона



Примечание. Эффективность тормозящего действия исследованных соединений (цифры в скобках) охарактеризована условным отношением $\frac{K}{K_1C}$, где K — скорость фотовосстановления в контрольном опыте, выраженная отношением $\frac{\Delta D}{\Delta t}$ на прямолинейном участке кривой (обычно первые 3—6 мин.); K_1 — скорость фотовосстановления в присутствии исследуемых веществ; C — концентрация (M) исследуемого вещества (ингибитора). Чем ьше абсолютная величина $\frac{K}{K_1C}$, тем больше эффекти сть тормозящего действия. Единица — от-

рассмотрения хода экспериментальных кривых рис. 2, *А* видно, что соединение *II* тормозит фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой в концентрации 10^{-4} *М*, тогда как соединение *I* в той же концентрации несколько ускоряет этот процесс. Экспериментальные кривые, приведенные на рис. 2, *Б*, показывают, что соединения *III* и *IV*, имеющие более длинную полиеновую цепочку, обладают большим тормозящим эффектом. Их действие существенно проявляется уже в концентрации $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*. Следовательно, и в случае полиметиновых красителей эф-

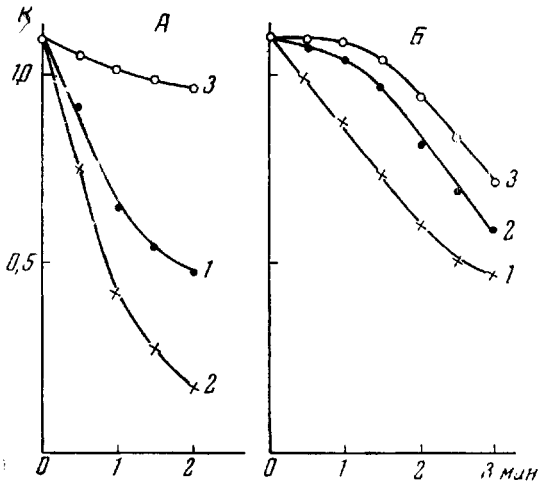


Рис.

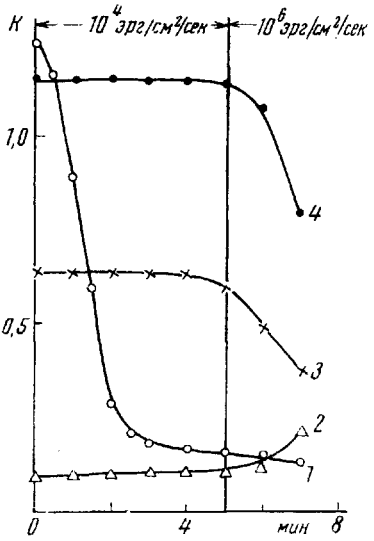


Рис. 3

Рис. 2. Влияние полиметиновых красителей на фотовосстановление хлорофилла

Показано изменение *K* в максимуме поглощения хлорофилла (670 *ммк*) по мере фотовосстановления. Концентрации: хлорофилл 10^{-5} *М*, соединения *I* и *II* — 10^{-4} *М*, соединения *III* и *IV* — $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*. *А*: *1* — без красителя; *2* — в присутствии соединения *I*; *3* — соединения *II*. *Б*: *1* — без красителя; *2* — в присутствии соединения *III*; *3* — соединения *IV*

Рис. 3. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление диэтилтиотрикарбоцианинйодида

Показано изменение *K* в максимумах поглощения по мере освещения: *1* — соединения *IV* при 760 *ммк* (таблица, группа 3); *2* — «красной» восстановленной формы хлорофилла (525 *ммк*); *3* — хлорофилла (440 *ммк*); *4* — контрольный опыт (соединение *IV*+аскорбиновая кислота). Концентрации: хлорофилл — $0{,}3 \cdot 10^{-5}$ *М*, соединение *IV* — $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*, аскорбиновая кислота — $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М*

фект тормозящего действия увеличивается с увеличением числа сопряженных двойных связей в молекуле красителя.

В другой серии опытов, поставленных для выяснения механизма действия этих соединений на фотовосстановление хлорофилла, мы обнаружили сенсибилизированное хлорофиллом восстановление соединений *II*, *III* и *IV*. В этих опытах производили освещение с меньшей интенсивностью, чтобы лучше выявить действие исследуемых веществ. О скорости реакции судили по изменению коэффициентов погашения хлорофилла, полиметиновых красителей и восстановленной «красной» формы хлорофилла в их максимумах поглощения. В опытах с соединениями *II* и *IV* освещали через красный светофильтр КС-13, а в опытах с соединением *III* — через синий СЗС-9. Во всех опытах наблюдалось сенсибилизированное хлорофиллом фотовосстановление перечисленных соединений, о чем свидетельствовало резкое падение величины *K* в максимумах исследуемых веществ и наличие индукционного периода в кривых, отражающих процесс фотовосстановления хлорофилла. Накопление фотовосстановленной «красной» формы хлорофилла (увеличение *K* при 525 *ммк*) происходило только после того, как произошло полное вос-

становление молекул красителя, являющихся в данном случае акцепторами электрона. Это ясно видно из экспериментальных кривых опыта с соединением *IV*, приведенных на рис. 3.

Полициклические углеводороды. Из числа соединений, относящихся к этой группе веществ, мы исследовали нафталин (*I*), антрацен (*II*) и тетрацен (*III*) (таблица, группа 3). Результаты одного из опытов даны на рис. 4, где ясно видно, что тетрацен существенно замедляет фотовосстановление хлорофилла в концентрации 10^{-5} *М*; антрацен обладает гораздо меньшим тормозящим эффектом, его действие при тех же условиях проявляется только при концентрации 10^{-2} *М*. В присутствии нафталина в концентрации 10^{-2} *М* фотовосстановление хлорофилла протекает с такой же скоростью, что и в контрольном опыте без акцептора. Таким образом, и в этом случае наличие большого числа сопряженных двойных связей в молекуле углеводорода ведет к увеличению тормозящего эффекта.

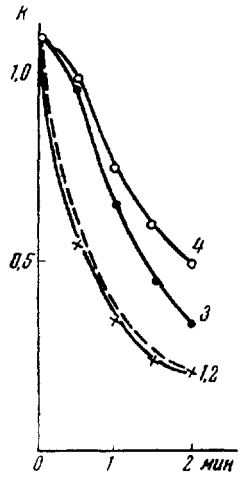


Рис. 4. Влияние полициклических углеводородов на фотовосстановление хлорофилла

Показано изменение *K* в максимуме поглощения хлолофилла по мере его фотовосстановления. Концентрации: хлорофилл — 10^{-5} *М*, нафталин, антрацен — 10^{-2} *М*, нафтацен — 10^{-5} *М*. Светофильтр КС-13. *1* — без углеводорода; 2 — в присутствии нафталина; 3 — антрацена; 4 — нафтацена

В другой серии опытов мы пытались выяснить, тормозит ли тетрацен фотовосстановление хлорофилла таким же путем, что и полиметиновые красители, т. е. не происходит ли сенсибилизированное восстановление тетрацена. Для этого поставили опыты с хлорофиллом *а* (имеет минимальное поглощение в максимуме поглощения тетрацена при 475 *ммк*) при 20° и —50° (чтобы затормозить обратную реакцию). О скорости реакции судили по изменению коэффициента погашения (*K*) не только в максимумах поглощения хлорофилла и «красной» формы хлорофилла, а также в одном из максимумов тетрацена, в пиридине, при 475 *ммк*. Ни в том, ни в другом случае не удалось обнаружить каких-либо изменений при 475 *ммк*, т. е. в этих опытах не произошло сенсибилизированного хлорофиллом фотовосстановления тетрацена. Опыты, поставленные для выяснения влияния тетрацена на окисление хлорофилла, показали, что при освещении опытной смеси красным светом происходит сенсибилизированное хлорофиллом окисление тетрацена. К тому же выводу мы пришли, наблюдая уменьшение флуоресценции тетрацена после освещения его растворов в присутствии хлорофилла. Полученные нами результаты о действии ароматических углеводородов на фотовосстановление соответствуют данным Шварца [14], исследовавшего относительную реакционность ароматиче-

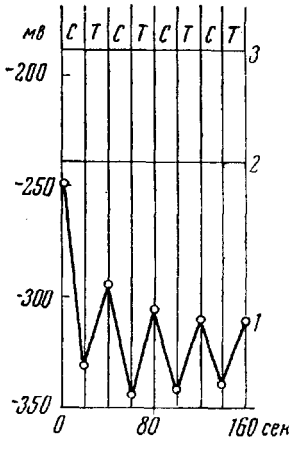


Рис. 5. Влияние каротина и нафтацена на изменение фотопотенциала системы хлорофилл — аскорбиновая кислота

Концентрации: хлорофилл — 10^{-4} *М*, каротин и нафтацен — 10^{-3} *М*, аскорбиновая кислота — $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М*. Светофильтр КС-13. *С* — свет; *Т* — темнота. *1* — хлорофилл; *2* — хлорофилл + каротин; *3* — хлорофилл + нафтацен

ских соединений по отношению к метильному радикалу. В опытах Шварца было показано чрезвычайно активное действие тетрацена, гораздо меньшая активность антрацена и совсем малая — нафталина, что соответствует действию этих соединений на фотовосстановление хлорофилла. Это сопоставление указывает на то, что тетрацен может играть роль соединения, реагирующего с ион-радикалом фотовосстановленного хлорофилла.

Влияние каротина и тетрацена на фотопотенциал системы хлорофилл — аскорбиновая кислота. Процесс фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой можно проследить также путем измерения потенциала инертного металлического электрода, опущенного в реаги-

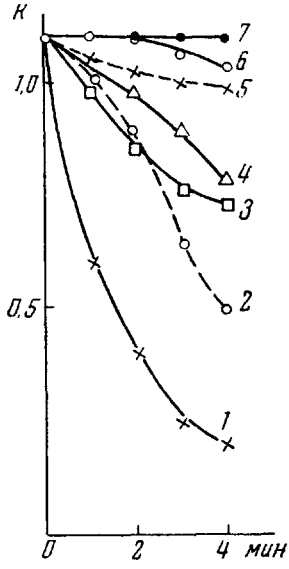


Рис. 6

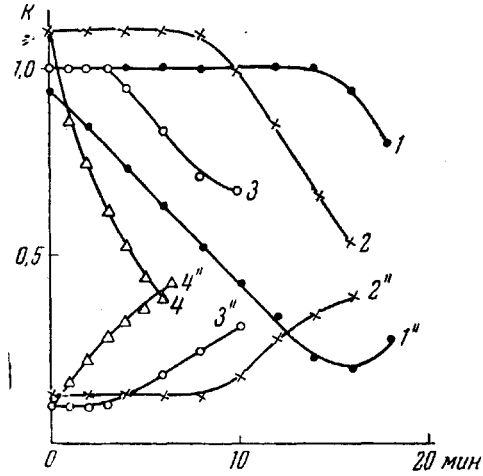


Рис. 7

Рис. 6. Влияние гетероциклических соединений на фотовосстановление хлорофилла

Показано изменение K в максимуме поглощения хлорофилла по мере восстановления. Концентрации: хлорофилл — 10^{-5} M, аскорбиновая кислота — $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ M, антрахинон — 10^{-4} M, акридин, акридиновый желтый, билирубин, менадион, феназин — 10^{-3} M. *1* — без гетероциклических соединений; *2* — в присутствии билирубина; *3* — акридина; *4* — менадиона; *5* — акридинового желтого; *6* — феназина; *7* — антрахинона

Рис. 7. Влияние метилового красного, менадиона и феназина на фотовосстановление хлорофилла

Изменение K в максимуме поглощения хлорофилла (670 *ммк*) — *1*, *2*, *3*, *4* — и в максимуме поглощения восстановленной «красной» формы хлорофилла (525 *ммк*) — *1''*, *2''* *3''*, *4''*. *1* и *1''* — в присутствии метилового красного; *2* и *2''* — феназина; *3* и *3''* — менадиона; *4* и *4''* — без исследуемых веществ. Концентрации: хлорофилл — 10^{-5} M, метиловый красный — 10^{-4} M, феназин и менадион — $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M

рующий раствор. Мы поставили опыты по выяснению влияния каротина и тетрацена на фотопотенциал системы хлорофилл — аскорбиновая кислота с использованием методики, принятой в нашей лаборатории [7].

Опыты проводили с пиридиновыми растворами пигментов. После выкачивания воздуха из сосуда с платиновым электродом измеряли начальную разность потенциалов, а затем следили за изменением потенциала при коротких промежутках освещения и затемнения (по 20 сек.). Опытную смесь освещали красным светом (лампа 300 *вт*, светофильтр КС-13). Результаты этих опытов (рис. 5) показывают, что каротин и тетрацен полностью тормозят появление фотопотенциала, что согласуется с их действием на фотовосстановление.

Гетероциклические соединения. Из этой группы соединений нами были изучены (таблица, группа 4) акридин (*I*), феназин (*II*), акриди-

новый желтый (*III*), менадион (*IV*), антрахинон (*V*), билирубин (*VI*), сафранин (*VII*) и рибофлавин (*VIII*). Все перечисленные соединения характеризуются наличием в молекуле сопряженных двойных связей и атомов азота и кислорода, находящихся в цепи сопряжения. Опыты с этими веществами ставили по той же схеме, что и все предыдущие. Нам удалось показать, что все перечисленные соединения в той или иной степени тормозят фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой. На рис. 6 приведены результаты некоторых опытов, из которых следует, что соединения, имеющие в своей молекуле большее число гетероатомов, обладают более сильным тормозящим действием, например, феназин сильнее тормозит фотовосстановление хлорофилла, чем акридин (рис. 6, кривые *6* и *3*).

Выясняя механизм действия этой группы соединений на фотовосстановление хлорофилла, мы показали, что наличие гетероатома (азота или кислорода) в молекуле обусловливает способность этих соединений претерпевать сенсибилизированное фотовосстановление. На рис. 7 приведены опыты с феназином, менадионом и метиловым красным, где ясно виден эффект тормозящего действия перечисленных соединений, объясняющийся их фотосенсибилизированным восстановлением (рис. 7, кривые *1*, *2* и *3*), что проявляется в форме индукционного периода при измерении K в максимуме поглощения хлорофилла по мере освещения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальный материал, приведенный выше, свидетельствует о том, что соединения, содержащие длинные цепочки сопряженных двойных связей, линейные или сопряженные по кругу, тормозят реакцию фотовосстановления хлорофилла; при этом удается наблюдать сенсибилизированное восстановление молекул, содержащих в цепи сопряжения гетероатомы (азот или кислород).

Рассмотрим возможный механизм действия этих соединений на отдельные стадии реакции фотовосстановления хлорофилла.

Первой стадией этой реакции, так же как и других фотореакций хлорофилла, является возбуждение молекулы хлорофилла (X) с образованием синглетных возбужденных состояний длительностью жизни $\sim 10^{-8}$ сек.: $X+h\nu \rightarrow X^*$. О взаимодействии посторонних молекул с возбужденными молекулами хлорофилла можно судить, наблюдая эффект тушения флуоресценции. Для того, чтобы выяснить, взаимодействуют ли каротин и тетрацен с возбужденным «синглетным» состоянием хлорофилла, мы измерили действие этих веществ и хинона на флуоресценцию хлорофилла.

Последнее соединение брали для контроля как вещество, явно тушащее флуоресценцию хлорофилла [15]. Интенсивность флуоресценции измеряли на ступенчатом фотометре при возбуждении красным светом [15]. Опыт проводили в трубках Тунберга в вакууме. В трубку вводили спиртовой раствор хлорофилла $a+b$ в $0,2 \cdot 10^{-5}$ M концентрации, в боковой отвод трубки брали определенные количества растворов каротина, тетрацена и хинона с тем расчетом, чтобы конечная концентрация их равнялась $1 \cdot 10^{-4}$ M. После эвакуации в течение 3 мин. измеряли интенсивность флуоресценции хлорофилла в контрольном опыте, затем производили измерение интенсивности в присутствии каротина, тетрацена и хинона. Оказалось, что каротин и тетрацен совершенно не тушат флуоресценции хлорофилла, тогда как хинон обладает сильным тушащим действием. Таким образом, эти соединения не взаимодействуют с синглетными возбужденными молекулами хлорофилла.

Следующей вероятной стадией реакции является образование метастабильных молекул хлорофилла в триплетном состоянии (символика Теренина [16]): $X^* \rightarrow X^v$. Ливингстон и Фужимори [12] нашли, что в при-

сутствии каротина и окислителей, таких, как кислород, хинон, сокращается τ — длительность жизни «триплетных» состояний хлорофилла, изученных методом импульсной спектроскопии.

В опытах этих авторов аскорбиновая кислота не влияла на величину τ хлорофилла (хотя это соединение энергично фотореагирует с хлорофиллом). Рассматривая эту работу, мы указали на то, что при мощных световых импульсах вполне вероятно образование фотовосстановленных форм хлорофилла за счет взаимодействия с растворителем или примесями; понятно, что эти восстановленные формы охотно реагируют с окислителями и не реагируют с аскорбиновой кислотой. В последующей работе Ливингстон [17] показал, что, проводя опыты в среде водного пиридина, все же удается наблюдать некоторое «тушащее» действие аскорбиновой кислоты, эффективность которого, однако, была на три порядка ниже, чем действия хинона и каротина. Ливингстон также приходит к выводу о возможном образовании фотовосстановленных форм в условиях опытов импульсной спектроскопии.

Теренин и Ермолаев [18], открывшие явление передачи энергии возбуждения между органическими молекулами на триплетном уровне, показали, что условием эффективного взаимодействия между возбужденной молекулой в триплетном состоянии и воспринимающей энергию молекулой, является более низкое расположение триплетного уровня у молекул-акцепторов.

Триплетный уровень хлорофилла, судя по наблюдениям фосфоресценции [19], расположен, по-видимому, около 1,5 электрон-вольт (*эв*) максимум ~850 *ммк*). Если каротин и тетрацен взаимодействовали бы с триплетным хлорофиллом по механизму Теренина — Ермолаева, то следовало бы ожидать наличия у этих молекул более низко расположенных триплетных уровней. Для каротина не удается наблюдать ни флуоресценции, ни фосфоресценции в растворах при комнатной и низкой температурах. Платт [20] высказал предположение, что каротин может образовывать с молекулами доноров и акцепторов тримолекулярный комплекс, что, по его мнению, может вести к перемещению синглетного или триплетного состояния каротина на уровень, более низко расположенный, чем у хлорофилла. Однако отсутствуют экспериментальные подтверждения этого предположения. Что же касается тетрацена, то измерения его фосфоресценции, в работах Муди и Рида [21], указывают на расположение низшего триплетного уровня около 2 *эв*, что препятствует восприятию энергии от триплетного хлорофилла. Триплетные уровни других изученных соединений — акридина, феназина, рибофлавина (обладающего красной фосфоресценцией) и т. п.,— по-видимому, лежат выше уровня хлорофилла.

Таким образом, передача энергии на триплетном уровне с промежуточным образованием комплекса $X \cdot A$ по схеме:

$$X^{v} + A \rightarrow X \cdot A \rightarrow X + A^{v}$$

маловероятна для некоторых из исследованных нами систем. Вышеизложенное, однако, не исключает возможности передачи энергии на триплетном уровне по какому-либо другому механизму.

Элементарный процесс фотовосстановления — это восприятие возбужденной молекулой хлорофилла электрона молекулы донора (аскорбиновой кислоты) с образованием пары ион-радикалов:

$$X + AH \leftrightarrows X \cdot AH \leftrightarrows \cdot X^{-} + \cdot AH^{+}.$$

Перенос электрона может идти в комплексе $X \cdot AH$ с последующим его распадом и образованием пары ион-радикалов.

Так как мы наблюдали в ряде случаев сенсибилизированное восстановление акцептора, то вероятен элементарный процесс восприятия непарного электрона фотовосстановленного хлорофилла молекулой-акцептором; мы предполагали в нашей первой работе [9], что каротин действует по тому же механизму. Считаем также возможным выдвинуть предположение о взаимодействии молекулы-акцептора с комплексом $X \cdot AH$, в котором произошел акт фотохимического переноса электрона.

Евстигнеев и Гаврилова [8] показали в нашей лаборатории, что освещение системы хлорофилл — фенилгидразин ведет к появлению фотопроводимости за счет образования ионов. Молекулы — акцепторы, в том числе каротин, снимают эффект, вероятно, за

счет взаимодействия с ион-радикалом хлорофилла (конечно, тот же результат наблюдался бы и при взаимодействии с возбужденным хлорофиллом, см. выше). В наших опытах каротин и тетрацен полностью снимают появление фотопотенциала (в системе хлорофилл — аскорбиновая кислота) обязанного появлению отрицательно заряженных «электродноактивных» продуктов фотовосстановления хлорофилла. Однако в случае полиенов и циклических углеводородов мы не могли наблюдать образования устойчивых продуктов сенсибилизированного фотовосстановления, тогда как гетероциклы в этих системах претерпевали сенсибилизированное восстановление.

Следующая стадия фотовосстановления — присоединение протонов и диспутация фотопродуктов. Вряд ли исследуемые соединения в $10^{-5}M$ концентрации в среде, обладающей большим сродством к протону (пиридин), могут влиять на эти стадии реакции.

Таким образом, наиболее вероятно взаимодействие исследованных соединений с фотовосстановленными формами пигментов, ведущее к обратимой регенерации хлорофилла. Этим определяется тормозящее действие изученных соединений на реакцию фотовосстановления. Чтобы оценить вероятность восприятия электрона анион-радикала хлорофилла молекулой акцептора, следовало бы знать величину сродства к электрону этих соединений. Нам неизвестны эти данные, что же касается возможности использования значений окислительно-восстановительного потенциала, то, к сожалению, ни каротин, ни тетрацен, ни полиметиновые и азокрасители не дают обратимых редокс-систем.

Стационарная концентрация хлорофилла в наших опытах в процессе освещения определяется скоростью фотореакции и скоростью обратной реакции взаимодействия фотовосстановленной формы хлорофилла с акцептором. Таким образом, увеличение скорости фотореакции при большой интенсивности света ведет к уменьшению стационарной концентрации хлорофилла; эффект добавок наиболее ясно выражен при малой интенсивности света, т. е. при более медленном ходе прямой фотореакции.

В предыдущих работах нашей лаборатории [3; 1] было установлено, что соединения, которые претерпевают сенсибилизированное восстановление, тормозят фотовосстановление и могут (в темноте) реагировать со вторичной и первичной фотовосстановленными формами пигментов. К числу этих соединений, исследованных ранее, принадлежат азокрасители (чаще всего метиловый красный), рибофлавин, сафранин и пиридиннуклеотиды. Азокрасители дают при этом продукты необратимого (по-видимому, деструктивного) восстановления, сафранин и рибофлавин — лейкосоединения, из которых при пуске воздуха регенерируют исходные соединения.

Напомним экспериментальные критерии течения сенсибилизированного восстановления. При освещении красным светом в максимуме хлорофилла тройной системы хлорофилл — аскорбиновая кислота — акцептор электрона происходят изменения (иногда обратимые) спектра поглощения молекул-акцепторов. Фотовосстановления хлорофилла не наблюдается до тех пор, пока не произойдет сенсибилизированное восстановление молекул-акцепторов, что проявляется в форме индукционного периода при измерении оптической плотности в максимуме хлорофилла от времени освещения. Это наблюдается наиболее явно при необратимом восстановлении молекул-акцепторов. В данной работе нам удалось показать фотосенсибилизированное восстановление полиметиновых красителей, феназина, акридина, антрахинона, менадиона. Отличные от этого эффекты наблюдаются в случае использования полициклических сопряженных систем — тетрацена, антрацена (торможение фотовосстановления без наблюдаемого индукционного периода как при комнатной температуре, так и при —50°). Отсутствие спектральных изменений у этих соединений при освещении указывает на то, что они не образуют достаточно стабильных продуктов фотовосстановления. Сравнение действия каротина и возможных осколков его молекулы указы-

вает на то, что наиболее сильное действие оказывают молекулы, содержащие наиболее длинные цепочки сопряженных двойных связей. То же самое наблюдается и в случае полициклических углеводородов; наиболее активны молекулы с наибольшим количеством колец. Однако эти соединения не образуют стабильных продуктов сенсибилизированного восстановления.

Указанные результаты приводят нас к следующему предположению: каротин и тетрацен обратимо воспринимают электрон фотовосстановленного хлорофилла, не будучи в состоянии долго «удержать» лишний электрон в молекуле с образованием более устойчивых валентнонасыщенных соединений, тогда как в случае циклических соединений, обладающих в цепи сопряжения гетероатомами (азота, кислорода, серы), восприятие электрона системой сопряженных связей приводит к образованию более стабильных продуктов восстановления (в конечном счете — валентнонасыщенных) путем последующего связывания протона вакантной электронной парой гетероатома и с последующей дисмутацией образуемых семихинонов.

Примером, иллюстрирующим такой механизм, служит поведение полиметиновых красителей, у которых полиеновая цепочка соединена с гетероциклом. В отличие от каротиноидов здесь наблюдается сенсибилизированное восстановление красителя, вероятно, путем локализации в его молекуле электрона, воспринимаемого от хлорофилла, за счет связывания протона атомами азота гетероцикла.

Таким образом, благодаря особенностям структуры молекулы-акцептора и наличию атомов азота, кислорода в цепи сопряжения, способных к «восприятию» протона и последующей дисмутации, происходит «захват» фотохимически мобилизованного электрона.

Итак, «надежно» действующая электронная ловушка представляет собой сочетание полиеновой цепочки с гетероциклом. Эти опыты позволяют понять особенность структуры соединений, определяющие их эффективное действие в качестве «ловушек» фотохимически мобилизованного электрона. Такими соединениями служат пиридин- и флавин-нуклеотиды, производные феназина, производные нафтахинона (витамин К), а также соединения, в которых сочетается полиеновая цепь с производными хинона (коэнзим Q). Все они не только воспринимают электрон, но могут образовывать более устойчивые и долгоживущие восстановленные соединения, которые служат «резервуаром» восстановительной силы и используются при ферментативных стадиях фотосинтеза.

С другой стороны, соединения, обладающие лишь цепью сопряженных связей, эффективно воспринимая электрон, не могут удержать его достаточно долго, что может определить их роль промежуточных переносчиков электрона; такими соединениями могут быть каротиноиды и ненасыщенные липоиды в структурах митохондрий и гранул хлоропластов.

Каротиноиды, являясь эффективными «ловушками» для свободных радикалов, могут защищать организм от повреждающего действия ион-радикалов, образующихся при фотоокислительных процессах, при фотодинамических реакциях и, возможно, при действии ионизирующей радиации.

С другой стороны, каротиноиды, воспринимая непарный электрон, по-видимому, могут передавать его акцепторам, участвуя таким образом в процессе переноса электрона [20]. Мы хотели бы в заключение указать на то, что примененный в данной работе метод исследования тормозящего действия разных соединений на реакцию фотовосстановления хлорофилла, по-видимому, может быть использован для качественной оценки эффективности взаимодействия электроно-акцепторных веществ со свободными радикалами.

ВЫВОДЫ

Сравнительное изучение действия органических молекул с различной структурой на реакцию фотовосстановления хлорофилла привело к следующим выводам:

Соединения, содержащие сопряженные двойные связи в виде полиеновой цепочки (каротиноиды и их производные), а также полициклические углеводороды (тетрацен) тормозят фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой; эффективность действия исследованных соединений находится в зависимости от числа сопряженных двойных связей в молекуле вещества: чем больше число связей, тем сильнее действие. В этих случаях не удалось наблюдать образования устойчивых продуктов сенсибилизированного фотовосстановления.

Полиметиновые красители (в молекуле которых полиеновая цепочка соединена с гетероциклом) ингибируют фотовосстановление, образуя в отличие от каротиноидов продукты сенсибилизированного восстановления. Гетероциклические соединения (акридин, феназин, менадион и др.), ингибируя фотовосстановление, также дают восстановленные продукты.

Сопоставление структуры исследованных молекул-акцепторов электронов приводит к тому предположению, что ингибирующее действие этих соединений на фотовосстановление хлорофилла определяется обратимым восприятием электронов системой сопряженных двойных связей, а наличие гетероатома (азота, кислорода) в цепи сопряжения определяет образование относительно устойчивых продуктов фотосенсибилизированного восстановления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Успехи химии **29**, 376, 1960; Ж. физ. химии **30**, 968, 1958.
2. Евстигнеев В. Б., Ж. физ. химии **32**, 969, 1958.
3. Красновский А. А., Докл. АН СССР **61**, 91, 1948.
4. Красновский А. А. и Брин Г. П., Докл. АН СССР **67**, 325, 1949.
5. Красновский А. А. и Брин Г. П., Докл. АН СССР **73**, 1239, 1950.
6. Красновский А. А. и Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **135**, 1258, 1960.
7. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **96**, 1201, 1954.
8. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **92**, 381, 1953; **127**, 198, 1959.
9. Красновский А. А. и Умрихина А. В., Докл. АН СССР **122**, 1061, 1958.
10. Красновский А. А., Биофизика **4**, 3, 1959.
11. Красновский А. А., Дроздова Н. Н. и Пакшина Е. В., Биохимия **25**, 288, 1960.
12. Fujimori E., Livingston R., Nature **180**, 1936, 1957.
13. Claes H., Nakayama T. O. M. Z. Naturforsch. **14b**, 746, 1959.
14. Szwarc M., J. Polymer Sci. **16**, 367, 1955.
15. Евстигнеев В. Б. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **60**, 623, 1948.
16. Теренин А. Н., Фотохимия красителей, Изд-во АН СССР, М., 1947.
17. Livingston R. Nature **186**, 969, 1960.
18. Теренин А. Н. и Ермолаев В. Л., Докл. АН СССР **85**, 547, 1952.
19. Becker R. S., Kasha M., J. Amer. Chem. Soc. **77**, 3669, 1955.
20. Platt J. R., Science **129**, 3346, 1959.
21. Modie M., Reid C., J. Amer. Phys. **22**, 252, 1954.
22. Claes H., Biochem. and Biophys. Res. Commun. **3**, 585, 1960.

Поступила в редакцию
23.II.1961

A STUDY OF CHLOROPHYLL PHOTOREDUCTION IN THE PRESENCE OF ELECTRON ACCEPTORS

A. A. KRASNOVSKY and *N. N. DROSDOVA*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A comparative study of the effect of organic molecules with a different structure upon the photoreduction of chlorophyll led to the following conclusions.

Compounds containing conjugated double bonds in the form of a polyene chain (carotenoids and their derivatives) as well as polycyclic carbohydrates (tetracene) strongly inhibit photoreduction of chlorophyll by ascorbic acid. The efficacy of the compounds studied depends on the number of coupled double bonds in its molecule: the greater this number the stronger the effect. In these cases it proved impossible to record the formation of any stable products of sensitized photoreduction of electron accepting molecules.

Polymethene dyes (in whose molecule the polyene chain is combined with a heterocycle) inhibit photoreduction and in contrast to carotenoids form rather stable products of sensitized reduction. Heterocyclic compounds, such as acridine, phenasine, menadion etc., while inhibiting photoreduction likewise yield reduced products.

It is suggested from a comparison of structure of the molecules-electron acceptors that the inhibitory effect of these compounds on photoreduction of chlorophyll is due to a reversible uptake of electrons by the system of coupled double bonds, and that the presence of a heteroatom (nitrogen, oxygen) in the chain of conjugation favores formation of relatively stable products of photosensitized reduction.

Доклады Академии наук СССР
1962. Том 147, № 3

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РЕАКЦИИ ХИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 28 VI 1962)

Изолированные хлоропласты и гомогенаты зеленых листьев растений способны к фотохимическому выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением вводимых извне акцепторов электрона: соединений окисного железа и других окислителей (реакция Хилла). При этой реакции происходит фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление окисного железа за счет электрона (водорода) воды. Реакция Хилла включает фотохимические и энзиматические стадии и ее не удалось наблюдать в растворах хлорофилла. Для выяснения природы элементарных стадий реакции такого типа желательно изучение более простой модельной системы, в которой мы использовали вместо хлорофилла неорганические фотокатализаторы — электронные полупроводники.

Мы уже указывали на то, что в системе окись цинка—феррицианид калия и окись цинка — хинон при освещении близким ультрафиолетом (в стеклянных сосудах) наблюдалось выделение кислорода ([1]). Эта реакция, вероятно, идет с промежуточным образованием OH-радикалов: Корсуновский ([2]) показал, что при освещении водной суспензии окиси цинка в вакууме, в присутствии бензола и метилового голубого образуется фенол, что свидетельствует об образовании OH-радикалов, реагирующих с бензолом.

В данной работе изучено фотокаталитическое (фотосенсибилизирующее) действие двуокиси титана, окиси цинка и вольфрамовой кислоты на реакцию фотовосстановления водных растворов феррицианида калия и железоаммиачных квасцов, сопровождающуюся выделением кислорода.

Окись цинка и двуокись титана белого цвета обладают сильным поглощением в близком ультрафиолете (до 400 мμ); поглощение желтого WO_3 простирается далее в сине-фиолетовую область.

Даин и Качан ([3]) обнаружили выделение кислорода при освещении кислых растворов перхлората железа светом ртутно-кварцевой лампы. Эта реакция шла в области ультрафиолетового поглощения ионов окисного железа, максимальный эффект наблюдался при 240 мμ. Согласно этому мы наблюдали малое выделение кислорода в растворе $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4$ в случае ведения опыта в кварцевых сосудах. В стеклянных сосудах (в которых задерживается ультрафиолетовое излучение короче 365 мμ) нам не удалось наблюдать фотохимического выделения кислорода в растворах $K_3Fe(CN)_6$ и $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4$, тогда как введение фотокатализаторов приводило и в этих условиях к выделению кислорода.

Измерение выделяющегося кислорода производилось микроманометрическим методом на приборе Варбурга в стеклянных и кварцевых сосудах особой формы. Ряд опытов вели в кварцевых сосудах, вставленных в стеклянную чашку Петри, игравшую роль светофильтра, поглощающего короткую область ультрафиолетового излучения ртутно-кварцевой лампы. Сосуды освещались со стороны дна погруженной в водяную ванну прибора ртутно-кварцевой лампой ПРК-4 в кварцевой муфте (рис. 1). Опыты вели в атмосфере азота и воздуха. В первом случае манометрический сосуд с реакционной смесью продували азотом, очищенным от следов кислорода в колонках со щелочным раствором гидросульфита.

Использовались следующие препараты фотокатализаторов: окись цинка Merck pro anal., цинковые белила муфельные, окись цинка люминофорная;

двуокись титана Schering Kahlbaum, титановые белила (со структурой анатаза); вольфрамовая кислота Schering Kahlbaum. Препараты соединений железа реактивные х. ч. В опыт обычно брали 0,3 г фотокатализатора и до 0,5 г соли железа в 6 мл воды. Общий объем манометрического сосуда около 25 мл. Опыты с освещением вели от 30 до 90 мин. с измерением кинетики выделения кислорода.

Чтобы судить о том, что выделяющийся газ действительно кислород, опыты проводили в атмосфере азота с раствором щелочного пирогаллола в боковом отводе манометрического сосуда. В присутствии щелочного пирогаллола весь выделяющийся при освещении газ поглощался.

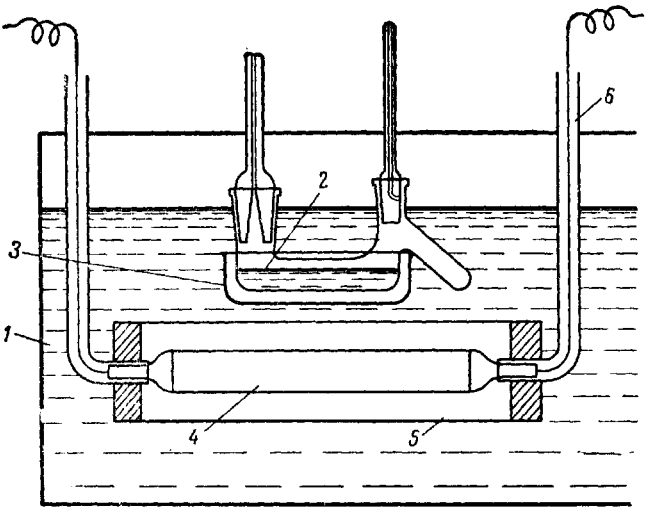


Рис. 1. Схема освещения манометрических сосудов: *1* — ванна термостата прибора Варбурга, *2* — манометрический кварцевый сосуд, *3* — стеклянный светофильтр, *4* — ртутно-кварцевая лампа ПРК-4, *5* — кварцевая муфта, *6* — стеклянные трубки для вывода контактов лампы

Освещение водных растворов железоаммиачных квасцов в кварцевых сосудах в азоте приводило к небольшому выделению кислорода, в согласии с работами Даина и Качан ([3]). В стекле этот эффект не наблюдался (см. рис. 2). В атмосфере воздуха не удалось наблюдать выделения газа ни в кварце, ни в стекле. В присутствии TiO_2 и WO_3 выделение кислорода в кварце увеличивалось, в стекле также наблюдалось близкое по величине выделение кислорода. Таким образом, в опытах в стеклянных сосудах наблюдалась сенсибилизация реакции к близкому ультрафиолету (365 и 404 мμ), который в отсутствие фотокатализатора не приводил к прямой фотореакции соли железа. Опыты в присутствии TiO_2 и WO_3 на воздухе и в азоте дали одинаковые результаты: существенно то, что в реакциях с железоаммиачными квасцами наличие кислорода в атмосфере не оказывает тормозящего действия. Окись цинка обладает основными свойствами и поэтому реагирует с железоаммиачными квасцами, теряя фотохимическую активность.

Освещение водных растворов феррицианида калия в азоте не приводило к выделению или поглощению газа, тогда как в атмосфере воздуха наблюдалось энергичное поглощение кислорода более интенсивное в кварце, чем в стекле. Механизм этого эффекта требует более детального исследования. Можно предположить следующее объяснение этого явления. Акт поглощения кванта света в комплексе $Fe^{2+}(CN)_6$ заключается в переносе электрона от адденда $(CN)^-$ к центральному атому железа ([4]); при этом происходит образование Fe^{2+} и радикала CN, который может окисляться кислородом до CNO. Молекула воды входит в комплекс $Fe^{2+}(CN)_5 \cdot H_2O$, который окисляется кислородом:

$$Fe^{2+}(CN)_5 \cdot H_2O + {}^1/_2\, O_2 \rightarrow Fe^{3+}(CN)_5 \cdot H_2O + 2OH^-.$$

В комплексе $Fe(CN)_5 \cdot H_2O$ при поглощении кванта света снова происходит перенос электрона с последующим включением второй молекулы воды в комплекс и т. д. с конечным образованием $Fe(OH)_3$ за счет подщелачивания среды при окислении Fe^{2+} и поочередного выхода CN^- из комплекса.

В присутствии фотокатализаторов в азоте наблюдалось выделение кислорода в кварце и стекле, наименьшее в присутствии TiO_2. На воздухе в присутствии TiO_2 и ZnO в кварце наблюдалось поглощение газа (меньшее, чем в отсутствие фотокатализаторов), вероятно, за счет экранирующего свет действия фотокатализаторов, тогда как в стекле в присутствии ZnO наблюдалось выделение кислорода в согласии с опубликованными нами ранее данными [1]. Тот же эффект, но более слабый, наблюдался в присутствии WO_3. С TiO_2 наблюдалось поглощение кислорода; в этих опытах, видимо, происходит наложение экранирующего и фотохимического действия.

Таблица 1

Выделение (+) и поглощение (—) кислорода в μл за 30 мин. ± (5 μл) при освещении системы фотокатализатор — водный раствор соединений окисного железа

Фотокатализатор	$Fe_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2SO_4$		$K_3Fe(CN)_6$	
	кварц	стекло	кварц	стекло
	В азоте			
—	+20	0	0	0
ZnO	—	—	+91	+90
TiO_2	+50	+37	+32	+12
WO_3	+100	+100	+95	+70
	На воздухе			
—	0	0	—645	—250
ZnO	—	—	—70	+89
TiO_2	+53	+27	—82	—165
WO_3	+100	+84	+6	+27

Примечание. Данные получены с реактивными образцами фотокатализаторов, титановые и цинковые белила были менее активными. Фотокатализаторы брались в количестве 0,3 г, $K_3Fe(CN)_6$ 0,015 г, $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4$ 0,5 г

Изученная реакция, так же как и реакция Хилла, должна следовать балансовому уравнению:

$$2Fe^{3+} + H_2O \rightarrow 2Fe^{2+} + 2H^+ + {}^1/_2\,O_2.$$

Чтобы проверить справедливость этого соотношения ставились более длительные опыты (1,5 часа) с титрованием Fe^{2+} в реакционной смеси 0,1N $KMnO_4$ до и после освещения.

В табл. 2 сопоставлен объем выделившегося кислорода и объем кислорода, подсчитанный по количеству образовавшегося Fe^{2+}, основываясь на

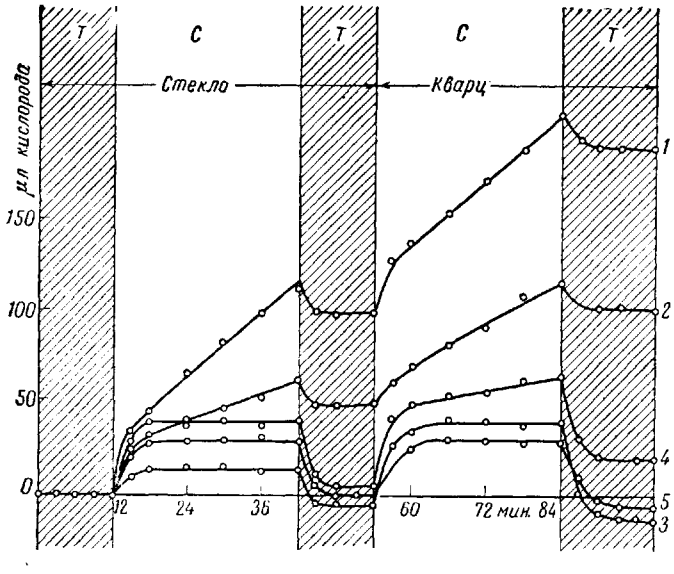


Рис. 2. Фотокаталитическое выделение кислорода в водных растворах железоаммиачных квасцов в атмосфере азота (0,3 г TiO_2 или WO_3; 0,5 г $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4$ и 6 мл воды): *1* — сенсибилизация реакции WO_3; *2* — сенсибилизация TiO_2; *3* — сенсибилизация TiO_2 в присутствии щелочного пирогаллола в боковом отводе, *4* — соль железа без фотокатализатора, *5* — фотокатализаторы без соли железа. *C* — освещение, *T* — темнота

стехиометрии реакции. Из табл. 2 видно удовлетворительное соответствие этих величин.

О механизме фотокаталитической реакции. При изучении фотохимического выделения кислорода в водных растворах перхлората церия Даин и Качан [3] показали, что введение кварцевого порошка в раствор приводило к увеличению количества фотохимически образованного кислорода. В опытах кварц играл роль катализатора, способствующего рекомбинации первично образованных гидроксильных радикалов.

Таблица 2

Выделение кислорода при фотореакции (в μл). Освещение 1,5 часа. Количество фотокатализатора 0,3 г, $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4$ 0,5 г и $K_3Fe(CN)_6$ 0,015 г. Атмосфера азота

Система	На приборе Варбурга	По образованию Fe^{2+}
$Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4 + WO_3$	353	336
$Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4 + TiO_2$	150	180
$K_3Fe(CN)_6 + ZnO$	90	100

В наших опытах введение кварцевого порошка или окиси алюминия в раствор соли железа при освещении в стекле не оказывало заметного влияния на выделение кислорода. Эти опыты указывают на то, что механизм действия ZnO, TiO_2 и WO_3 отличен от действия SiO_2 и Al_2O_3, не обладающих поглощением в близком ультрафиолете. Следует считать, что свет, поглощенный фотокатализатором, используется для осуществления реакции. Можно представить следующий гипотетический механизм реакции. На поверхности фотокатализатора адсорбируются молекулы соединения железа и молекулы воды (ионы гидроксила), и между ними происходит перенос электрона, вероятно, через зону фотопроводимости фотокатализатора — полупроводника. Образованные на поверхности гидроксильные радикалы рекомбинируют с выделением кислорода.

Элементарные процессы можно представить в виде схемы:

1. Фотовосстановление Fe^{3+} на электронодонорном центре поверхности фотокатализатора: $Fe^{3+} + e \rightarrow Fe^{2+}$.

2. Фотоокисление воды (или иона гидроксила) на электроноакцепторном участке поверхности фотокатализатора

$$H_2O - e \rightarrow H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH$$

или

$$OH^- - e \rightarrow OH.$$

3. Рекомбинация гидроксильных радикалов на поверхности фотокатализатора и выделение кислорода

$$2OH \rightarrow H_2O + {}^1/_2\,O_2.$$

Балансовый процесс: $Fe^{3+} + {}^1/_2H_2O \rightarrow Fe^{2+} + H^+ + {}^1/_4O_2$ соответствует реакции Хилла с тем отличием, что в суспензии хлоропластов реакция идет в видимой области поглощения хлорофилла, тогда как в изученных нами моделях реакция сенсибилизирована к близкой ультрафиолетовой области спектра.

В изученных гетерогенных модельных системах фотокатализатор (полупроводник) играет роль пигмента — сенсибилизатора, поглощающего свет, и катализатора, способствующего выделению кислорода из первичных продуктов фотоокисления воды и тем самым препятствующего течению обратных реакций первичных фотопродуктов.

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

Поступило
28 VI 1962

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **139**, 142 (1961). [2] Г. А. Корсуновский, Проблемы фотосинтеза, Изд. АН СССР, 1959, стр. 87; ЖФХ, **34**, 510 (1960). [3] Б. Я. Даин, А. А. Качан, ДАН, **61**, 471 (1948). [4] S. Ašpergěr, Trans. Farad. Soc., **48**, 617 (1952). [5] Б. Я. Даин, А. А. Качан, ДАН, **67**, 85 (1949).

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и М. И. БЫСТРОВА

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

Измерение спектров флуоресценции этиолированных листьев при температуре жидкого азота показало наличие в них максимумов флуоресценции при 633 и 655 *ммк*, соответствующих неактивной и активной формам протохлорофилла [1]. Освещение приводило к быстрому превращению формы протохлорофилла 655 *ммк* в предшественника хлорофилла с максимумом флуоресценции 690 *ммк*. При дальнейшем освещении максимум флуоресценции сдвигался до 680 *ммк*, что соответствует «мономерной» форме хлорофилла. Накопление хлорофилла в процессе зеленения этиолированных листьев приводило к образованию агрегированных форм с максимумами флуоресценции ~740 *ммк* (при температуре —190°) [2]. Результаты, полученные при измерении флуоресценции, согласуются с измерениями спектров поглощения зеленеющих листьев [3]. Гомогенаты этиолированных листьев содержат активную и неактивную формы протохлорофилла с теми же максимумами флуоресценции, что и в неповрежденных листьях [4]. При освещении гомогенатов «активный» протохлорофилл превращается в предшественника хлорофилла с флуоресценцией 690 *ммк* и далее — в форму пигмента с максимумом флуоресценции при 680 *ммк*. Дальнейшего накопления хлорофилла и образования агрегированных форм в гомогенатах не наблюдалось, так как в них, по-видимому, нарушался синтез и накопление протохлорофилла.

Изучение кинетики превращения пигментных форм при зеленении этиолированных листьев было сопоставлено с результатами хроматографирования на бумаге пигментов на разных стадиях процесса [5]. Эти опыты показали, в согласии с работами других исследователей [6—10], что активная форма протохлорофилла с флуоресценцией при 655 *ммк*, по-видимому, представляет собой соединение протохлорофиллида с белком, тогда как неактивная форма с максимумом флуоресценции при 633 *ммк*, по-видимому, является смесью протохлорофилла и протохлорофиллида.

Для фотохимического превращения активной формы протохлорофилла в хлорофилл необходимо сохранение нативного состояния белкового комплекса. Всякие воздействия, нарушающие максимум флуоресценции при 655 *ммк* в листьях и гомогенатах, приводят к торможению образования хлорофилла. К таким воздействиям относятся нагревание до 40°, действие органических растворителей и особенно пиридина в малых концентрациях [4]. Гомогенаты, в которых сохраняется протохлорофиллид, но нарушена его связь с белком, полностью теряют способность к образованию хлорофилла.

Существенным является решение вопроса о специфике связи протохлорофиллида в этиолированных листьях с белками и липоидами, определяющей избирательное фотовосстановление полуизолированной двой-

ной связи в молекуле протохлорофиллида. Одним из путей, ведущих к выяснению этого вопроса, является изучение спектральных и фотохимических свойств протохлорофилловых пигментов в различных состояниях.

МЕТОДИКА

Спектры флуоресценции измеряли при комнатной и низкой (от —100 до —190°) температурах обычно при возбуждении линиями ртути 365, 404—436 *ммк*. Применяли фотографическую регистрацию спектров при малой интенсивности свечения (например, в случае водных коллоидных растворов пигментов при 20°) и фотоэлектрическую регистрацию с автоматической записью. Методы измерений описаны в других работах [4 11]. На рис. 1—4 по ординате показана относительная интенсивность флуоресценции.

Протохлорофилл выделяли из внутренних оболочек семян тыквы с конечной хроматографией на бумаге по методу, применяемому в нашей лаборатории. Протохлорофиллид извлекали из этиолированных листьев фасоли ацетоном, переводили в серный эфир и хроматографировали на бумаге в смеси растворителей, предложенной Годневым с сотр. [12]. Протофеофитин получали из протохлорофилла путем обработки эфирного раствора 5%-ным водным раствором соляной кислоты. Водные коллоидные растворы пигментов получали путем приливания нескольких капель концентрированного раствора пигментов в ацетоне к 5 *мл* 1/15 *М* фосфатного буферного раствора или растворением пигментов, адсорбированных на сахарозе, в водных буферных растворах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Флуоресценция протохлорофилловых пигментов в разных формах. Френч и Смит с сотр. [13] измерили флуоресценцию растворов протохлорофилла и протофеофитина в ацетоне и эфире. В наших опытах положения максимумов флуоресценции протохлорофилла и протохлорофиллида в органических растворителях одинаковы (±1 *ммк*) и составляют: в ацетоне 629—630 *ммк*, в этиловом спирте 636 *ммк*, в пиридине около 640 *ммк*. Введение аммиака в пиридин не приводило к перемещению максимума.

Коллоидные растворы пигментов в фосфатных буферных смесях (pH 4,5—8,5) при комнатной температуре обнаружили слабые максимумы флуоресценции около 630 (протохлорофилл) и 640 *ммк* (протохлорофиллид), характерные для мономерных форм. Введение в водные коллоидные растворы пигментов насыщенного раствора хлористого магния приводило к коагуляции коллоида и выпадению сгустка; в спектре флуоресценции надосадочной жидкости и выпавшего коагулята также наблюдали максимумы флуоресценции при 630 (протохлорофилл) и 640 *ммк* (протохлорофиллид). Коллоидные растворы протохлорофилла, полученные растворением в воде хроматограмм на сахаре, давали подобный, «мономерный», спектр флуоресценции. Таким образом, в водных коллоидах наряду с доминирующими агрегированными формами, не флуоресцирующими при комнатной температуре, в равновесии всегда находится некоторое количество мономерных форм вероятно расположенных на фазовых границах: коллоидная мицелла — диспергирующая среда.

Протохлорофиллид в щелочном растворе (0,02 н. KOH) обладает максимумом флуоресценции около 640 *ммк*. Коллоидный раствор протохлорофиллида в буфере с pH 3 обнаружил максимум флуоресценции около 655 *ммк*, что вызывается феофитинизацией; безмагниевый протохлорофиллид в этих условиях обладает максимумом флуоресценции при 653—655 *ммк*.

Для сравнения мы сопоставили флуоресценцию хлорофилла *а* и хлорофиллида *а*. Оба эти пигмента в разбавленных растворах в органических растворителях обладают максимумами флуоресценции: в ацетоне — при 670—672, в пиридине — при 678—680 и в метиловом спирте — при 675 *ммк*. После коагуляции $MgCl_2$ (1 капля 10%-ного раствора на 5 *мл* коллоида), так же как и в случае протохлорофилла, наблюдается «мономерная» флуоресценция в надосадочной жидкости и в сгустке при 680—682 *ммк*.

Таким образом, измерения флуоресценции протохлорофилла при комнатной и низкой температурах в различных состояниях не дали возможности наблюдать сдвиг максимума флуоресценции до 655 *ммк*, характерный для активной формы протохлорофилла в этиолированных листьях.

Измерения флуоресценции при низкой температуре. Спектры флуоресценции разных форм протохлорофилла в этиолированных листьях измеряли при замораживании объектов жидким азотом; поэтому следует сопоставить с этими данными результаты измерений флуоресценции протохлорофилловых пигментов также при низкой температуре. Измерения, произведенные в согласии с описанной ранее методикой при возбуждении линиями ртути 365, 404—436 *ммк*, представлены на рис. 1. Протохлорофилл и протохлорофиллид в пиридиновом растворе при 20° обладают максимумами флуоресценции при 640 и 700 *ммк*. Замораживание до —120° вело к появлению максимума около 690 *ммк*, который можно приписать агрегированной форме протохлорофилла по аналогии с поведением растворов хлорофилла при замораживании. Более длительная экспозиция при освещении возбуждающим светом приводила к появлению максимумов при 655 и 710 *ммк*. Для того, чтобы понять происхождение этих максимумов, следует остановиться на флуоресценции протофеофитина, который в пиридиновых растворах обладает характерными максимумами около 653 и 707—710 *ммк*. Эти максимумы наблюдаются при +20 и —120°; понижение температуры не влечет за собой изменения положения максимумов спектра протофеофитина (в отличие от протохлорофилла), но влияет на их относительную интенсивность. Размораживание экспонированного раствора протохлорофилла ведет к исчезновению максимума при 655 *ммк*. Можно предположить, что этот максимум образуется за счет частичной феофитинизации протохлорофилла при действии света и что этот эффект обратим после повышения температуры. Существенно, что при —196°, т. е. в условиях еще большего затруднения феофитинизации, требующей известной энергии активации, нам не удалось наблюдать появления максимума при 655 *ммк*. Следовательно, лишь безмагниевые производные протохлорофилла и протохлорофиллида обладают максимумами флуоресценции при 655 *ммк*, соответствующими максимуму активной формы протохлорофилла в этиолированных листьях.

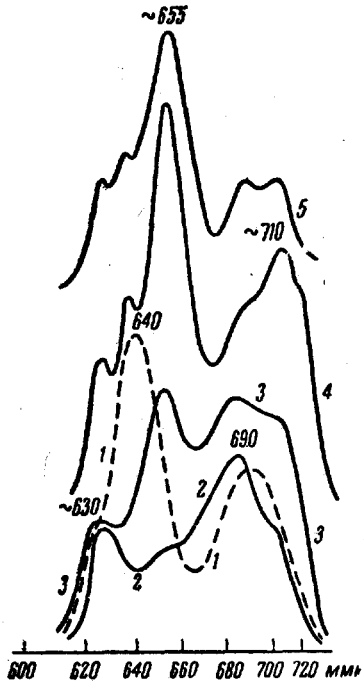


Рис. 1. Спектры флуоресценции протохлорофилла и протофеофитина

1 — раствор протохлорофилла в пиридине при комнатной температуре; *2* — раствор протохлорофилла в пиридине при —120°, начальная экспозиция (2 мин.); *3* — раствор протохлорофилла в пиридине при —120° после освещения возбуждающим светом (10 мин); *4* — раствор протофеофитина в пиридине при —120°; *5* — гомогенат этиолированных листьев фасоли при —120°; спектры даны без поправки на спектральную чувствительность фотоматериала (пластинок «панинфра»)

Флуоресценция пигментов в адсорбированном состоянии. Так как «активный» протохлорофилл с максимумом флуоресценции при 655 *ммк* представляет собой белковое соединение [14], интересно было измерить спектры флуоресценции пигментов в адсорбированном состоянии.

Раствор протохлорофилла в эфире (очищенный последовательной хроматографией на сахаре и на бумаге) с концентрацией пигмента около 10^{-5} *моль/л* наносили в количестве 0,03 *мл* на адсорбент. Эфир

испаряли на воздухе, объект зажимали между двумя стеклами и возбуждали флуоресценцию линией ртути 436 *ммк*; спектр снимали на регистрирующей установке. Оказалось, что последовательное измерение спектров флуоресценции адсорбатов протохлорофилла на фильтровальной бумаге, целлюлозе, капроне, паралоне* сразу после нанесения пигмента на адсорбент и через 10, 20, 30 мин. экспозиции приводит к появлению и постепенному увеличению максимума флуоресценции около 653 *ммк* (рис. 2, *1, 2, 3*). После измерения флуоресценции пигмент элюировали с адсорбента пиридином и измеряли флуоресценцию элюата, которая всегда соответствовала спектру протохлорофилла (рис. 2, *4*). Таким образом, можно думать, что адсорбция не ведет к необратимой феофитинизации; однако спектр адсорбированного протохлорофилла похож на спектр протофеофитина (рис. 2, *5*) и на спектр пигмента в этиолированных листьях (рис. 1, *5*). Появление максимума около 653 *ммк* в процессе освещения адсорбата можно объяснить постепенной фотофеофитинизацией протохлорофилла, которая может быть обратимой в темноте. Наряду с этим возможно выцветание формы протохлорофилла с максимумом флуоресценции около 633 *ммк*. По-видимому, это связано с природой адсорбента и способом упаковки молекул протохлорофилла, так как эти эффекты не удалось наблюдать на неорганических адсорбентах (MgO, SiO_2 Al_2O_3, CaO, $CaCO_3$).

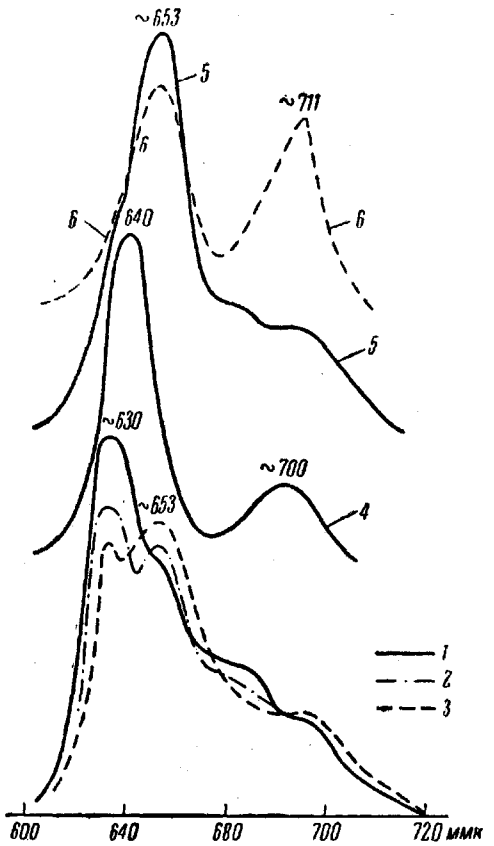


Рис. 2. Спектры флуоресценции адсорбатов протохлорофилла и протофеофитина

1—3 — адсорбат протохлорофилла на целлюлозе (последовательные экспозиции до 30 мин.); *4* — пиридиновый элюат протохлорофилла с адсорбента; *5* — протофеофитин, адсорбированный на целлюлозе; *6* — пиридиновый элюат протофеофитина с адсорбента; фотоэлектрическая регистрация с пересчетом на спектральную чувствительность

Обращает на себя внимание чрезвычайное сходство спектра флуоресценции гомогената этиолированных листьев (рис. 1, *5*) со спектром флуоресценции адсорбированного протохлорофилла (рис. 2, *3*), протофеофитина, содержащего примесь протохлорофилла (рис. 1, *4*) и со спектром освещенного протохлорофилла в пиридине при —100°. Однако из этиолированных листьев растворителями извлекается не протофеофитин, а протохлорофиллид и протохлорофилл. Об этом свидетельствуют работы ряда авторов [6—10], а также тот факт, что при совместной хроматографии протохлорофилла и протохлорофиллида примесь безмагниевых пигментов располагается в другой зоне.

Таким образом, протохлорофиллид, связанный с белком в этиолированных листьях, и протохлорофилл в ряде модельных состояний об-

* Образцы капрона и паралона были нам любезно предоставлены Г. Комиссаровым

ладают спектром флуоресценции, близким к протофеофитину. Это заставляет предполагать что связь пигмента с белком приводит к перераспределению связей центрального атома магния с «оттягиванием» его из центра молекулы или частичным нарушением связи магния с атомами азота пиррольного кольца и созданием «квазифеофитиновой» структуры. Вероятно, этому благоприятствует также наличие карбоксильной группы в молекуле пигмента, определяющей возможность ее связи с основными группировками белка; в активном белковом комплексе протохлорофиллида («протохлорофилл-голохрома» по Смиту) можно ожидать сцепления молекулы пигмента с белком по двум точкам: центральному атому магния и карбоксильной группе. Мы показали, что в этиолированных листьях часть протохлорофиллида не является активной [5]. Вероятно, эта часть не связана с белком и обладает спектром, подобным спектру протохлорофилла. В случае протохлорофилла, не обладающего свободной карбоксильной группой, вид связи, соответствующий активной форме, отсутствует и в этиолированных листьях этому виду связи соответствует «неактивная» форма, которая, однако, тоже может быть связана с белками и липоидами.

Фотовосстановление протохлорофилловых пигментов в модельных условиях. При фотовосстановлении протохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридине наряду с образованием «обратимой» формы с максимумом поглощения при 470 *ммк* наблюдали появление продукта, поглощающего при 670 *ммк* [15]. Фотореакция в спирто-пиридиновой среде приводила к образованию продукта с поглощением при 470 *ммк*, обратимо реагирующего в темноте с регенерацией исходного протохлорофилла [16]. Годнев и Калишевич [17], восстанавливая протохлорофилл цинком, не обнаружили хлорофиллоподобных продуктов. В аналогичных условиях восстановления в нашей лаборатории наблюдалось образование малого количества обратимо окисляющегося продукта с поглощением около 670 *ммк* [18].

Мы предполагали выяснить, могут ли в условиях фотовосстановления протохлорофилла аскорбиновой кислотой образоваться продукты, у которых фотовосстановление происходило бы по месту одной из полуизолированных двойных связей. Фотовосстановление протохлорофилла обычно ведет к образованию обратимо окисляющихся фотовосстановленных продуктов; в этом случае доминирует обратимое фотовосстановление по системе конъюгированных связей [19]. Измерение спектров флуоресценции является чрезвычайно чувствительным методом, с помощью которого можно было надеяться установить возможность образования малого количества хлорофиллоподобных продуктов в модельных системах; как известно, спектр флуоресценции хлорофилла отличается от спектра флуоресценции протохлорофилла сдвигом в длинноволновую сторону (протохлорофилл в растворе имеет максимум флуоресценции при 630—640 *ммк*, хлорофилл — при 670—680 *ммк*).

Мы испытали различные условия фотовосстановления, при которых варьировали способ обработки (обезвоживания) пиридина, количество восстановителя, количество воды. Все эти факторы могли влиять на условия кислотно-основного равновесия, во многом определяющие спектральные свойства конечных фотопродуктов.

Обычно постановка опытов была следующей. Протохлорофилл и протохлорофиллид получали из внутренних оболочек семян тыквы и этиолированных листьев с конечным хроматографическим разделением на бумаге в смеси растворителей [12]. Пигменты с хроматограммы элюировали пиридином или ацетоном с последующим испарением его в вакууме и переводом пигмента в пиридин. В растворах, с которыми ставили опыты, концентрация пигментов составляла 10^{-6} *моль/л*. 3 *мл* пиридинового раствора пигмента с различным количеством аскорбино-

вой кислоты помещали в трубку Тунберга, откуда откачивали при взбалтывании растворенный воздух с помощью масляного форвакуумного насоса. Спектр флуоресценции исходного раствора регистрировали с помощью фотографической или фотоэлектрической методики [4; 11]. Раствор в трубке Тунберга освещали светом лампы накаливания (10^4 *эрг/см²/сек*) от 30 сек. до 15 мин. при 20°. В процессе освещения регистрировали спектры флуоресценции. По окончании опыта пускали воздух и через 1—2 часа снимали спектр флуоресценции, с тем чтобы убедиться, что он принадлежит необратимым восстановленным продуктам. В этих опытах особое внимание уделяли обработке пиридина. Мы использовали реактивный перегнанный пиридин, обычно содержащий около 1% воды. С целью обезвоживания в течение нескольких часов кипятили пиридин с прокаленной CaO или BaO с последующей перегонкой (0,02% H_2O); использовали также пиридин, перегнанный над металлическим натрием. Во всех этих случаях получали фотопродукты, обладающие различными спектрами флуоресценции.

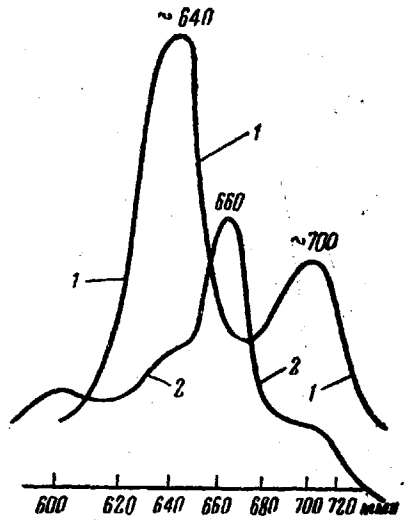


Рис. 3. Фотовосстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридине, высушенном окисью бария:
1 — исходный раствор протохлорофилла;
2 — после фотореакции

Следовало иметь в виду возможность образования при фотовосстановлении протохлорофилла продуктов, обладающих спектром флуоресценции, близким к хлорофиллу, но регенерирующих в протохлорофилл при действии кислорода, т. е. не дающих стабильных продуктов фотовосстановления по месту полуизолированных двойных связей. Подобная картина наблюдалась в нашей лаборатории при фотовосстановлении порфиринов, когда спектры поглощения фотовосстановленных продуктов имели максимумы при 660 и 740 *ммк*, соответствующие по положению максимумам поглощения, наблюдающимся обычно у хлоринов и бактериохлоринов [20]. Однако эти соединения при действии кислорда воздуха регенерировали в исходный порфирин, а при действии аммиака и уксусной кислоты наблюдали их взаимопревращения, связанные со сдвигом в кислотно-основном равновесии [20]. Таким образом, испытание действия аммиака и уксусной кислоты в сочетании с действием воздуха должно было служить критерием устойчивости образованных продуктов фотовосстановления.

Фотовосстановление в обычном пиридине, содержащем 1% воды, приводило к образованию продуктов, слабо флуоресцирующих в области 600 *ммк*, в согласии с известными данными [11]. При пропускании воздуха происходила регенерация протохлорофилла с возвращением исходного максимума флуоресценции в области 640 *ммк*. В случае применения пиридина, высушенного над окисью бария, в том же режиме опытов наблюдали появление максимума флуоресценции около 660 *ммк*, также обратимо регенерирующего в протохлорофилл при пуске воздуха (рис. 3). В спектре поглощения той же системы после фотореакции регистрировали небольшой максимум в области 658—660 *ммк*. Мы не выясняли специально, насколько полно происходит феофитинизация протохлорофилла в этих условиях. Таким образом, в этих условиях опытов не удавалось наблюдать устойчивых хлорофиллоподобных продуктов.

Применение пиридина, перегнанного над металлическим натрием, приводило к несколько иной картине. В спектре флуоресценции фотопродуктов наблюдали максимум при 680 *ммк*, не исчезающий при пуске воздуха и при действии аммиака (рис. 4). В спектре поглощения системы после фотореакции в этом случае регистрировали небольшой максимум около 674 *ммк*. Испарение в вакууме пиридина с последующим введением ацетона приводило к образованию раствора с максимумом флуоресценции, характерным для хлорофилла в ацетоне (рис. 4, *3*). Спектр флуоресценции искусственной смеси протохлорофиллида и хлорофилла оказался подобным спектру флуоресценции системы после реакции фотовосстановления (рис. 4, *4*). Эти опыты указывают на возможность получения хлорофиллоподобных продуктов. Обратная реакция приводит к регенерации около 80% исходного протохлорофиллида. Однако трудно оценить количество пигмента, превращающегося в хлорофиллоподобный продукт, так как в остатке (~20%) нерегенерируемого пигмента обычно образуются продукты необратимого деструктивного восстановления. Возникает вопрос, почему в пиридине, обработанном натрием, удается наблюдать образование хлорофиллоподобных продуктов? Это не связано со степенью обезвоживания пиридина, так как добавление 3—5% воды к перегнанному над натрием пиридину не изменяло результатов. Пиридин, обработанный металлическим натрием, имеет более высокий восстановительный потенциал по сравнению с обычным пиридином, и его водные растворы обладают более основными свойствами (pH~10) по сравнению с растворами обычного пиридина (pH~9). Известно, что при кипячении пиридина с металлическим натрием образуется дипиридил и может происходить образование восстановленных продуктов. Однако введение пиперидина в количестве до 5% в обычный пиридин не способствовало образованию хлорофиллоподобных соединений.

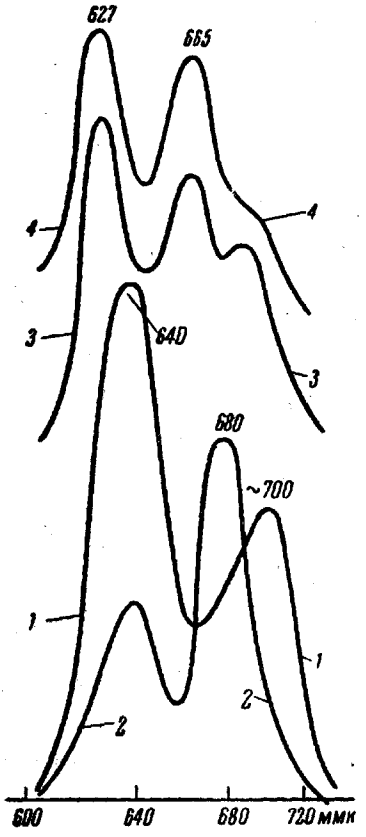


Рис. 4. Фотовосстановление протохлорофиллида аскорбиновой кислотой в пиридине, обработанном металлическим натрием:

1 — исходный раствор; *2* — после фотореакции; *3* — ацетоновый раствор пигментов, полученный в результате испарения пиридина из реакционной системы после фотореакции; *4* — смесь протохлорофиллида и хлорофилла *a* в ацетоне

Таким образом, варьируя условия, в которых происходит фотовосстановление пигментов, удается в случае протохлорофиллида, протофеофитина, протохлорофиллида наряду с обратимо реагирующими продуктами наблюдать образование малых количеств хлорофиллоподобных соединений.

В модельных опытах пока не удается воспроизвести условия, существующие в листьях и гомогенатах, где связанный с белком протохлорофиллид, по данным Смита [21], превращается в хлорофилл с высоким квантовым выходом (0,6). В опытах Смита было показано, что превращение протохлорофилл-голохрома в хлорофилл-голохром происходит без вводимых извне восстановителей. Возможно, восстановление полуизолированной двойной связи в протохлорофиллид-голохроме происхо-

дит за счет восстанавливающих группировок белка — цистеина, а возможно триптофана и гистидина. Наличие карбоксильной группы у протохлорофиллида определяет его связь с основными групами белка. Понятно, что в наших опытах органические основания ингибировали превращение протохлорофилла в хлорофилл, нарушая эту связь. Связывания по карбоксильной группе, по-видимому, недостаточно для тех спектральных смещений, которые наблюдаются *in vivo*, так как при растворении протохлорофиллида в сильных основаниях и водных щелочных растворах смещение достигает лишь 642 *ммк*.

Мы уже высказывали предположение о том, что связывание с белком происходит и в других точках молекулы пигмента, например по атому магния, который может образовывать комплексы как с основными, так и с кислыми группировками белка. Расположение молекулы протохлорофиллида на молекуле белка, закрепленной в нескольких точках, может способствовать пространственно выгодному взаимодействию с восстанавливающими группировками. Первичные фотопродукты восстановления протохлорофилла, связанного с белком, путем дисмутации могут вести к образованию валентно-насыщенного хлорофилла. Вопрос о структуре протохлорофиллид-белкового комплекса нуждается в углубленном изучении.

ВЫВОДЫ

Сравнительное исследование спектров флуоресценции этиолированных листьев и протохлорофилловых пигментов в различных состояниях показало, что в ряде модельных систем (адсорбаты, пиридиновые растворы при —100° после экспозиции возбуждающим светом) протохлорофилл приобретает спектры флуоресценции, подобные протофеофитину (максимум около 655 *ммк*) и «активному» протохлорофиллу этиолированных листьев. Это приводит к предположению о том, что связь протохлорофилла в активной форме с белком ведет к перераспределению связей центрального атома магния с его «оттягиванием» из центра молекулы и образованием «квазифеофитиновой» структуры.

В модельных условиях удалось наблюдать при фотовосстановлении протохлорофилла аскорбиновой кислотой образование малого количества хлорофиллоподобных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **117**, 106, 1957; Докл АН СССР **120**, 764, 1958.
2. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. и Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР **135**, 1528, 1960.
3. Schibata K., J. Biochem. (Japan) **44**, 147, 1957.
4. Красновский А. А. и Быстрова М. И., Биохимия **25**, 168, 1960.
5. Красновский А. А. и Быстрова М. И., Докл. АН СССР **136**, 1227, 1961.
6. Loeffler J. E., Carn. Inst. Wasch. Y. B. No. 54, 159, 1954—55.
7. Wolf Y. B, Price L., Plant Physiol. **31**, 30, 1956; Arch. Biochem. and Biophys. **72**, 293, 1957.
8. Годнев Т Н., Шлык А. А. и Ляхнович Я. П. Физиол. растений **4**, 393, 1957.
9. Годнев Т. Н., Шлык А. А. и Шабельская Э. Ф. Бюл. ин-та биол. АН СССР за 1957 г., в. 3, стр. 89, 1958.
10. Virgin H. I., Physiol. Plant. **13**, 155, 1960.
11. Ерохин Ю. Е. и Красновский А. А. Биофизика **6**, 392, 1961.
12. Годнев Т. Н. и Акулович Н. К., Сб. физиол. и биохим. раст., М., 1958.
13. French C. S., Smith J. H. C., Virgin H. Y., Airth R., Plant Physiol., **31**, 369, 1956.
14. Smith J. H. C., Kupke D. W., Nature, **178**, 751, 1956.
15. Красновский А. А. и Войновская К. К., Докл. АН СССР **66**, 663, 1949.
16. Красновский А. А. и Войновская К. К., Докл. АН СССР **112**, 911, 1957.
17. Годнев Т. Н. и Калишевич С. В., Тр. ин-та физиол. раст. им. Тимирязева АН СССР, в. 2, 160, 1945.

18. Евстигнеев В. Б. и Савкина И. Г., Биофизика 4, 289, 1959.
19. Красновский А. А., Успехи химии 29, 736, 1960.
20. Красновский А. А. и Пакшина Е. В., Докл. АН СССР 120, 58, 1958.
21. Smith J. H. C., French C. S., Carn. Inst. Wash., Y. B. 57, 290, 1957—58.

Поступила в редакцию
16.V.1962

SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF PROTOCHLOROPHYLL PIGMENTS IN MODEL SYSTEMS

A. A. KRASNOVSKY and M. I. BYSTROVA

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A comparative study of fluorescence spectra of etiolated leaves and of protochlorophyll pigments in different states showed that in a variety of model systems (such as pigment adsorbed on cellulose ets., in pyridine solutions at — 100° after exposure to excitig light) protochlorophyll acquires fluorescence spectra similar to those of protopheophytin (maximum at 655 *mμ*) and «active» protochlorophyll of etiolated leaves.

It might therefore be suggested that the linkage of the active form of protochlorophyllid to the protein results in rearrangements of the bonds of the central magnesium atom which is displaced from the center of the molecule so that a «quasipheophytinic» structure is formed.

Upon photoreduction of protochlorophyll under model conditions by ascorbic acid it proved possible o see a small amoun of chlorophyll — like products.

Доклады Академии наук СССР
1962. Том 145, № 1

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

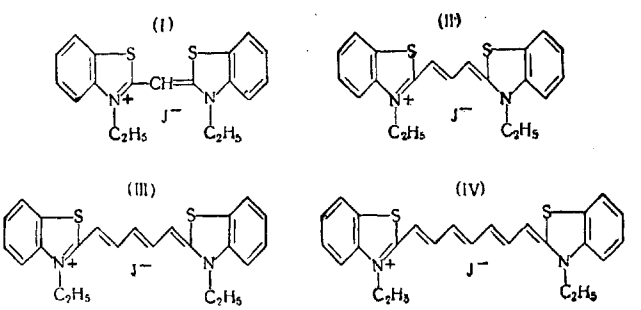
А. А. КРАСНОВСКИЙ и Н. Н. ДРОЗДОВА

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 10 II 1962)

Изучая действие полиеновых соединений на реакцию обратимого фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой, мы нашли, что некоторые полиметиновые красители претерпевают при этом фотосенсибилизированное восстановление ([1]). Эти наблюдения указали на возможность прямого фотовосстановления красителей данного класса. Нам удалось найти условия, в которых наблюдается обратимое фотовосстановление этих соединений аскорбиновой кислотой и цистеином и происходит фотосенсибилизированное восстановление азокрасителя метилового красного. Полученные результаты указывают на то, что фотосенсибилизирующее действие таких красителей в растворах (так же как и в случае хлорофилла и его аналогов ([2])) связано с их способностью к реакции обратимого фотовосстановления. В статье кратко описываются результаты исследования.

Фотовосстановление. В работе были использованы тиокарбоцианины, отличающиеся друг от друга длиной полиеновой цепи (I, II, III, IV)



Для нас представляли наибольший интерес соединения III и IV, имеющие максимумы поглощения в красной (III) и близкой инфракрасной области спектра (IV), где расположены максимумы поглощения хлорофилла и бактериохлорофилла. Раствор красителя в пиридине с концентрацией около 10^{-5} *М/л* вводили в вакуумную трубку Тунберга особой формы, приспособленную для измерений спектров поглощения на спектрофотометре СФ-4. Применяли реактивный х. ч. пиридин, перегнанный в пределах 112—114°, к которому добавляли 5% воды. В трубку вводили аскорбиновую кислоту в виде водного или пиридинового (свежеприготовленного) раствора, откачивали воздух из трубки масляным вакуумным насосом при энергичном взбалтывании в течение трех минут и освещали в фокусе конденсора осветителя (лампа 300 вт) обычно через красный светофильтр КС-13 (около 10^5 эрг/см^2·сек). Общий объем смеси после откачивания воздуха 4 мл. По мере освещения наблюдали падение оптической плотности (D) в максимуме поглощения красителей и обратимое возрастание D в темноте (трубка помещена в колодку спектрофотометра) при разных периодах освещения.

После периода освещения до момента измерения обычно проходило 15—20 сек., за это время частично протекала обратная реакция. Таким образом на рисунках показан ход обратной реакции, который наблюдался после начального периода 15 сек. до 2—3 мин. В тех случаях, когда не наблюдалось явной обратной реакции в темноте (опыты с цистеином) оставалась возможность того, что обратная реакция проходила за 15 сек., требуемых для начала измерения на спектрофотометре. После опыта в трубку пускали воздух и снова измеряли ход реакции в темноте. При этом наблюдалась более медленная регенерация красителя из восстановленных форм. Опыты при низкой температуре (до —50°) проводили в прозрачном сосуде Дьюара, содержащем смесь спирта с твердой углекислотой. В прозрачный охлажденный спирт погружали трубку Тунберга и освещали в обычных условиях. Обратную реакцию наблюдали при той же температуре.

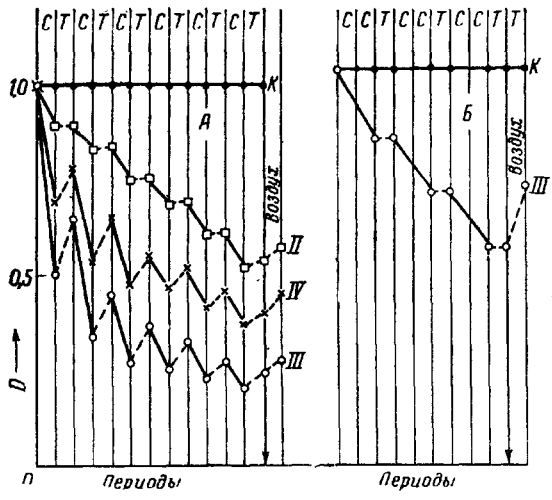


Рис. 1. Фотовосстановление тиокарбоцианинов (II, III, IV) аскорбиновой кислотой (*А*) (*К* — контрольные опыты без аскорбиновой кислоты) и цистеином (*Б*) в пиридине (*К* — контрольный опыт без цистеина). Обратимое изменение оптической плотности (*D*) в максимумах поглощения при 565 мμ (*II*), при 660 мμ (*III*) при 770 мμ (*IV*). *D* красителей в максимумах около 1, аскорбиновая кислота 0,25 мг, цистеин 0,1 мг, вода 5%, конечный объем смеси после откачивания воздуха 4 мл. Освещение через красный светофильтр КС-13 в опытах с III и IV и без светофильтра с II. Температура +20°. Откачивание воздуха 3 мин. Периоды: освещение 0,5 мин. (*С*), темнота 2 мин. (*Т*), воздух — 20 мин.

Исследование влияния концентрации восстановителя — аскорбиновой кислоты и цистеина на скорость реакции показало, что в изученных пределах концентрации восстановителя от 10^{-4} до 10^{-2} *М* не наблюдается существенных изменений в скорости фотореакций. Обратимость процесса наиболее отчетливо наблюдается при концентрации восстановителя 10^{-3}—10^{-4} *М*. В опытах с аскорбиновой кислотой при комнатной температуре наблюдалась обратимость реакции в темноте (без доступа воздуха) на фоне постепенного падения оптической плотности (*D*), вызванного одновременно идущим процессом деструктивного (необратимого) фотовосстановления (рис. 1 *А*). В опытах с цистеином некоторая обратимость наблюдалась лишь после пуска воздуха, окисляющего продукты фотовосстановления (рис. 1 *Б*), в контрольном опыте (рис. 1 *Б*, *К*) (раствор красителя без восстановителя) не наблюдается изменений красителя при освещении. При данных условиях опыта соединение I не восстанавливается ни аскорбиновой кислотой, ни цистеином.

Исследование влияния температуры на скорость процесса в пределах от +20° до —25° показало, что при понижении температуры до —25° реакция не замедляется по сравнению с комнатной температурой, что указывает на возможность образования комплекса красителя с восстановителем. В присутствии аскорбиновой кислоты и цистеина не удается наблюдать изменения спектров поглощения и флуоресценции красителей (рис. 2), что может служить указанием на отсутствие взаимодействия восстановителя с синглетным возбужденным состоянием красителя. При этом сохраняется возможность взаимодействия с триплетным возбужденным состоянием. Предварительное образование комплекса может и не сопровождаться изменением спектра поглощения. Спектр флуоресценции измерен Ю. Е. Ерохиным

(при возбуждении синими линиями ртути, выделяемыми светофильтром ЗС-3) на установке, описанной в другом месте ([3]).

Фотосенсибилизация. При изучении фотосенсибилизированных окислительно-восстановительных реакций в растворах весьма удобно применение необратимо восстанавливающегося акцептора электрона, дающего возможность наблюдать результат сенсибилизированной реакции после периода освещения. В качестве такого конечного акцептора электрона часто применяют азокрасители ([4]).

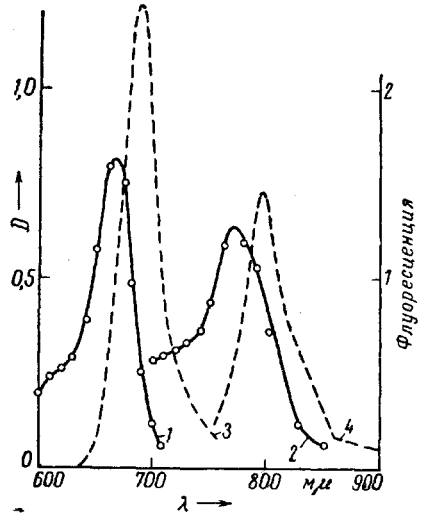


Рис. 2. Спектры поглощения и флуоресценции тиокарбоцианинов. *1*, *2* — спектры поглощения красителей в присутствии и отсутствие аскорбиновой кислоты и цистеина: *1* — краситель III, *2* — краситель IV, *3*, *4* — спектры флуоресценции красителей в присутствии и отсутствие аскорбиновой кислоты: *3* — краситель III, *4* — краситель IV. Флуоресценция в относительных единицах

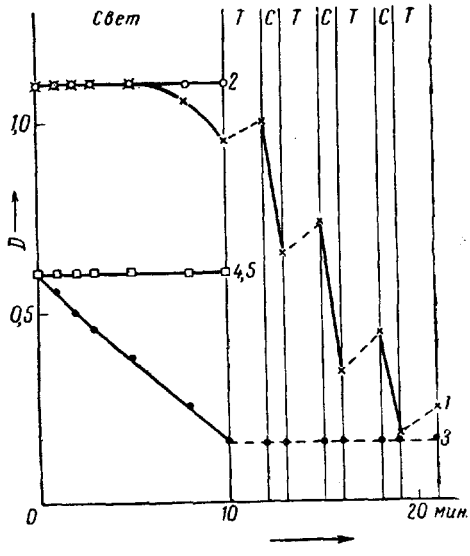


Рис. 3. Фотосенсибилизированное тиокарбоцианином восстановление метилового красного. *1*, *2* — изменение оптической плотности в максимуме поглощения тиокарбоцианина при 660 мμ. *1* — тиокарбоцианин + метиловый красный + аскорбиновая кислота, *2* — тиокарбоцианин + метиловый красный; *3*, *4*, *5* — изменение оптической плотности в максимуме поглощения метилового красного при 425 мμ. *3* — метиловый красный + тиокарбоцианин + аскорбиновая кислота, *4* — метиловый красный + тиокарбоцианин, *5* — метиловый красный + аскорбиновая кислота (*C* — свет, *T* — темнота)

Реакции в тройной системе мы проводили в следующих условиях: к 4 мл пиридинового раствора красителя (III) в концентрации около 10^{-5} *M* (*D* при 660 мμ около 1) прибавляли 0,25 мг аскорбиновой кислоты (0,1 мл водного раствора) и метиловый красный (0,01 мл водного раствора) с таким расчетом, чтобы его оптическая плотность (*D*) при 425 мμ составляла 0,6 (в этой области сенсибилизаторы практически не поглощают свет). После откачивания воздуха освещали через красный светофильтр КС-13 и измеряли оптическую плотность в красном максимуме поглощения сенсибилизатора и в области максимума метилового красного при 425 мμ. Наблюдалось быстрое фотосенсибилизированное восстановление метилового красного, характеризующееся падением оптической плотности при 425 мμ. На этой стадии процесса *D* в максимуме поглощения сенсибилизатора оставалось неизменным, так как происходила полная регенерация сенсибилизатора за счет взаимодействия его фотовосстановленной формы с метиловым красным. После того как метиловый красный «сенсибилизированно» восстановился, наступало фотовосстановление сенсибилизатора с эффектами обратимости в темноте (рис. 3).

Основываясь на этих опытах и аналогии с поведением хлорофилла в растворах, механизм реакции можно представить следующей гипотетической схемой:

Предварительное взаимодействие красителя-сенсибилизатора и восстановителя

$$К + АН \rightleftarrows К \cdot АН. \quad (1)$$

Фотоперенос электрона в комплексе К · АН и «расхождение» образованных ион-радикалов

$$К \cdot АН \rightleftarrows К^- \cdot АН^+ \rightleftarrows \cdot К^- + \cdot АН^+. \quad (2)$$

«Темновое» взаимодействие семихинона фотовосстановленного сенсибилизатора с акцептором электрона, с регенерацией красителя-сенсибилизатора

$$\cdot К^- + МК \rightarrow К + \cdot МК^-. \quad (3)$$

За этим следуют стадии присоединения протона и дисмутация радикалов с образованием валентнонасыщенных соединений.

Как известно, сенсибилизирующим действием обладают как мономерные, так и агрегированные формы красителей, адсорбированные на бромистом серебре. Кэррол и Уэст ([5]) указывают на то, что сенсибилизация «мономерными» молекулами, беспорядочно адсорбированными на поверхности бромистого серебра, обычно более эффективна, чем сенсибилизация агрегированными формами красителя. В литературе неоднократно указывалась возможность участия красителей в процессах фотохимического переноса электрона от восстановителя (например, от SH-групп желатины) к иону серебра в решетке бромистого серебра ([6,7]). Возможно, что описанная способность полиметиновых красителей к обратимому восприятию электрона (фотовосстановлению) может быть связана с механизмом их участия в фотосенсибилизированном разложении бромистого серебра. Мы далеки от того, чтобы уподобить реакции, идущие в растворах красителей (где образуются сравнительно долгоживущие промежуточные фотопродукты), реакциям, идущим в условиях адсорбции мономерных и агрегированных форм красителей на кристаллах бромистого серебра. В этом случае элементарный фотопроцесс возможно не связан с диффузией промежуточных фотопродуктов. Однако способность красителей-сенсибилизаторов к обратимому фотовосстановлению (наблюдаемая в растворе) может проявиться и на бромистом серебре, где фотопревращения красителей могут быть ограничены обратимым восприятием электрона от донорного компонента и его передачей электроноакцепторному компоненту системы.

Приносим глубокую благодарность проф. И. И. Левкоеву, любезно предоставившему нам препараты красителей.

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

Поступило
8 II 1962

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Биохимия, **26**, 859 (1961). [2] А. А. Красновский, Усп. химии, **29**, 736 (1960). [3] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун Юй-цунь, ДАН, **143**, № 2 (1962). [4] R. Livingston et al., J. Phys. Coll. Chem., **51**, 775 (1947). [5] B. H. Carrol, W. West, Photogr. Sensitiv., **162** (1951) (цит. по сборн. Физическая химия фотографических процессов, ред. К. В. Чибисов, ИЛ, 1954). [6] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей и родственных органических соединений, Изд. АН СССР, 1947. [7] Kögel, Steigmann, Zs. wiss. Photogr., **24**, 18, 171 (1926) (цит. по ([6])).

Доклады Академии наук СССР
1962. Том 143, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, Ю. Е. ЕРОХИН и ХУН ЮЙ-ЦЮНЬ

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА, БАКТЕРИОВИРИДИНА И ХЛОРОФИЛЛА В СВЯЗИ С СОСТОЯНИЕМ ПИГМЕНТОВ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМАХ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 4 X 1961)

В 1952 г. в нашей лаборатории было установлено, что своеобразный спектр поглощения пурпурных бактерий с тремя максимумами поглощения в ближней инфракрасной области спектра при 800, 850 и 890 мμ соответствует поглощению агрегированных форм бактериохлорофилла в твердых пленках и водных коллоидных растворах ([1]). Влияние ряда воздействий (нагревания, освещения, растворителей) на хроматофоры бактерий и на искусственные агрегированные формы бактериальных пигментов приводило к сходным эффектам ([2]). Основываясь на этих фактах, мы предположили, что бактериохлорофилл в клетках находится в основном в агрегированных формах, в условиях, когда достаточно сильно проявляется взаимодействие между близко расположенными молекулами пигмента.

Основной трудностью этой гипотезы было отсутствие данных о флуоресценции искусственных (модельных) агрегированных форм бактериальных пигментов ([3]). Недавно Броди ([4]) обнаружил люминесценцию в концентрированных растворах хлорофилла при 710—720 мμ, которую можно было приписать агрегированным (димерным) формам.

В нашей лаборатории было обнаружено постепенное изменение спектров флуоресценции хлорофилла в зеленеющих этиолированных проростках, связанное с агрегацией пигмента, и отмечено существенное увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла в длинноволновой области при охлаждении листьев до —196° ([5]). Мы обнаружили люминесценцию агрегированных форм бактериовиридина в пленках, коллоидах и адсорбатах и показали, что своеобразие свойств этого пигмента в зеленых серных бактериях также связано с его агрегацией. В этих организмах отчетливо наблюдаются «мономерные» и «агрегированные» формы с характерными для них спектрами поглощения ([8]) и люминесценции ([6]).

Известно, что бактериохлорофилл в пурпурных бактериях обладает характерным максимумом флуоресценции при 900—920 мμ, в спектрах флуоресценции зеленых бактерий обычно наблюдаются три максимума (при 680, 780 и 805 мμ), из которых два последних, по-видимому, принадлежат агрегированным формам бактериовиридина. Следовало выяснить, в каких условиях агрегированные формы бактериальных пигментов обладают флуоресценцией в этой области спектра, что явилось бы серьезным доводом в пользу существования агрегированных форм такого типа в организмах.

Измерение флуоресценции мы проводили на специальной регистрирующей установке (описание которой будет дано в другом месте), в которой приемником служил фотоумножитель ФЭУ-22, охлаждаемый жидким азотом. Бактериохлорофилл выделяли из культуры Rhodopseudomonas palustris по методу, принятому нашей лабораторией, с конечной хроматографической очисткой на сахарозе. Другие пигменты выделялись из соответствующих объектов по методам, принятым в нашей лаборатории, с окончательной хроматографической очисткой на сахарозе. Синие зоны хромато-

граммы с чистым бактериохлорофиллом хранили в холодильнике в вакууме, по мере надобности пигмент элюировали свободным от перекисей эфиром. Агрегированные формы пигмента получали следующими методами: 1) испарением в вакууме растворов пигмента в эфире в стеклянных трубках Тунберга; 2) растворением хроматограмм пигментов на сахаре в водных буферных растворах; 3) выливанием ацетоновых и спиртовых растворов в воду и в водные буферные растворы.

Проведенные измерения позволили обнаружить, что все исследованные пигменты (хлорофилл а, бактериохлорофилл, бактериовиридин и протохлорофилл) обладают характерной флуоресценцией агрегированных форм, сдвинутой в длинноволновую область спектра по сравнению с обычной «мономерной» флуоресценцией этих пигментов в растворах. Опыты показали, что вид спектра флуоресценции существенно зависит от степени удаления активирующих примесей, в частности растворителя.

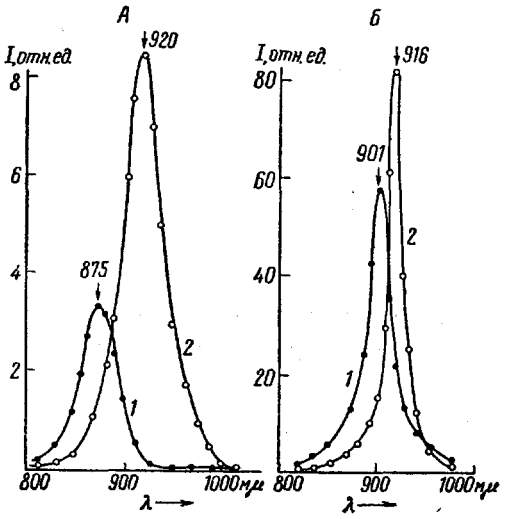


Рис. 1. Спектры флуоресценции бактериохлорофилла в твердой пленке (*А*) и в культуре Rhodopseudomonas palustris (*Б*) при + 20° (*1*) и — 196° (*2*)

Можно было подобрать такие условия откачивания, при которых спектр флуоресценции пленок при комнатной и низкой температурах был очень близок к спектру флуоресценции живых бактерий (в случае бактериохлорофилла и бактериовиридина) или зеленого листа (в случае хлорофилла). Более полное удаление растворителя в высоком вакууме (10^{-5}) при откачивании около часа на диффузионном масляном насосе вело к полному исчезновению флуоресценции мономерных форм, тогда как длинноволновая флуоресценция агрегированных форм сохранялась.

У бактериохлорофилла плотно упакованные квазикристаллические формы в пленках в условиях длительного откачивания обнаруживали очень слабую люминесценцию при 850—890 мμ при +20°. Замораживание пленок до —196° приводило к значительному увеличению интенсивности этой люминесценции и вызывало сдвиг максимума до 910—920 мμ (рис. 1). Адсорбаты бактериохлорофилла на сахарозе при +20° обнаруживали слабую флуоресценцию при 810 и 880 мμ. При замораживании их до —196° наблюдалось увеличение интенсивности и сдвиг максимумов люминесценции до 820 и 915 мμ соответственно. Коллоидные растворы бактериохлорофилла обладали максимумами флуоресценции около 800 мμ при +20° и при 810—815 мμ при —196°. Пленки бактериовиридина в условиях длительного откачивания давали слабую люминесценцию около 780—790 мμ при +20° и довольно интенсивную люминесценцию при 805—810 мμ при —196° (рис. 2). Коллоидные растворы бактериовиридина и его адсорбаты на сахарозе флуоресцировали в области 780—790 мμ при +20°, а при —196°— в области 780—800 мμ.

Твердые пленки хлорофилла а обладали характерным максимумом люминесценции при —196° около 740—750 мμ (рис. 3). В некоторых случаях (при неполной откачке растворителя) удалось получить спектры пленок хлорофилла, обладающие набором мономерных и агрегированных максимумов, очень близкие к спектрам флуоресценции листьев.

Интересно отметить, что максимум флуоресценции при 810—815 мμ, обычно наблюдаемый в листьях, присутствовал также в спектрах люминесценции таких пленок. Однако в отличие от листьев в разбавленных растворах хлорофилла в органических растворителях такого максимума обнаружить не удалось ([7]).

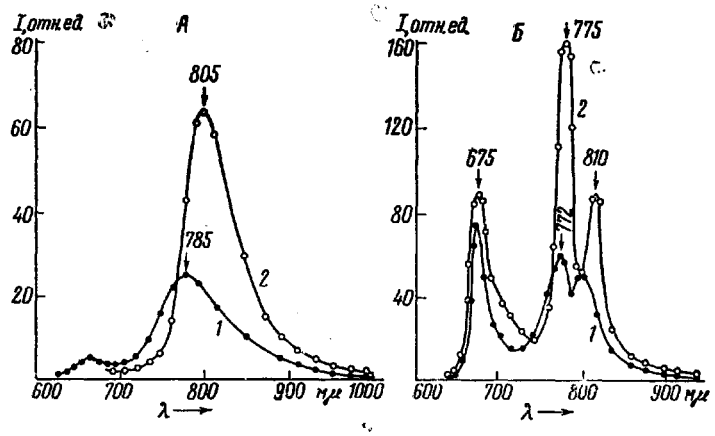


Рис. 2. Спектры флуоресценции твердой пленки бактериовиридина (*А*) и культуры зеленых бактерий Chlorobium (*Б*) при +20° (*1*) и —196° (*2*)

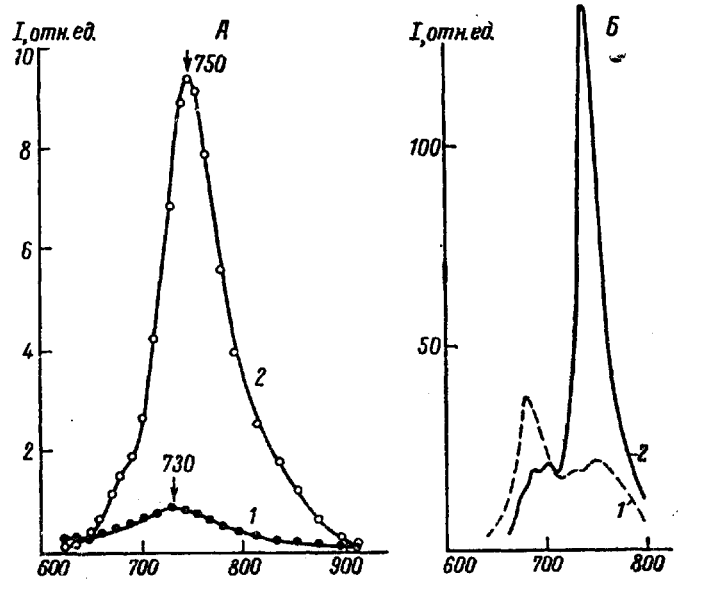


Рис. 3. Спектры флуоресценции пленки хлорофилла а (*А*) и листа фасоли (*Б*) при +20° (*1*) и —196° (*2*). Спектры флуоресценции листа взяты из работы ([5])

Присутствие максимума при 810—815 мμ в листе, вероятно, связано с особым типом агрегации молекул хлорофилла в гранах. Аналогичный максимум при 805—820 мμ наблюдался нами также в спектрах люминесценции живых зеленых бактерий, а также в пленках бактериовиридина, пигмента этих организмов. Третьего длинноволнового максимума флуоресценции в растворах бактериовиридина не обнаружено, так же как и у других пигментов: хлорофилла, бактериохлорофилла и протохлорофилла. Но этот максимум появляется при агрегации. Так, у пленок протохлорофилла (в ус-

ловиях неполного откачивания) наряду с основным максимумом флуоресценции агрегированной формы при 685 мμ и максимумами мономерной формы при 623—635 мμ наблюдался небольшой максимум при 760 мμ.

Мы уже обращали внимание на то, что влияние охлаждения на флуоресценцию пигментов может быть критерием агрегации ([5]). Можно предложить следующее объяснение усилению флуоресценции агрегированных форм пигментов при низкой температуре. Длительность жизни возбужденных состояний «мономерных» разобщенных друг от друга молекул пигмента определяется главным образом внутримолекулярными процессами дезактивации. Понижение температуры приводит к уменьшению населенности колебательных уровней в основном и возбужденном состояниях и к некоторому сужению и небольшому смещению полосы поглощения и люминесценции. В отличие от мономерных форм, в случае близко расположенных молекул в агрегированных структурах большое значение имеют процессы межмолекулярной дезактивации за счет взаимодействия и возможного перекрывания облаков π-электронов близкорасположенных молекул. Тепловое движение способствует «вхождению в контакт» соседних молекул, тогда как замораживание приводит к фиксации их положения и уменьшению влияния межмолекулярной инактивации возбужденных состояний. Таким образом, температурная зависимость люминесценции может служить весьма эффективным критерием оценки взаимодействия между молекулами в агрегированных структурах.

Проведенные исследования позволили установить, что определенные типы упаковок агрегированных структур бактериальных пигментов обнаруживают спектральные особенности, соответствующие их поведению в хроматофорах бактерий. На очереди установление структурных особенностей, способствующих появлению фотохимической активности этих состояний и особенностей их поведения в процессе фотосинтеза.

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

Поступило
28 IX 1961

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 117 (1952). [2] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, **92**, 1201 (1953). [3] E. E. Jacobs, A. E. Vatter, J. Holt, Arch. Biochem. and Biophys., **53**, 228 (1954). [4] S. S. Brody, Science, **128**, 838 (1958). [5] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева, ДАН, **135**, 1958 (1960). [6] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, И. Б. Федорович, ДАН, **134**, 1232 (1960). [7] Ф. Ф. Литвин, Диссертация, М., 1958. [8] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **227**, 913 (1959).

БИОФИЗИКА

Том VII, вып. 5 1962

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ СПЕКТРЫ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ И СОСТОЯНИЕ ХЛОРОФИЛЛА

Ф. Ф. ЛИТВИН, Г. Т. РИХИРЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биолого-почвенный факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Уже несколько десятилетий тому назад изучение спектров поглощения хлорофилла в гомогенатах листьев растений позволило В. Н. Любименко высказать мысль о существовании нескольких состояний хлорофилла в живой клетке [1]. На эту возможность указывали позднее и некоторые другие исследователи [2]. Т. Н. Годнев в опытах по экстрагированию пигмента водным ацетоном обнаружил, что прочность связи хлорофилла в пигмент-белковом комплексе различна у разных растений [3].

Систематические исследования, проводившиеся в лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР с 1946 г., позволили обосновать представления о существовании нескольких нативных форм хлорофилла и других пигментов. Эти представления вкратце можно свести к следующему.

1. В фотосинтезирующих организмах хлорофилл (и бактериохлорофилл) находится в нескольких формах, отличающихся положением максимума поглощения; в случае хлорофилла различаются формы, близкие к пигменту в растворе (максимум около 670 *ммк*), и формы, характеризующиеся более или менее значительным сдвигом спектра в длинноволновую сторону (максимум 680 *ммк*) [4; 5].

2. Существует определенная последовательность появления разных форм хлорофилла в процессе его образования: первыми появляются формы, поглощающие в более коротковолновой области; образование более «длинноволновых» форм связано с накоплением пигментов [5, 6].

3. Количественные соотношения форм различны у разных видов растений и зависят от условий выращивания [7].

4. Разные формы в различной мере устойчивы по отношению к действию разрушающих агентов (нагревание, действие растворителей и дезагрегирующих веществ). Воздействие этих факторов приводит к увеличению относительного количества форм с коротковолновым поглощением [8].

5. «Коротковолновые» формы пигмента отличаются большей фотохимической активностью и флуоресценцией («рабочие», «активные» формы) по сравнению с «длинноволновыми» формами [9].

6. Сопоставление свойств нативных форм со свойствами агрегированного хлорофилла в модельных системах дало основание считать, что формы с более коротковолновыми максимумами являются мономерными в противоположность длинноволновым агрегированным формам пигмента. Представления об агрегационной природе различий нативных форм хлорофилла не исключают существенной роли связи пигмента с липопротеидами [5—10]. Спектральные свойства изолированных пигментбелковых комплексов были исследованы в работах Смита [11—13].

Если несколько лет тому назад сам факт существования двух форм хлорофилла in vivo мог вызывать сомнения [14], то исследования последнего времени, осуществленные уже на целых, неповрежденных клетках, не только подтвердили ранее полученные данные, но и дали начало новому развитию проблемы. Так, например, удалось обнаружить несколько максимумов в красной и ближней инфракрасной области спектра водоросли филлофоры, принадлежащих разным нативным формам пигмента [15]. Исследуя флуоресценцию листьев, Френч и сотр. установили, что накопление хлорофилла сопровождается смещением максимума флуоресценции в длинноволновую область [16, 17].

Прижизненные исследования поглощения и низкотемпературной флуоресценции этиолированных листьев в процессе их зеленения [18; 19] дали возможность выявить целую цепь взаимопревращающихся форм хлорофилла и его предшественника, тогда как ранее, при исследовании гомогенатов, удавалось обнаружить лишь отдельные звенья этой цепи [5; 6; 12; 13]. Взаимопревращения форм хлорофилла (Chl) и его предшественника (PChl) в зеленеющих листьях можно изобразить в следующем виде:

$$PChl^{630}_{633} \rightleftarrows PChl^{650}_{655} \xrightarrow{h\nu} Chl^{684}_{690} \rightarrow Chl^{673}_{675} \rightarrow Chl^{677}_{686}$$

(цифры сверху указывают положение максимумов поглощения [18], а внизу — максимумов низкотемпературной флуоресценции [19]). Сопоставление спектральных данных с результатами исследований других авторов [20—22] указывает на то, что активная форма предшественника $PChl_{655}$ и первая форма хлорофилла Chl_{690} представлены безфитольными пигментами (протохлорофиллид и хлорофиллид).

В более поздней работе было установлено, что постоянный синтез хлорофилла во взрослом листе осуществляется через те же формы предшественника, что и в этиолированных листьях [23]. Это было подтверждено в работах Виргина и Шлыка, которым удалось обнаружить образование и превращение протохлорофиллида в зеленых листьях растений [24; 25]. Разработка Френчем метода производной спектроскопии [26—28] дала возможность не только обнаружить в интактных клетках формы хлорофилла, известные по спектрам гомогенатов, но и систематически исследовать разнообразие нативных форм пигментов у большого числа водорослей (формы «673», «683», «695»).

Применение методики глубокого охлаждения оказалось особенно плодотворным для изучения длинноволновых форм хлорофилла, начинающих хорошо флуоресцировать только при низкой температуре. При исследовании темно-зеленых листьев при —150° нами было отмечено появление длинноволновой полосы поглощения около 690—696 *ммк* [9, 33]. В работе Броди было обнаружено появление нового максимума флуоресценции около 720 *ммк* в спектре хлореллы при —196°; автор также пришел к выводу о том, что длинноволновый максимум принадлежит агрегированной форме хлорофилла [29]. На основании своих исследований [29—31] Броди выдвинул представления, согласно которым агрегированная форма является димером хлорофилла. (Ранее мысль о существовании димеров хлорофилла in vivo была высказана Лаворелем [32].) В наших исследованиях низкотемпературной флуоресценции листьев растений выявлена сложная структура спектров в красной и инфракрасной области, указывающая на существование не одной, а нескольких длинноволновых форм хлорофилла [23; 33; 34].

Новые данные о спектральных свойствах нативных форм хлорофилла были получены при измерении тонкой структуры спектров поглощения, при исследовании низкотемпературных спектров листьев и суспензий водорослей [34—36].

Наиболее важной стороной проблемы состояния хлорофилла следует считать вопрос о функциональной роли тех форм, которые удается наблюдать в живой клетке. В настоящее время появился целый ряд исследований, благодаря которым вопрос о функциональной роли разных форм приобретает новое освещение, а сама проблема множественности состояний хлорофилла in vivo становиться одной из центральных проблем механизма фотосинтеза. Несмотря на различие в подходах и методах, наиболее общим итогом этих исследований можно считать положения о том, что разные пигменты и различные формы хлорофилла осуществляют различные фотохимические реакции фотосинтеза [37; 38]. Становится ясным, что расшифровка сложного механизма фотосинтеза невозможна без выяснения породы разных форм пигментов, ответственных за эти реакции и взаимодействующих друг с другом.

Ниже приводятся результаты наших исследований нативных форм хлорофилла по низкотемпературным спектрам поглощения и флуоресценции листьев растений, их гомогенатов и суспензий водорослей. Некоторые из этих результатов в кратком виде были описаны нами ранее [33; 34, 39].

Экспериментальная часть

Исследования низкотемпературных спектров показали, что спектры люминесценции листьев простираются от ультрафиолетовой до инфракрасной области и имеют весьма сложную структуру (рис. 1).

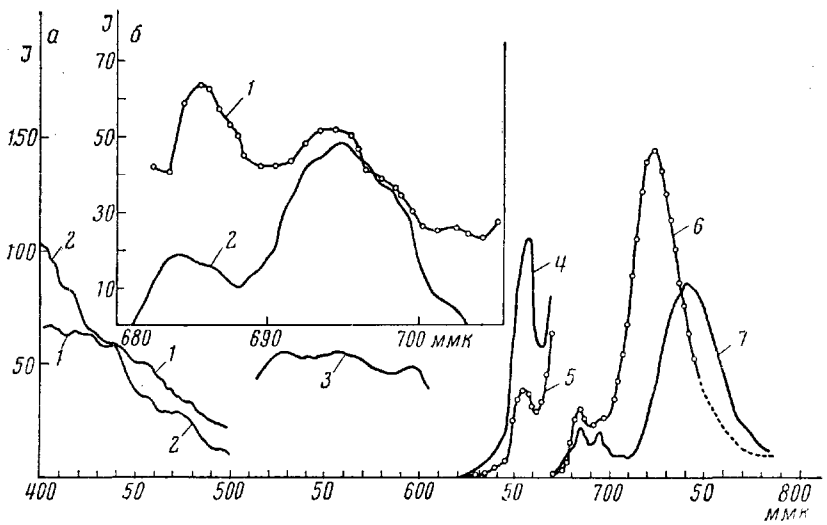


Рис. 1. Низкотемпературные спектры люминесценции листьев растений и суспензии водорослей.

а — спектры листьев фасоли и суспензии хлореллы в области 400—800 *ммк* [19; 23; 33]: *1* — зеленый лист, —150°; *2* — этиолированный лист, —150°; *3* — микрофотограмма спектра зеленого листа, —150°; *4* — зеленый лист, затемнявшийся в течение 48 час., —196°; *5* — то же + 5 минут освещения; *6* — зеленый лист, —196°; *7* — суспензия хлореллы при —196°.

б — тонкая структура спектров в области 680—700 *ммк* при —196° С: *1* — людвигия; *2* — сахарная свекла

Коротковолновая люминесценция. В области 400—500 *ммк* спектр люминесценции листьев имеет несколько слабо выраженных максимумов; некоторые из них можно идентифицировать как максимум пиридиннуклеотидов в свободной (460 *ммк*) и связанной с апоферментом (435 *ммк*) форме и максимум флавинов. Основной максимум люминесценции лежит в ультрафиолетовой области (<400 *ммк*) [33]. На

спектрах возбуждения коротковолновой люминесценции (см. рис. 2, кривые *1—3*) видны отчетливые максимумы в области 310—650 *ммк*, принадлежащие, по-видимому, пиридиннуклеотидам, и максимумы, характерные для спектров возбуждения люминесценции белков 220—230 *ммк* и 270—290 *ммк* [40]. Люминесценция листьев, возбуждаемая в максимумах поглощения белка обусловлена не только флуоресценцией, но и послесвечением, наблюдаемым даже при комнатной температуре,

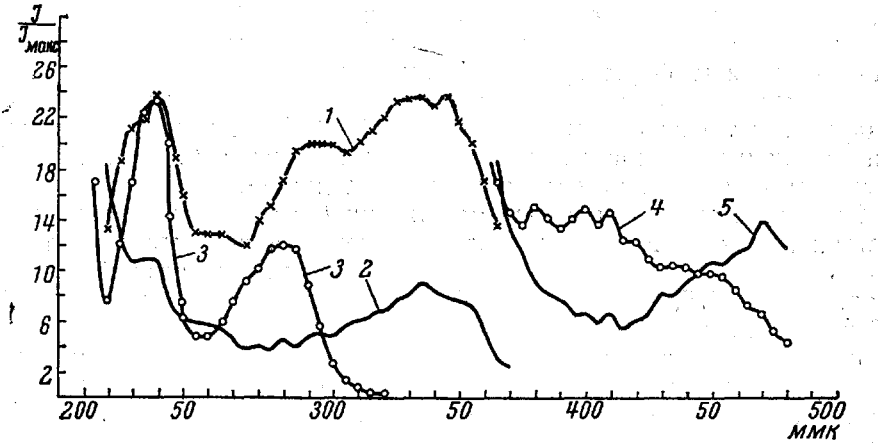


Рис. 2. Спектры возбуждения люминесценции и послесвечения листьев растений.

1—для люминесценции в области 400—600 *ммк* при 20°; *2*—то же при —150°; *3*—для послесвечения (1 сек. после освещения) при —150°; *4* — люминесценции в области 500—600 *ммк* при 20° С; *5* — то же при —150°

тогда как растворы белка обладают способностью к послесвечению только при замораживании. Сложная структура спектров люминесценции и ее возбуждения объясняется, по-видимому, флуоресценцией (помимо указанных веществ) нескольких дополнительных, пока еще не идентифицированных соединений (в области около 400 *ммк* флуоресцируют вещества клеточных оболочек).

Люминесценция в области 500—600 ммк. Интерпретация спектров слабой люминесценции в средней области с максимумами при 530—535, 550—560 и 590—600 *ммк* (рис. 1) представляет собой еще более трудную задачу [33]. Интересная возможность появления коротковолновой люминесценции хлорофилла, соответствующей переходу со второго (более высокого) электронного уровня, не подтверждается экспериментальными данными. Спектр возбуждения люминесценции в области 386—480 *ммк* (см. рис. 2) не характерен и трудно сопоставим с кривой поглощения хлорофиллов in vivo. Другая возможность, не менее интересная и, по-видимому, более реальная — интерпретировать указанную люминесценцию как флуоресценцию фотовосстановленных форм хлорофилла в живой клетке [33]. Сходство спектра люминесценции листьев в этой области со спектром фотовосстановленных форм хлорофилла в растворе (максимумы при 525, 575, 595, 640 *ммк*) и форма кривой спектра возбуждения делают такое сопоставление особенно заманчивым. Не исключено, что ряд максимумов в этой области может принадлежать флавиновым соединениям, или порфиринам, включающимся в цепь биосинтеза хлорофилла.

Люминесценция в красной области спектра (600—680 ммк). Коротковолновую часть этой области можно с полным основанием считать областью люминесценции предшественников хлорофилла и тех его «молодых» форм, которые первыми образуются в процессе биосинтеза. В спектре зеленых листьев, выдержанных в темноте, обнаруживаются

максимумы 655 и 633 *ммк*, быстро уменьшающиеся при освещении (см. рис. 1, кривые *4*, *5*). Сопоставление со спектрами этиолированных листьев [19] позволило сделать вывод о том, что быстропревращающаяся форма 655 является комплексом протохлорофиллида с белком, а менее активная (633 *ммк*) принадлежит протохлорофиллу и «неактивному» протохлорофиллиду, возможно не связанному с носителем. Близкие по положению максимумы (630, 640 и 655 *ммк*) были обнаружены и в спектре выдержанной в темноте хлореллы, биосинтез пигмента в которой отличается от синтеза в листьях растений (рис. 1). Некоторые особенности дифференциального спектра хлореллы, возможно, связаны с превращением форм предшественника при освещении. В низкотемпературных спектрах темно-зеленых листьев и суспензии хлореллы были обнаружены также слабые максимумы (648, 660), которые, возможно, принадлежат иным пигментам порфиринового типа (в частности, феофитинам) или неизвестным формам хлорофилла[1].

Исходя из общности механизма биосинтеза в зеленеющих и зеленых листьях [23], естественно ожидать появления в зеленых листьях всей цепи форм хлорофилла, характерных для начальных стадий зеленения (формы 690, 675, 680 *ммк*). Действительно, максимумы около 675 и 680 *ммк* видны в области основного максимума зеленых листьев (рис. 3). Можно полагать, что максимумы 675 и 680 *ммк* соответствуют формам хлорофилла, известным по исследованиям спектров поглощения гомогенатов листьев и водорослей (673, 678 *ммк*). Характерный максимум (690 *ммк*) самой первой формы хлорофилла (хлорофиллида) казалось естественным сопоставить с аналогичным максимумом в зеленых листьях 693—696 *ммк* (рис. 3). Однако тот факт, что пока не удалось установить изменения максимума 693—696 *ммк* при затемнении взрослых растений, и его сравнительно большая величина указывают на то, что он имеет иное происхождение и обусловлен особой формой хлорофилла. (Возможно, что флуоресценция хлорофиллида, присутствующего в незначительных концентрациях в зеленых листьях [24; 25], маскируется флуоресценцией этой формы.)

Одним из существенных вопросов, возникающих при исследовании низкотемпературных спектров, является вопрос о том, не приводит ли глубокое охлаждение к нарушению естественного состояния биологического объекта и появлению артефактов. На рис. 3 приведен спектр флуоресценции листа фасоли при комнатной температуре, измеренный при минимальной ширине щели. Сопоставление кривой *1* с другими кривыми рис. 3 показывает, что характерная структура низкотемпературного спектра существует и при комнатной температуре. Таким образом, охлаждение не нарушает естественного состояния пигментов зеленого листа, а вызывает лишь увеличение квантового выхода люминесценции некоторых форм и делает более резкой структуру спектров.

Характерные черты низкотемпературных спектров являются, по-видимому, общими для разных видов высших растений и для водорослей (см. рис. 3). Однако точное положение максимумов и их соотношение различно у разных видов. Это относится не только к соотношению основных максимумов (на величине которых может сказаться изменение реабсорбции флуоресценции), но и к форме кривых в длинноволновой области (соотношение максимумов 730, 740 и 750 *ммк*). В спектре водорослей основной длинноволновый максимум сдвинут в коротковолновую сторону по сравнению со спектром листьев. Некоторые различия в структуре спектров, возможно, являются видовыми (максимум в области 690—700 *ммк* особенно интенсивен у листьев сахарной свеклы, см. кривые на рис. 1*б*, 3*а*, 3*б*).

[1] Следует упомянуть также, что в области 640 *ммк* имеется максимум в спектре флуоресценции фотовосстановленного хлорофилла в растворе.

Действие нагревания и растворителей приводит к резкому изменению спектров люминесценции — и прежде всего к падению интенсивности люминесценции в длинноволновой области (см. рис. 4). Обращает на себя внимание тот факт, что при таком воздействии изменяется не только соотношение коротковолновой и длинноволновой люминесценции (682/740 *ммк*), но и вся структура спектра. При нагревании особенно заметно уменьшается максимум 695 *ммк*, а в длинноволновой области — максимум 740 *ммк* (максимум 730 *ммк* сохраняется лучше, что приводит к уширению и смещению спектра в коротковолновую сторону). Мак-

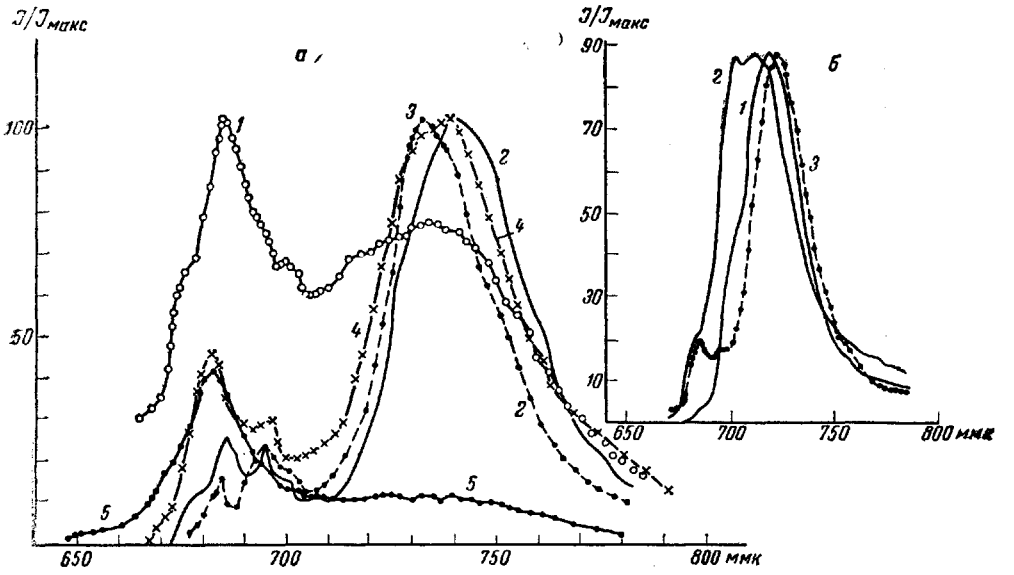


Рис. 3. Низкотемпературные спектры люминесценции листьев растений и водорослей в области 650—800 *ммк*.

а — спектры листьев растений: *1* — фасоль при 20°; *2* — то же при —196°; *3* — сахарная свекла при —196°. *4* — гомогенат листьев фасоли при —196° (толщина слоя 15 *мк*); *5* — то же при 20°
б — спектры водорослей при —196°: *1* — суспензия Scenedesmus; *2* — то же после добавления глицерина; *3* — суспензия хлореллы (толщина слоя 4 *мм*)

симум 695 *ммк* также наиболее чувствителен и к действию пиридина и ацетона. Как видно из рис. 4, в спектре более высокодисперсной фракции гомогената листьев значительно более выражена коротковолновая люминесценция; спектр осадка значительно ближе к исходному спектру гомогената (квантовый выход люминесценции осадка значительно ниже). Таким образом, формы, люминесцирующие в длинноволновой области, по-видимому, связаны с частицами больших размеров. (Следует, однако, учесть возможность частичного разрушения структур при центрифугировании и образования хлорофиллида из-за действия хлорофиллазы).

Для выяснения вопроса о природе люминесцирующих нативных форм хлорофилла представляют интерес попытки получить аналогичные спектры хлорофилла вне живой структуры. В работах Броди [29, 30] в качестве такой аналогии приводились низкотемпературные спектры флуоресценции концентрированных растворов хлорофилла [29]. Однако эти спектры не имели тонкой структуры, характерной для спектров хлорофилла in vivo. На рис. 4 представлен спектр флуоресценции концентрированного раствора хлорофилла (*a*+*b*) при —196°, который, как видно из рисунка, удивительно сходен с низкотемпературным спектром листьев не только по соотношению интенсивностей главных максимумов, но и по тонкой структуре (раздвоение коротковолнового и длинноволно-

вого максимумов, «плечи» на склоне длинноволнового максимума и т. д.). Однако весь спектр несколько сдвинут в длинноволновую сторону. Сложность структуры спектра хлорофилла в растворе объясняется, по-видимому, существованием нескольких типов агрегированного хлорофилла в растворе (мономеры, полимеры, различной величины микрокристаллы). Этот вывод подтверждается постепенным ростом длинноволнового максимума и изменением структуры при увеличении концентрации хлорофилла. При агрегации коллоидных растворов хлорофилла

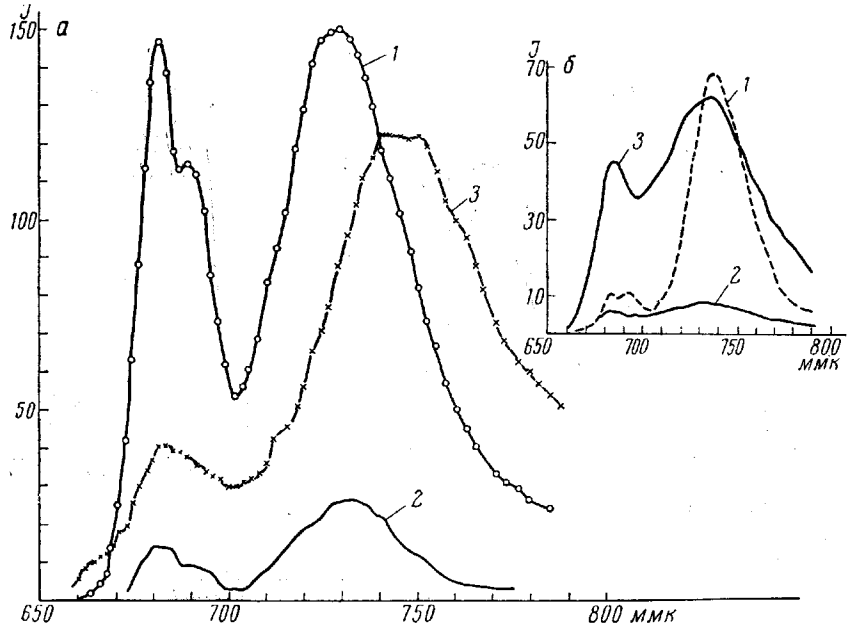


Рис. 4. Изменение низкотемпературных спектров люминесценции при различных воздействиях.

а — спектры гомогенатов листьев фасоли и раствора хлорофилла: *1* — надосадочная жидкость (гомогенат центрифугировали при 25 000 *об/мин.*, слой 15 *мк*); *2* — осадок, условия и оптическая плотность те же; *3* — спектры люминесценции концентрированного раствора хлорофилла *a*+*b* ($5{,}5 \cdot 10^{-3}$ *М*), слой 15 *мк*, —196°.
б — действие нагревания: *1* — зеленый лист фасоли; *2* — то же после нагревания в течение 5 мин. при 100°С; *3* — то же, масштаб увеличен в 8 раз

(водно-спиртовые смеси) нами также получены спектры с преобладанием максимумов в длинноволновой области. Положение максимумов (730 и 740 *ммк*) было ближе к их положению в спектрах листьев. При добавлении детергентов к таким растворам появлялся максимум мономерной формы.

Характерные черты низкотемпературного спектра длинноволновых форм хлорофилла появляются в течение первых суток зеленения листьев. Этот процесс идет параллельно увеличению концентрации хлорофилла [34]. На рис. 5 видно, что в первые часы зеленения обнаруживается максимум около 740 *ммк*, а затем в результате темнового процесса возникает максимум около 730 *ммк*. Эти процессы, по-видимому, объясняют вариации в структуре двойного максимума 730—740 *ммк* и в темно-зеленых листьях. В спектрах зеленеющих листьев особенно хорошо проявляется наличие многих максимумов как в длинноволновой, так и в коротковолновой области — 675, 682, 686, 696, 700—705, 710, 730, 740, 760 *ммк* (рис. 5).

Изменение интенсивности люминесценции под действием света при —196°. Как видно из рис. 6 при 20° наблюдаются значительные обратимые изменения интенсивности флуоресценции под действием возбуж-

дающего света. При низкой температуре изменения менее выражены, а обратный процесс значительно замедлен. Возможно, что изменения при низкой температуре связаны с обратимыми превращениями самой молекулы пигмента. Пока трудно установить, насколько реальны различия в кинетике фотовыцветания в различных максимумах, однако самая коротковолновая форма выцветает наиболее значительно (на 30—35%), а форма 730 *ммк*, по-видимому, более устойчива (выцветание на 15—20%) (см. рис. 6*а*).

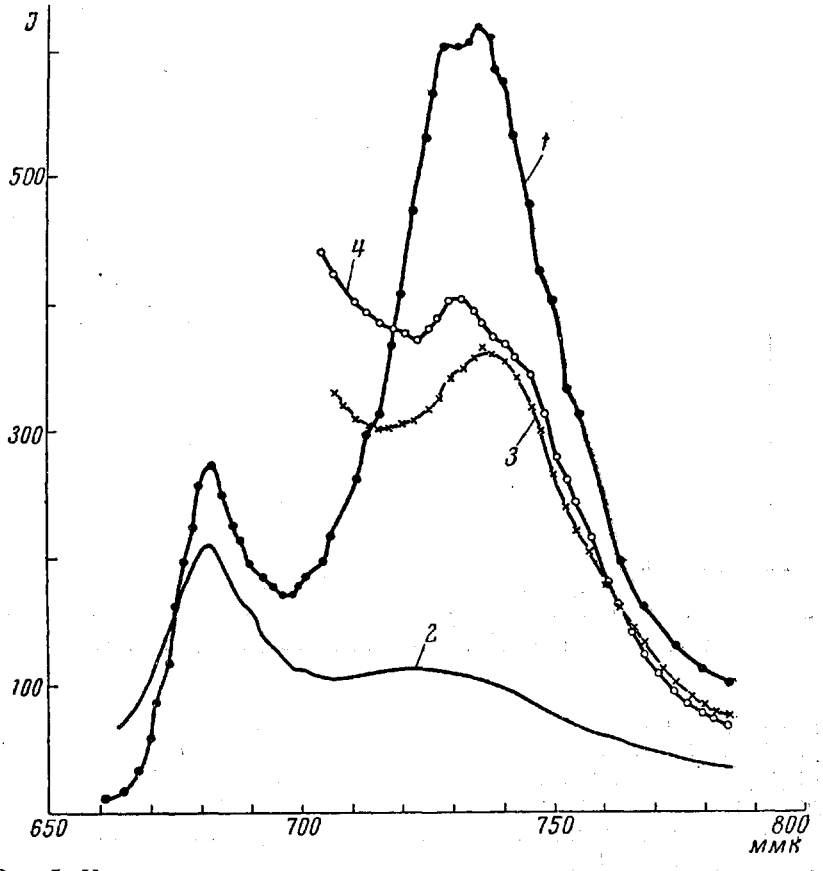


Рис. 5. Изменение низкотемпературных спектров люминесценции листьев в процессе накопления хлорофилла.

1 — этиолированный лист, освещавшийся 24 час.; *2* — то же, 9 час. освещения; *3* — этиолированный лист, 4,5 час. освещения; *4* — то же + 1,5 час. в темноте

Низкотемпературные спектры поглощения листьев и гомогенатов. Спектры измеряли на спектрофотометре со сферой Ульбрихта (СФ-2 *М*) при —196°. Использовали растения, выращенные под люминесцентными лампами и при естественном освещении. Как видно из приведенных спектров [2], глубокое охлаждение вызывает следующие изменения спектров поглощения (рис. 7): сдвиг спектра в коротковолновую сторону (на 40—60 $см^{-1}$ в красной и до 100—120 $см^{-1}$ в синей области); 2) сужение полос поглощения, в связи с чем максимумы становятся более резкими; 3) появление дополнительной структуры в длинноволновой области (710, 730, 740—750 *ммк*) и усиление максимума 650 *ммк*. Максимумы в длинноволновой области варьируют по величине и форме у листьев разного возраста и у разных видов растений. Наиболее отчетливо вы-

[2] В исследовании спектров поглощения принимал участие В. Е. Барский.

является максимум 710 *ммк*, который, по-видимому, аналогичен максимуму, обнаруженному Батлером [35]. Максимумы 740—750 *ммк* [38] не всегда достаточно хорошо воспроизводятся из опыта в опыт.

Особенности низкотемпературных спектров листьев свойственны и гомогенатам листьев (при 0° в фосфатном буфере), однако они исчезают при хранении гомогената и при изменении pH до 5.

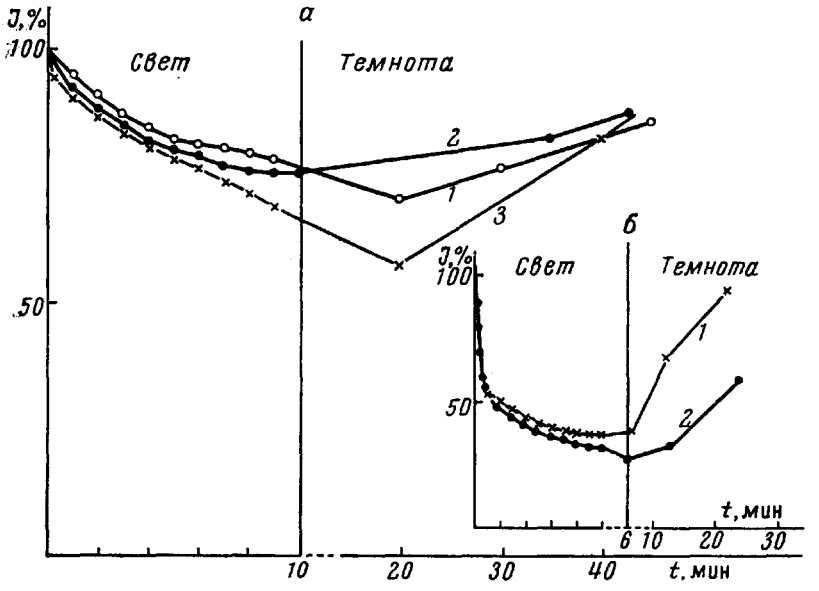


Рис. 6. Изменение интенсивности люминесценции листьев под действием возбуждающего света (380—580 *ммк*).

а — зеленые листья фасоли при —196°: *1* — в максимуме 730 *ммк*; *2* — в максимуме 695 *ммк*; *3* — при 685 *ммк*.

б — то же при 20° С: *1* — в максимуме 730 *ммк*; *2* — при 685 *ммк*

Кратковременное нагревание и действие 5%-ного раствора пиридина приводят к исчезновению максимумов при 710, 730 *ммк* и одновременному уменьшению поглощения при 650 *ммк*. При добавлении 2% пиридина в гомогенаты также наблюдается падение поглощения при 650 и 710 *ммк* и выравнивание спектральной кривой в самой длинноволновой области (рис. 8).

Обсуждение

Наиболее вероятную интерпретацию полученных выше данных можно изложить в виде следующих основных положений.

1) Сложность структуры спектров флуоресценции может быть связана с наличием структуры в спектре одной или двух форм хлорофилла. Охлаждение до —196° может приводить к обострению максимумов тонкой структуры, подобно тому, как это происходит в парафиновых растворах порфиринов («эффект Шпольского») [41]. Кроме того, сложная структура низкотемпературных спектров может быть обусловлена набором длинноволновых форм хлорофилла с максимумами 682, 693—696, 705, 710, 735, 740, 760, 780 и 810 *ммк*. В пользу этого свидетельствует неравномерность изменения интенсивности флуоресценции по спектру при воздействии разрушающих агентов (рис. 4 и 8) и света (рис. 6) и спектральные изменения в области 730—740 *ммк* в процессе накопления хлорофилла (рис. 5). Возможно что различные соотношения разных форм пигмента определяют и вариации в структуре спектров разных видов растений (рис. 3). Точное доказательство существования

набора длинноволновых форм хлорофилла, очевидно, можно будет получить при исследовании спектров возбуждения низкотемпературной флуоресценции (выделяя отдельные компоненты спектра люминесценции), зависимости структуры спектра от длины волны возбуждающего света [3] и из опытов по фотовыцветанию длинноволновых форм.

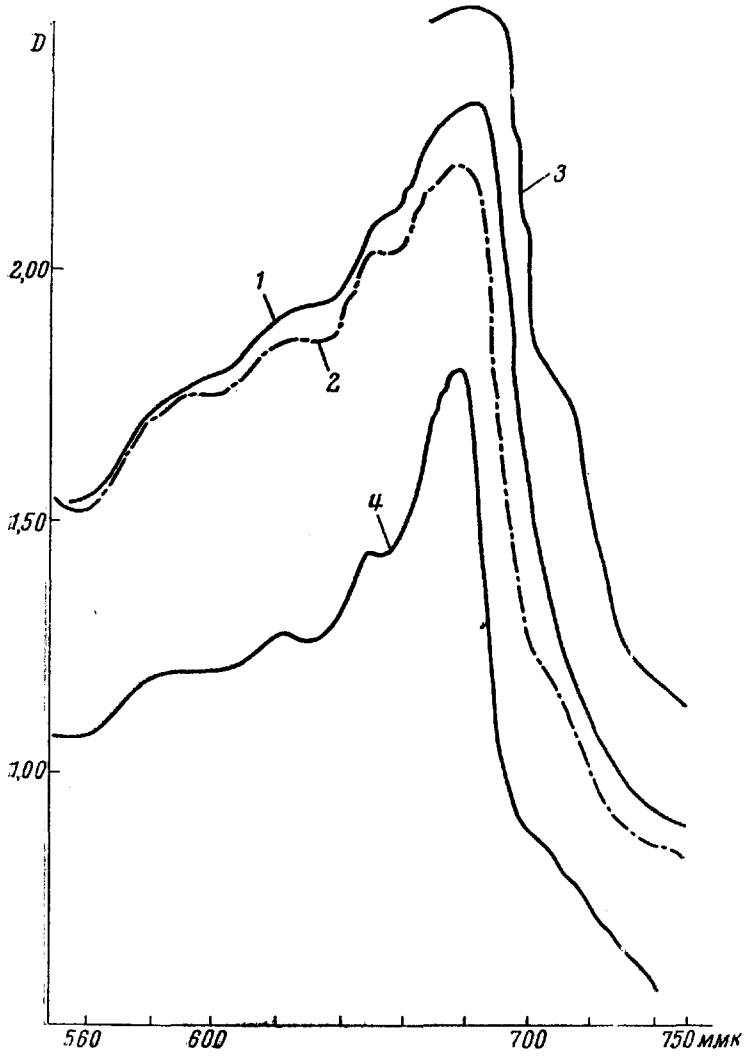


Рис. 7. Спектры поглощения листьев растений при —196°.
1 — фасоль при 20°; *2* — то же при —196°; *3* — то же при двойном слое листьев; *4* — лист огурца при —196°

2. Наиболее вероятное объяснение природы разных форм хлорофилла может быть основано на ранее высказанных представлениях [4; 5; 34], согласно которым «длинноволновые» формы хлорофилла — это агрегированные формы пигмента. В пользу этого говорят следующие факты. Положение спектра, соотношение максимумов люминесценции и даже структура спектра in vivo сходны с соответствующими чертами спектра агрегированного хлорофилла в растворе (ср. рис. 4, кривая *3* и

[3] Предварительные данные показывают, что такая зависимость действительно существует.

рис. 3). Существует параллелизм между увеличением концентрации пигмента в листе и появлением максимумов длинноволновых форм (см. [34] и рис. 5). Факторы, действие которых можно считать дезагрегирующим [4; 8], вызывают резкое падение интенсивности флуоресценции длинноволновых форм и усиление коротковолновой люминесценции

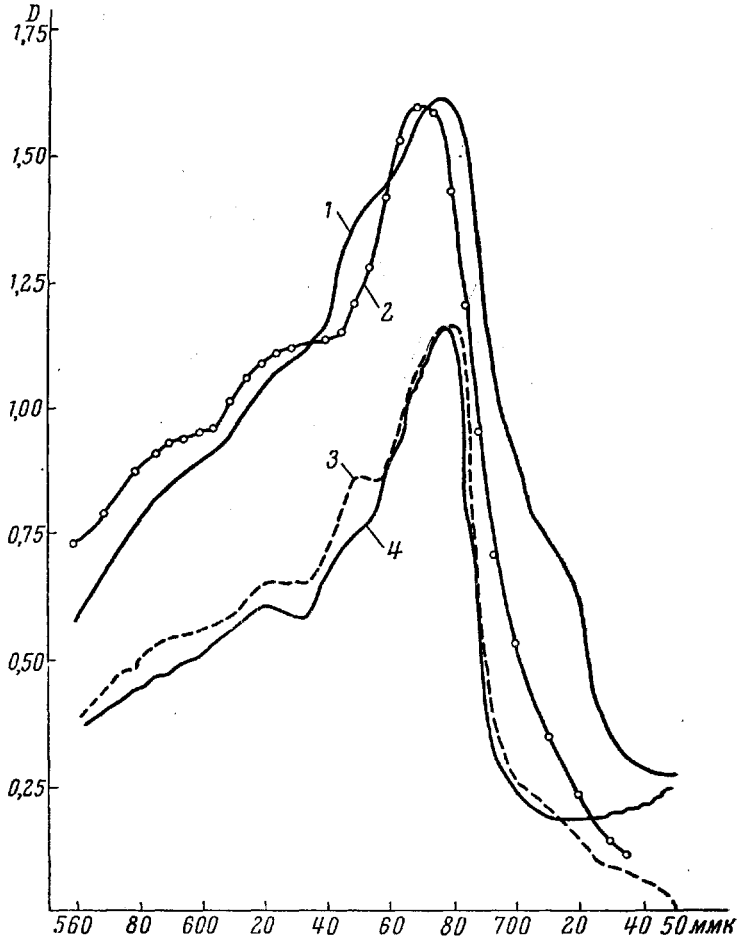


Рис. 8. Действие нагревания и пиридина на спектры поглощения листьев фасоли и их гомогенатов при —196° С.

1 — спектр листа при — 196°; *2* — то же после предварительного нагревания листа (5 мин., 100°); *3* — гомогенат при —196°; *4* — то же + 3% пиридина

(рис. 4, *б*). Для флуоресценции длинноволновых форм характерно резкое увеличение интенсивности при понижении температуры [29; 30] (см. также рис. 3, *а*).

3. Факты, свидетельствующие о существовании нескольких длинноволновых форм хлорофилла, не укладываются в рамки представлений о существовании лишь одной (димерной) агрегированной формы хлорофилла [29, 30]. Целесообразно рассмотреть возможность существования нескольких агрегированных форм in vivo, отличающихся типом агрегации (плотностью упаковки, различным характером взаимной ориентации молекул, величиной агрегатов и т. д.). В модельной системе аналогичное явление имеет место в случае спектра концентрированного раствора хлорофилла (см. рис. 4, *а*), структура которого определяется, вероятно, целым набором форм (мономерная, димерная, агрегаты и мик-

рокристаллы разной величины). Появление в спектре поглощения клеток максимумов, сдвинутых далеко в длинноволновую область (710, 730—740 *ммк*), указывает на то, что некоторая часть пигмента может существовать в виде довольно крупных агрегатов [48]. Этим максимумам, по-видимому, соответствует ряд максимумов в спектре флуоресценции: 730—740, 760, 810 *ммк* (рис. 3).

4. Суждения о конкретном строении агрегатов нативных форм хлорофилла, основанные на прямом сопоставлении спектральных свойств этих форм со свойствами агрегированного пигмента in vitro [30], нельзя считать достаточно обоснованными. На свойствах нативных форм не может не сказываться наличие организованной структуры хлоропласта и связь пигмента с белково-липоидным комплексом. На влияние такой связи указывают значительные изменения ранних форм хлорофилла (и протохлорофилла) в зеленеющих листьях растений с низким содержанием пигментов при действии нагревания и растворителей (сдвиги 655→633, 690→680 и 690→635 *ммк* [42]). Возможно, что связь пигмента с белком определяет вариации структуры спектров в пределах одного вида и у разных систематических групп (см. рис. 3). Можно предположить, что разные агрегированные формы отличаются и по типу белково-липоидного носителя (связаны с разными белками).

5. Целый ряд данных указывает, что представления об агрегационной природе различий форм хлорофилла в клетке не могут полностью объяснить все имеющиеся экспериментальные данные. Это прежде всего относится к формам хлорофилла и его предшественника в этиолированном и зеленеющем листе. Значительные различия в положении максимумов разных форм предшественника (633 и 655 *ммк*) и хлорофилла (690, 675, 680 *ммк*) [19] трудно объяснить агрегацией пигмента в силу его чрезвычайно низкой концентрации и некоторых характерных свойств указанных форм. Так, например, взаимопревращения этих форм, сопровождающиеся смещением спектра как в длинноволновую, так и в коротковолновую сторону (690→675→680 *ммк*), происходят на фоне одинаково низкой и постоянной концентрации пигмента. Длинноволновые формы в зеленеющем листе (в частности, форма 690 *ммк*), как показали наши измерения, хорошо флуоресцируют и при комнатной температуре. Известно, что формы 633, 675 и 680 *ммк* представлены фитольными пигментами (протохлорофиллом и хлорофиллом), а формы 655 и 690 *ммк* — их бесфитольными аналогами; при этом существенно, что в растворе сами по себе фитольные и безфитольные пигменты не отличаются по своим спектрам в видимой области. Таким образом, можно полагать, что наличие связи пигмента с белково-липоидным носителем приводит к появлению значительных спектральных различий химически близких пигментов.

6. Сопоставление результатов исследований по действию агентов, нарушающих естественное состояние пигмента в этиолированных и зеленеющих листьях с аналогичными опытами на зеленых листьях (см. рис. 3, *б*), наводит на мысль о том, что и в случае нативных форм «взрослого» листа аналогичные изменения не сводятся только к дезагрегации, а могут быть вызваны воздействием либо непосредственно на молекулы пигмента, либо на пигмент-белково-липоидный комплекс. Возможно, что и сами спектральные различия некоторых длинноволновых форм пигмента могут быть объяснены различием химической структуры молекулы пигмента или пигмент-белкового комплекса в целом. Значительная величина длинноволнового смещения спектра (вплоть до 800 *ммк*) указывает на то, что химические изменения (если они существуют) должны затрагивать непосредственно хромофорную часть молекулы пигмента (аналогичные по величине смещения спектра наблюдаются, как известно, в ряду протохлорофилл (630 *ммк*) — хлорофилл (670 *ммк*) — бактериохлорофилл (800 *ммк*), где они обусловлены по-

следовательным гидрированием «полуизолированных» двойных связей [43]). Лабильные химические изменения пигмента (гидрирование?) могут быть стабилизированы в естественных условиях при наличии связи пигмента с белком, тогда как при нарушении этих условий (нагревание, экстрагирование) происходит превращение их в более устойчивую форму со спектром, характерным для растворенного пигмента [4].

Вопрос о химической вариабильности хлорофилла почти не исследован. В связи с этим следует упомянуть также известные по работам Кока изменения спектров поглощения в области 700 и 650 *ммк*, интерпретируемые как окислительно-восстановительные превращения особого гипотетического пигмента $П_{700}$ [44]. Исследования спектров действия фототропизма указывают на существование двух химически различных форм пигмента, ответственных за этот процесс и поглощающих в области 730 и 650 *ммк*. В низкотемпературных спектрах поглощения листьев именно в этой области (650 и 730—740 *ммк*) обнаруживаются заметные изменения при действии пиридина и нагревания; эти изменения исчезают при стоянии гомогенатов на воздухе. Возможно, эти максимумы соответствуют двум взаимопревращающимся типам хлорофилла. Длинноволновым («кристаллическим») формам хлорофилла отводилось особое важное место в гипотетических построениях относительно полупроводникового механизма первичного акта фотосинтеза [45; 46]. В наших опытах по исследованию свечения фотовосстановленного хлорофилла в растворе, а также свечения пленок пигментов и хлоропластов [47] было показано, что как послесвечение, так и термолюминесценция хлорофилла объясняются не запасанием энергии в полупроводниковых ловушках, а хемилюминесценцией фотопродуктов хлорофилла (в частности, его фотовосстановленных форм). Можно предположить что самые длинноволновые формы пигмента (со спектром в области 696—812 *ммк*) выполняют химически специфичные функции в процессах фотосинтеза подобно тому, что обнаружено для более коротковолновых форм [37; 38]. В пользу такого предположения свидетельствует существование не только положительных, но и отрицательных эффектов изменения выхода фотосинтеза в этой области спектра, известных по работам Рабиновича [38 и сотр.].

Допущение существования химически различающихся нативных форм пигмента не исключает роли агрегационных различий. Высокая концентрация пигмента в хлоропласте должна привести к тесному энергетическому взаимодействию хлорофиллов и обеспечить функционирование такого механизма как миграция экситона [48] и, возможно, передачу «дырки» или электрона [49] между разными формами пигмента. При этом разные агрегированные формы могут быть связаны с разными типами белков и занимать различное положение в структуре гранулы. В свою очередь, химические различия некоторых форм могут обусловливать различия функций пигмента при участии в разных реакциях фотосинтеза.

Поступила в редакцию
28.III.1962

ЛИТЕРАТУРА

1. Любименко В. Н., Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, М., 1935.
2. Seybold A., Egle K., Botan. Arch. **41**, 578, 1940.
3. Годнев Т. Н. Строение хлорофилла и возможные пути его образования в растении. Изд. АН СССР, М.— Л., 1947.
4. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР **63**, 163, 1948.
5. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **177**, 1952; **91**, 340, 1953.

[4] В связи с этим особый интерес представляет изменение формы хлорофилла 690 (в зеленеющих листьях), которая при нагревании частично превращается в форму с максимумом около 636 *ммк* (максимум, свойственный формам протохлорофилла [42]).

6. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. Биохимия **19**, 37, 1954.
7. Красновский А. А., Воробьева Л. М., Пакшина Е. В., Физиол. раст. **4**, 124, 1957.
8. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953.
9. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Биохимия **21**, 126, 1956.
10. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Докл. АН СССР **104**, 440, 1955.
11. Smith J. H. C., Kupke D. V., Loeffler I. F., Benitez A., Ahrne I., Geise A., Research in Photosynthesis, 467, N. Y., 1957.
12. Smith J. H. C., Carnegie Inst. Wash. Y. B. N 52, 151, 1953.
13. Smith J. H. C., Benitez A., Carnegie Inst. Wash. Y. B. N 52, 149, 1953.
14. Рабинович Е., Фотосинтез **3**, 644, М., 1959.
15. Красновский А. А., Нестеровская Е. А., Гольденберг А. Б., Биофизика **1**, 328, 1956.
16. French C. S., Young V. K., J. Gen. Physiol. **35**, 873, 1952.
17. French C. S., Luminescence in Biological systems., 51, Wash., 1955.
18. Shibata K., J. Biochem. (Japan) **44**, 147, 1957.
19. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР **117**, 106, 1957.
20. Loeffler J. E., Carnegie Inst. Wash. Y. B. N 54, 159, 1955.
21. Wolf J. B., Price L., Arch. Biochem. Biophys. **72**, 293, 1957.
22. Годнев Т. Н., Шлык А. А., Ляхнович Я. П., Физиол. раст. **4**, 393, 1957.
23. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР **127**, 699, 1959.
24. Virgin H. J., Physiol. Plant. **13**, 155, 1960.
25. Шлык А. А., Калер В. Л., Подчуфарова Г. М., Биохимия **26**, 259, 1961.
26. French C. S., Brookhaven Symp., Biol. **11**, 65, 1959.
27. Brown I. S., French C. S., Plant. Physiol. **34**, 305, 1959.
28. French C. S., Brown I. S., Allen M., Eliot R., Carnegie Inst. Wash. Y. B., 1959.
29. Brody S. S., Science **128**, 838, 1958.
30. Brody S. S., Brody M., Nature **189**, 547, 1961.
31. Brody S. S., Brody M., Arch. Biochem. Biophys. **95**, 52, 1961.
32. Lavorel J., J. Phys. Chem. **61**, 1600, 1957.
33. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР **820**, 764, 1958.
34. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР **135**, 1528, 1960.
35. Butler W. L., Biophys. and Biochem. Research. Comm. **2**, 419, 1960.
36. Butler W. L., Arch Biochem and Biophys. **93**, 413, 1961.
37. French C. S., Myers J., Carnegie Inst. Wash. Y. B. **58**, 327, 1959.
38. Govindjee, Rabinowitch S., Science **132**, 355, 1960.
39. Литвин Ф. Ф., Рефераты докладов V Межд. биохим. конгр. **2**, 367, М., 1961.
40. Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф., Биофизика **5**, 127, 1960.
41. Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Докл. АН СССР **136**, 798, 1961.
42. Литвин Ф. Ф., Кандидатская диссертация. М., МГУ, 1958.
43. Рабинович Е., Фотосинтез **2**, стр. 216. М., 1953.
44. Kok B., Biochim. Biophys. Acta **22**, 399, 1956.
45. Arnold W. H., Sherwood H. K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **43**, 105, 1957.
46. Tollin G., Calvin M., Proc. Nat. Acad. Sci USA **43**, 895, 1957.
47. Литвин Ф. Ф., Владимиров Ю. А., Красновский А. А., Усп. физ. наук **71**, 149, 1960.
48. Рабинович Е., Усп. физ. наук **74**, 289, 1961.
49. Теренин А. Н. Радиотехника и электроника **1**, 1127 (1956).

БИОФИЗИКА

Том VII, вып. 5 1962

ИЗУЧЕНИЕ СРЕДНЕЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА В ПРОЦЕССЕ ЗЕЛЕНЕНИЯ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

А. Б. РУБИН, Л. Е. МИНЧЕНКОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ, Л. А. ТУМЕРМАН

Институт радиационной и физико-химической биологии, Москва
Биолого-почвенный факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

С помощью методов низкотемпературной фиксации и измерения спектров флуоресценции при температуре жидкого азота удалось выяснить, что освещение этиолированных листьев сопровождается характерным изменением спектров флуоресценции [1, 2]. Замороженный до —196° этиолированный лист обладает характерными максимумами флуоресценции при 655, 707 и 633 *ммк*. В первые секунды освещения максимумы флуоресценции 707 и 655 *ммк*, принадлежащие активной форме протохлорофилла, исчезают, и в спектре флуоресценции появляется максимум при 690 *ммк*. Эта форма 690* может вступать в цепь дальнейших реакций, ведущих к появлению формы хлорофилла с максимумом флуоресценции при 680 *ммк* [1; 2]. Подобное изменение спектров флуоресценции наблюдается и при освещении гомогенатов этиолированных листьев [3]. Эти изменения спектров флуоресценции соответствуют изменениям спектров поглощения, которые происходят при освещении этиолированных листьев [4] и полученных из них гомогенатов [5; 6]. Наличие в этиолированных листьях протохлорофиллида и его превращение в хлорофилл на свету было установлено в работах ряда авторов [7; 8].

Согласно имеющимся данным, активная форма протохлорофилла 655 представляет собой белковое соединение протохлорофиллида, форма 690, вероятно,— хлорофиллид, тогда как форма 680 является мономерной формой хлорофилла [9]. Мало активная форма 633, по-видимому, соответствует смеси протохлорофилла и протохлорофиллида [9].

При продолжительном освещении этиолированных листьев в них происходит дальнейшее накопление хлорофилла, ведущее к его агрегации в структурных гранулах [5, 6] и сопровождающееся появлением низкотемпературной люминесценции агрегированных форм с максимумом при 720—740 *ммк* [10—11].

Очевидно, изучение одних только спектров флуоресценции и поглощения недостаточно для установления природы процессов, лежащих в основе превращения протохлорофилла в хлорофилл. Дополнительную важную информацию об этих процессах могут дать измерения длительности флуоресценции участвующих в них пигментов. Как было показано [12—15], эта величина может служить мерой эффективности конкурирующих с флуоресценцией процессов фотохимической дезактивации возбужденных молекул пигмента. Возрастание эффективности этих процес-

* Вместо частых повторений «форма с максимумом флуоресценции при 655 *ммк*» мы будем говорить коротко: форма 655 и т. п.

сов должно приводить к уменьшению значений величины τ (длительности флуоресценции), а уменьшение эффективности должно проявляться как возрастание значений τ.

В настоящей работе наличие такой связи между значениями длительности флуоресценции пигментов в живом листе и эффективностью конкурирующих с ней фотохимических процессов использовано для изучения процесса превращения протохлорофилла в хлорофилл.

Методы и материалы

В работе использованы этиолированные листья фасоли сорта «Триумф», выращенные в темноте при 20—23°, а также зеленые листья табака, фасоли, сахарной свеклы.

Измерения средней длительности флуоресценции τ производили на фазовой флуорометрической установке [16, 17]. Флуоресценцию возбуждали синей линией ртути 436 *ммк* (лампа СВДШ-250). В опытах с этиолированными листьями пучок света, возбуждавший флуоресценцию листа, одновременно вызывал и превращение в нем протохлорофилла в хлорофилл. Свет флуоресценции пигментов выделяли с помощью красных светофильтров, пропускавших только излучение с длинами волн >640 *ммк*.

Регистрацию кинетики изменения величины τ во времени производили автоматически с помощью самопишущего устройства. При снятии температурной зависимости величины τ этиолированный лист помещали в прозрачный сосуд Дьюара, наполненный жидким азотом. При испарении жидкого азота за 30—40 мин. происходило повышение температуры листа от —196 до —80°. Изменение температуры листа контролировали термопарой.

Спектры флуоресценции измеряли на установке ИСП-51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1, в которой был установлен фотоумножитель, чувствительный в красной области спектра до $\sim$820 *ммк*. Ширина входной щели монохроматора составляла 0,1—0,2 *мм*.

При изучении флуоресценции живых листьев с применением низкотемпературной фиксации возникает вопрос о влиянии глубокого охлаждения на нативные свойства объекта. Было установлено, что пятисемидневные этиолированные листья фасоли сохраняют способность к фотохимическому превращению протохлорофилла при +20° после того, как они были в темноте подвергнуты один-два раза воздействию температуры —196°. Однако многократное (4—5 раз) охлаждение листа до температуры —196° с последующим размораживанием приводит к полному исчезновению максимума флуоресценции 655 *ммк* и появлению максимума 633 *ммк*, соответствующего неактивной форме протохлорофилла [1—3]. В наших опытах форма 633 не претерпевала существенных изменений под действием света.

Результаты и обсуждение

1 *Изменение длительности флуоресценции фотосинтетических пигментов в процессе превращения протохлорофилла в хлорофилл.* В этой серии опытов, производившихся при комнатной температуре, этиолированный лист помещали в темноте в флуорометрическую установку и исследовали изменение величины τ в процессе превращения протохлорофилла в хлорофилл, происходившем под действием модулированного светового пучка, который возбуждал флуоресценцию пигментов в листе (рис. 1).

В параллельной серии опытов в моменты, соответствующие точкам *A*, *B*, *C*, *D*, *E* (на рис. 1), лист переносили в жидкий азот и снимали спектр его флуоресценции при —196° (рис. 2). Так как при этой темпе-

ратуре не происходит фотохимического превращения протохлорофилла в хлорофилл, то можно считать, что полученные таким образом спектры характеризуют состояние пигмента в листе в соответствующий момент времени. При этом для каждой точки приходится брать новый лист. Однако, как показали специальные контрольные опыты, времен-

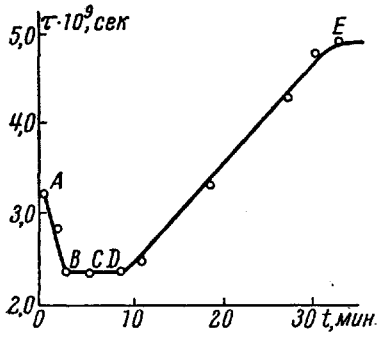


Рис. 1

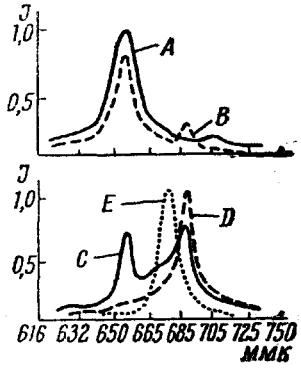


Рис. 2

Рис. 1. Изменение средней длительности флуоресценции τ в процессе превращения протохлорофилла в хлорофилл при освещении этиолированного листа

A, B, C, D, E — точки на кривой изменения τ. По оси абсцисс время, мин.; по оси ординат значения τ флуоресценции, сек.

Рис. 2. Схема изменения спектра флуоресценции этиолированного листа при его освещении.

A, B, C, D, E — спектры флуоресценции, соответствующие точкам *A, B, C, D, E* на рис. 1

По оси абсцисс — длина волны света флуоресценции; по оси ординат — относительная интенсивность. За единицу на оси ординат принята интенсивность флуоресценции при 655 *ммк* на верхнем рисунке и при 680 *ммк* — на нижнем

ной ход изменения величины τ оказался весьма сходным для большого числа листьев в возрасте от 5 до 15 дней. Поэтому корреляция между изменениями спектров флуоресценции и ее длительности носит общий характер.

Сравнение рис. 1 и 2 позволяет сделать следующие выводы:

А. В первые несколько минут освещения (на участке кривой *AB*) заметное превращение протохлорофилла 655 в хлорофилл 690 еще не имеет места: максимум при 690 *ммк* в точке *B* только начинает появляться. Тем не менее, на этом участке кривой происходит заметное снижение длительности флуоресценции от $3{,}2 \cdot 10^{-9}$ до $2{,}3 \cdot 10^{-9}$ сек. Этот факт можно интерпретировать как результат постепенного повышения эффективности использования поглощенных протохлорофиллом световых квантов в фотохимической реакции превращения его в хлорофилл, т. е. как постепенную адаптацию ответственного за это превращение аппарата к условиям освещения. Явление это аналогично известному явлению индукционного периода в фотосинтезе, на протяжении которого также происходит постепенное уменьшение τ для хлорофилла [15]. Однако в отличие от адаптации фотосинтетического аппарата зеленого листа на протяжении индукционного периода адаптация аппарата, ответственного за превращение протохлорофилла в хлорофилл, необратима: помещение этиолированного листа в темноту на 10 мин. в момент времени, соответствующий точке *B*, не приводит к возрастанию значений τ.

Б. В следующие ~7 мин., на отрезке *BD* (рис. 1) значения τ не меняются и остаются достаточно низкими $(2 \div 2{,}5) \cdot 10^{-9}$ сек. Как показывают кривые *B, C* и *D* (рис. 2), в этот период происходит превращение протохлорофилла 655 в хлорофилл 690, полностью заканчиваю-

щееся к моменту *D*. В точке *C*, в которой максимумы флуоресценции при 655 и 690 *ммк* имеют приблизительно одинаковую интенсивность и, следовательно, оба пигмента содержатся в листе приблизительно в одинаковых количествах, измерения величины τ были выполнены с двумя светофильтрами, один из которых пропускал весь свет флуоресценции, а другой — только свет флуоресценции формы 690. В обоих случаях были получены практически одинаковые значения τ.

Интегралы абсорбции, или интегралы Кравца ($\int \varepsilon_\nu d\nu$, где ε_ν молярная адсорбция при частоте ν) для обоих пигментов приблизительно одинаковы [4]. Поэтому должны быть одинаковы и неизмененные конкурирующими процессами собственные значения длительности возбужденного состояния этих молекул τ_0. Следовательно, совпадение фактически измеренных величин τ для обоих пигментов означает, что в тех условиях, в которых они находятся в листе, процесс фотохимического использования энергии возбужденного состояния каждого из пигментов конкурирует с его флуоресценцией с приблизительно одинаковой эффективностью. Иными словами, образующийся из протохлорофилла пигмент 690 сам подвергается фотохимическому превращению, которое, однако, не проявляется в виде заметных изменений спектра флуоресценции. Можно думать, что результатом этого превращения является образование некоторой промежуточной формы, которая в дальнейшем превращается в форму 680. Последнее превращение, по-видимому, не является процессом фотохимическим, так как превращение формы 690 в форму 680 может происходить и в темноте [4].

В. На участке кривой *DE*, т. е. в следующие $\sim$20 мин., происходит, как это видно из сравнения спектров *D* и *E* на рис. 2, переход хлорофилла из формы 690 в форму 680. На рис. 1 показано, что в этот период τ постепенно возрастает и в точке *E*, в которой уже практически весь хлорофилл находится в форме 680, достигает значения около $5 \cdot 10^{-9}$ сек., характерного для флуоресценции хлорофилла в растворе. Постепенное возрастание значений τ на участке *DE* (рис. 1) может быть объяснено уменьшением количества формы 690, подвергающейся фотохимическому превращению и потому характеризующейся низкими значениями τ и увеличением количества формы 680, которая еще не участвует в реакциях фотосинтеза и характеризуется высокими значениями τ. Как было уже показано [15], на протяжении следующих нескольких часов это высокое значение τ постепенно уменьшается до значения $(1 \div 1{,}5) \cdot 10^{-9}$ сек., характерного для состояния пигмента в нормально функционирующем фотосинтетическом аппарате клетки.

2. *Влияние температуры на процесс превращения протохлорофилла в хлорофилл.* В работе [18] было установлено, что спектральными методами удается обнаружить превращение протохлорофилла в хлорофилл лишь в том случае, если освещение этиолированных листьев производится при температуре выше примерно —80°. При более низкой температуре обнаружить в листе появление хлорофилла не удается. Наши спектральные измерения подтверждают этот вывод. Этиолированный лист помещали в темноте в прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом и переносили в спектральную установку, где его подвергали в течение 10—15 мин. очень сильному освещению линией ртути 436 *ммк*, после чего измеряли спектр его флуоресценции (кривая *1* на рис. 3). Далее лист постепенно нагревали и фиксировали форму спектра люминесценции в различных температурных точках. Вплоть до температуры —90° никаких изменений формы спектра люминесценции наблюдать не удалось, и только при температуре около —80° начинает появляться максимум у 685 *ммк*, указывающий на частичное превращение протохлорофилла в хлорофилл (рис. 3, кривая *2*).

Однако параллельно произведенные измерения длительности флуоресценции листа показали, что величина τ при нагревании листа посте-

пенно уменьшается от значения $5 \cdot 10^{-9}$ сек., которое она имеет и для растворов протохлорофилла, до значения $(1 \div 2) \cdot 10^{-9}$ сек., характерного для люминесценции пигментов в нормально фотосинтезирующих клетках (рис. 4). С точки зрения развитых выше представлений о том, что длительность флуоресценции является мерой эффективности конкурирующего с ней фотохимического процесса, этот факт означает, что, хотя в этой температурной области спектральными методами и не уда-

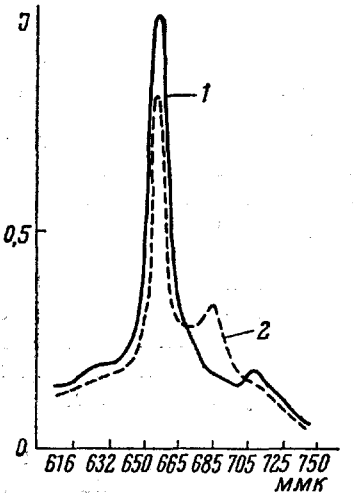


Рис. 3

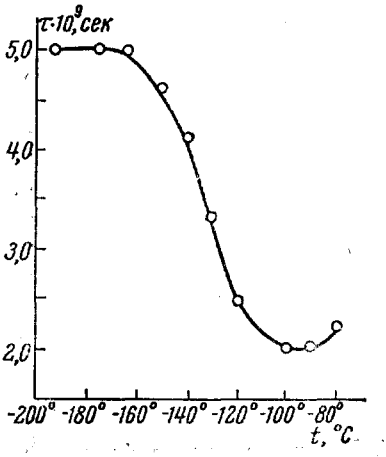


Рис. 4

Рис. 3. Изменение спектра флуоресценции этиолированного листа при его освещении при различных температурах.

1 — спектр флуоресценции при температурах ниже —90°, *2* — при температуре —80°. По оси абсцисс — длины волн; по оси ординат относительная интенсивность. За единицу на оси ординат принята интенсивность флуоресценции при 655 *ммк*

Рис. 4. Зависимость средней длительности флуоресценции протохлорофилла в этиолированном листе от температуры.

По оси абсцисс — температура листа; по оси ординат — значения τ флуоресценции протохлорофилла в этиолированном листе

ется обнаружить существование продуктов фотохимической реакции, идущей при участии протохлорофилла, такая реакция все же идет, но только ее продукты спектрально не отличимы от исходного вещества.

Эти факты подсказывают предположение, что при температуре ниже —80° под действием света идет только переход молекулы пигмента в промежуточное состояние (возможно, радикальную форму), а превращение протохлорофилла в хлорофилл является результатом последующей темновой реакции между этой промежуточной формой и молекулой исходного вещества. Схема процесса представляется при этом в следующем виде:

$$P_{655} + h\nu \rightarrow P^*_{655} \rightarrow P^{\cdot}, \qquad (1)$$

$$P^{\cdot} + P_{655} \rightarrow Chl_{690}. \qquad (2)$$

Завершающая реакция (2), приводящая к образованию спектрально обнаруживаемых продуктов, может идти только при температуре выше —80°. Сделанное предположение подтверждается следующим опытом. Лист, подвергавшийся освещению при температуре —196°, нагревали при освещении до —120°. Спектр его флуоресценции при этом, как указывалось, не изменялся (рис. 5, кривая *1*). После этого лист в темноте

нагревали до комнатной температуры, выдерживали при этой температуре в течение нескольких минут и снова охлаждали в темноте до температуры жидкого азота. В спектре его флуоресценции после такой обработки возникал «хлорофильный» максимум при 685 *ммк*, а «протохлорофильные» максимумы при 655 и 707 *ммк* соответственно снижались (рис. 5, кривая *2*). Появление максимума 633 *ммк* связано с частичным разрушением формы 655. Это можно рассматривать как результат того, что при низкой температуре шла только первичная реакция (1), а при комнатной температуре в темноте прошла завершающая стадия реакции (2).

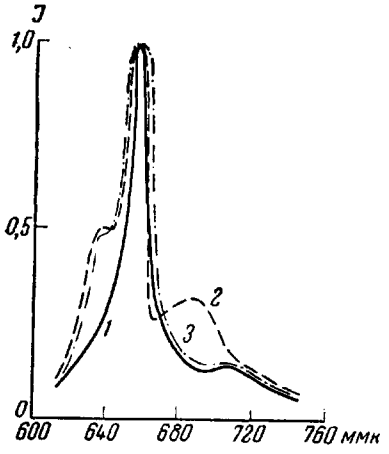


Рис. 5. Изменение спектра флуоресценции этиолированного листа в темноте после предварительного освещения листа при температуре —120°.

1 — спектр флуоресценции при —120°; *2* — спектр флуоресценции при —196° после предварительного освещения листа при —120° и последующего повышения температуры листа до +20° в темноте; *3* — то же после воздействия температуры —196° в темноте. Подробные объяснения в тексте.
По оси абсцисс — длины волн; по оси ординат — относительная интенсивность. За единицу на оси ординат принята интенсивность флуоресценции при 655 *ммк*

Нужно также отметить, что сделанное нами предположение о двухступенчатом характере процесса превращения протохлорофилла в хлорофилл находится в согласии с данными работ [18] и [19], в которых было показано, что кинетика этого процесса соответствует реакции второго порядка с константой скорости, пропорциональной первой степени интенсивности действующего света.

Параллельно произведенные измерения длительности флуоресценции хлорофилла в зеленом листе обнаружили совершенно аналогичную изображенной на рис. 4 температурную зависимость величины τ. Значения τ флуоресценции хлорофилла в зеленом листе $(1{,}0 \div 2{,}0) \cdot 10^{-9}$ сек. сохраняются при понижении температуры вплоть до —80°, после чего они начинают возрастать. Однако в то время, как в случае этиолированного листа величина τ при —196° достигает $5{,}0 \cdot 10^{-9}$ сек., в случае зеленого листа она остается в пределах $(3{,}0 \div 3{,}3) \cdot 10^{-9}$ сек. Значения же средней длительности флуоресценции растворов как протохлорофилла, так и хлорофилла составляют примерно $5{,}0 \cdot 10^{-9}$ сек. при +20° и увеличиваются при понижении температуры до —196° только на 20—40% (см. таблицу).

Таблица

Результаты изучения средней длительности флуоресценции разных форм пигментов при +20 и —196°

Объект	$\tau \cdot 10^9$ сек. при +20°	$\tau \cdot 10^9$ сек. при —196°	Отношение $\tau_{-196°} : \tau_{+20°}$
Зеленый лист	0,8—1,0	3,0—3,3	3—4
Зеленые гомогенаты листа	0,8—1,0	2,7—3,2	3—4
Зеленые гомогенаты с 90% спирта	6,2	7,1	1,1
Ацетоновый раствор хлорофилла $a + b$	5,5	7,8	1,4
Активная форма протохлорофилла 655 в этиолированном листе	2,0—2,5	5,0	2,0—2,5
Ацетоновый экстракт протохлорофилла	6,2	7,5	1,2
Неактивная форма протохлорофилла 633	5,0	5,0	1,0
Новообразованная форма хлорофилла 680	5,0	5,0	1,0
Промежуточная форма 690	2,0—2,5	5,0	2,0—2,5
Твердая пленка хлорофилла на стекле	0,6	0,6	1,0

Указанное выше различие в поведении зеленых и этиолированных листьев, возможно, связано с тем, что в зеленом листе имеют место два процесса дезактивации возбужденных молекул хлорофилла. В то время как понижение температуры в пределах от —80 до —196° вызывает угнетение одного из процессов и соответственное возрастание значений τ, эффективность второго процесса вообще не изменяется с понижением температуры. Вследствие этого общее значение τ при —196°, связанное с протеканием обоих процессов, остается существенно меньше $5{,}0 \cdot 10^{-9}$ сек. Более подробно этот вопрос освещен в работе [20].

Выводы

Измерение средней длительности τ и спектров флуоресценции этиолированных листьев в процессе их освещения при +20° показало, что значение τ не остается постоянным, а обнаруживает изменения. В первые минуты освещения значение τ флуоресценции протохлорофилла 655 падает от $(3{,}2 \div 3{,}5) \cdot 10^{-9}$ до $(2{,}0 \div 2{,}5) \cdot 10^{-9}$ сек.; значение τ флуоресценции формы 690, образующейся из протохлорофилла 655, составляет $(2{,}0 \div 2{,}5) \cdot 10^{-9}$ сек., а значение τ для формы хлорофилла $680 = 5{,}0 \cdot 10^{-9}$ сек. Длительное освещение этиолированного листа приводит к агрегированию хлорофилла и формированию фотосинтетической структуры хлоропластов и сопровождается падением значений τ при +20 и —196°. Средняя длительность возбужденного состояния молекул протохлорофилла в листьях значительно возрастает с понижением температуры от +20 до —196°, что является отличительной чертой поведения молекул пигментов в листе по сравнению с их поведением, в растворе. Под действием света в этиолированном листе при температуре ниже —80° образуются спектрально не обнаруживаемые активные продукты, которые вызывают образование формы 690 при повышении температуры до +20°.

Поступила в редакцию
12.IV.62

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР **117**, 106, 1957.
2. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР **120**, 764, 1958.
3. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия **25**, 168, 1960.
4. Shibata K., J. Biochem. (Tokyo) **44**, 147, 1957.
5. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **85**, 177, 1952.
6. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **91**, 343, 1953.
7. Wolf I. B., Price L., Arch. Biochem. Biophys. **72**, 293, 1957.
8. Годнев Т. Н., Шлык А. А., Ляхнович А. Н., Физиол. раст. **4**, 393, 1957.
9. Красновский А. А., Быстрова М. И., Сорокина А. Д., Докл. АН СССР **136**, 1327, 1961.
10. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т. Докл. АН СССР **135**, 1528, 1960.
11. Brody M., Linshitz H., Science **133**, 705, 1961.
12. Rabinovitch E., Brody S., Science **125**, 555, 1957.
13. Тумерман Л. А., Докл. АН СССР **117**, 605, 1957.
14. Дмитриевский О. Д., Ермолаев В. Л., Теренин А. Н., Докл. АН СССР **114**, 751, 1957.
15. Тумерман Л. А., Борисова О. Ф., Рубин А. Б., Биофизика **6**, 645, 1961.
16. Тумерман Л. А., Усп. физ. наук **33**, 1, 1957.
17. Борисов А. Ю., Тумерман Л. А., Изв. АН СССР, сер. физ. **24**, № 1, 1957.
18. Smith J. H. C., Benitez, Plant Physiol. **29**, 135, 1954.
19. Годнев Т. Н., Изв. АН БССР, сер. биол. № 1, 140, 1960.
20. Тумерман Л. А., Рубин А. Б., Докл. АН СССР **144**, стр. 685, 1962.

541.144.7

ФИТОЛЬНЫЕ и БЕСФИТОЛЬНЫЕ ФОРМЫ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ И ГОМОГЕНАТАХ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, М. И. БЫСТРОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Изучая изменения пигментов в процессе зеленения этиолированных листьев фасоли, мы обнаружили [1], что свежеобразованный хлорофилл отличается по своим спектральным и фотохимическим свойствам от хлорофилла «взрослых» зеленых листьев. На основании этого мы обосновали представления о начальном образовании «мономерных» форм хлорофилла с постепенной агрегацией пигмента в структурах гранул по мере его накопления в процессе биосинтеза [2]. Применение метода производной спектроскопии позволило обнаружить разные формы хлорофилла непосредственно в зеленых листьях [3].

Последующие работы, выполненные методами абсорбционной спектроскопии листьев [4] и люминесцентной спектроскопии замороженных листьев и гомогенатов на разных стадиях зеленения [5; 6], обнаружили более сложную картину промежуточных стадий, включающую превращения бесфитольных форм пигментов [7—11]. Оказалось, что протохлорофиллид этиолированных листьев под влиянием света превращается в хлорофиллид и только следующая ступень — присоединение фитола — превращает хлорофиллид в хлорофилл. Флуоресцентным методом удалось обнаружить протохлорофилл в зеленых листьях растений [12]. Применение изотопного метода позволило детально изучить накопление и превращение протохлорофилла и протохлорофиллида в листьях растений [13]. Измерение флуоресценции при низкой температуре выявило характерную флуоресценцию агрегированных форм и их накопление в листьях, что подтвердило полученные ранее результаты [14; 15].

Однако следовало установить с полной определенностью, какова химическая природа спектроскопически различных форм пигментов, образующихся в процессе зеленения этиолированных листьев. Измерения спектров флуоресценции при зеленении листьев с одновременной хроматографией пигментов на бумаге показали, что форме с максимумом флуоресценции 635 *ммк* соответствует смесь протохлорофилла и протохлорофиллида, форме с максимумом 655 *ммк* — протохлорофиллид [16].

Предшественник хлорофилла с максимумом флуоресценции при 690 *ммк* соответствовал хлорофиллиду, причем часть его оказалась «неактивной» и в хлорофилл не переходила. Форма с максимумом флуоресценции при 680 *ммк* оказалась «обычным» хлорофиллом *а*. Оставались, однако, неясными соотношения хлорофиллида и хлорофилла в мономерных и агрегированных формах пигмента.

Ранее мы наблюдали различия в фотохимических свойствах разных форм пигментов [1; 2]. Форма с максимумом поглощения при 670 *ммк* в гомогенатах зеленеющих этиолированных листьев быстро разрушалась при освещении красным светом высокой интенсивности. Мы назвали эту форму фотохимически активной вследствие ее быстрого разрушения (выцветания) при сильном освещении. По мере накопления пигмента и агрегации его молекул устойчивость хлорофилла к освещению возрастала, однако на всех стадиях в гомогенатах из листьев фасоли присутствовала форма, быстро выцветающая при освещении.

Быстровыцветающая форма хлорофилла была нами обнаружена и в гомогенатах зеленых листьев [17], однако количество этой формы было различным у разных растений [18; 19]. Так, например, в гомогенатах листьев сахарной свеклы, тополя и лебеды ее количество достигало 20—30%, тогда как в гомогенатах листьев фасоли и злаков оно не превышало 3—7%. Следовало выяснить химическую природу быстровыцветающих форм хлорофилла. Шлык и Николаева обратили наше внимание на то, что у растений, в листьях которых мы наблюдали значительные количества быстроразрушающегося хлорофилла, была обнаружена высокая активность хлорофиллазы; следовало выяснить, не является ли быстровыцветающая форма хлорофилла в гомогенатах зеленых листьев бесфитольной формой хлорофилла — хлорофиллидом.

Задача настоящей работы сводилась к определению соотношения фитольных и бесфитольных пигментов в спектроскопически различающихся формах пигментов в процессе зеленения этиолированных листьев и к установлению природы изменений спектральных свойств и соотношения фитольных и бесфитольных форм пигментов в гомогенатах из этиолированных, зеленеющих и зеленых листьев по сравнению с интактными листьями.

МЕТОДИКА

В настоящем исследовании особенно важны были методические приемы фиксации листьев и извлечения пигментов, с тем чтобы по возможности ингибировать действие хлорофиллазы и не получать при анализе избыточного количества хлорофиллида в качестве артефакта. Годнев и Шлык указывают, что при извлечении пигментов 60%-ным ацетоном активно действующая хлорофиллаза приводит к увеличению количеств хлорофиллида в экстракте [20]. В соответствии с этим растирание листьев свеклы и лебеды при комнатной температуре с х. ч. ацетоном (Reanal) приводило в наших опытах к заметному образованию хлорофиллида (4%). Фиксация листьев погружением в кипящую воду на 1—1,5 мин. уменьшала содержание хлорофиллида до 0,4% у листьев свеклы и до 0,7% у листьев лебеды. Наименьшие количества хлорофиллида наблюдались при растирании нефиксированных листьев при 2° с ацетоном, охлажденным до этой же температуры (листья свеклы — 0,3%, лебеды — 0,4%), и при измельчении листьев в жидком азоте с дальнейшей экстракцией охлажденным ацетоном (листья лебеды — 0,32%). Способ фиксации зеленых и зеленеющих листьев фасоли не оказывал большого влияния на количество хлорофиллида в экстракте, однако при работе с зеленеющими листьями фасоли мы применяли фиксацию погружения листьев в кипящую воду.

Количество фитольных и бесфитольных форм пигментов определяли распределением пигментов между фазой петролейного эфира и водным ацетоном. Этот метод, примененный Вольф и Прайс [7] для разделения фитольных и бесфитольных форм при образовании пигментов в этиолированных листьях, использовался Шлыком и Калером [13] и рядом других авторов для определения естественных бесфитольных форм и хлорофиллазной активности лиственных препаратов.

Работу вели с этиолированными и зелеными листьями фасоли сорта Сакса, сахарной свеклы сорта Верхнячка и лебеды. Сахарную свеклу растили летом в грунте, зимой в оранжерее, лебеду растили летом в грунте, фасоль зимой и летом в оранжерее. Этиолированные проростки фасоли растили в течение 2-х недель в песке при 20°.

Для образования и накопления хлорофиллида и хлорофилла этиолированные проростки фасоли освещали при 450 и 1750 *лк*. Температура во время освещения в разных вариантах опытов была от 0 до 20°. Через различные интервалы времени брали пробы листьев и измеряли спектр поглощения и флуоресценции. Одновременно часть листьев фиксировали погружением на 1 мин. в кипящую воду и определяли соотношение фитольных и бесфитольных форм пигментов; из другой части листьев готовили гомогенат.

Гомогенаты из этиолированных и зеленых листьев готовили в затемненной комнате при 2°. Листья (5 *г*) измельчали в ступке с 25 *мл* $^1/_{15}$ *М* раствора Na_2HPO_4. Кашицу отжимали через полотно и центрифугировали 10 мин. при 5000 *об/мин*. Полученный гомогенат в случае необходимости разбавляли $^1/_{15}$ *М* раствором Na_2HPO_4 или смешивали с глицерином в соотношении 4 : 6.

Спектры поглощения этиолированных и зеленеющих листьев и приготовленных из них гомогенатов измеряли на спектрофотометре СФ-10, спектральные измерения при работе с гомогенатами зеленых листьев производили на спектрофотометре СФ-5. Спектры флуоресценции снимали при температуре жидкого азота фотоэлектрическим методом [21].

Нами был принят следующий порядок экстракции и определения пигментов. Листья растирали с ацетоном в присутствии $CaCO_3$. К полученному ацетоновому экстракту приливали до 20% (по объему) 5%-ный водный раствор NaCl для лучшего расслоения петролейного эфира и водного ацетона. Осадок на фильтре промывали 80%-ным ацетоном до практически полного извлечения пигментов. Для извлечения пигментов из лиственных гомогенатов к ним приливали ацетон в отношении 1 : 4 и фильтровали. После фильтрации и промывания осадка 80%-ным ацетоном к раствору добавляли насыщенный раствор NaCl. Измеряли величину оптической плотности в красном максимуме поглощения и при 700 *ммк* полученных ацетоновых растворов. При работе с этиолированными и зеленеющими листьями фасоли измеряли спектр поглощения полученных ацетоновых растворов в области 600—700 *ммк*. Мерой количества пигментов принимали разность экстинкции в красном максимуме поглощения и при 700 *ммк*.

Для разделения пигментов водно-ацетоновый раствор переводили в делительную воронку и 5—8 раз взбалтывали с легким петролейным эфиром (темп. кип. до 50°). При этом хлорофилл переходил в петролейный эфир, а хлорофиллид оставался в водном ацетоне. По экстинкции пигментов в красном максимуме поглощения в ацетоновом растворе до и после обработки петролейным эфиром (с учетом изменения объема) судили о содержании бесфитольных пигментов — протохлорофиллида и хлорофиллида. При работе с гомогенатами листьев свеклы, для того чтобы работать с меньшими объемами, при-

меняли следующий прием: 5 *мл* гомогената помещали в центрифужную пробирку, добавляли 1—2 капли насыщенного раствора $CaCl_2$ для коагуляции белков и пигментов и центрифугировали при 2° в течение 15 мин. при 6000 *об/мин*. Все окрашенное вещество гомогената при этом осаждалось. Бесцветную надосадочную жидкость удаляли и осадок экстрагировали при 2° ацетоном. Все последующие операции производили как описано выше. В опытах с гомогенатами листьев сахарной свёклы, содержащих 60% глицерина, 5 *мл* гомогената разбавляли вдвое водой, к 10 *мл* полученного раствора добавляли 4 капли насыщенного раствора $CaCl_2$ и центрифугировали. При работе с гомогенатами листьев лебеды ацетон не извлекает полностью весь пигмент из коагулированного осадка. При центрифугировании гомогенатов этиолированных и зеленеющих листьев фасоли после коагуляции хлористым кальцием все пигменты полностью не осаждались, и поэтому в большей части опытов с этими гомогенатами пигменты извлекали добавлением ацетона до 80%.

Опыты по определению количества пигмента, разрушающегося на интенсивном свету, проводили в круглых кюветах. В случае необходимости удаления воздуха опыты проводили в вакуумных трубках. При освещении кювету помещали в стеклянный сосуд, в котором циркулировала вода из ультратермостата с температурой 22—23°. В опытах при 1,5° в этот сосуд помещали воду с кусочками льда. Кювету освещали 500-ваттной киноламповой с конденсором без светофильтра или через красный светофильтр RG-2 или КС-11. О количестве выцветающего пигмента судили по падению оптической плотности в красном максимуме поглощения гомогената. В тех случаях, когда производили извлечение пигментов ацетоном до и после освещения, о количестве разрушающегося на свету пигмента судили по разности оптической плотности в красном максимуме поглощения ацетоновых растворов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Пигменты этиолированных и зеленеющих листьев фасоли. При извлечении пигментов из этиолированных листьев фасоли около 80% пигментов не переходит в легкий петролейный эфир и остается в водном ацетоне, представляя собой, таким образом, протохлорофиллид. Эта величина хорошо совпадает с литературными данными [22]. При освещении этиолированных листьев, обладающих максимумом поглощения при 650 *ммк*, в первые же секунды происходило образование пигмента с максимумом поглощения при 686 *ммк*. Исследование соотношений хлорофиллида и хлорофилла при 5—30-минутном освещении этиолированных листьев показало, что в этом случае около половины образующихся пигментов представлено хлорофиллидом (табл. 1). В этих опытах происходило присоединение фитола к образующемуся хлорофиллиду. При 20-секундном освещении хлорофиллида было больше (до 64%). Понижение температуры тормозило присоединение фитола, являющееся ферментативной реакцией. Освещение этиолированных листьев при 0° в течение 30 мин. приводило к накоплению в них до 90% хлорофиллида. Максимум поглощения при этом был расположен при 686 *ммк*. Освещение проростков свыше 30 мин. при комнатной температуре сопровождалось постепенным перемещением максимума поглощения пигментов листа до 672 *ммк* и постепенным падением содержания хлорофиллида. После 1 часа освещения этиолированных листьев при интенсивности света 450 *лк* в них обнаруживалось 16% хлорофиллида, максимум поглощения составлял 674 *ммк*. Через 3—4 часа освещения содержание хлорофиллида падало до 5—7%, максимум поглощения был 672 *ммк*. Отсюда следует, что форма пигмента, имеющая максимум поглощения при 672 *ммк*, является хлорофиллом.

Таким образом, определение соотношений фитольных и бесфитольных форм пигментов в этиолированных и зеленеющих листьях фасоли соответствует общепринятой ныне схеме

Протохлорофиллид 650 *ммк* → хлорофиллид 686 *ммк* → мономерный хлорофилл 672 *ммк* → агрегированные формы хлорофилла

Пигменты гомогенатов этиолированных и зеленеющих листьев фасоли. Процедура приготовления гомогенатов из частично позеленевших

листьев фасоли в наших опытах не изменяла соотношения пигментов. Однако спектральные свойства пигментов в листьях и гомогенатах были различны. При 5—30-минутном освещении этиолированных листьев

Таблица 1

Соотношение фитольных и бесфитольных форм хлорофилла при зеленении этиолированных листьев фасоли

Здесь и в табл. 2 максимум поглощения выражен с точностью ±1 *ммк*

Время освещения	Максимум поглощения	Хлорофиллид, % к сумме хлорофилл + + хлорофиллид
Этиолированные листья освещали при 17°450 *лк*		
7 мин.	686	50
30 »	685	54
4 часа	672	7,7
Этиолированные листья освещали при 20° 450 *лк*		
30 мин.	685	53,2
30 мин., 15 мин., темнота	674	—
1 час	674	16,4
3 часа	672	4,7
Этиолированные листья освещали при 20° 1750 *лк*		
20 сек.	686	63,5
5 мин.	683 (плечо 670)	51,7
10 »	680 (плечо 670)	—
15 »	675	—
30 »	674	4,0
Этиолированные листья освещали при 0° 450 *лк*		
3 мин.	686	54,4
30 »	686	86,2

Таблица 2

Соотношение фитольных и бесфитольных форм хлорофилла в листьях и гомогенатах освещенных этиолированных проростков фасоли

Объект	Условия освещения	Время освещения	Максимум поглощения, *ммк*	Хлорофиллид, %
Листья	20°, 1750 *лк*	5 *мин.*	686	32
Гомогенат			670	37
Листья	20°, 450 *лк*	30 »	685	53
Гомогенат			672 (плечо 680)	47
Листья	0°, 450 *лк*	30 »	686	85
Гомогенат			676	78
Листья	19°, 450 *лк*	3 часа	672	5
Гомогенат			672	11

образуется предшественник хлорофилла с максимумом поглощения при 686 *ммк*, а во время приготовления гомогената происходило смещение максимума в короткую сторону — до 670—672 *ммк* (табл. 2). Можно было бы предположить, что хлорофиллид, образованный в гомогенате в результате освещения, превращается в хлорофилл путем темновой ферментативной реакции; однако опыты показали, что количество хло-

рофилла и хлорофиллида в гомогенате то же, что и в листьях. Следовательно, процедура приготовления гомогената, занимающая около 20 мин. при 0°, приводит к изменению состояния нативной формы хлорофиллида. В том случае, когда процент хлорофиллида в листьях был невелик (3 часа освещения этиолированных листьев) и максимум поглощения пигмента располагался при 672 *ммк*, приготовление гомогената не изменяло положения максимума.

Измерения спектров флуоресценции показали сходную картину изменения свойств пигментов в гомогенатах по сравнению с листьями. Максимуму флуоресценции хлорофиллида при 691 *ммк* в листьях соответствовал более короткий максимум гомогената — 684 *ммк*. (Следует подчеркнуть, что в нашей предыдущей работе [6], где применялся более быстрый способ приготовления гомогената, столь явных спектральных изменений в гомогенате по сравнению с листьями не наблюдалось.) Максимумы флуоресценции листьев и гомогенатов совпадали лишь в том случае, когда образованный при освещении пигмент представлял собой хлорофилл, а не хлорофиллид. Таким образом, нативная форма хлорофиллида особенно лабильна.

Сходные спектральные изменения наблюдались в гомогенатах этиолированных листьев, обладающих максимумом поглощения при 650 *ммк* (табл. 3). В гомогенатах этиолированных листьев, приготовленных при

Таблица 3

Соотношение фитольных и бесфитольных форм хлорофилла и протохлорофилла в листьях и гомогенате этиолированных проростков фасоли

Максимумы поглощения и флуоресценции выражены с точностью ±1 *ммк*

Объект	Максимум поглощения	Максимум флуоресценции	Бесфитольные формы, % к сумме пигментов
Этиолированные листья	650	655	78
Гомогенат этиолированных листьев	640	640,652	83
Гомогенат после освещения 12 мин., 23°, 180 *лк*	673	680,634	78

2°, максимум поглощения располагался при 640 *ммк*, тогда как в гомогенатах, приготовленных при комнатной температуре,— при 635 *ммк*. При этом соотношение протохлорофиллида и протохлорофилла в гомогенатах оставалось таким же, каким оно было в этиолированных листьях (около 80% протохлорофиллида). Следовательно, максимум поглощения протохлорофиллида в гомогенатах располагается при 635 *ммк*. Это согласуется с нашими прежними данными [1] и измерениями Смита [22] спектра поглощения «протохлорофилл-голохрома», максимум поглощения которого 636 *ммк*. При освещении гомогената с максимумом поглощения 640 *ммк* лампой накаливания без светофильтра, дающей освещенность в 180 *лк* (23°), в течение 12 мин. в спектре поглощения гомогената обнаруживается максимум поглощения при 673 *ммк*, а не при 686 *ммк*, как это имеет место при освещении этиолированных листьев. В спектре поглощения освещенного гомогената обнаруживается также пологий максимум в области 630 *ммк*. Подсчет соотношения пигментных форм показал, что при освещении гомогената этиолированных листьев свыше 80% образующихся пигментов составляет хлорофиллид. Следовательно, в этих условиях хлорофиллид обладает максимумом поглощения при 673 *ммк*.

Сходные изменения показали спектры флуоресценции. У этиолированных листьев главный максимум флуоресценции расположен при 655 *ммк*, в области 630—635 *ммк* — небольшой максимум. При быст-

рой процедуре приготовления гомогената [6] в его спектре флуоресценции также преобладает максимум «активной формы» при 655 *ммк*.

В гомогенате этиолированных листьев, использованном в данной работе, наблюдалось два максимума флуоресценции — при 640 и 652 *ммк*, причем максимум 640 *ммк* был бо́льшим по величине, хотя, как уже указывалось, в таком гомогенате около 80% пигмента присутствовало в форме протохлорофиллида. Максимум 652 *ммк* принадлежал протохлорофиллиду, максимум 640 *ммк*, по-видимому, представлял собой смесь протохлорофиллида и протохлорофилла. После освещения гомогената белым светом 180 *лк* от 3 до 12 мин. наблюдалось два максимума флуоресценции — при 680 и 635 *ммк*. Ранее мы обнаружили [6], что в гомогенатах этиолированных листьев, приготовленных «быстрым» способом, 15-секундное освещение приводило (как и в листьях) к появлению максимума флуоресценции 690 *ммк*, который при более длительном освещении сдвигался до 680 *ммк*.

Хлорофиллид составлял свыше 80% пигментов, образующихся при освещении гомогената этиолированных листьев. Второй максимум флуоресценции в освещенных гомогенатах этиолированных листьев расположен около 635 *ммк*. Измерения показали, что пигмент, обладающий после освещения гомогената этиолированных листьев максимумом флуоресценции при 635 *ммк*, на 70% состоит из протохлорофиллида. Следовательно, в этих условиях максимум флуоресценции протохлорофиллида располагается при 635 *ммк*, т. е. по положению совпадает с максимумом протохлорофилла.

Мы не смогли обнаружить убыли протохлорофилла при освещении гомогената этиолированных листьев. После 12 мин. освещения в гомогенате присутствовал весь протохлорофилл, содержавшийся до освещения, и около 40% исходного протохлорофиллида. По-видимому, трансформация пигментов в гомогенатах этиолированных листьев останавливается на стадии хлорофиллида. Этот вывод согласуется с данными Смитта [22], также не наблюдавшего в сходных условиях этирификации хлорофиллида. Описанные данные позволяют прийти к заключению, что процедура получения гомогената, примененная в данной работе, приводит к изменению состояния протохлорофиллида и хлорофиллида таким образом, что максимумы поглощения и флуоресценции этих соединений приближаются к соответствующим максимумам фитольных форм — протохлорофилла и хлорофилла. Следует указать, что стояние при комнатной температуре гомогенатов, приготовленных без центрифугирования, также приводило к коротковолновому смещению максимумов [6]. Вопрос о характере нарушений, обусловливающих изменения спектральных свойств протохлорофиллида и хлорофиллида в гомогенатах, пока неясен; можно предполагать изменения связи пигмента с липопротеидным комплексом.

Превращения пигментных форм в листьях и гомогенатах этиолированных и зеленеющих листьев фасоли можно представить в виде следующей схемы (рис. 1).

Образование хлорофиллида в гомогенатах зеленых листьев. В гомогенатах из листьев сахарной свеклы и лебеды, приготовленных при комнатной температуре, были обнаружены значительные количества хлорофиллида (табл. 4). Количество хлорофиллида быстро возрастало по мере стояния гомогената (при комнатной температуре). У лебеды за 24 часа количество хлорофиллида в гомогенате достигало 65%.

Для идентификации пигменты из водного ацетона переводили в серный эфир и затем хроматографировали на бумаге (Ленинградская быстрая) из смеси Лефлера (петролейного эфира 30 частей, серного эфира 30 частей и этилового спирта 0,5 части). На хроматограмме наблюдали три полосы пигментов. С фронтом растворителя шла желтая полоса каротиноидов, недалеко от точки нанесения располагалась по-

лоса хлорофиллида *а* и сразу над ней — полоса хлорофиллида *b*. При обработке хроматограмм 0,02 н. КОН зоны хлорофиллида вымывались.

Понижение температуры приготовления гомогенатов тормозило образование хлорофиллида. В том случае, когда гомогенат листьев свеклы готовили при 2°, сразу после приготовления в нем обнаруживалось

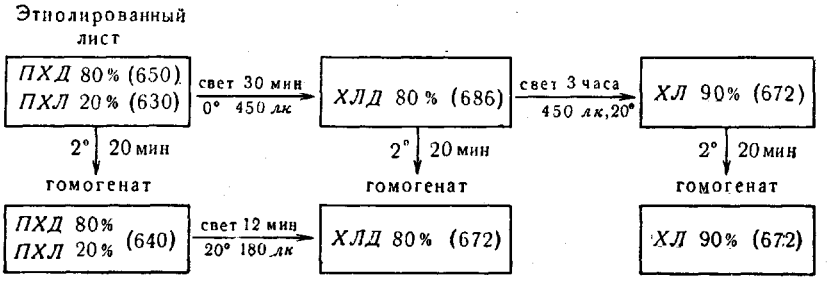


Рис. 1. Схема превращения пигментов в этиолированных листьях и гомогенатах

Цифры в скобках — максимумы поглощения, *ммк*. *ПХД* — протохлорофиллид; *ПХЛ* — протохлорофилл; *ХЛД* — хлорофиллид; *ХЛ* — хлорофилл

3—5% хлорофиллида; при хранении этого гомогената во льду количество хлорофиллида не менялось в течение 24 час. Стояние гомогената, приготовленного при 2°, при комнатной температуре приводило к накоплению в нем хлорофиллида. В первые часы стояния при комнатной

Таблица 4

Образование хлорофиллида в гомогенатах зеленых листьев

Объект	Максимум поглощения, *ммк*	Температура при приготовлении или хранении гомогената, °С	Время хранения гомогената, часы	Хлорофиллид, %
Свекла	677,5	20	0	7,6
	676,5	20	3,5	25,2
	677,5	2	0	5,4
	676,5	20	2	21,2
	678	2	0	5,0
	677,5	2	24	5,1
Фасоль	678,5	20	0	0,2
	678	20	3, 5	0,4
Лебеда	677,5	20	0	14,0
	673	20	24	65,6

температуре образование хлорофиллида шло в прямой зависимости от времени. В гомогенатах из зеленых листьев фасоли такого интенсивного процесса образования хлорофиллида не было. В гомогенате зеленых листьев фасоли при 20° содержалось 0,2% — хлорофиллида, через 3,5 часа стояния при комнатной температуре — 0,4%.

«Красный» максимум поглощения сразу после приготовления гомогенатов из листьев свеклы и лебеды располагался при 677—678 *ммк*. По мере стояния гомогенатов при комнатной температуре и накопления в них хлорофиллида максимум постепенно перемещался в коротковолновую область спектра. При 65% хлорофилла в гомогенате листьев лебеды максимум поглощения был расположен при 673 *ммк*.

Добавление 60% глицерина к гомогенатам, приготовленным при комнатной температуре и при 2°, сильно тормозило образование хлорофиллида. Стояние гомогената (приготовленного при 2°) в течение 2 час. при 23° в присутствии 60% глицерина не приводило к образованию хлорофиллида, в то время как в этом же растворе без глицерина количество хлорофиллида возросло почти в 5 раз.

Разрушение пигментов при освещении гомогенатов. Мы определяли количество пигмента, разрушающегося при освещении гомогената красным светом высокой интенсивности. О количестве выцветающего пигмента судили по падению оптической плотности в красном максимуме поглощения. Опыты показали, что меньше всего пигмента разрушалось в гомогенатах листьев фасоли. Сразу после приготовления гомогената при 20° и после его стояния при этой температуре в течение 3,5 часа освещение приводило к разрушению около 5% пигмента. В гомогенатах листьев сахарной свеклы и лебеды наблюдали значительное разрушение пигментов при освещении. Как правило, при большем содержании хлорофиллида в гомогенате часть пигмента, разрушающегося на свету, возрастала. Больше всего выцветало пигментов в гомогенатах листьев лебеды: при 14% хлорофиллида за 12 мин. освещения гомогената разрушалось 45% пигмента. В том случае, когда гомогенат листьев свеклы стоял при 0° и количество хлорофиллида в нем не возрастало, не увеличивалось и световое разрушение пигментов.

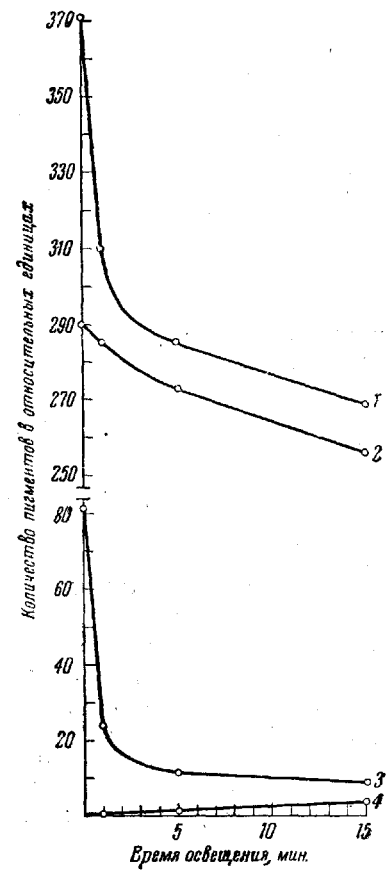


Рис. 2. Деструктивное фотохимическое разрушение пигментов в гомогенате листьев свеклы (60% глицерина)

1 — сумма пигментов; *2* — хлорофилл (с учетом хлорофиллида, образующегося в темноте); *3* — хлорофиллид; *4* — хлорофиллид, образующийся в темноте

Для выяснения кинетики разрушения хлорофиллида и хлорофилла под влиянием красного света высокой интенсивности опыты проводили следующим образом: определяли количество хлорофиллида в гомогенате листьев свеклы, затем гомогенат освещали при 23° и вновь определяли количество хлорофиллида. Для сравнения в параллельном опыте следили за падением поглощения пигментов в красном максимуме. Определение пигментов в контрольном образце, простоявшем 15 мин. при 23° в темноте, показало образование хлорофиллида в темноте. При вычислении количеств хлорофилла, разрушающегося на свету, делали поправку на темновое образование хлорофиллида.

Опыты показали, что бóльшую часть пигмента, разрушающегося за первую минуту освещения, составляет хлорофиллид (рис. 2), причем бóльшая часть хлорофиллида, присутствующего в гомогенате, разрушалась в течение первой минуты освещения. После 5 мин. освещения количество хлорофиллида в гомогенате не уменьшалось и оставалось постоянным. 15 мин. освещения гомогената при 2° приводило к разрушению всего хлорофиллида, присутствующего в гомогенате.

Однако полученные данные не позволяют прийти к выводу, что в гомогенатах при освещении разрушается только хлорофиллид, так как

количество пигмента, выцветающего за время опыта, заметно превышало количество хлорофиллида, присутствующего в гомогенате до освещения и образующегося за время опыта в темноте при той же температуре. В наших опытах за 15 мин. освещения кроме хлорофиллида разрушалось до 16% хлорофилла, присутствующего в гомогенате. В присутствии 60% глицерина, тормозящего активность хлорофиллазы, количество хлорофиллида возрастало в темноте за 15 мин. на 1%; за это же время на свету разрушалось около 12% хлорофилла. Для проверки возможности ускорения светом хлорофиллазной активности мы освещали гомогенат листьев свеклы в отсутствие воздуха красным светом, но ускоряющего влияния света на реакцию не наблюдали.

Начиная с работ Вильштеттера и Майера, хлорофиллазную активность определяли в присутствии органических растворителей. Недавно Клейн и Вишняк [23] обнаружили хлорофиллазную активность в водных системах в присутствии детергента Тритона X-100. В наших опытах наблюдали хлорофиллазную активность в водных гомогенатах листьев сахарной свеклы и лебеды без добавок растворителя и детергента. Может быть, это объясняется наличием в гомогенатах листьев этих растений поверхностно-активных веществ, однако растирание листьев фасоли с бесцветным раствором, полученным после фильтрования гомогената листьев свеклы через тальк, не стимулировало хлорофиллазную активность гомогената, приготовленного из листьев фасоли. Вероятно, особенно активно хлорофиллаза расщепляет мономерные, дезагрегированные формы хлорофилла, и этим объясняется тот факт, что для действия хлорофиллазы в большинстве случаев необходимо присутствие органических растворителей или детергентов. В присутствии 60% спирта или ацетона практически весь хлорофилл переходит в растворенное состояние [24].

Таким образом, в гомогенатах листьев свеклы образуется значительное количество хлорофиллида, фотохимически разрушающегося в присутствии воздуха.

В наших опытах было описано обратимое восстановление хлорофилла и фотосенсибилизирующая активность гомогенатов свеклы, более высокая, чем гомогенатов из листьев фасоли [17; 18]. Вероятно, эти явления в значительной мере определяются наличием хлорофиллида, активность которого в этих реакциях велика. В связи с этим следует отметить, что Остер и Бройд [25] установили способность водорастворимого производного хлорофилла — хлорофиллина (у которого два свободных карбоксила) к реакции фотовосстановления.

Выделив хлорофиллид из гомогенатов листьев свеклы, мы измерили его спектры поглощения в растворе $^1/_{15}$ *M* Na_2HPO_4 и нашли максимумы, соответствующие мономерным и агрегированным формам (при 675, 700 и 740 *ммк*). При освещении интенсивным светом наблюдали быстрое выцветание пигмента; наиболее устойчивой была агрегированная форма «740 *ммк*».

Скоростное центрифугирование гомогенатов. При центрифугировании гомогенатов этиолированных и зеленеющих листьев фасоли при 20 000 *g* происходит обогащение надосадочной жидкости формой пигмента с максимумом флуоресценции при 635 *ммк* (состоящей, по-видимому, из протохлорофилла и измененного протохлорофиллида). В опытах с гомогенатами зеленеющих листьев свежеобразованная форма хлорофилла и форма протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 655 *ммк* оседали скорее, чем «форма 635» [16].

Мы наблюдали ранее, что скоростное центрифугирование гомогенатов из листьев сахарной свеклы и лебеды приводит к обогащению гомогенатов «коротковолновой» фракцией пигмента [19]. При продолжительном центрифугировании гомогенатов из листьев свеклы при 25 000 *g* (5°) максимум поглощения смещался от 678 до 675—673 *ммк*. В данной ра-

боте мы исследовали влияние скоростного центрифугирования на соотношение хлорофилла и хлорофиллида в гомогенатах. Для этих опытов использовали гомогенат листьев свеклы, приготовленный при комнатной температуре. Гомогенат охлаждали до 0° и часть его центрифугировали при 2° в течение 25 мин. при 15 000 *об/мин* (2°). Гомогенат, стоявший это же время при 2°, служил контролем. В гомогенате после центрифугирования содержалось около 46% хлорофиллида, в контроле — 26%. Это свидетельствует об обогащении гомогената хлорофиллидом.

Пока неясно, какие нарушения естественного состояния пигментов происходят в гомогенатах этиолированных и зеленых листьев помимо образования хлорофиллида. Можно предполагать изменение или нарушение связи пигментов с белковым комплексом. Однако оседание большей части хлорофиллида совместно с белковыми частицами при скоростном центрифугировании гомогенатов листьев свеклы говорит о том, что хлорофиллид в таких гомогенатах находится в связанном состоянии.

ВЫВОДЫ

Исследование превращений фитольных и бесфитольных форм пигментов в зеленеющих листьях фасоли показало, в согласии с общепринятой ныне схемой, образование хлорофиллида (с максимумом поглощения в листьях при 686 *ммк*) и хлорофилла *а* (с максимумом поглощения в листьях при 670—672 *ммк*).

Приготовление гомогенатов из этиолированных и зеленеющих листьев показало большую лабильность белковых комплексов протохлорофиллида, обладающих максимумами поглощения, сдвинутыми в гомогенатах в коротковолновую сторону по сравнению с листьями, причем эти сдвиги не связаны с этерификацией фитолом.

При освещении гомогенатов этиолированных листьев образуется хлорофиллид.

В гомогенатах зеленых листьев сахарной свеклы и лебеды при комнатной температуре образуется значительное количество хлорофиллида, тогда как в гомогенатах листьев фасоли накопления хлорофиллида не наблюдалось. При интенсивном освещении гомогенатов листьев свеклы на воздухе происходит деструктивное выцветание хлорофиллида, более быстрое, чем хлорофилла.

Скоростное центрифугирование гомогенатов из листьев свеклы ведет к обогащению надосадочной жидкости фракцией хлорофиллида.

При исследовании пигментных превращений в гомогенатах следует контролировать изменения нативного состояния пигментов и образование бесфитольных форм за счет действия хлорофиллазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **85**, 177, 1952
2. Красновский А. А. и Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **91**, 343, 1953
3. French C. S., Huang H. S., Carnegie Inst. Wash. Y. B. **56**, 266, 1956—57
4. Shibata K., J. Biochem. **44**, 147, 1957
5. Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **117**, 106, 1957
6. Красновский А. А. и Быстрова М. И., Биохимия **25**, 168, 1960
7. Wolff J. B., Price L., Arch. Biochem. and Biophys. **72**, 293, 1957
8. Loeffler J. E., Carnegie Inst., Wash., Y. B. **54**, 159, 1954—55
9. Годнев Т. Н., Шлык А. А. и Ляхнович Я. П., Физиол. растений **4**, 393, 1957
10. Virgin H. I., Physiol. Plant. **13**, 155, 1960
11. Судьина О. Г., Довбиш К. П., Укр. бот. ж. **19**, 10, 1962
12. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. и Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР **127**, 699, 1959
13. Шлык А. А., Калер В. Л. и Подчуфарова Г. М., Биохимия **26**, 259, 1961
14. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. и Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР **135**, 1528, 1960
15. Brody S. S., Brody M., Biochim. et biophys. acta **54**, 495, 1961

16. Красновский А. А., Быстрова М. И. и Сорокина А. Д., Докл. АН СССР **136**, 1227, 1961
17. Воробьева Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **21**, 126, 1956
18. Воробьева Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **23**, 760, 1958
19. Красновский А. А., Воробьева Л. М. и Пакшина Е. В., Физиол. растений **4**, 124, 1957
20. Шлык А. А., Николаева Г. Н., Власенок Л. И. и Годнев Т. Н., Докл. АН БССР **5**, 364, 1961
21. Ерохин Ю. Е. и Красновский А. А., Биофизика **4**, 392, 1961
22. Смит Дж., Структура и функция фотосинтетического аппарата, стр. 300. Изд-во иностр. лит., М., 1962
23. Klein A. O., Vishniac W., J. Biol. Chem. **236**, 2544, 1961
24. Кособуцкая Л. М. и Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953
25. Oster G., Broyde S. B., Nature **192**, 132, 1961

Поступила в редакцию
23.X.1962

PHYTOLIC AND NON-PHYTOLIC FORMS OF PIGMENTS IN LEAVES AND HOMOGENATS

L. M. VOROBYEVA, M. I. BYSTROVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A study of phytol and non-phytol pigments transformations in greening haricot leaves has revealed, in agreement with a generally accepted scheme, the formation of chlorophyllid (absorption maximum in leaves at 686 $m\mu$) and of chlorophyll *a* (absorption maximum in leaves at 670—672 $m\mu$).

Preparation of homogenates from etiolated and greening leaves showed a greater lability of protein complexes of protochlorophyllid and chlorophyllid with absorption maxima shifted in homogenates towards the short range as compared with the leaves; the shifts are not caused by phytol esterification.

Upon illumination of etiolated leaves homogenates chlorophyllid is being formed.

In homogenates of green leaves of sugar beet and of goose-foot an appreciable amount of chlorophyllid was formed at room temperature whereas in homogenates of haricot leaves no chlorophyllid accumulation was noted. Upon strong illumination of sugar beet leaves homogenates in the air destructive bleaching of chlorophyllid proceeds a higher rate than that of chlorophyll.

High speed centrifugation of sugar beet leaves homogenates leads to supernatant enrichment in the chlorophyllid fraction.

In studies of pigment transformations in homogenates changes in the native state of the pigments and formation of non-phytolic forms by the action of chlorophyllase should be considered.

БИОФИЗИКА

Том VIII, вып. 4 1963

577.45

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ И ПРЕВРАЩЕНИЙ ПИГМЕНТОВ В ПУРПУРНЫХ И ЗЕЛЕНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЯХ

Ю. Е. ЕРОХИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Успехи спектроскопии живых организмов, развитие «дифференциальной» и «производной» спектрофотометрии, измерения поглощения и люминесценции при низких температурах убедительно показали, что хлорофилл и его аналоги в фотосинтезирующих организмах находятся в различных состояниях и формах. К сожалению, уровень современной экспериментальной техники еще не позволяет прямо наблюдать расположение молекул пигментов и формы их связи в слоистых структурах гранул и хроматофоров. Не удивительно, что до настоящего времени нет единого мнения в вопросе о состоянии пигментов.

В литературе давно обсуждается вопрос о причинах сдвига в инфракрасную область максимумов поглощения и люминесценции бактериохлорофилла в живых клетках по сравнению с их положением в растворах. В ранних работах [1—4] эти своеобразные спектральные свойства бактериохлорофилла объяснялись образованием разных белковых комплексов пигмента. Однако все попытки выделить такие комплексы или получить искусственные, близкие по спектральным свойствам к нативным структурам, не увенчались успехом. Взаимодействие с каротиноидами и другими компонентами клеток также не приводило к существенным изменениям в спектрах основных пигментов. Это обстоятельство делает маловероятным предположение другой группы исследователей [5—6], считавших, что именно это взаимодействие определяет своеобразие спектральных свойств живых организмов.

В работах лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха в 1952 г. [7] было показано, что спектры поглощения бактериохлорофилла в пленках и коллоидных растворах, т. е. в условиях агрегации молекул пигментов, очень близки к спектрам поглощения пурпурных бактерий. Было высказано предположение, что своеобразие спектральных свойств in vivo определяется различными типами взаимодействия между самими молекулами пигмента. Сходство спектров поглощения агрегированных форм бактериохлорофилла и бактериовиридина [7—8] в модельных системах и живых бактериях свидетельствовало о том, что эти пигменты находятся в клетках главным образом в агрегированном состоянии. Но в то время как для бактерий была характерна слабая флуоресценция, данных о люминесценции агрегированных форм бактериальных пигментов в литературе не было. Использование чувствительных методов регистрации спектров в сочетании с глубоким охлаждением объектов позволило нам обнаружить люминесценцию агрегированных форм бактериохлорофилла [9] и бактериовиридина [8] и измерить их спектры [10], о чем мы кратко сообщали ранее. Эта

статья содержит изложение результатов работы по сравнительному изучению состояния и некоторых фотохимических свойств пигментов пурпурных и зеленых фотосинтезирующих бактерий в клетках с преимущественным использованием метода измерения люминесценции при низкой температуре.

Методика

Измерение спектров люминесценции пигментов проводилось на установках двух типов. Первая установка состояла из светосильного стеклянного спектрографа ИСП-51 и фотоэлектрической приставки ФЭП-1. Приемником излучения служил фотоумножитель ФЭУ-22, чувствительный в красной и близкой инфракрасной области спектра. Запись спектров осуществлялась на электронном пишущем потенциометре ЭПП-09. Установка позволяла проводить измерения в области от 400 до 850 *ммк*.

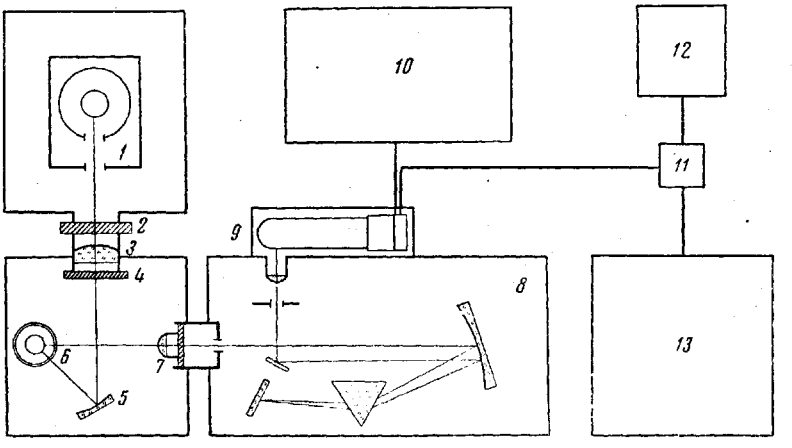


Рис. 1. Блок-схема установки для измерения спектров люминесценции при разных температурах

1 — источник возбуждающего света (ДРШ-250); *2* — тепловой фильтр; *3* — линза; *4* — светофильтры; *5* — вогнутое зеркало; *6* — образец в прозрачном сосуде Дьюара; *7* — конденсор; *8* — монохроматор ИКС-11; *9* — фотоумножитель; *10* — высоковольтный выпрямитель-стабилизатор; *11* — усилитель постоянного тока; *12* — гальванометр; *13* — записывающее устройство или осциллограф

Вторая установка была собрана на основе монохроматора со стеклянной призмой инфракрасного спектрометра ИКС-11. В качестве приемника использовался также ФЭУ-22, напряжение на который подавалось от высоковольтного стабилизатора. Сигнал с фотоумножителя усиливался усилителем постоянного тока и записывался гальванометром с фотозаписью. Кроме того, усиленный сигнал фотоумножителя можно было подавать на вход низкочастотного осциллографа ЭНО-1. При самой медленной развертке луча и быстром сканировании спектра удавалось получать полный спектр свечения объекта на экране трубки осциллографа. В сочетании с осциллографом установка позволяла регистрировать быстрые изменения как в спектрах, так и в отдельных максимумах.

Поворотом зеркала в монохроматоре ИКС-11 была достигнута возможность проводить измерения в области от 400 до 1200 *ммк*. Блок-схема установки представлена на рис. 1.

Спектральная чувствительность обеих установок была измерена при помощи ленточной вольфрамовой лампы накаливания, у которой известно распределение энергии по спектру, и соответствующие поправки были внесены в кривые спектров люминесценции.

Люминесценция возбуждалась со стороны передней стенки объекта (рис. 1) фокусированным светом ртутной лампы сверхвысокого давления ДРШ-250. Спектральная область возбуждения выделялась обычно комбинацией светофильтров УФС-3 и ЗС-3 и представляла собой участок спектра от 330 до 440 *ммк* с максимумом около 370 *ммк* (группа линий ртути при 366, 404, 407, 436 *ммк*). Объект закреплялся в специальном держателе, который одновременно служил холодопроводом. Регулируя глубину погружения нижней части держателя в жидкий азот, налитый в прозрачный сосуд Дьюара, можно было создавать различную температуру образца от комнатной до —196°. Контроль за температурой осуществлялся калиброванной термопарой медь — константан по гальванометру М-91/А.

Объектами исследования служили двух-трехдневные культуры пурпурных бактерий Rhodopseudomonas palustris и Chromatium sp. и зеленых бактерий Chlorobium thiosulfatophilum и Chloropseudomonas ethylicum, любезно предоставляемые нам кафедрой микробиологии МГУ. Пигменты из этих организмов выделяли по методикам, обычно принятым в нашей лаборатории, хроматографировали на сахарозе и хранили в темноте в вакууме на холоду.

Результаты

1. *Спектры люминесценции пурпурных бактерий.* В культурах Rhodopseudomonas palustris обнаружены максимумы при 610, 640, 670 и 901 *ммк* (рис. 2, *а*), а у Chromatium sp. те же максимумы, лишь последний находился при 907 *ммк*. Максимумы при 610, 640, 670 *ммк* принадлежали порфиринам; при фильтрации культур бактерий через фильтр с тальком или центрифугировании порфирины с указанным спектром в основной массе оставались в культуральной жидкости. Клетки бактерий в этих случаях содержали лишь следы порфиринов, и наблюдался максимум при 901—907 *ммк*, принадлежащий бактериохлорофиллу. При действии на клетки растворителей наблюдается падение флуоресценции в этой области и появление характерной флуоресценции бактериохлорофилла в растворе при 780—790 и 830 *ммк*. В процессе роста культуры от момента засева до отмирания отмечено накопление порфиринов, а количество бактериохлорофилла, измеренное по интенсивности в максимуме флуоресценции при 901 *ммк*, проходило через максимум, совпадающий по времени с максимумом физиологической активности (потребление CO_2, H_2S, прирост биомассы), отмеченным в работе [11]. При неблагоприятных условиях для роста бактерий (большая интенсивность света, дефицит ионов железа и др.) отмечалось накопление свободных порфиринов и снижение синтеза бактериохлорофилла, что раньше было установлено Лассельс [12], а также в нашей лаборатории [13]. Изменение соотношений этих двух типов пигментов при выращивании бактерий на свету с различными интенсивностями представлено на рис. 3.

2. *Спектры люминесценции зеленых бактерий.* Спектр флуоресценции культур зеленых бактерий Chlorobium thiosulfatophilum и Chloropseudomonas ethylicum оказался более сложным (рис. 2, *б*). Помимо небольших максимумов при 610 и частично при 680 *ммк*, принадлежащих свободным внеклеточным порфиринам, отмечены интенсивные пики при 780 и 805 *ммк*, которые были обусловлены флуоресценцией бактериовиридина. Если у пурпурных бактерий бактериохлорофилл по спектрам поглощения давал по крайней мере три различные по агрегации формы с максимумами поглощения при 800, 850, 890 *ммк* [2—5; 7], а флуоресцировала только длинноволновая форма 890 *ммк* [2; 3; 10], то у зеленых бактерий можно было предположить на основании данных по флуо-

ресценции, что каждая форма давала характерный максимум. Вопрос о природе этих форм будет обсуждаться ниже.

Неблагоприятные для роста этих бактерий факторы, такие как высокая интенсивность света, наличие кислорода, недостаток ионов железа, кобальта и другие, приводили, как и у пурпурных бактерий, к накоплению свободных порфиринов при одновременном снижении коли-

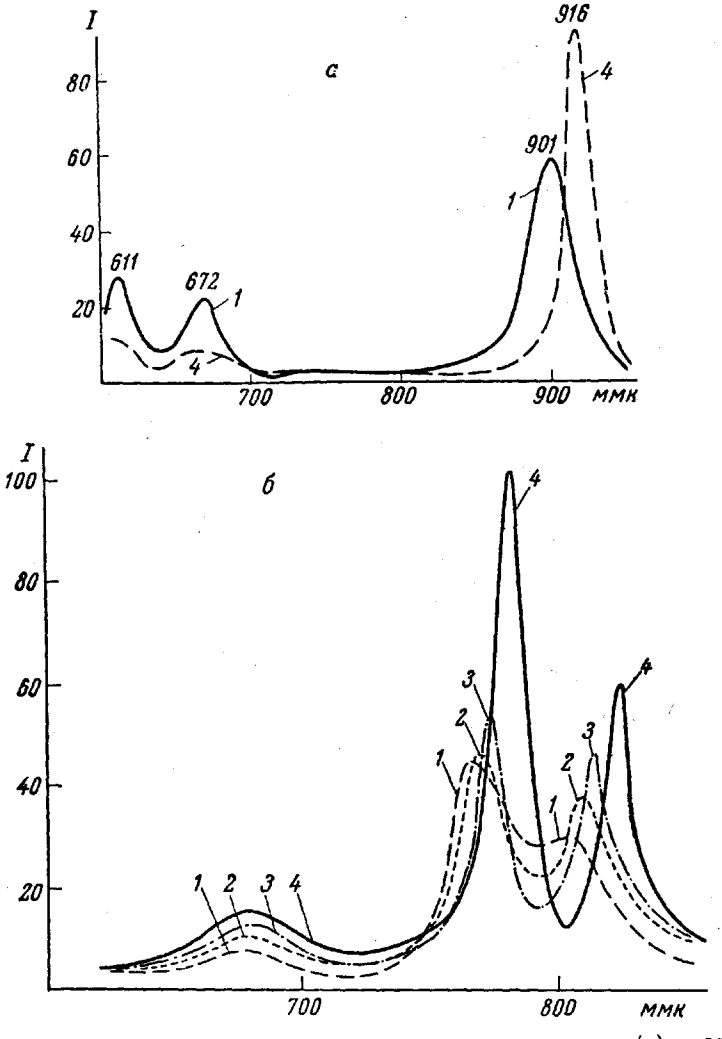


Рис. 2. Спектры люминесценции культур пурпурных (*а*) и зеленых (*б*) бактерий при разных температурах (в °С)
1 — при +20; *2* — при —30; *3* — при —80; *4* — при —196

чества основного их пигмента — бактериовиридина. С возрастом культуры лишь форма бактериовиридина с максимумом при 780 *ммк* проходила через максимум интенсивности на 3—4-й день (совпадает с максимумом физиологической активности по данным работы [14]), а при отмирании интенсивность значительно уменьшалась, тогда как формы с максимумами 680 и 805 *ммк* накапливались в старых, отмирающих клетках. Это указывает на то, что, возможно, именно форма с максимумом флуоресценции при 780 *ммк*, т. е. поглощающая при 730—750 *ммк*, является наиболее активной, «работающей» формой этого пигмента в бактериях. Измеренные Ларсеном спектры действия фотосинтеза этих бактерий также обладали максимумом около 750 *ммк* [14].

Наличие нескольких максимумов в спектрах флуоресценции зеленых бактерий в красной и ближней инфракрасной области, естественно, приводило к мысли, не обусловлены ли они несколькими разными пигментами, тем более что в последнее время появились работы [15; 16] о существовании двух химически различных видов бактериовиридина у разных штаммов бактерий.

С этой целью нами была проведена восходящая хроматография на бумаге пигментных вытяжек из этих бактерий. Пигменты извлекали 80%-ным ацетоном или метанолом из отцентрифугированных клеток и переводили в серный эфир. Эфирный раствор наносили тонкой полоской на бумагу и хроматографировали смесью петролейного и серного эфиров (1 : 1) с добавкой 1% по объему этанола. Зеленый пигмент давал

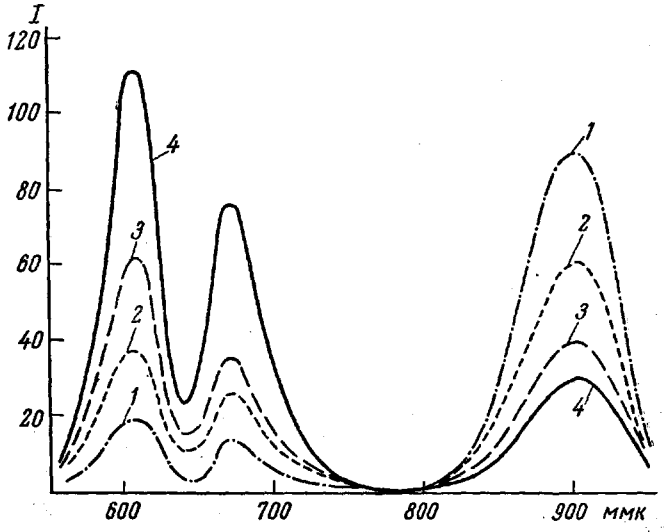


Рис. 3. Изменения в спектрах пурпурных бактерий, выращенных на свету с различной интенсивностью (в *лк*)
1 — 1000; *2* — 2000; *3* — 5000; *4* — 11000

одну широкую основную зону, обладавшую флуоресценцией при 790 *ммк* по всему пятну пигмента. Эфирный элюат этой зоны обладал характерной для бактериовиридина флуоресценцией с максимумами при 665 и 720 *ммк*. Воздействие на суспензию бактерий нарушающими агентами, такими как растворители, нагревание и пр., приводило к появлению полос флуоресценции, характерных для бактериовиридина, что отмечалось нами ранее [17; 18]. Следовательно, можно было предположить, что максимумы флуоресценции при 680, 780, 805 *ммк* в спектрах зеленых бактерий принадлежат одному пигменту — бактериовиридину, находящемуся в различных формах.

3. *Природа длинноволнового смещения и состояния пигментов в клетках бактерий.* Хорошо известно, что бактериальные пигменты в живых клетках обладают максимумами поглощения и флуоресценции, смещенными на 80—120 *ммк* в инфракрасную область по сравнению с таковыми в растворах. Мы уже указывали, что существует несколько точек зрения на причины этого смещения. В работах нашей лаборатории [7—9] показано, что своеобразие спектральных свойств пигментов в нативном состоянии можно объяснить взаимодействием между молекулами пигментов, находящихся в различных состояниях. Было отмечено поразительное сходство спектров поглощения химически индивидуальных пигментов бактерий в твердых пленках и коллоидных растворах со спектрами живых бактерий. Однако отсутствие указаний на нали-

чие флуоресценции у агрегированных пигментов в модельных системах являлось основным затруднением данной гипотезы.

Недавно нам удалось обнаружить люминесценцию таких модельных систем агрегированных бактериохлорофилла, бактериовиридина и хлорофилла [10]. Было показано, что при замораживании до —196° агрегированные формы пигментов в бактериях и в твердых пленках обнаруживают общую характерную черту — значительно увеличивают интенсивность свечения и дают длинноволновый сдвиг максимумов люминесценции при низкой температуре по сравнению с комнатной. На рис. 2 показаны изменения в спектрах люминесценции при замораживании культур фотосинтезирующих бактерий.

У пурпурных бактерий основной пик 901 *ммк* при +20° С смещается до 920 *ммк* при —196° С (рис. 2, *а*). У зеленых бактерий наибольший сдвиг отмечен для максимума 805 *ммк* при +20° С, который смещался до 820 *ммк* при —196° С. Максимум 770 *ммк* при +20° С в замороженной до —196 С культуре располагался при 778—780 *ммк*, а максимум при 680 *ммк* практически не изменял своего положения при замораживании (рис. 2, *б*).

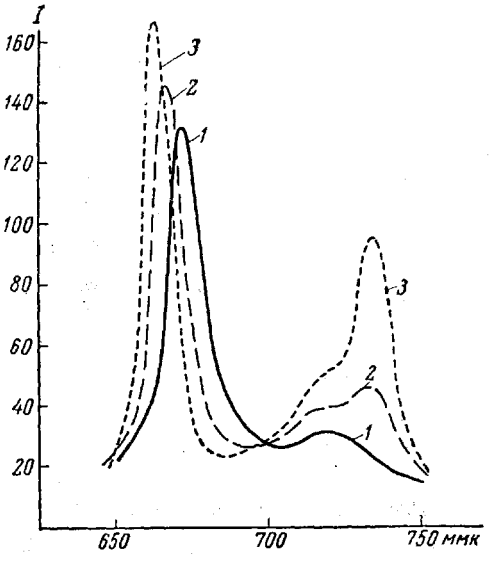


Рис. 4. Спектры люминесценции бактериовиридина в пиридине (в °С)
1 — при +20; *2* — при —80; *3* — при —196

Опыты с разбавленными растворами ($\sim 10^{-6}$ *М*) пигментов показали, что при их замораживании до температуры жидкого азота наблюдается обычно лишь небольшой сдвиг полос флуоресценции мономерных молекул пигментов в коротковолновую сторону и незначительное увеличение интенсивности. В концентрированных растворах ($\sim 10^{-4}$ *М*) при низкой температуре наряду с «мономерными» пиками появляются новые, дополнительные пики агрегированных, возможно, димерных форм, что впервые было отмечено Броди для растворов хлорофилла [18], а также наблюдалось нами у бактериальных пигментов и представлено на рис. 4 для раствора бактериовиридина в пиридине.

В коллоидных растворах, полученных разбавлением водой спиртовых или ацетоновых растворов или растворением в воде адсорбированных на сахарозе при хроматографировании пигментов, у адсорбатов пигментов на бумаге и сахарозе и монослоев, образующихся при выливании на поверхность воды пигментов в растворе и перенесенных на стеклянную пластинку по методике Джекобса [19; 20], охлаждение до —196° С вызывало либо небольшое смещение в длинноволновую сторону (на 2—7 *ммк*), либо положение максимумов не изменялось, но всегда отмечалось значительное увеличение свечения по сравнению с комнатной температурой, при которой флуоресценция этих форм пигментов была крайне слаба.

Твердые пленки пигментов, полученные испарением растворов с последующей откачкой паров растворителя на вакуумной установке, обладали при +20° С весьма слабой флуоресценцией. При —196° С у таких пленок наблюдался наиболее далекий длинноволновый сдвиг максимума (на 10—15 *ммк*) и значительное увеличение интенсивности.

Было промерено изменение интенсивности люминесценции в максимумах мономерных и агрегированных форм от температуры и построена температурная зависимость для бактериовиридина в концентрированных растворах и непосредственно в клетках бактерий (рис. 5). Для мономерных форм характерно плавное и сравнительно небольшое увеличение интенсивности люминесценции. Агрегированные формы давали экспоненциальную зависимость выхода люминесценции с понижением температуры как в растворах, так и в бактериях, что согласуется с данными Броди [18] по хлорофиллу.

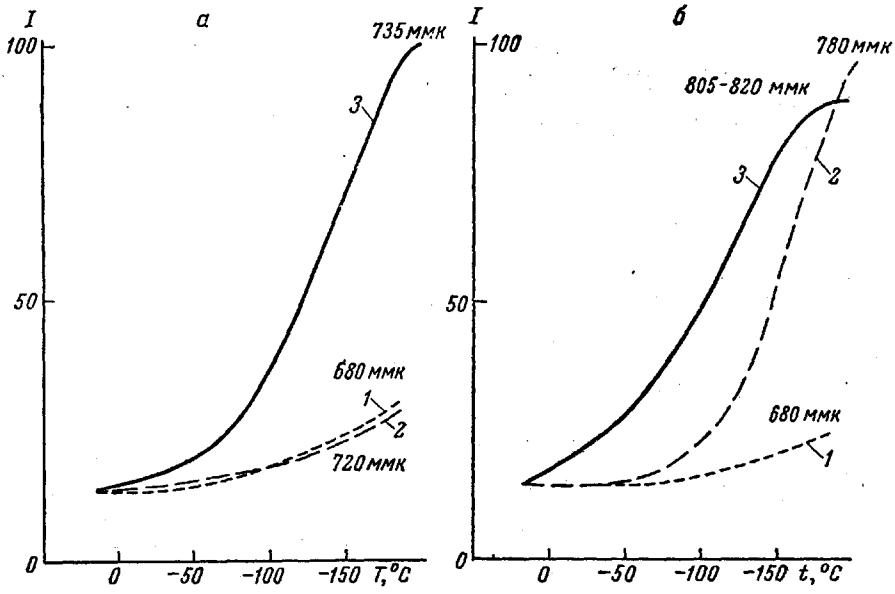


Рис. 5. Температурная зависимость люминесценции бактериовиридина в максимумах мономерной и агрегированных форм (в *ммк*)

а — в растворе: *1* — 680; *2* — 720; *3* — 735; *б* — в клетках зеленых бактерий: *1* — 680; *2* — 780; *3* — 805—820

Сопоставляя эти данные, можно предположить, что максимум 805 *ммк* у зеленых бактерий принадлежит наиболее плотноупакованным «квазикристаллическим» агрегированным формам пигмента, так как именно для этих форм, как и для пленок пигмента, характерен был наибольший длинноволновый сдвиг и увеличение выхода свечения. Сходную структуру, вероятно, имеет и форма 901 *ммк* у пурпурных бактерий, обладавшая теми же свойствами. Форма с максимумом при 780 *ммк* у зеленых бактерий по температурной зависимости и положению максимума наиболее близка к бактериовиридину в монослоях или его адсорбатам, когда взаимодействуют соседние молекулы в плоских двумерных структурах. Форма, флуоресцирующая при 680 *ммк*, по положению и поведению при замораживании сходна с мономерной формой бактериовиридина в растворах. Очень небольшое количество мономерной формы бактериохлорофилла с максимумом флуоресценции при 780 *ммк* можно было обнаружить при широких щелях и максимальном усилении в культурах пурпурных бактерий.

При действии растворителей, нагревании, сильном освещении наблюдался постепенный переход пигментов из агрегированных форм в мономерные как у зеленых, так и у пурпурных бактерий. Интересно, что сразу же после добавления небольших количеств растворителей (спирт, ацетон — до 5%, пиридин — до 1—2%) отмечалось падение интенсивности в агрегированных формах, хотя при этом флуоресценция моно-

мерных форм не увеличивалась. Это могло быть вызвано либо тушением возбужденных состояний агрегированных молекул пигментов, что показано для хлорофилла [20], либо, что нам кажется более вероятным, нарушением упорядоченных пигментных структур в хроматофорах бактерий.

Такое нарушение в свою очередь могло вызвать падение эффективности или полную потерю передачи энергии на агрегированные формы и ее растрату в тепло в местах повреждения («дефектах решетки»).

4. *Некоторые фотохимические свойства мономерных и агрегированных форм бактериальных пигментов.* Большое значение имеет вопрос о функциях и участии отдельных форм пигментов в процессах фотосинтеза. Фотосинтезирующие бактерии и особенно зеленые серные бактерии представляют весьма удобный объем для изучения проироды различных форм пигмента и их функций. Действительно, если у растений и водорослей наблюдается значительное наложение и перекрывание спектров поглощения и люминесценции «мономерных» и агрегированных форм [18; 21], то у бактерий отдельные формы довольно четко спектрально разграничены.

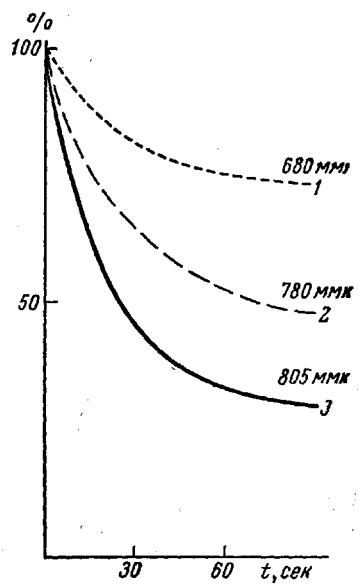


Рис. 6. Фотохимические изменения интенсивности люминесценции мономерной (максимум при 680 *ммк* — *1*) и агрегированных форм (максимумы при 780 *ммк* — *2* и при 805—820 *ммк* — *3*) бактериовиридина в клетках бактерий

Мы измеряли кинетику выцветания в отдельных максимумах люминесценции различных форм при комнатной и низкой температурах. Источником действующего света была та же лампа, возбуждавшая люминесценцию, но только с одним светофильтром ЗС-3 (область пропускания 320—620 *ммк*), так как при комбинации ЗС-3 и УФС-3 заметного изменения в максимумах не происходило. В культурах пурпурных бактерий Rhodopseudomonas palustris и Chromatium как при комнатной, так и при низкой температурах наблюдалось лишь необратимое падение интенсивности в длинноволновом максимуме (при 901 и 920 *ммк* соответственно при +20 и —196°) люминесценции. Оно может быть вызвано разрушением флуоресцирующего комплекса агрегированных форм, как и в случае воздействия малыми дозами растворителей или нагреванием.

Была также измерена кинетика фотохимического разрушения различных форм у зеленых бактерий. Наибольшее выцветание было отмечено при 805 *ммк*, наименьшее при 680 *ммк*. Форма с максимумом при 780 *мк* имела промежуточный характер выцветания (рис. 6).

Наряду с необратимым выцветанием можно было предположить, что происходит образование некоторого количества химически измененных долгоживущих форм пигментов. Действительно, измерения спектров люминесценции зеленых бактерий в средней части спектра показали, что после 7—10 мин. предварительного освещения возбуждающим светом лампы ДРШ-250 через светофильтр ЗС-3 происходило обратимое появление пиков около 520 и 570 *ммк*, которые исчезали при стоянии бактерий в темноте. Заманчиво приписать их фотовосстановленному бактериовиридину, максимумы которого мы наблюдали в этой же области [22]. Однако для окончательного решения необходимы дополнительные опыты.

Обсуждение результатов

Проведенные сравнительные исследования спектральных свойств разных форм пигментов в живых организмах и модельных системах показали, что для агрегированных пигментов характерна специфическая зависимость интенсивности люминесценции от температуры: увеличение интенсивности свечения и сдвиг максимумов в длинноволновую область при понижении температуры. Относительно природы этого свечения можно высказать лишь некоторые общие предположения. Произведенные нами фосфороскопические измерения указывают на то, что длительность жизни этого свечения меньше 0,001 сек. Являются ли эти длинноволновые полосы, появляющиеся при низкой температуре, β-полосами (фосфоресценцией), сказать трудно. Следует только подчеркнуть, что при понижении температуры наблюдается постепенный сдвиг этих максимумов в инфракрасную область, а не появление какой-то новой полосы сразу в определенном участке спектра. Измерения в тонких слоях суспензий бактерий и тонких пленках пигментов (оптическая плотность в основном максимуме не более 0,10), где практически отсутствует реабсорбция, показали ту же картину спектральных изменений. Для выяснения природы этого свечения и причин своеобразного температурного поведения необходимы дальнейшие исследования. Плотность и регулярность упаковки существенно влияют на величину сдвига. Так, у плотноупакованных пленок пигментов отмечался наибольший сдвиг в инфракрасную область. Коллоиды, адсорбаты и монослои при замораживании дают меньший сдвиг с одновременным увеличением интенсивности, характерный для всех агрегированных форм.

Характер адсорбента, по-видимому, оказывает значительно меньшее влияние на положение максимумов. Так, для бактериовиридина на бумаге или сахарозе максимум люминесценции отличается всего на 2—4 *ммк*. Данные по спектрам поглощения пигментов [23], адсорбированных на самых различных веществах (белки, окись магния и др.), свидетельствуют о том, что положение главных полос мало изменяется и скорее зависит от концентрации равновесного раствора, из которого наносился пигмент, чем от природы адсорбента.

Обычно искусственные хлорофилл-белковые комплексы не воспроизводят всех спектральных особенностей пигментов. Даже в тех случаях, когда спектры поглощения их были близки к живым системам [24], можно думать, что это связано с агрегацией молекул пигмента на белковых структурах.

Установленное сходство спектров поглощения и люминесцентных свойств агрегированных форм пигментов в модельных системах и живых организмах позволяет допустить, что спектральные и некоторые фотохимические особенности пигментов в клетках бактерий определяются главным образом характером пигмент-пигментного взаимодействия в мономерных и агрегированных формах пигментов. Конечно, это не исключает взаимодействия и связи их с другими компонентами клеток, такими как белки, липоиды; однако такое взаимодействие приводит к гораздо меньшим изменениям в спектрах, чем агрегация (взаимодействие между молекулами пигмента).

Относительно участия отдельных форм в бактериальном фотосинтезе на основании данных по спектрам действия [14] можно считать, что агрегированные формы принимают непосредственное участие в этом процессе. Измерения кинетики выцветания в различных максимумах люминесценции у зеленых бактерий показали наибольшие изменения в максимумах агрегированных форм. Эти изменения были одинаковы при комнатной и низкой температурах.

Сам факт изменений при действии света указывает на возможность их вовлечения в фотохимические превращения при фотосинтезе. Обна-

руженные обратимые изменения в средней части спектра у зеленых бактерий указывают на образование лабильных фотопродуктов, которые могут избыточно накапливаться при больших интенсивностях света в случае насыщения фотосинтетических путей превращения возбужденных молекул пигментов.

Элементарный механизм участия отдельных форм пигментов в процессах фотосинтетического переноса электрона нельзя считать установленным. Мы хотели указать здесь на следующие возможные пути.

1. При действии света на агрегированные формы происходит их фотодезагрегация, и мономерные формы пигментов вовлекаются в систему реакций фотохимического переноса электрона; мы указывали в 1952 г. на эту возможность [7].

2. Агрегированные формы непосредственно участвуют в элементарных фотореакциях, происходящих на фазовых границах. В нашей лаборатории было показано, что агрегированные формы бактериовиридина обладают фотосенсибилизирующим действием в реакциях переноса водорода, так же как и суспензии живых бактерий; мономерные формы пигмента в растворах были активнее [8].

В том и другом случае участие пигментов в переносе электронов может быть связано с элементарным процессом фотоокисления цитохромов, что явствует из опытов Чанса [25] по измерениям дифференциальных спектров поглощения бактерий при низких температурах. Возможно, что элементарным процессом является восприятие электрона от восстановленного цитохрома возбужденной молекулой бактериохлорофилла. В опытах нашей лаборатории в 1955—1956 гг. было показано в модельных системах, что хлорофилл и бактериохлорофилл способны фотосенсибилизировать окисление и восстановление цитохрома [26].

* * *

В экспериментальной работе по люминесценции пурпурных бактерий участвовал студент МГУ Хун Юй-цюнь, в работе с зелеными бактериями — Б. А. Гуляев. Приносим глубокую благодарность кафедре микробиологии, акад. В. И. Шапошникову и Е. Н. Кондратьевой за предоставленные культуры фотосинтезирующих бактерий.

Выводы

Измерены спектры люминесценции бактериальных пигментов при комнатной и низкой температурах в культурах пурпурных и зеленых фотосинтезирующих бактерий, а также в модельных системах (растворах, монослоях, адсорбатах, пленках), в которых пигменты находятся в мономерных и агрегированных формах. Максимум флуоресценции бактериохлорофилла в клетках пурпурных бактерий находился при +20° С около 901—907 *ммк* в зависимости от вида бактерий, а при —196°С — около 916—920 *ммк*. Близкий по положению максимум наблюдался у твердых пленок бактериохлорофилла, который при +20°С был расположен около 890—900 *ммк*, а при —196° — около 910—920 *ммк*. В спектрах флуоресценции культур зеленых бактерий наблюдалось три максимума — при 680, 780 и 805 *ммк*, принадлежащих различным формам бактериовиридина. Замораживание до —196° С вызывало смещение двух последних до 782 и 817 *ммк* соответственно. Твердые пленки бактериовиридина обладали при +20°С максимумом флуоресценции около 790—800 *ммк*, а при —196° С — около 810—820 *ммк*, т. е. довольно близким к наиболее длинноволновому максимуму флуоресценции около 790—800 *ммк*, а при 196° С — около 810—820 *ммк*, 780—790 *ммк* была характерна для монослоев и адсорбатов бактерио-

виридина. В концентрированных растворах при низких температурах наряду с максимумами мономерного бактериовиридина при 670 и 720 *ммк* обнаружен довольно интенсивный максимум при 732—735 *ммк*, возможно, принадлежащий димерам этого пигмента. Измерена температурная зависимость интенсивности люминесценции для мономерных и агрегированных форм бактериовиридина в таких растворах и клетках бактерий. Агрегированным формам была свойственна характерная зависимость увеличения интенсивности свечения с понижением температуры; тогда люминесценция «мономерных» форм мало усиливается с понижением температуры.

У агрегированных форм в клетках зеленых и пурпурных бактерий как при комнатной, так и при низкой температуре под действием света отмечено значительное уменьшение люминесценции.

Поступила в редакцию
9.VIII.1962

ЛИТЕРАТУРА

1. Любименко В. Н., Журнал русского ботанического общества **6**, 97, 1921
2. Wassink E. C., Katz E., Dorrstein R., Enzymologia **7**, 113, 1939
3. Duysens L. N. M., Thesis, Utrecht, 1952
4. French C. S., J. Gen. Phys. **21**, 71, 1937
5. Griffits M., Sistrom W. R., Cohen-Bazire G., Stanier R. Y., Nature **176**, 1211, 1955
6. Calvin M., Nature **176**, 1214, 1955
7. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **85**, 389, 1952
8. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **127**, 913, 1959
9. Красновский А. А., Биофизика **6**, 3, 1959
10. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй-цюнь, Докл. АН СССР **143**, 456, 1962
11. Кондратьева Е. Н., Мошенцева В. А., Докл. АН СССР **135**, 460, 1960
12. Lassels J. G., Biochem. J. **62**, 78, 1956
13. Войновская К. К., Красновский А. А., Биохимия **20**, 123, 1955
14. Larsen H., J. Gen. Phys. **36**, 161, 1952
15. Stanier R. V., Smith J., Biochim. Biophys. Acta **41**, 478, 1960
16. Stanier R. V., in: Comparative Biologie of Photoreactive Systems. p. 69. N. Y.—L., 1960
17. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Федорович И. Б., Докл. АН СССР **134**, 1232, 1960
18. Brody S. S., Science **128**, 838, 1958
19. Jacobs E. E., Holt A. E., Rabinowitch E., J. Chem. Phys. **22**, 42, 1954
20. Тумерман Л. А., Борисова О. Т., Рубин А. Б., Биофизика **6**, 645, 1961
21. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР **135**, 1528, 1960
22. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика **6**, 392, 1961
23. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР **63**, 163, 1948
24. Kamen J. G., Biochim. Biophys. Acta, **22**, 9, 1956
25. Chance B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **46**, 19, 1960
26. Красновский А. А., Войновская К. К., Биофизика **1**, 120, 1956

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 149, № 6

БИОФИЗИКА

Н. В. КАРАПЕТЯН, Ф. Ф. ЛИТВИН,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИЗМЕНЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ СПЕКТРОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ

Одним из перспективных путей выяснения механизма участия пигментов в фотосинтезе является исследование дифференциальных спектров поглощения (свет — темнота) фотосинтезирующих организмов ([1–9]). Особый интерес представляют измерения в красной и близкой инфракрасной области, где поглощение целиком обусловлено хлорофиллом или хлорофиллоподобными пигментами. Данные, полученные на зеленых растениях и

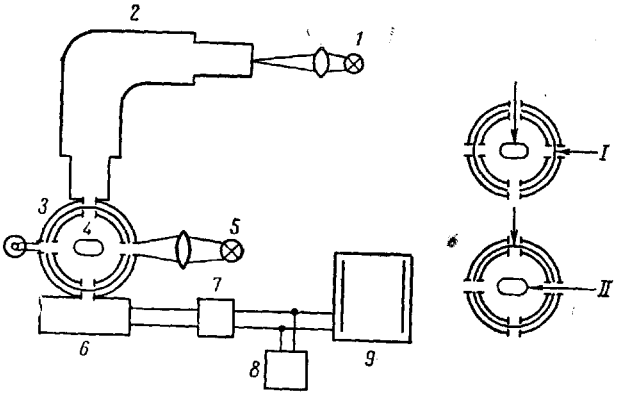


Рис. 1. Установка для измерения дифференциальных спектров: *1* — источник измеряющего света (лампа накаливания 12 в, 30 вт); *2* — монохроматор УМ-2; *3* — модулятор с мотором; *4* — объект; *5* — источник действующего света (750 вт, кинолампа); *6* — фотоумножитель ФЭУ-22; *7* — усилитель постоянного тока; *8* — гальванометр; *9* — регистрирующий потенциометр. Справа — положения вращающегося цилиндра при прохождении измеряющего (*I*) и действующего (*II*) лучей

водорослях для этой области, весьма немногочисленны и противоречивы как в отношении самого существования изменений поглощения, так и в отношении положения главного максимума изменений ([3–5]). Нами были обнаружены ([9]) спектральные изменения в красной области, возникающие при освещении суспензии хлореллы и листьев; было установлено, что наблюдаемые эффекты обусловлены не изменениями поглощения, а изменениями люминесценции объекта, возбуждаемой измеряющим лучом.

Опыты проводили на установке для измерения дифференциальных спектров поглощения (рис. 1). Модулятор светового потока позволял попеременно (через 0,02 сек.) освещать объект интенсивным действующим, а затем монохроматическим измеряющим лучом. Исследования проводили в режиме измерения дифференциальных спектров поглощения. Величина фототока I, обусловленная пропущенным светом, без дополнительного освещения, была постоянной при каждой длине волны. При измерении поглощения этот фототок компенсировался, и измерялся сигнал ΔI, возникающий

при освещении объекта * действующим светом. При измерениях изменений флуоресценции перед фотоумножителем (ФЭУ) помещали светофильтр, пропускающий только длинноволновую флуоресценцию объекта и отсекающий монохроматический измеряющий (возбуждающий флуоресценцию) свет. Величину флуоресценции определяли по разнице между отсчетами при помещении светофильтра до и после объекта на пути монохроматического луча. Через 2—3 сек. после включения действующего света измеряли изменение интенсивности флуоресценции $\Delta\Phi$. Зависимость величины ΔI (при постоянной I) от длины волны измеряющего света обычно рассматривают как дифференциальный спектр поглощения $\Delta I = \Delta T = f(\lambda)$, что справедливо, если пренебречь изменениями флуоресценции, возбуждаемой измеряющим светом. Изменение $\Delta\Phi$ с длиной волны измеряющего света представляет собой дифференциальный спектр возбуждения флуоресценции без поправки на интенсивность возбуждения света (при постоянной I величина поправки зависит от спектральной чувствительности ФЭУ и пропускания объекта).

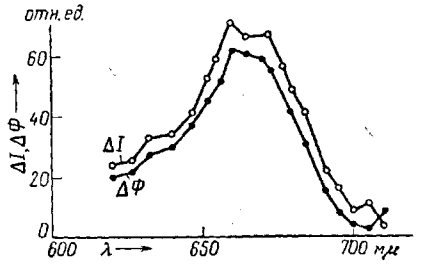


Рис. 2. Изменение флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом, при освещении действующим светом у Chlorella pyrenoidosa. $\Delta\Phi$ — изменение флуоресценции (комбинация светофильтров КС-19 и СЗС-12, пропускающая только свет флуоресценции); ΔI — то же, измеренное без светофильтров

Изменение поглощения. Для измерения истинных изменений поглощения перед ФЭУ помещали светофильтр, отсекающий длинноволновую люминесценцию. При исследовании дифференциальных спектров хлореллы и листьев растений с синими и интерференционными светофильтрами были обнаружены изменения поглощения в области 515—525 мμ, возникающие под действием освещения и не связанные с люминесценцией хлорофилла. Эти данные согласуются с результатами других исследователей ([1б,2-6]). При использовании интерференционных светофильтров (максимум пропускания 670 и 680 мμ) нам не удалось обнаружить каких-либо изменений поглощения в пределах чувствительности установки (10^{-3} единиц оптической плотности). В исследованных нами дифференциальных спектрах фотосинтезирующих бактерий был обнаружен максимум при 785 мμ, который также обусловлен увеличением поглощения (см. ниже).

Изменение люминесценции. В опытах с суспензией хлореллы перед ФЭУ помещали светофильтр, пропускающий люминесценцию объекта $\lambda > 710$ мμ. При измерении $\Delta\Phi$ вносили поправку на расеянный действующий свет и длительное послесвечение объекта. Сопоставление полученной кривой со спектром ΔI, измеренным без светофильтра (рис. 2), показывает, что дифференциальный спектр в красной области обусловлен изменением люминесценции объекта (возбуждаемой измеряющим лучом) при освещении действующим светом. Кривая $\Delta\Phi$ имеет сложную структуру с рядом «плеч» при (625); 633; (647); 653—657; 664; 668; 673; 680—682; 695—697 и 702—705 мμ, которые проявляются в виде довольно резких максимумов на расчетной кривой $\Delta\Phi/\Phi$. Относительная величина «плеч» и их точное положение зависят от возраста культуры и условий, предшествующих измерению, однако общий вид спектра воспроизводится достаточно хорошо. Сходные изменения интенсивности люминесценции при освещении наблюдались также на листьях фасоли.

При измерении дифференциального спектра пурпурных бактерий (рис. 3, *А*) перед ФЭУ помещали светофильтр, пропускающий свет флуоресцен-

* Культуры фотосинтезирующих бактерий и Chlorella pyrenoidosa были нам любезно предоставлены кафедрой микробиологии Московского университета и лабораторией фотосинтеза Института физиологии растений АН СССР.

ции $\lambda > 900$ мμ. В спектре Chromatium обнаруживаются максимумы и «плечи» при 785—790; 805; 845; 860—870 и 890 мμ. Сопоставление этой кривой с соответствующей кривой ΔI, измеренной без светофильтра, показывает, что быстрые эффекты в области 800—900 мμ обусловлены в основном изменением люминесценции объекта при освещении. В области 750—790 мμ при измерении со светофильтром обнаруживается небольшое увеличение сигнала, тогда как при измерении без светофильтра наблюдается его уменьшение. Таким образом, изменения при 750—790 мμ с максимумом 785 мμ, очевидно, обусловлены действительным изменением поглощения. Этот вывод подтверждается результатами измерений с интерференционным светофильтром (максимум пропускания 790 мμ), при которых обнаружено аналогичное уменьшение пропускания под действием освещения. Изменения люминесценции при освещении наблюдались также и у зеленых бактерий (максимум при 755 мμ (рис. 3, *Б*).

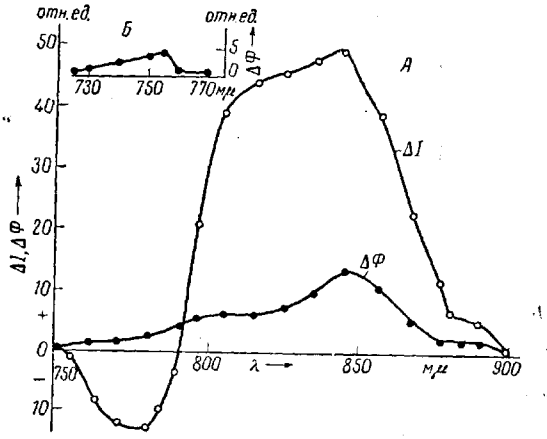


Рис. 3. Изменения флуоресценции фотосинтезирующих бактерий под действием освещения. *А* — Chromatium: $\Delta\Phi$ — измерено со светофильтром ИКС-3, выделяющим флуоресценцию; ΔI — то же без светофильтра (значение $\Delta\Phi$ занижено, так как светофильтр пропускал лишь ~25% флуоресценции). *Б* — Chloropseudomonas etilicum: $\Delta\Phi$ измерена со светофильтром ИКС-1

Обнаруженные нами спектральные изменения люминесценции фотосинтезирующих организмов могут быть вызваны двумя причинами: 1) изменением (увеличением) концентрации люминесцирующей формы пигмента под действием света; 2) изменением квантового выхода люминесцирующей формы при дополнительном освещении. В качестве рабочей гипотезы можно предположить, что возгорание люминесценции вызывается фотодезагрегацией пигментов, ведущей к устранению эффекта тушения за счет взаимодействия близкорасположенных молекул пигмента, или изменением состояния комплекса пигмента с тушителем люминесценции, участвующим в цепи фотосинтетического переноса электрона (так, сенсибилизированное восстановление тушащего флуоресценцию пластохинона может приводить к возгоранию флуоресценции). Сложная структура кривой $\Delta\Phi$ может быть объяснена, исходя из предположения о существовании не одной, а нескольких форм пигмента, ответственных за люминесценцию и по-разному меняющих квантовой выход люминесценции под действием освещения. Поэтому «плечи» на кривой $\Delta\Phi$ можно сопоставить с максимумами поглощения разных форм хлорофилла ([10–13]).

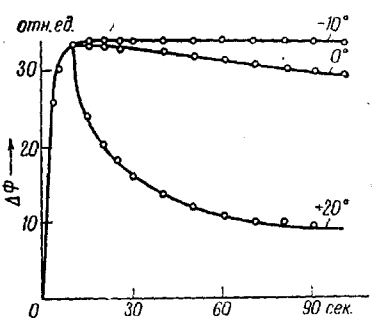


Рис. 4. Влияние температуры на кинетику изменения флуоресценции листа фасоли под действием освещения

Изменения флуоресценции под действием освещения наблюдались нами только на живых объектах; при нагревании суспензии водорослей или бактерий в течение 2 мин. при 100° эти изменения полностью исчезали. При выдерживании суспензии хлореллы в течение одного дня в темноте (без продувания смесью углекислоты и кислорода) величина изменений значительно уменьшалась. Кривые кинетики изменений флуоресценции $\Delta\Phi$

у хлореллы и листьев по своей форме сходны с кривыми индукционных явлений). При понижении температуры до 0° скорость спада кривой $\Delta\Phi$ при освещении уменьшалась (ср.[14]); при —10° спада кривой не происходило вообще. Охлаждение до —196° приводило к полному исчезновению изменения флуоресценции при освещении, тогда как величина флуоресценции резко возрастала. Добавление хинона подавляло как флуоресценцию, так и ее изменения при освещении. В присутствии фенилуретана интенсивность флуоресценции несколько возрастала, а ее изменения почти полностью исчезали.

Изложенные выше данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые изменения флуоресенции связаны с нативным состоянием фотосинтетического аппарата и способностью клетки к фотосинтезу. Обнаруженные изменения флуоресценции, по-видимому, отражают участие различных форм пигментов в фотосинтезе. Существование спектральной зависимости изменений флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом, может быть существенно для объяснения дифференциальных спектров фотосинтезирующих организмов в красной области спектра, которые рассматривались как следствие изменений поглощения пигментов.

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

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 I 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] L. N. M. Duysens, *а*) Thesis, Utrecht (1952); *б*) Science, **120**, 353 (1954). [2] Л. Н. Белл, ДАН, **113**, 695 (1957). [3] B. L. Strehler, V. H. Lynch, Arch. Biochem. and Biophys., **70**, 527 (1957). [4] J. W. Coleman, A. S. Holt, E. J. Rabinowitch, J. Phys. Chem., **63**, 30 (1959). [5] B. Kok, Plant. Physiol., **34**, 189 (1959). [6] H. T. Witt, Research in Photosynthesis, Ed. by H. Gaffron, 1957, p. 75. [7] J. M. Olson, B. Kok, Biochim. et biophys. acta, **32**, 278 (1959). [8] R. K. Clayton, Bacteriol. Revs., **26**, 2, p. 1, 151 (1962). [9] Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Биофизика, **8**, № 2 (1963). [10] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952); **91**, 343 (1953). [11] C. S. French, Light and Life, Ed. McElroy, Baltimore, 1961, p. 447. [12] J. B. Thomas, Biochim. et biophys. acta, **59**, 202 (1962). [13] Ф. Ф. Литвин, Г. П. Рихирева, А. А. Красновский, Биофизика, **7**, 578 (1962). [14] J. Franck, C. S. French, T. T. Puck, J. Phys. Chem., **45**, 268 (1941).

БИОФИЗИКА

Том VIII, вып. 2 1963

577.45

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ХЛОРОФИЛЛА МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Н. В. КАРАПЕТЯН, Ф. Ф. ЛИТВИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР
Биолого-почвенный факультет МГУ, Москва

В последнее время все больший интерес исследователей, работающих в области изучения механизма фотосинтеза, привлекают методы дифференциальной спектрофотометрии фотосинтезирующих организмов.

Этот интерес обусловлен тем, что дифференциальные спектры поглощения позволяют судить о быстрых изменениях пигментов и ферментных систем, участвующих в процессах фотосинтеза, непосредственно в живых нормально функционирующих организмах. Поскольку изменения концентраций превращающихся соединений и соответствующие им изменения поглощения очень малы, они недоступны для исследования при помощи стандартных спектрофотометров (СФ-4, СФ-2М, Бекман и т. п.).

За последние годы создано несколько чувствительных установок различного типа [1—8] для дифференциальной спектрофотометрии, которые позволяют обнаруживать изменения поглощения до 0,01—0,001%, протекающие в интервале времени до 10^{-2}—10^{-5} сек.

Наибольшее значение при исследовании первичных стадий фотосинтеза имеет изучение спектральных изменений, возникающих под действием освещения (дифференциальный спектр «свет — темнота»). Именно в этой области исследований получено наибольшее число данных как на целых фотосинтезирующих организмах (листья, водоросли, бактерии), так и на модельных системах (суспензии хлоропластов, растворы, экстракты пигментов и т. д.). Дифференциальные спектры листьев и зеленых водорослей, измеренные различными исследователями [3; 5; 9; 10], обладали сложной структурой с целым рядом максимумов — положительных (увеличение оптической плотности при освещении) 340, 515—525, 580 и 730 *ммк* и отрицательных (уменьшение оптической плотности при освещении: 390, 430, 480, 585, 625, 680 и 710 *ммк*). Спектральные изменения поглощения, возникающие при освещении объекта, были изучены в нескольких аспектах: в зависимости от различных внешних условий [5; 11; 12], от принадлежности изучаемых организмов к различным систематическим группам [3; 9; 13; 14], на различных модельных системах [3; 10; 15; 16]; изучен целый ряд кинетических закономерностей [3; 5; 11; 17]. Благодаря этим исследованиям была установлена связь изменений поглощения с основными процессами фотосинтеза. Сопоставление результатов, полученных на целых организмах, с данными по модельным системам и изучение кинетики спектральных изменений позволило ряду авторов [5; 10; 13] попытаться идентифицировать вещества, которым можно приписать максимумы в дифференциальном спектре. Так, изменения поглоще-

ния в средней области спектра (450—600 *ммк*) разными исследователями были отнесены за счет превращений цитохромов, каротиноидов, флавинов. Однако до настоящего времени убедительной и общепринятой интерпретации дифференциальных спектров не выработано.

Остается открытым вопрос о том, в какой мере дифференциальные спектры отражают превращения хлорофилла при вовлечении его в процессы фотосинтеза. Сложность этой проблемы во многом обусловлена тем, что в наиболее хорошо изученной области спектра (400—600 *ммк*) наряду с хлорофиллом поглощают многие другие компоненты клетки. Можно считать установленным факт уменьшения поглощения в области синего максимума хлорофилла *а* при 435 *ммк* и одновременного появления нового максимума в области 515—525 *ммк*, где поглощает восстановленная форма хлорофилла [18]. Изменения в области 435 *ммк* были обнаружены у различных организмов, у которых общим пигментом был только хлорофилл *а* [19]. Однако изучение изменений в красной области, где отсутствует поглощение других веществ, и сопоставление их с результатами измерений в средней области спектра до сих пор остается наиболее трудным и малоисследованным вопросом. Имеющиеся данные малочисленны и противоречивы. Так, Стрелер и Линч [5] считают, что изменений поглощения в области красного максимума хлорофилла нет или они настолько малы, что не превышают 10% величины изменений в зеленой области при 520 *ммк*. С другой стороны, Кок [3; 13; 20] обнаружил хорошо выраженный отрицательный максимум при 700 *ммк*. Однако положение этого максимума не совпадает с положением основного максимума поглощения хлорофилла in vivo (680 *ммк*). Были найдены лишь небольшие изменения при 650 и 680 *ммк*. На основании этих исследований Кок выдвинул гипотезу об участии в фотосинтезе пигмента, поглощающего при 700 *ммк* и служащего конечным акцептором световой энергии. Следует указать, что Кок обнаружил также одновременное уменьшение поглощения при 435 *ммк* и высказал предположение, что оба отрицательных максимума при 435 и 700 *ммк* обусловлены превращением какого-то производного хлорофилла *а* [20].

В противоположность обоим авторам Колеман, Холт и Рабинович [8] и Колеман и Рабинович [10] обнаружили уменьшение поглощения при 680—685 *ммк*, т. е. в области главного максимума поглощения хлорофилла in vivo, достигающее 0,2% (меньшие эффекты были выявлены при 625, 650 и 710 *ммк*). При этом было найдено, что уменьшение поглощения в красной области наступает лишь при достаточно высоких интенсивностях действующего света, тогда как увеличение поглощения в зеленой области обнаруживается уже при гораздо меньших интенсивностях. Авторы делают вывод о том, что обнаруженные ими спектральные изменения указывают на возможность фотохимического восстановления хлорофилла при его участии в фотосинтезе. В этой связи они обсуждают проблему соотношения изменений в зеленой области спектра (фотовосстановленная форма хлорофилла, возможно — каротиноиды) с изменениями в красной области (хлорофилл).

Таким образом, для интерпретации дифференциальных спектров и прежде всего для выяснения вопроса о превращениях хлорофилла при фотосинтезе особый интерес приобретает исследование дифференциальных спектров поглощения свет — темнота в красной области. Методическая трудность, возникающая при решении этой задачи, связана с необходимостью отделения измеряющего света от рассеянного действующего и от флуоресценции объекта, возникающей в результате его освещения интенсивным действующим светом.

Методика

Нами была сконструирована установка для измерения дифференциальных спектров поглощения свет — темнота с механическим разделением измеряющего и действующего световых пучков. Установка состояла из источника измеряющего света, монохроматора, модулятора с держателем объекта, источника действующего света, фотоумножителя с усилителем и регистрирующим устройством (рис. 1, *А*). При измерении дифференциальных спектров особое значение имеет стабильность питания источника измеряющего света и фотоумножителя. В качестве источника измеряющего света использована лампа накаливания 12 *в*, 30 *вт* с питанием от батареи кислотных аккумуляторов. Питание фотоумножителя осуществлялось от высоковольтного выпрямителя-стабилизатора ВС-22. Модулятор состоял из трех коаксиальных цилиндров: средний вращающийся цилиндр имел 2 щели (через 180°), а внутренний и наружный цилиндры (неподвижные) — по 4 щели (через 90°). При повороте среднего цилиндра объект попеременно освещался измеряющим и действующим лучами (рис. 1, *Б*). Такое разделение световых пучков исключает попадание на фотоумножитель света флуоресценции, возбуждаемой действующим светом, а также интенсивного рассеянного света и дает возможность производить измерения в широкой области спектра от 500 до 900 *ммк* независимо от спектрального состава действующего света. Время измерения и действия сильного освещения составляло по 0,002 сек., интервал времени между освещением объекта действующим и измеряющим лучами — 0,02 сек. Для установки был специально подобран фотоумножитель ФЭУ-22 с максимальной чувствительностью при минимальном уровне темновых шумов. Сигнал от фотоумножителя усиливали при помощи усилителя постоянного тока и подавали на гальванометр М-91/А или на регистрирующий потенциометр ЭПП-09. Источником действующего света служила киноламна (750 *вт*) с конденсором и водным тепловым фильтром. Объект помещали в держателе, находящемся во внутреннем неподвижном цилиндре модулятора.

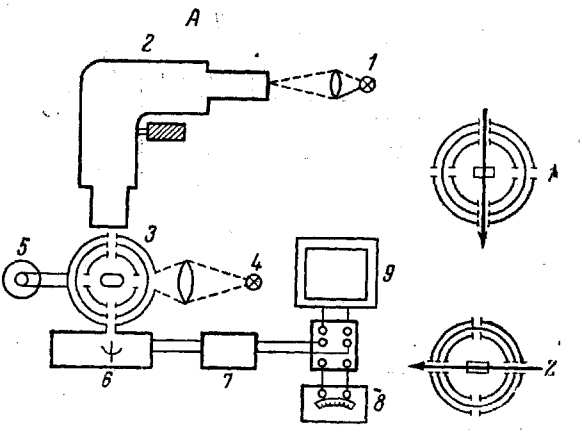


Рис. 1. Установка для измерения дифференциальных спектров поглощения

А — блок-схема: *1* — источник измеряющего света; *2* — монохроматор; *3* — модулятор; *4* — источник действующего света; *5* — мотор; *6* — фотоумножитель; *7* — усилитель; *8* — гальванометр; *9* — регистрирующий потенциометр; *Б* — положение вращающегося цилиндра при прохождении измеряющего (*1*) и действующего (2) лучей

После включения монохроматического измеряющего света, проходящего через объект, сигнал от фотоумножителя компенсировали током от батареи сухих элементов. Интенсивность измеряющего света подбирали таким образом, чтобы величина фототока (компенсированный сигнал) была одинаковой при всех длинах волн. Затем объект освещали действующим светом и измеряли изменение его пропускания при данной длине волны. Чувствительность установки позволяла обнаруживать изменения поглощения около 0,05—0,1% в случае измерений на живых объектах и 0,05% при исследовании растворов.

В одном из вариантов установки применялась двулучевая схема (рис. 2). В этом случае был использован раздвоитель пучка, представ-

ляющий собой систему зеркал и помещавшийся у выходной щели монохроматора, и два фотоумножителя, при помощи раздвоителя пучка можно было уравнивать сигналы от измеряющего (проходящего через объект) и компенсирующего (проходящего через образец сравнения) лучей. Выходы обоих фотоумножителей были включены навстречу один другому (рис. 2, *Б*): при выключенном действующем свете уравнивали сигналы от измеряющего и компенсирующего лучей. Сигнал, возникающий в результате изменения пропускания при освещении объекта, из-

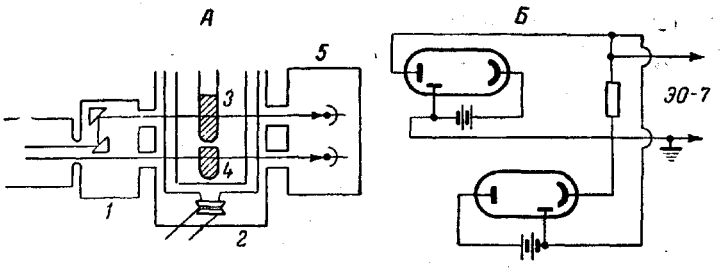


Рис. 2. Схема двулучевого дифференциального спектрофотометра
А — оптическая схема: *1* — раздвоитель пучка с зеркалами; *2* — модулятор; *3* — исследуемый объект; *4* — стандартный образец; *5* — фотоумножители; *Б* — схема включения фотоумножителей (сигналы поданы навстречу)

меряли на осциллографе ЭО-7. Применение двулучевой схемы позволяло устранить колебания, вызванные нестабильностью измеряющего света, однако точность измерений описываемой схемы была несколько ниже. Поэтому бо́льшая часть измерений была проделана на установке с однолучевой схемой с компенсацией тока.

Результаты

Для выяснения механизма первичных процессов фотосинтеза и участия хлорофилла в этих процессах, а также для объяснения дифференциальных спектров поглощения представляет интерес сравнительное исследование дифференциальных спектров свет — темнота растворов хлорофилла и живых фотосинтезирующих организмов.

Опыты с растворами хлорофилла. Хорошо известно, что при освещении растворов хлорофилла в органических растворителях пигмент способен как к окислению (на воздухе), так и к восстановлению (в вакууме в присутствии донора электрона [18]). Эти превращения хлорофилла обычно исследовали при длительном освещении; наблюдавшиеся изменения концентрации хлорофилла были при этом достаточно большими, реакции были обратимы за длительный темновой промежуток времени (в случае восстановления). Представляло интерес проследить начальные стадии превращений хлорофилла при освещении с целью обнаружить быстрые и обратимые изменения и сопоставить их с результатами измерений на живых объектах при тех же условиях на нашей установке.

Фотоокисление кислородом воздуха. При кратковременном освещении спиртового раствора хлорофилла $a+b$ модулированным светом в течение 15 сек. в красном максимуме хлорофилла обнаруживаются изменения поглощения, лишь незначительно обратимые в темноте. Дифференциальный спектр свет — темнота (рис. 3, *Б*) имеет отрицательный максимум в области красной полосы поглощения хлорофилла и небольшой положительный максимум при 510—530 *ммк*, соответствующий, по-видимому, максимуму окисленной формы хлорофилла [21]. Быстрых и обратимых изменений, как в случае фотовосстановления (см. ниже), обнаружено не было, что согласуется с работой [21].

Фотовосстановление. Реакцию проводили в обычных условиях [18]: пиридиновый раствор хлорофилла $a+b$ в вакууме с добавлением аскорбиновой кислоты и 5% воды. Кратковременное освещение модулированным светом (свет 0,002 сек., темнота 0,02 сек.) в течение 10 сек. приводило к достаточно большому изменению (~1,5%) в красном максимуме поглощения хлорофилла, которое было почти полностью обратимо в темноте. Измерение кинетики изменений при 670 *ммк* показало, что изменения в этой области наступают мгновенно при включении действующего света (рис. 4, *А*), причем характер кривой изменения поглощения во времени свидетельствует о наличии быстрой и медленной компонент в процессе превращений хлорофилла под действием света. При более кратковременном освещении модулированным светом (чередование периодов освещения и темноты 2,5 сек.) быстрая обратимая стадия особенно четко начинает проявляться после нескольких циклов освещения (рис. 4, *В*). Неполная обратимость при первых циклах освещения, возможно, связана с сенсибилизированным восстановлением следов кислорода.

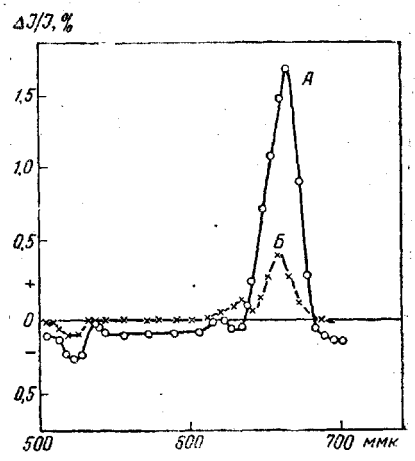


Рис. 3. Дифференциальные спектры
А — в процессе фотовосстановления (пиридиновый раствор хлорофилла с аскорбиновой кислотой в вакууме); *Б* – в процессе фотоокисления (спиртовый раствор хлорофилла на воздухе)
По оси ординат — изменение пропускания

Освещение в течение 15 сек. модулированным светом приводило к увеличению поглощения при 525 *ммк*, которое было обратимо в темноте. В противоположность изменениям поглощения в красной области изменения при 525 *ммк* начинались не сразу после включения действующего света, а лишь через 1—3 сек.

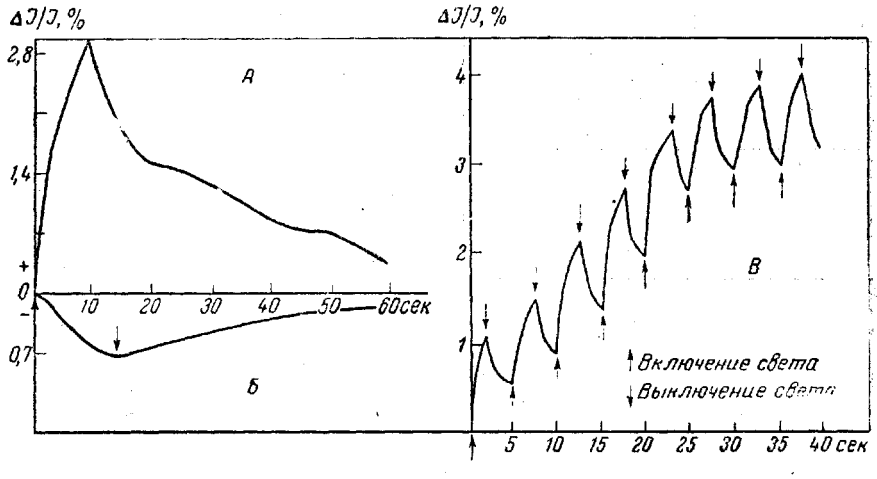


Рис. 4. Кинетика изменений поглощения хлорофилла при реакции обратимого фотовосстановления (запись на ЭПП-09)
А — при 670 *ммк*; *Б* — при 525 *ммк*; *В* — при 670 *ммк*, при чередовании коротких интервалов освещения и темноты (по 2,5 сек) По оси ординат изменение пропускания

Быстрая компонента, по-видимому, отсутствует в зеленой области спектра (рис. 4, *Б*).

В дифференциальном спектре в процессе фотовосстановления изменение поглощения при каждой длине волны измерялось после 10 сек.

освещения модулированным светом; измерения в соседних точках были разделены темновым интервалом в 1 мин. Как видно из рис. 3, *А*, отрицательный максимум совпадает по положению с главным максимумом поглощения хлорофилла в пиридине (670 *ммк*). Положительный максимум появляется в области поглощения красной фотовосстановленной формы хлорофилла (525 *ммк*). Изменение поглощения при 670 *ммк* значительно (в 6—7 раз) превосходит изменение поглощения при 525 *ммк*. Отношение этих величин D_{670}/D_{525} в условиях кратковременного освещения приблизительно в 2—2,5 раза больше, чем наблюдаемое в условиях более длительного непрерывного освещения. Очевидно, на первых стадиях фотовосстановления возникают лабильные промежуточные продукты, не поглощающие при 525 *ммк*, о чем также свидетельствует сопоставление кинетики при 525 и 670 *ммк*.

Необходимо отметить, что все указанные эффекты исчезают при добавлении в раствор красителя (метиловый красный), который реагирует с фотовосстановленными формами хлорофилла. После того как краситель полностью необратимо восстанавливался в результате фотосенсибилизированной реакции, описанные выше эффекты наблюдались вновь. Все это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения поглощения обусловлены реакцией фотовосстановления хлорофилла.

Опыты с живыми организмами. Исследовали суспензии зеленой водоросли Chlorella pyrenoidosa и фотосинтезирующих бактерий Chromatium и Rhodopseudomonas palustris[1]. В средней области от 500 до 600 *ммк* дифференциальный спектр свет — темнота измеряли при освещении объекта красным светом с длиной волны >640 *ммк* со светофильтром СЗС-18 перед фотоумножителем (пропускает свет с длиной волны <600 *ммк*). Отсчет производили через 2—3 сек. после освещения модулированным светом, темновой интервал между измерениями 1 мин.

В дифференциальном спектре хлореллы в зеленой области четко обнаруживается увеличение поглощения с максимумом при 515 *ммк* (рис. 5). Аналогичный эффект был обнаружен при освещении белым светом (в этом случае вносилась поправка на рассеянный действующий свет и длительное послесвечение объекта, см. ниже). При попытках измерить дифференциальный спектр поглощения в красной области спектра при освещении хлореллы белым светом были обнаружены значительные изменения с максимумом при 670 *ммк*, которые можно было бы принять за изменение пропускания. Однако эти изменения не воспроизводились, если перед фотоумножителем (после объекта) помещали интерференционный светофильтр с максимумом пропускания при 664 или 680 *ммк* (при измеряющем свете той же длины волны). Это обстоятельство указывало на то, что эффект может быть связан не с изменением пропускания, а с изменением люминесценции объекта. Действительно, опыты с красным светофильтром КС-18 (пропускание в области >685 *ммк*), помещаемым на пути монохроматического измеряющего света перед объектом и после него

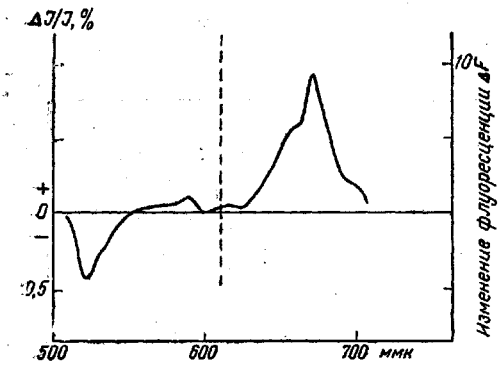


Рис. 5. Дифференциальный спектр свет — темнота суспензии хлореллы (D_{680}=1,5)

Левая часть — изменение пропускания; правая часть — изменение флуоресценции (в относительных единицах)

[1] Культуры водорослей и фотосинтезирующих бактерий были любезно предоставлены нам сотрудниками кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета МГУ Е. Н. Кондратьевой и А. А. Раменской.

(перед фотоумножителем), показали, что измеряющий свет возбуждает флуоресценцию объекта, интенсивность которой изменяется при включении действующего света.

Более детальные исследования позволили установить, что эффекты, наблюдаемые в красной области при освещении хлореллы, складываются из следующих составляющих: а) рассеянный объектом действующий свет (паразитный свет, отраженный между цилиндрами модуля-

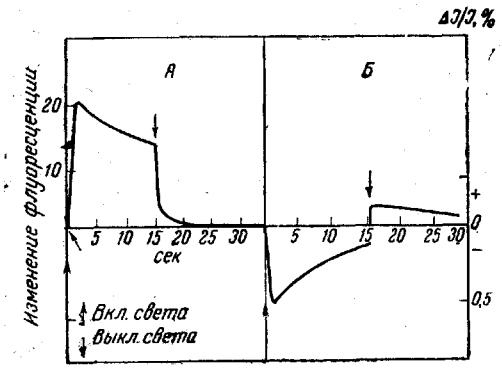


Рис. 6. Кинетика изменений флуоресценции и поглощения при освещении суспензии хлореллы

А — изменение флуоресценции (измеряющий свет 665 *ммк*) в относительных единицах; Б — изменение пропускания при 525 *ммк*

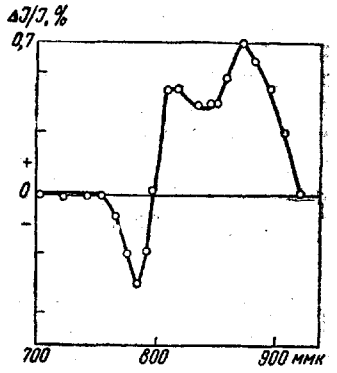


Рис. 7. Дифференциальный спектр суспензии Chromatium при освещении белым светом

По оси ординат — изменение пропускания

тора), создающий постоянный фон — наблюдается без измеряющего света: б) длительное послесвечение объекта (хемилюминесценция), вызванное действующим светом — наблюдается без измеряющего света; в) изменение флуоресценции объекта, возбуждаемой измеряющим лучом, при включении действующего света — измеряется со светофильтром, помещаемым перед фотоумножителем (светофильтр пропускает только свет флуоресценции объекта); г) изменение поглощения объекта — наблюдается со светофильтром, отсекающим флуоресценцию.

Количественная оценка каждой из составляющих показала, что полученный дифференциальный спектр в красной области обусловлен в основном изменением флуоресценции объекта, возбуждаемой измеряющим светом, под действием освещения (в). Этот вывод подтверждается также тем фактом, что дифференциальный спектр свет — темнота можно получить, помещая перед фотоумножителем красный светофильтр, пропускающий только флуоресценцию объекта.

Рассеянный действующий свет и послесвечение (хемилюминесценция) объекта (а, б) составляют небольшой постоянный фон, который вычитается из показаний прибора при каждой длине волны.

Собственно изменение поглощения (г) в области от 665 до 680 *ммк* не превышало ошибки измерения и составляло не более 10% от изменений поглощения в зеленой области спектра.

Таким образом, измеренные нами дифференциальные спектры отражают в основном изменение флуоресценции, возбуждаемой монохроматическим измеряющим светом, под действием интенсивного освещения (рис. 5, правая часть). При этом относительные изменения флуоресценции были значительны и достигали 50—80% исходной величины до включения действующего света.

Обратимые изменения люминесценции под действием освещения наблюдались только на живом объекте. Эти изменения исчезали при нагревании суспензии водоросли до 100° в течение 3 мин. Форма спектральной кривой для хлореллы изменялась в зависимости как от дли-

тельности периода освещения, так и от длительности темнового интервала между включениями действующего света при каждой последующей длине волны измеряющего света. Кинетика изменений и их величина в красной области (рис. 6) воспроизводились при повторном освещении в том случае, если темновой интервал между ними составлял не менее 4 мин.

При исследовании суспензий бактерий Chromatium и Rhodopseudomonas palustris были получены дифференциальные спектры, один из которых изображен на рис. 7. По общей форме кривой этот спектр сходен с аналогичными спектрами, полученными Дюйзенсом [14] и Олсоном и Коком [22]. Найдено, что измеряющий луч возбуждал флуоресценцию бактерий. При дополнительном освещении быстрые эффекты обусловлены изменением флуоресценции, а медленные — изменением поглощения. Следует отметить, что положение длинноволнового максимума зависит от возраста культуры (в нашем распоряжении была старая культура).

Обсуждение

Описанные выше результаты свидетельствуют о том, что собранная нами установка пригодна для измерения дифференциальных спектров как растворов, так и живых фотосинтезирующих организмов (водоросли, бактерии) в широкой спектральной области.

Измеренные дифференциальные спектры первых быстрых стадий фотовосстановления и фотоокисления хлорофилла в растворе указывают на то, что окисленная и восстановленная формы хлорофилла поглощают в одной и той же области, что может затруднить идентификацию этих форм in vivo. Один из нас уже давно указал на это сходство [18; 21].

Из литературы [3; 5; 10] известно, что изменения в зеленой области in vivo, особенно при слабых интенсивностях действующего света, превосходят изменения в красной области. В опытах in vitro это несоответствие также наблюдается, однако оно имеет противоположный характер — изменения в красной области при 670 *ммк* значительно (в 7 раз) превосходят изменения при 525 *ммк*.

Наши опыты с кратковременным (2,5 сек.) освещением хлорофилла в среде, содержащей восстановитель, показали, что быстрые обратимые изменения хлорофилла при освещении наблюдались в течение менее чем 1 сек.

Отношение величин изменений в максимумах при 670 и 525 *ммк* D_{670}/D_{525} и кинетика изменений в этих максимумах показывают, что в начальных стадиях освещения хлорофилл переходит в лабильные формы, не поглощающие при 525 *ммк*. В темноте эта форма быстро превращается с регенерацией исходного хлорофилла. Таким образом, несоответствие изменений поглощения в красной и зеленой областях объясняется, по-видимому, наличием промежуточных стадий в процессе превращения хлорофилла в восстановленную форму, поглощающую при 525 *ммк*. Возможно, что быстрая компонента реакции соответствует «первичной» восстановленной (электродно-активной) форме хлорофилла, определяющей быстрые и обратимые изменения потенциала инертного электрода [23]. В живой системе эти промежуточные стадии также могут иметь место, однако вследствие того, что условия стабилизации промежуточных продуктов иные, несоответствие между изменениями при 670 и 525 *ммк* имеет противоположный характер. Вместе с тем, не исключена возможность того, что изменения поглощения при 525 *ммк* in vivo могут быть также обусловлены превращениями иных пигментов и кофакторов ферментных систем, которые протекают при освещении хлорофилла. Например, наблюдалось, что при фотовосстановлении хлорофилла в гомогенатах изменения в красной области не сопровождались значительными изменениями в зеленой области [24]. Итак,

даже в модельной системе нет простого соответствия между изменениями поглощения в красной и зеленой областях как по величине, так и по характеру кинетики.

Измерение дифференциальных спектров живых фотосинтезирующих организмов выявило изменения поглощения в зеленой области, которые в наших опытах достигали 1% в начальные моменты освещения. В красной области кажущиеся изменения в пропускании хлореллы в условиях наших измерений были вызваны изменениями не поглощения, а интенсивности флуоресценции, возбуждаемой монохроматическим измеряющим лучом; у фотосинтезирующих бактерий были найдены как изменения поглощения, так и изменения флуоресценции, также возбуждаемой измеряющим светом. Поэтому измеренные дифференциальные спектры хлореллы в красной области можно рассматривать как дифференциальные спектры возбуждения флуоресценции. Для точного определения спектра необходимо учитывать влияние эффекта реабсорбции при разных длинах волн, пропускание и спектральную чувствительность фотоумножителя.

Изменения флуоресценции могут быть вызваны либо изменением состояния пигментов (например, фотодезагрегация), либо изменением квантового выхода флуоресценции в процессе фотосинтеза. Фотодезагрегация может привести к увеличению концентрации хорошо люминесцирующей мономерной формы хлорофилла [25; 26]. В связи с этим следует отметить, что кинетика изменений в красной области у хлореллы (рис. 6) напоминает кривые, характеризующие индукционные явления [27; 28]: при включении света происходит «возгорание» флуоресценции, а затем постепенное падение ее интенсивности, вызванное, по-видимому, запуском реакций фотосинтеза. Возможно, что описанные нами быстрые изменения флуоресценции имеют то же происхождение, что и индукционные явления, наблюдаемые при перенесении фотосинтезирующих организмов из темноты на свет. Тот факт, что кинетика изменений при 525 *ммк*, как уже указывалось Стрелером [5], сходна с кинетикой индукционных явлений, наводит на мысль, что некоторые изменения в средней области спектра могут быть вызваны изменениями флуоресценции веществ, поглощающих в этой области, например флавинов. Несомненно, что этот вопрос заслуживает дальнейшего детального исследования.

Необходимо отметить, что методики измерения дифференциальных спектров, описанные другими авторами, изложены недостаточно подробно. Поэтому трудно судить о том, насколько изменения флуоресценции могли сказываться на дифференциальных спектрах, измеренных в красной области и в других областях спектра в ранее опубликованных исследованиях. В тех случаях, когда для измерения использовали большие концентрации суспензий водорослей или хлоропластов и интенсивность измеряющего света была достаточно высокой, не исключена возможность, что эффекты изменения флуоресценции при освещении имели место. Решение этого вопроса, по-видимому, имеет чрезвычайную важность для интерпретации данных, полученных при помощи дифференциальной спектрофотометрии.

Отличие наших данных об изменениях в красной области спектра от результатов других авторов, обнаруживших выраженные изменения поглощения в этой области [3; 10], пока трудно объяснить, поскольку примененные установки и условия измерения дифференциальных спектров описаны ими лишь в самом общем виде. Противоречивость имеющихся данных, возможно, свидетельствует о том, что величина изменений зависит как от условий освещения (интенсивности действующего света, его спектрального состава, длительности освещения, различного режима освещения — импульсного или непрерывного и т. д.), так и от способа измерения (в частности, величина изменений зависит от дли-

тельности темнового интервала между окончанием освещения и началом измерения). В случае, если интенсивность действующего света мала, а темновой интервал между освещением и измерением достаточно велик, быстрые обратимые изменения могут быть не зарегистрированы на установке.

Выводы

1. Собрана установка для измерения дифференциальных спектров поглощения с механическим разделением во времени измеряющего и действующего света. Установка позволяет осуществлять измерение дифференциальных спектров «свет — темнота» растворов хлорофилла и живых фотосинтезирующих организмов.

2. Измерены дифференциальные спектры поглощения хлорофилла в растворах при его фотовосстановлении и фотоокислении, которые оказались весьма сходными. При исследовании кинетики изменений поглощения обнаружено, что при обратимом фотовосстановлении хлорофилла, наряду с более медленными изменениями, протекают быстрые (в пределах менее 1 сек.) полностью обратимые стадии. При фотоокислении обнаруживаются медленные и, в основном, необратимые изменения хлорофилла.

3. Измерены дифференциальные спектры суспензий зеленой водоросли Chlorella pyrenoidosa и фотосинтезирующих бактерий Chromatium и Rhodopseudomonas palustris. Установлено, что в дифференциальном спектре свет — темнота хлореллы изменения в красной области при освещении вызваны главным образом изменением флуоресценции, тогда как в зеленой области спектра наблюдаются изменения поглощения.

4. При интерпретации дифференциальных спектров свет — темнота следует учитывать изменения люминесценции хлорофилла (возбуждаемой монохроматическим измеряющим светом) под действием интенсивных световых импульсов.

Поступила в редакцию
4.VII.1962

ЛИТЕРАТУРА

1. Duysens L. N. M., Research in Photosynthesis, p. 59, N. Y., 1957
2. Chance B., Science **120**, 767, 1954
3. Kok B., Plant Physiol. **34**, 189, 1959
4. Witt H. T., Moraw R., Müller A., Z. Phys. Chem. **20**, 193, 1959
5. Strehler B. L., Lynch V. H., Arch. Biochem. Biophys. **70**, 527, 1957
6. Lundegårdh H. Physiol. Plantarum **7**, 375, 1954
7. Белл Л. Н., Докл. АН СССР **107**, 329, 1956
8. Coleman J. W., Holt A. S., Rabinowitch E. J., Science **123**, 795, 1956
9. Duysens L. N. M., Science **120**, 353, 1954
10. Coleman J. W., Rabinowitch E. J., J. Phys. Chem. **63**, 30, 1959.
11. Witt H. T. Research in Photosynthesis, p. 75, N. Y. 1957.
12. Spruit C. J. P. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **75**, 1097, 1956
13. Kok B., Acta Bot. Neerl. **6**, 316, 1957
14. Duysens L. N. M. Thesis. Utrecht, 1952
15. Lynch V. H., French C. S. Carnegie Inst. Wash. Year Book **54**, 166, 1955
16. Witt H. T., Z. Phys. Chem. **28**, 286, 1961
17. Белл Л. Н., Докл. АН СССР **113**, 695, 1957
18. Красновский А. А. Докл. АН СССР **60**, 421, 1948; Усп. химии **29**, 736, 1960
19. Witt H. T., Труды V Международного биохимического конгресса, М., VI симпозиум, стр. 67, 1962
20. Kok B., Труды V Международного биохимического конгресса, М., VI симпозиум, стр. 76, 1962
21. Красновский А. А., Докл. АН СССР **58**, 617, 1947; **58**, 835, 1947
22. Olson J. M., Kok B., Biochim. Biophys. Acta **32**, 278, 1959
23. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **95**, 841, 1954
24. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **91**, 343, 1953
25. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР **63**, 163, 1948
26. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биохимия **23**, 760, 1958
27. McAlister E. D., J. Gen. Physiol. **22**, 613, 1939.
28. Frank J., French C. S., Puck T. T., J. Phys. Chem. **45**, 1268, 1941

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 153, № 1

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

УЧАСТИЕ ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПИРИДИН-НУКЛЕОТИДОВ В ФОТОХИМИЧЕСКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ

В предыдущих работах мы показали, что хлорофилл сенсибилизирует к красной области спектра фотовосстановление пиридин-нуклеотидов и бензил-никотинамида аскорбиновой кислотой и фотоокисление восстановленных форм этих соединений кислородом воздуха ([1–3]). Мы обратили внимание на то, что активированный светом восстановленный бензил-никотинамид (БНА-Н) способен к фотовосстановлению хлорофилла ([3]).

В настоящей работе исследуются реакции возбужденных светом молекул восстановленного дифосфопиридин-нуклеотида (ДПН-Н), а также способность возбужденных и невозбужденных молекул этого соединения быть донором водорода (электрона) в разных типах фотохимических реакций.

Фотоокисление возбужденных молекул ДПН-Н и БНА-Н. В качестве окислителей мы исследовали кислород воздуха, ацетальдегид, сафранин Т, рибофлавин и хлорофилл. Применение сафранина в качестве акцептора электрона в изучаемой системе особенно удобно, так как это соединение не поглощает в области 320—400 мμ, где расположены максимумы поглощения ДПН-Н и БНА-Н. Реакцию возбуждали группой ртутных линий при 365 мμ, т. е. в области максимумов поглощения ДПН-Н и БНА-Н.

Опыты вели в кварцевых трубках Тунберга, приспособленных для измерений на спектрофотометре СФ-4. Трубки освещали при 20° ртутно-кварцевой лампой ПРК-4 через светофильтр УФС-2 или кинолампой 300 вт через светофильтр КС-13 (10^5—10^6 эрг/см^2·сек) и ЗС-2. В работе использовали 60% ДПН-Н (L. Light Co) и БНА-Н, полученный по описанному методу ([4]). Реакции изучали в растворах воды, пиридина и спирта. О фотоокислении судили по падению характерных для восстановленных форм максимумов поглощения при 340 мμ для ДПН-Н и при 355 мμ для БНА-Н.

На рис. 1 показано фотоокисление ДПН-Н в водном растворе различными акцепторами электрона (реакция идет также в спирте и пиридине). Фотореакция с кислородом воздуха (*А*) идет очень медленно. Реакция с ацетальдегидом (*Б*) идет гораздо быстрее, что указывает на возможность не только энзиматической, но и фотохимической активации ДПН-Н. Рибофлавин при освещении светом 365 мμ восстанавливается внутримолекулярно (в условиях нашего опыта — медленно), введение ДПН-Н приводит к чрезвычайному ускорению световой реакции. После пуска воздуха регенерирует восстановленный рибофлавин, тогда как ДПН-Н окисляется необратимо (рис. 1*В*). Реакция с сафранином идет в области возбуждения ДПН-Н (340 мμ) и сафранина (540 мμ). Освещение водного раствора ДПН-Н в вакууме не приводило к изменению. В темноте за 10 мин. реакции с изученными акцепторами электрона не наблюдалось. Длительное освещение (до 30 мин.) в вакууме растворов ДПН-Н в спирте и пиридине ведет к окислению ДПН-Н, сопровождающемуся, по-видимому, более глубоким восстановлением растворителя. В пиридине появляется новый максимум поглощения при 360 мμ.

Окисление ДПН-Н возбужденными молекулами пигментов. Существенно то, что окисление ДПН-Н наблюдается не

только при возбуждении в максимуме поглощения при 340 мμ, но и при возбуждении в максимуме поглощения пигментов — акцепторов электрона.

Реакция в вакууме с сафранином Т идет быстро при возбуждении светом, поглощенным ДПН-Н (365 мμ), и при возбуждении светом, поглощенным сафранином (от кинолампы накаливания через зеленый светофильтр ЗС-2). В темноте обратная реакция идет очень медленно, при пуске воздуха происходит полная регенерация сафранина. Продукт восстановления сафранина обладает поглощением в области 340—360 мμ; чтобы констатировать изменения ДПН-Н, сопутствующие фотовосстановлению сафранина, были

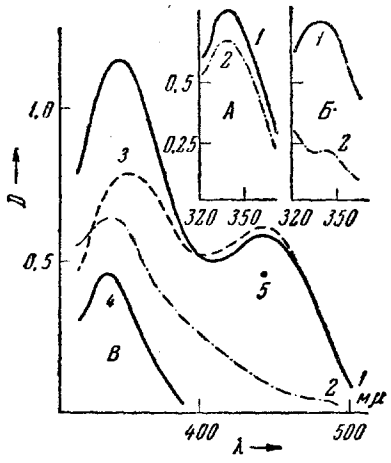


Рис. 1. Фотоокисление ДПН-Н в воде акцепторами электрона. *А* — освещение раствора ДПН-Н в присутствии воздуха (*1* — исходный спектр и контрольный опыт в вакууме, *2* — после 8 мин. освещения); *Б*—освещение раствора ДПН-Н с ацетальдегидом ($10^{-2}M$) в вакууме (*1* — до освещения, *2* — после 8 мин. освещения); *В* — освещение раствора ДПН-Н с рибофлавином (*1* — до освещения, *2* — после 1 мин. освещения, *3* — после пуска воздуха, *4* — разность *1—3*, соответствующая окислению ДПН-Н, *5* — изменение раствора рибофлавина за 1 мин. освещения без ДПН-Н)

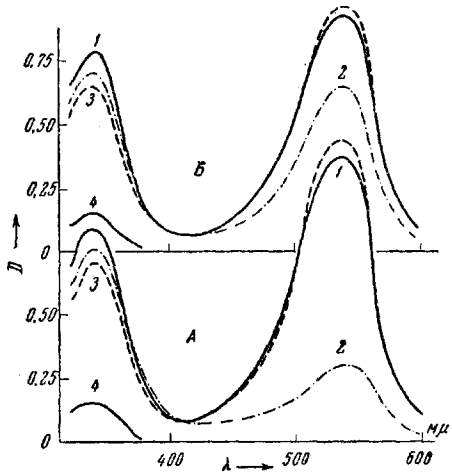


Рис. 2. Сопряженное фотоокисление ДПН-Н и фотовосстановление сафранина. *А* — освещение светом 365 мμ; *Б* — освещение зеленым светом. Спектры поглощения: *1* — исходный спектр и через 10 мин. темноты, *2* — после 3 мин. освещения, *3* — через 10 мин. после пуска воздуха в темноте, *4* — разность *1—3*, соответствующая окислению ДПН-Н

измерены спектры поглощения до освещения, после освещения и после пуска воздуха. Кислород обратимо окисляет восстановленный сафранин, и спектр поглощения его полностью совпадет с исходным. ДПН-Н в этой реакции окисляется необратимо, что отчетливо видно по дифференциальному спектру поглощения до и после освещения (рис. 2).

Реакцию с хлорофиллом изучали в пиридине и спирте. Освещение системы хлорофилл — ДПН-Н красным светом ведет к незначительному падению максимума поглощения хлорофилла, тогда как освещение в области 340 мμ приводит к значительному фотовосстановлению хлорофилла с обратимым образованием красной формы. В спирте наблюдается некоторое падение максимума ДПН-Н, но образования красной восстановительной формы хилорофилла не наблюдалось.

ДПН-Н — донор водорода при сенсибилизированных реакциях. Рассмотрим теперь тип сенсибилизированной реакции, при которой ДПН-Н играет роль неактивированного светом донора водорода. В качестве сенсибилизаторов были исследованы сафранин и хлорофилл. Сначала изучали систему ДПН-Н — сенсибилизатор — кислород воздуха. Мы уже указывали, что хлорофилл энергично сенсибили-

зирует окисление изученных соединений к красной области спектра ([2],[3]). То же действие оказывает сафранин (возбуждение в зеленой области спектра).

Однако хлорофилл и сафранин могут быть не только сенсибилизаторами, но и конечными акцепторами электрона (водорода). В этом случае под действием красного света, поглощенного хлорофиллом, происходит сенсибилизированное восстановление сафранина, ДПН-Н играет роль исходного донора водорода, так же как и аскорбиновая кислота в системах, изученных нами ранее ([5]).

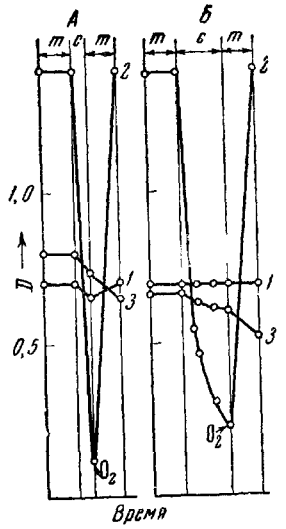


Рис. 3. Сопряженное фотосенсибилизированное окисление — восстановление в системе хлорофилл — сафранин — ДПН-Н в спирте. *А* — освещение красным светом (КС-13) (*с* — свет 1 мин., *т* — темнота 2 мин.). *Б* — освещение зеленым светом (ЗС-2) (*с* — свет 3 мин., *т* — темнота 2 мин.). *1* — максимум поглощения хлорофилла при 660 мμ, *2* — максимум поглощения сафранина при 530 мμ, *3* — максимум поглощения ДПН-Н при 340 мμ

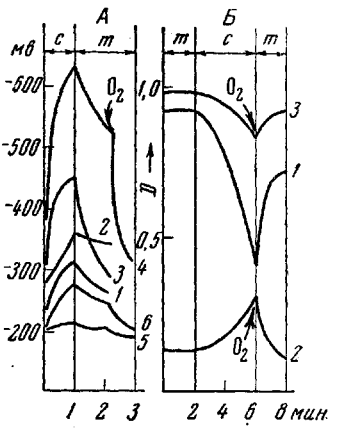


Рис. 4. Фотохимия системы ДПН-Н — хлорофилл а в пиридине. *А* — измерение фотопотенциала (*1* — хлорофилл — ДПН-Н в вакууме, красный свет, *2* — та же система, освещение 365 мμ, *3* — хлорофилл а — аскорбиновая кислота в вакууме, красный свет, *4* — хлорофилл а — БНА-Н, красный свет, *5* — хлорофилл а — БНА-Н, освещение 365 мμ, *6* — БНА-Н без хлорофилла, освещение 365 мμ); *Б* — изменение максимумов поглощения в системе хлорофилл — ДПН-Н в пиридине, освещение 365 мμ (*1*—670; *2*—525; *3* — 340 мμ). *с* и *т* — то же, что на рис. 3

При освещении системы хлорофилл — сафранин — ДПН-Н зеленым светом (в области поглощения сафранина) наблюдается восстановление сафранина. Таким образом, при возбуждении красным или зеленым светом сафранин восстанавливается за счет ДПН-Н (рис. 3).

Мы привели здесь результаты спектрофотометрических измерений. Для анализа механизма реакции проведено измерение фотопотенциала изученных систем против стандартного каломельного электрода с помощью лампового потенциометра ЛП-5, согласно методу, принятому в нашей лаборатории ([6]). Освещение раствора БНА-Н и ДПН-Н в вакууме в пиридине и в воде ведет к увеличению отрицательного потенциала платинового электрода. В темноте нет обратимости. Эффект снимается кислородом воздуха. Наблюдаемое увеличение восстановительного потенциала следует приписать образованию фотоактивированных форм ДПН-Н. Освещение ДПН-Н в присутствии обратимого акцептора электрона — сафранина или хлорофилла — ведет к обратимому появлению фотопотенциала, аналогично системе хлорофилл — аскорбиновая кислота. Существенно то, что обратимый

отрицательный потенциал в системе ДПН-Н — хлорофилл появляется при действии красного света, т. е. в условиях, когда не удалось наблюдать явного изменения хлорофилла путем спектрофотометрических измерений (рис. 4).

Изученные реакции можно классифицировать следующим образом (поведение ДПН-Н и БНА-Н подобно в большинстве описанных опытов).

1. Фотоокисление возбужденных молекул ДПН-Н акцептором электрона А (кислород, ацетальдегид, рибофлавин, сафранин, хлорофилл)

$$\text{ДПН-Н} + h\nu \rightarrow \text{ДПН-Н}^*$$
$$\text{ДПН-Н}^* + \text{А} \rightarrow \text{ДПН} + \text{АН}.$$

2. Фотовосстановление пигментов А (хлорофилл, сафранин) с использованием ДПН-Н как неактивируемого светом донора водорода

$$\text{А} + h\nu \rightarrow \text{А}^*$$
$$\text{А}^+ + \text{ДПН-Н} \rightarrow \text{АН} + \text{ДПН}.$$

3. Фотосенсибилизированное восстановление акцептора электрона (кислород, сафранин и др.) с использованием ДПН-Н в качестве исходного донора электрона и пигментов (хлорофилл, сафранин)— в качестве сенсибилизатора

$$\text{ДПН-Н} + \text{А} \xrightarrow{(\text{пигмент} + h\nu)} \text{ДПН} + \text{АН}.$$

О механизме изученных реакций могут быть высказаны следующие соображения: молекулы ДПН-Н и БНА-Н — сильные восстановители (E_0' —0,32 в); возбуждение при поглощении кванта света активирует эту способность, усиливая тенденцию молекул ДПН-Н к фотоокислению; при наличии в системе партнера, способного воспринимать электрон (водород), происходит его восстановление, сопряженное с окислением ДПН-Н. В то же время при возбуждении пигментов (хлорофилла и его аналогов, сафранина) происходит их взаимодействие с невозбужденным ДПН-Н, играющим роль донора электрона с последующими обратимыми реакциями фотовосстановленных форм пигментов.

Фотохимические реакции, при которых происходит прямая активация пиридин-нуклеотидов, могут быть связаны с рядом фотохимических эффектов, наблюдаемых при действии на организмы близкой у.-ф. области спектра. Фотодинамическое действие красителей может быть связано с фотосенсибилизированным окислением ДПН-Н, что ведет к нарушению нормального метаболизма. Наконец, сенсибилизированные хлорофиллом превращения пиридин-нуклеотидов связаны с их участием в процессе фотосинтеза.

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

Поступило
3 VIII 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949). [2] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **24**, 1085 (1959). [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **150**, 1157 (1963). [4] D. Mauserall, F. H. Westheimer, J. Am. Chem. Soc., **77**, 2261 (1955). [5] А. А. Красновский, Усп. химии, **29**, 736 (1960). [6] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953).

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 150, № 5

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН, Н. Н. ДРОЗДОВА

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ БЕНЗИЛНИКОТИНАМИДА И ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ

В 1949 г. мы экспериментально установили возможность фотосенсибилизированного восстановления пиридин-нуклеотидов в растворе за счет энергии света, поглощенного хлорофиллом ([1]). В 1959 г. мы возвратились к изучению этого вопроса ([2]) в связи с появлением ряда работ, в которых было установлено фотовосстановление пиридиннуклеотидов в суспензиях хлоропластов, в гомогенатах листьев и непосредственно в живых фотосинтезирующих организмах. Мы хотели выяснить, на каком уровне структурной организации сохраняются обнаруженные нами эффекты и как они связаны с процессами, идущими в интактных биологических структурах. Оказалось, что при воздействиях, изменяющих структуру хлоропластов и гранул, происходит нарушение сопряжения в цепи фотосинтетического переноса электрона с конечной изоляцией простых фрагментов цепи, изученных в наших работах. Мы обнаружили ([2]), что хлорофилл энергично фотосенсибилизирует окисление восстановленных пиридиннуклеотидов как в растворах, так и в гомогенатах и суспензиях хлоропластов.

Вернон ([3]) установил, в согласии с нашими исследованиями, что хлорофилл и другие пигменты в водных коллоидных растворах в присутствии аскорбиновой кислоты и препаратов фотосинтетической пиридиннуклеотидредуктазы способны фотосенсибилизировать восстановление пиридиннуклеотидов.

Баннистер и Бернардини ([4]), детально изучая фотовосстановление хлорофилла в присутствии пиридиннуклеотидов, пришли к заключению, что дифференциальный спектр (свет — темнота) с максимумом поглощения при 340—380 мμ принадлежит конечным продуктам фотовосстановления феофитина; было высказано предположение, что описанный в нашей работе дифференциальный спектр поглощения с максимумом при 340 мμ имеет то же происхождение. В этой работе не были воспроизведены условия наших опытов: применялось в 20 раз более сильное и длительное освещение, что благоприятствует деструкции хлорофилла. В наших опытах дифференциальный спектр восстановленного дифосфопиридиннуклеотида наблюдался при неизменности оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла; таким образом, появление максимума при 340 мμ нельзя приписать продуктам фотохимического превращения хлорофилла. Кроме того, мы выделяли из реакционной среды восстановленный пиридиннуклеотид, переводя его в водный раствор ([2]), что, по-видимому, не было замечено при воспроизведении наших результатов в цитируемой работе ([4]).

В связи с важностью изучения фотосенсибилизированных хлорофиллом превращений пиридиннуклеотидов мы решили вернуться к изучению этого вопроса на примере более просто построенного аналога этих соединений N-бензилникотинамида (БНА). Восстановленный БНА (который мы далее обозначаем БНА-Н) был получен по методу Мозеролла и Вестхеймера ([5]). Это соединение имеет максимум поглощения при 355 мμ (максимум восстановленных пиридиннуклеотидов при 340 мμ).

Сенсибилизированное хлорофиллом а восстановление БНА. В трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, вводили 4 мл раствора хлорофилла а в пири-

дине, содержащем 10% воды, 5 мг аскорбиновой кислоты и 5 мг БНА. Ставили следующие варианты опытов: хлорофилл-БНА; аскорбиновая кислота-БНА; хлорофилл-БНА-аскорбиновая кислота. После эвакуации воздуха из трубки Тунберга проверяли отсутствие реакции в темноте, затем трубку освещали красным светом ($0{,}5 \cdot 10^6$ эрг/см^2 ·сек в области 620—710 мμ), измеряя кинетику реакции в максимуме поглощения восстановленного БНА при 355 мμ.

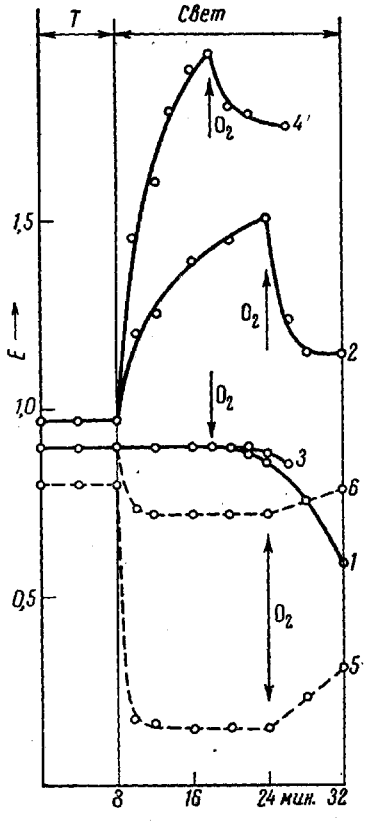


Рис. 1

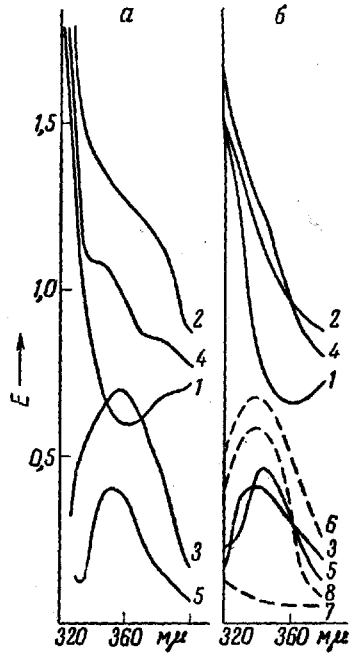


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика фотосенсибилизированного хлорофиллом а восстановления БНА и ДПН. Условия опыта с БНА: 4 мл раствора хлорофилла а в пиридине с 10% воды, 5 мг аскорбиновой кислоты и 5 мг БНА; в трубке Тунберга, в вакууме; освещение красным светом (*КС*-11); измерения в максимумах поглощения хлорофилла при 670 мμ (*1*), и БНА-Н при 355 мμ (*2*). Условия опыта с ДПН: 3,2 мл раствора хлорофилла а в пиридине, 3 мг аскорбиновой кислоты и 5 мг ДПН в 0,8 мл 5% водного раствора аммиака; освещение красным светом; измерения в максимумах поглощения хлорофилла при 670 мμ (*3*) и ДПН-Н при 340 мμ (*4*). Контрольный опыт: хлорофилл а — аскорбиновая кислота в растворе пиридина с 10% воды в тех же условиях. Измерения при 670 (*5*) и 355 (*6*) мμ. *T* — темнота, ↑ O_2 — пуск воздуха

Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения (свет—темнота) при фотосенсибилизированном восстановлении БНА и ДПН. Условия опытов те же, что рис. 1. *а* — опыт с БНА: *1* — спектр до освещения, *2* — после 24 мин. освещения красным светом, *3* — дифференциальный спектр *2—1*, *4* — спектр после добавления к раствору *1* кристаллического БНА—Н, *5* — дифференциальный спектр *4—1*. *б* — опыт с ДПН: *1* — спектр до освещения, *2* — после 10 мин. освещения красным светом, *3* — дифференциальный спектр *2—1*, *4* — после добавления к раствору *1* кристаллического ДПН-Н, *5* — дифференциальный спектр *4—1*, *6* — спектр поглощения выделенного после освещения ДПН-Н (перегонка пиридина в головку трубки и растворение сухого остатка в воде), *7* — то же без освещения, *8* — спектр ДПН-Н в воде

До и после реакции измеряли спектр поглощения раствора. В присутствии БНА оптическая плотность хлорофилла в красном максимуме поглощения не изменялась при освещении. После окончания опыта, в котором происходило восстановление БНА, в трубку пускали воздух и освещали красным светом, наблюдая окисление восстановленного БНА, сенсибилизирован-

ное хлорофиллом. На рис. 1 показана кинетика изменения максимумов поглощения хлорофилла и БНА в этом опыте. На рис. 2*а* приведены спектры поглощения до и после освещения и дифференциальный спектр (свет—темнота), соответствующий поглощению восстановленного БНА. Кристаллический препарат восстановленного БНА вводили в трубку с реакционной смесью для сравнения с полученным в опыте спектром. Отчетливо видно сенсибилизированное хлорофиллом восстановление БНА и идентичность дифференциального спектра поглощения спектру БНА-Н.

В аналогичных условиях были проведены опыты с дифосфопиридиннуклеотидом (препарат содержал 90% ДПН). В этом случае в среду вводили также аммиак, препятствующий накоплению «красной» восстановленной формы хлорофилла ([6]). В опытах с БНА в этом не было необходимости. Дифференциальный спектр (свет—темнота) соответствует восстановленному ДПН (ДПН-Н). Введение в реакционную

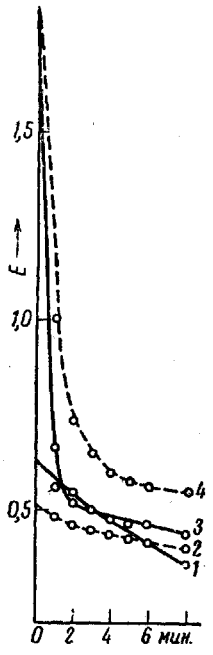


Рис. 3. Фотоокисление БНА-Н, сенсибилизированное хлорофиллом а. Условия опыта: 3 мл хлорофилла а в пиридине или в спирте, 0,3 мл водного раствора 0,2 мг БНА-Н. Освещение красным светом в присутствии воздуха. Измерения в максимумах поглощения в пиридине — при 670 (*1*) и 355 (*2*) мμ, в спирте — при 660 (*3*) и 355 (*4*) мμ

смесь до освещения препарата ДПН-Н приводит к дифференциальному спектру поглощения, идентичному спектру после освещения (см. рис. 2). Измерение флуоресценции в процессе реакции не показательно, так как продукты окисления аскорбиновой кислоты в пиридине обладают спектром флуоресценции, близким к спектру восстановленных пиридиннуклеотидов (450—480 мμ).

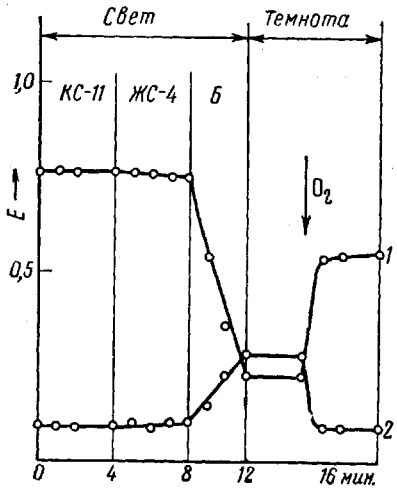


Рис. 4. Фотовосстановление хлорофилла восстановленным БНА. Условия опыта: 4 мл раствора хлорофилла а в пиридине с 10% воды и 3 мг БАН —Н, в вакууме. Освещение красным светом (*КС-11*), затем желтым (*ЖС-4*) и белым (*Б*) светом. Измерения в максимумах поглощения хлорофилла при 670 мμ (1) и «красной» фотовосстановленной формы хлорофилла при 525мμ(*2*)

После опыта проводилось выделение восстановленного ДПН из реакционной среды двумя методами: 1) по способу, описанному нами ранее ([2]), осаждением восстановленного ДПН из реакционной смеси холодным ацетоном и переводом осадка в воду; 2) отгонкой в вакууме растворителя (пиридина) в охлажденный до —70° приемник, которым служила головка трубки Тунберга (процедура, сходная с лиофильной сушкой); сухой остаток растворяли в воде, фильтровали и измеряли спектр поглощения, при этом наблюдался максимум при 340 мμ, соответствующий восстановленной форме ДПН; контрольный опыт с той же смесью без освещения, прошедший ту же процедуру, не обладал этим максимумом (рис. 2*б*).

Для проверки того, что максимум поглощения в воде при 340 мμ действительно принадлежит восстановленному ДПН, в водный раствор вводили препарат алкогольдегидрогеназы и

ацетальдегид, приэтом наблюдалось падение максимума поглощения при 340 мμ. Следует указать, что в системе бактериохлорофилл — аскорбиновая кислота — БНА нам не удалось наблюдать сенсибилизированного восстановления этого соединения, что согласуется с нашими опытами 1952 г. ([7]), показавшими отсутствие сенсибилизированного восстановления ДПН в этой системе.

В наших работах было показано, что ДПН и другие акцепторы электрона окисляют в темноте фотовосстановленный хлорофилл, приводя к регенерации исходного хлорофилла. Евстигнеев и Гаврилова ([8]) показали, что ДПН реагирует в темноте с первичной фотовосстановленной формой феофитина.

Совокупность имеющихся данных (блокирование фотовосстановления хлорофилла БНА и ДПН, темновые реакции этих соединений с фотовосстановленными формами) указывает на то, что реакция в среде пиридина, вероятно, идет с промежуточным фотовосстановлением хлорофилла и взаимодействия его ион-радикальной формы с БНА и с ДПН.

Фотосенсибилизированное хлорофиллом окисление восстановленного БНА. Раствор БНА-Н в пиридине и спирте в присутствии хлорофилла на воздухе освещали красным светом. Наблюдалось чрезвычайно быстро идущее окисление восстановленного N-бензилникотинамида (рис. 3), так же как и восстановленного ДПН([2]).

Для того чтобы получить данные о природе фотоокисления БНА-Н, мы исследовали возможность фотовосстановления хлорофилла восстановленным БНА в пиридине. Оказалось, что освещение красным и желтым светом приводило к очень медленному фотовосстановлению хлорофилла. Однако освещение «белым» светом, покрывающим также область поглощения БНП-Н, приводило к быстрому фотовосстановлению с образованием «красной» формы хлорофилла (рис. 4). Это интересное явление указывает, что в данном случае происходит фотоактивация молекулы восстановленного БНА.

Таким образом, хлорофилл в присутствии доноров водорода способен осуществлять фотосенсибилизированное восстановление бензилникотинамида и пиридиннуклеотидов, а в присутствии кислорода —фотосенсибилизированное окисление восстановленных форм этих соединений.

Приносим глубокую благодарность А. А. Ясникову за предоставление препарата N-бензилникотинамида.

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

Поступило
20 III 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949). [2] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, 24, в. 6, 1085 (1959). [3] L. Vernon, Acta chem. scand., 15, № 8 1651 (1962). [4] T. Bannister, J. Bernardini, Biochim. et biophys. acta, 59, 188 (1962). [5] D. Mauzerall, F. Westheimer, J. Am. Chem. Soc., 77, 2261 (1955). [6] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, 120, 581 (1958). [7] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 87, 109 (1952). [8] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 114, 1066 (1957).

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 150, № 6

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХЛОРОФИЛЛА, БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОВИРИДИНА С ХИНОНОМ И КИСЛОРОДОМ В СПИРТОГЛИЦЕРИНОВОЙ СРЕДЕ

Исследования обратимых фотохимических окислительно-восстановительных превращений хлорофилла, могущих быть звеном в цепи фотосинтетического переноса электрона, ведутся в течение многих лет. При этом наибольший интерес к себе привлекали такие превращения, которые сопровождаются «запасанием» энергии света в продуктах реакции. Этим объясняется то внимание, которое было уделено исследованию обратимого фотовосстановления хлорофилла, его аналогов и производных ([1]). Стабилизация «запасающих» энергию фотопродуктов при этой реакции наблюдалась главным образом в основных средах.

В 1947 г. мы наблюдали способность хлорофилла и его аналогов к обратимому фотоокислению кислородом воздуха, идущему наиболее отчетливо в спиртовых растворах ([2]). При интенсивном освещении растворов пигментов на воздухе происходит давно известное деструктивное фотоокисление. Однако наряду с продуктами необратимого окисления образуются промежуточные окисленные соединения, из которых удалось частично регенерировать пигмент действием слабых восстановителей (аскорбиновая кислота); это наблюдалось у фталоцианина магния и менее отчетливо — у хлорофилла а ([2]); в наиболее явной форме эффект обратимого фотоокисления был выражен у бактериохлорофилла ([3]). Эти работы были подтверждены в исследованиях Годхера, показавшего также возможность окисления бактериохлорофилла рядом других соединений ([4]). При окислении растворов пигментов перекисью бензоила образуются лабильные промежуточные окисленные формы, из которых удается регенерировать пигмент добавлением аскорбиновой кислоты ([5]).

Евстигнеев и Теренин ([6]) нашли, что знак фотопотенциала твердых пленок хлорофилла и его аналогов связан с окислительно-восстановительными свойствами окружающего пленку электролита. В присутствии окислителей наблюдается обычно положительный потенциал, который можно связать с наличием фотоокислительных реакций пигмента, а в присутствии восстановителей — отрицательный потенциал, связанный с элементарным фотовосстановлением. Качан и Даин ([7]), освещая хлорофилл ультрафиолетовым светом в «жестких» средах при температуре —190°, нашли изменения поглощения хлорофилла, которое они объяснили элементарным фотоокислением. Линшитц и Реннерт показали, что при освещении хлорофилла красным светом при низкой температуре (—190°) в смеси эфир — изопентан — спирт происходит выцветание, которое усиливается в присутствии хинона и может объясняться фотоокислением ([8]). Толлин и Грин наблюдали при освещении системы хлорофилл — хинон в той же «жесткой» среде появление сигнала э. п. р. со спектром семихинона, что служит указанием на одновременно идущее одноэлектронное фотоокисление хлорофилла ([9]). Эти результаты можно также интерпретировать как сенсибилизированное хлорофиллом восстановление хинона с использованием компонентов растворителя в качестве донора электрона. Тушение флуоресценции хлорофилла кислородом и хиноном ([10]), при котором не удалось обнаружить обратимых фотохимических изменений пигмента ([11]), может рассматриваться как обратимое «одноэлектронное» окисление возбужденной молекулы хлорофилла молекулами окислителя ([12]).

В настоящей работе продолжались поиски обратимого фотоокисления в растворах путем наблюдения за обратимыми изменениями оптической плотности в «красном» максимуме поглощения пигмента при чередующихся периодах света и темноты. В поисках этих превращений мы выбрали среду, которая благоприятствует фотоокислению. Такой средой является смесь спирта с глицерином ([13]), в которой возможно также изучение реакции и при низких температурах. При —70° смесь этилового или метилового спирта с глицерином (1 : 2) представляет собой прозрачную высоковязкую систему. В этих средах мы изучали фотоокисление хлорофилла и его аналогов растворенным кислородом воздуха и *n*-бензохиноном (возогнанный препарат).

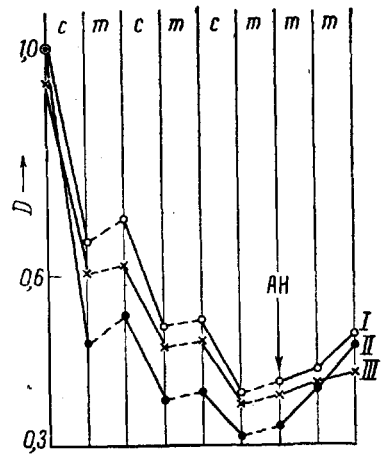


Рис. 1. Фотоокисление хлорофилла а (*I*), бактериохлорофилла (*II*) и бактериовиридина (*III*) в спирто-глицериновой среде кислородом воздуха при +20°. Изменение оптической плотности в максимумах поглощения пигментов при 665 (*I*), 770 (*II*) и 665 (*III*) мμ. Освещение через красный светофильтр КС-13 (*I*), через КС-13 и НС-3 (*II*, *III*). Периоды освещения (*c*): *I* — 3 мин., *II* — 10 сек., *III* — 1 мин. Период темноты (*m*) для всех пигментов 2 мин. Введение аскорбиновой кислоты (АН) показано стрелкой

В первой серии опытов мы исследовали фотохимическое поведение хлорофилла а, бактериохлорофилла и бактериовиридина в спирто-глицериновых растворах в присутствии кислорода воздуха. Опыты ставились следующим образом: в цилиндрическую кювету вводили эфирный раствор пигмента, снятого с соответствующей зоны хроматограммы на сахаре, эфир удаляли испарением в вакууме, приливали 1,35 мл этилового спирта и 2,7 мл глицерина. Затем освещали в фокусе конденсора осветителя (лампа 300 вт) через красный светофильтр КС-13 ($0{,}5 \cdot 10^6$ эрг/см·сек в области 710—630 мμ) в случае хлорофилла а и в опытах с бактериохлорофиллом и бактериовиридином через фильтры КС-13 и НС-3 ($0{,}5 \cdot 10^5$эрг /см^2·сек в той же области). Опыты проводили при температуре +20° и —70°, в последнем случае трубку с раствором помещали в прозрачный сосуд Дюара, содержащий охлаждающую смесь (спирт с твердой углекислотой). Для всех исследованных пигментов при понижении температуры наблюдалось некоторое увеличение коэффициента поглощения. По мере освещения наблюдали падение оптической плотности (D) и изменение D в темноте (в опытах при +20° трубку помещали в колодку спектрофотометра; в опытах при —70° трубку держали в сосуде с охлаждающей смесью). После периода освещения до момента измерения обычно проходило 15—20 сек. В этих опытах не удалось обнаружить значительных обратимых эффектов. Явный эффект обратимости наблюдался только после добавления в опытную смесь некоторого количества аскорбиновой кислоты или при введении аскорбиновой кислоты в среду до начала освещения. На рис. 1 приведены результаты опытов с хлорофиллом а, бактериохлорофиллом и бактериовиридином при +20°. Хлорофилл а выцветает значительно медленнее, чем бактериохлорофилл и бактериовиридин, хотя интенсивность освещения в опытах с последними в 10 раз меньше и интервалы освещения гораздо короче. Эффект обратимости от добавления аскорбиновой кислоты проявляется лучше всего в опытах с бактериохлорофиллом.

Анализ влияния температуры на скорость фотоокисления исследованных пигментов показал, что понижение температуры до —70° приводит к ускорению реакции в опытах с хлорофиллом а и к незначительному замедлению в опытах с бактериохлорофиллом и бактериовиридином (рис. 2). Наши опыты показали, что понижение температуры до —70° не ведет к увеличению эффекта тушения флуоресценции хлорофилла растворенным кисло-

родом; можно думать, что в этих условиях не происходит стабилизации комплексов кислорода с невозбужденными или синглетными возбужденными молекулами хлорофилла. Это указывает на возможную стабилизацию при низкой температуре предреакционных комплексов молекул хлорофилла а (вероятно, в триплетном состоянии) с кислородом.

В следующей серии опытов мы наблюдали за обратимым выцветанием исследуемых пигментов в присутствии хинона в спиртоглицериновой среде (соотношение спирт — глицерин 1 : 2) при температуре +20° и —70°. Опыты проводили в трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений, в вакууме. Перед добавлением в опытную смесь глицерина растворяли 5 мг хинона

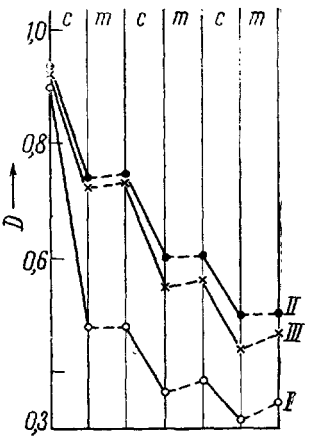


Рис. 2. Фотоокисление пигментов кислородом воздуха при —70°. Изменение оптической плотности в максимумах поглощения пигментов: *I* — хлорофилл а, *II* — бактериохлорофилл, *III* — бактериовиридин. Периоды освещения (*c*) для *I* и *III* — 1 мин., для *II* — 10 сек.

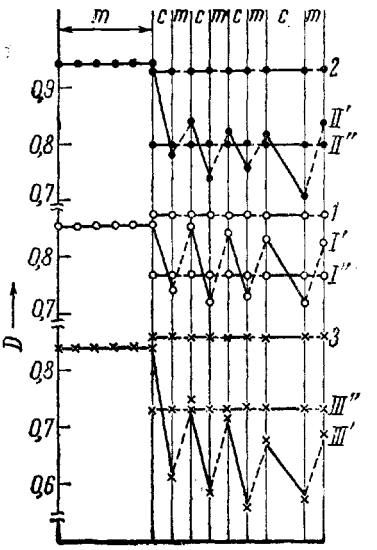


Рис. 3. Обратимое фотохимическое взаимодействие пигментов с хиноном в спиртоглицериновой среде. Опыты с хиноном при —70° (*I'*, *II'*, *III'*) и при +20° (*I''*, *II''*, *III''*). Контрольные опыты, без хинона, при —70° (*1*, *2*, *3*). *I'*, *I''*, *1* — хлорофилл а; *II'*, *II''*, *2* — бактериохлорофилл; *III'*, *III''*, *3* — бактериовиридин. Освещение через красный светофильтр КС-13. Периоды света (*c*) и темноты (*m*) 3 мин.

в 1,35 мл спиртового раствора пигмента, затем приливали 2,7 мл глицерина и отмечали объем меткой. Перед откачкой воздуха приливали 1,3 мл спирта и эвакуировали при сильном вспенивании «до метки» и прекращения кипения раствора. С парами спирта удалялся растворенный кислород воздуха.

Освещая опытную смесь при температуре +20° и при обычной процедуре измерения, мы не наблюдали изменений в максимуме поглощения пигмента (во всех случаях — измерение через 15 сек. после освещения), но проводя опыты при —70°, мы смогли обнаружить обратимые эффекты; стояние в темноте при той же температуре ведет к практически полной регенерации пигмента (рис. 3). В темноте не происходит взаимодействия между пигментами и хиноном, и изменение оптической плотности имеет место только после освещения опытной смеси. Обратимое падение оптической плотности в красных максимумах поглощения хлорофилла а, бактериохлорофилла и бактериовиридина достигает 20—25% от исходной величины (см. рис. 3). В условиях низкой температуры и большой вязкости среды прямая и обратная реакции достаточно медленны (минуты) и допускают измерение после светового периода. В опытах, проведенных с хлорофиллом а и хиноном

при —70°, наблюдалось, помимо обратимого падения D в красном максимуме, одновременное увеличение поглощения при 720; 550 и 500 мμ, которое также обратимо в темноте. В отсутствие хинона в вакууме растворы пигментов устойчивы к воздействию света, освещение их в продолжении 15 мин. не приводит к изменению оптической плотности, которое наступает только после пуска воздуха и освещения, за счет фотоокисления кислородом*.

В этих условиях мы обнаружили также обратимое изменение полиметиловых красителей, фотовосстановление которых мы недавно наблюдали ([14]). Однако в опытах с феофитином а в этих же условиях нам не удалось наблюдать изменений оптической плотности, что согласуется с известным фактом его устойчивости к окислению, но может быть объяснено и быстроидущей обратной реакцией.

Следовало выяснить, нельзя ли приписать эти обратимые изменения фотовосстановлению пигментов гидрохиноном или семихиноном, который мог бы образоваться при реакции хинона с глицерином и спиртом за счет фотосенсибилизированной реакции или в темноте. В опытах, поставленных с гидрохиноном, не удалось обнаружить изменений пигментов в данных условиях.

Таким образом, совокупность данных указывает на то, что наблюдаемые эффекты можно приписать обратимому фотоокислению хлорофилла и его аналогов *n*-хиноном, однако требует дальнейшего исследования возможность фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления хинона спиртом и вторичных реакций пигмента с образованным семихиноном.

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

Поступило
20 III 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Усп. хим., **29**, 376 (1960). [2] А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947). [3] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). [4] J. C. Goedheer, Biochim. et Biophys. Acta, **27**, 3, 478 (1962). [5] А. А. Красновский, ДАН, **58**, 835 (1947). [6] В. Б. Евстигнеев, А. Н. Терений, ДАН, **81**, 223 (1951). [7] А. А. Качан, Б. Я. Даин, ДАН, **80**, 619 (1951). [8] H. Linschitz, J. Rennert, Nature, **169**, 193 (1952). [9] G. Tollin, G. Green, Biochim. et Biophys. Acta, 60, 524 (1962). [10] В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, **60**, 623 (1948). [11] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, **74**, 315, (1950). [12] И. И. Дилунг, Н. Н. Чернюк, ДАН, **140**, 162 (1961). [13] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **21**, 126 (1956). [14] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **145**, 129 (1962).

* Обратимые эффекты наблюдались при освещении красным светом; при освещении «белым» светом лампы накаливания обратимости не было, что можно приписать ускорению обратных реакций семихинонами, образованными при освещении хинона.

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 153, № 3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА

ИЗУЧЕНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ХЛОРОФИЛЛА И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ В ВЯЗКИХ СРЕДАХ

Изучение фотохимических реакций в вязких средах и при низких температурах позволяет изолировать первичные стадии и получить данные о течении процесса внутри молекулы или молекулярного комплекса, отделив эту ступень реакции от последующих стадий, требующих диффузии компонентов.

В высоковязких спирто-глицериновых растворах при —70° нам удалось наблюдать обратимое взаимодействие хлорофилла с хиноном, вероятно из-за замедления обратной реакции медленно диффундирующих фотопродуктов ([1]).

В данной работе исследуются фотохимическое окисление, восстановление и фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода в вязких средах различной природы. Системы этиловый спирт — глицерин и пиридин — глицерин (1 : 2) при комнатной температуре достаточно подвижны, а при — 70° неподвижны, образуя прозрачную высоковязкую систему (леденец). В этих средах хлорофилл образует растворы. Мы нашли, что хлорофилл растворяется в ортофосфорной кислоте с сохранением характерной красной флуоресценции. Эти среды использовались в работе.

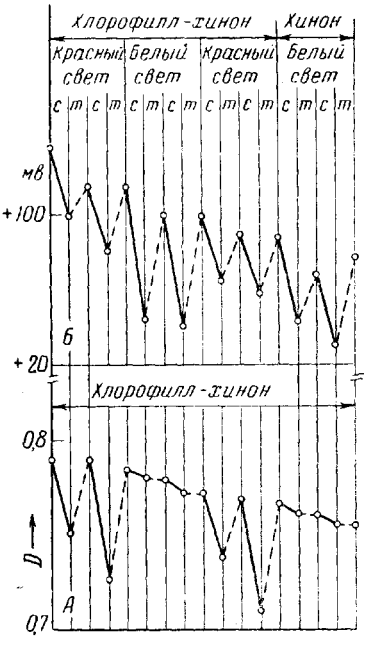


Рис. 1. Фотохимия системы хлорофилл—хинон в спирто-глицериновой среде при освещении красным и белым светом. *с* — свет, *т* — темнота. *А* — изменение оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла при 665 мμ при —70° (*с*—3 мин., *т* — 3 мин.). *Б* — изменение потенциала системы при +20° *с* — 15 сек., *т* — 30 сек.

Опыты производили согласно принятой в нашей лаборатории методике в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для измерения в спектрофотометре. Освещение — в фокусе конденсора осветителя (лампа 300 вт) через красный светофильтр КС-13 или без светофильтра (интенсивность света $5 \cdot 10^5$ эрг/см^2 · сек в области 630—700 мμ). В опытах при низких температурах трубку с раствором помещали в прозрачный сосуд Дьюара, содержащий охлаждающую смесь заданной температуры — спирт с твердой углекислотой. По мере освещения наблюдали падение оптической плотности (D) в максимумах поглощения и изменение ее в темноте. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-4 в специальной колодке, непосредственно в трубках Тунберга. Концентрация хлорофилла в этих опытах обычно 10^{-5} M, аскорбиновой кислоты 10^{-2}, хинона 10^{-2} M. Общий объем смеси после откачивания воздуха во всех опытах 4 мл.

Фотохимическое взаимодействие с окислителями. Взаимодействие хлорофилла и его аналогов с кислородом и хиноном в спиртоглицериновых средах описано в прыдыдущей работе ([1]). Существенно, что эффект наблюдается только при действии красного света; при освещении «белым» светом не удалось наблюдать обратимых эффектов, что следует объяснить фотохимическим взаимодействием хинона с растворителем с образованием семихинона и реакцией превращенных форм пиг-

мента с семихиноном (рис. 1, *А*). Для проверки этой возможности были проведены измерения фотопотенциала в системе хлорофилл—хинон в спиртоглицериновом растворе при освещении красным (светофильтр КС-13) и «белым» светом. Измерение фотопотенциала хинона (без хлорофилла) в смеси спирт—глицерин (1 : 2) показало, что освещение белым светом ведет к быстрому и обратимому в темноте появлению фотопотенциала (обратимому уменьшению положительного потенциала) (рис. 1 *Б*). Таким образом, опыты указывают на образование семихинона при фотовосстановлении хинона спиртом или глицерином. Эта система в присутствии хлорофилла при освещении красным светом дает меньший сдвиг потенциала в ту же сторону. Известно, что электродно-активен семихинон, а об электродной активности положительного ион-радикала хлорофилла нет данных. Сдвиг фотопотенциала в отрицательную сторону можно приписать образованию семихинона ($\cdot$ Хин$^-$) согласно реакции $X + Хин \rightleftarrows \cdot X^+ + \cdot Хин^-$ или сенсибилизированному хлорофиллом (X) образованию семихинона с использованием растворителя (АН) как исходного донора водорода по схеме: $Хин + AH \xrightarrow[h\nu]{X} \cdot Хин^- + \cdot AH^+$, что представляется более вероятным.

Механизм образования семихинона в реакциях этого типа требует дальнейшего исследования.

Фотохимическое восстановление. Евстигнеев и Гаврилова ([2]) нашли, что скорость образования первичной фотовосстановленной формы феофитина не зависит от температуры, если вязкость среды мало меняется. Если вязкость увеличивается за счет введения глицерина, скорость реакции уменьшается. При замерзании раствора реакция вообще не идет, что указывает на необходимость кинетических соударений. В системе этиловый спирт—глицерин (1 : 2), при данной процедуре эксперимента (измеряя оптическую плотность в красном максимуме поглощения пигмента через 15 сек. после действия света при температуре от +20 до—70°), не удалось наблюдать образования обратимо реагирующих продуктов фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой. При +20° освещение ведет к постепенному падению красного максимума поглощения хлорофилла, которое следует приписать необратимому фотовосстановлению. Без аскорбиновой кислоты этот эффект не наблюдается. В системе пиридин—глицерин (1 : 2) освещение вело к обратимому образованию красной фотовосстановленной формы, тогда как при —70° в «леденце» эта реакция не идет. В пиридине при —70° наблюдается фотовосстановление с образованием красной формы, которое протекает значительно медленнее, чем при комнатной температуре.

Таблица 1

Скорость фотовосстановления хлорофилла а аскорбиновой кислотой в вакууме (выражена отношением 1000 $\Delta D/t$ за первые 3—6 мин. фотореакции в красном максимуме)

t, °С	Спирт	Спирт + глицерин	Пиридин	Пиридин + глицерин	Фосфорная к-та	Фосфорная к-та + глицерин
+20	93	13	270	187	15	18
—70	0	0	35	0	0	0

В растворителях без аскорбиновой кислоты реакция практически не идет. Из табл. 1 видно, что фотовосстановление идет во всех средах с разной скоростью при комнатной температуре. Однако в высоковязких средах при —70° реакция практически останавливается, что может служить указанием на диффузионные стадии при образовании устойчивых продуктов фотовосстановления.

Измерение фотопотенциала в системе хлорофилл—аскорбиновая кислота по методике, принятой в нашей лаборатории ([3]), показало, что в пиридине и в смеси пиридина с глицерином наблюдается обратимое появление фотопотенциала. В этой смеси при +20° сильно замедляется обратная

реакция. При — 70° в смеси пиридина с глицерином эффект появления потенциала полностью отсутствует, что указывает на необходимость диффузии фотопродуктов и перемещения ионов при образовании фотопотенциала.

Хлорофилл и феофитин хорошо растворимы в ортофосфорной кислоте (ч. д. а.) с образованием растворов сине-зеленого цвета с яркой красной флуоресценцией. Спектры поглощения и флуоресценции хлорофилла *а* и феофитина *а* в этой среде одинаковы (рис. 2*А*), что свидетельствует о вероятной феофитинизации хлорофилла в ортофосфорной кислоте. Измерение фотопотенциала раствора хлорофилла *а* + *в* с аскорбиновой кислотой в фосфорной кислоте показало, что при чередующихся коротких периодах света и темноты вначале происходят обратимые изменения фотопотенциала (уменьшение положительного потенциала). При более длительном освещении обратимость исчезает, и наблюдается постепенное уменьшение положительного потенциала (рис. 2*Б*). Проводя измерения на спектрофотометре, мы также смогли обнаружить небольшие (в пределах ±0,02 *D*) обратимые изменения поглощения пигмента в красном максимуме поглощения при чередующихся периодах света и темноты. При понижении температуры до —20° в переохлажденной прозрачной высоковязкой фосфорной кислоте фотореакция прекращается. В изученных вязких средах наблюдаемая фотореакция связана со стадиями, требующими диффузии. Для сравнения представляло интерес измерить фотовосстановление рибофлавина, идущее внутримолекулярно ([4]). Растворы рибофлавина в спирте и в смеси спирта с глицерином освещали белым светом при температурах +20° и —70° (рис. 3). Во всех случаях наблюдается фотовосстановление, даже в практически неподвижной среде (спирт — глицерин при —70°), что подтверждает внутримолекулярный механизм процесса. В тех же условиях хлорофилл, сафранин и метиловый красный без донора водорода не изменяются.

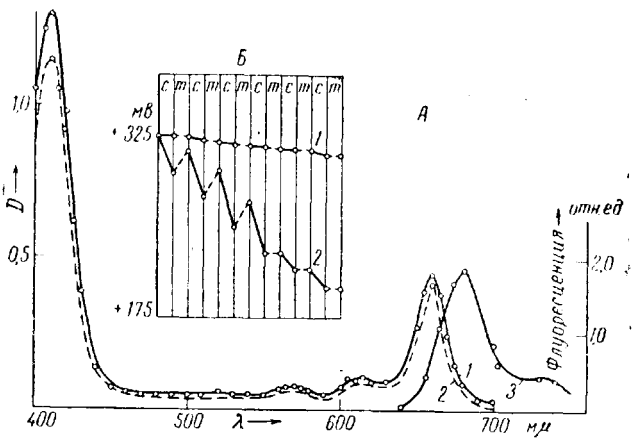


Рис. 2. Спектральные и фотохимические свойства хлорофилла в ортофосфорной кислоте. *А* — спектры поглощения хлорофилла *а* (*1*) и феофитина *а* (*2*); *3* — флуоресценция (возбуждение синими линиями ртути, выделяемыми светофильтром СЗС-3). *Б* — изменение фотопотенциала системы. *1* — хлорофилл *а* + *b*, *2* — то же + аскорбиновая кислота (*с* — свет, 1 мин., *т* — темнота, 2 мин.)

Фотосенсибилизация. Использовали тройные системы, изученные в предыдущих работах нашей лаборатории: аскорбиновая кислота—хлорофилл—акцептор электрона (метиловый красный, сафранин и рибофлавин). Изучали сенсибилизированное восстановление этих акцепторов электрона (преимущественно метилового красного) в разных средах при температуре от+20 до—70°. В системе спирт—глицерин (1 : 2) сенсибилизированное восстановление метилового красного становится все менее эффективным с увеличением вязкости по мере понижения температуры. Так, при —40° в этой системе уже не удается наблюдать сенсибилизированной реакции. Существенно, что в этиловом спирте даже при —70° наблюдается быстрая сенсибилизация (рис. 4*А*). Таким образом, эффект связан не с замедлением реакции при —70°, а с увеличением вязкости системы. Сенсибилизированное фотовосстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в системе пиридин — глицерин дает ту же картину. В фосфорной ки-

слоте и в смеси фосфорной кислоты с глицерином при комнатной температуре наблюдается эффективно идущая сенсибилизация, а при —20° (в переохлажденной вязкой системе) процесс полностью останавливается (рис. 4*Б*). Сенсибилизированное восстановление сафранина и рибофлавина показывает те же закономерности. Таким образом, в модельных системах работа короткой цепи фотохимического переноса водорода (донор электрона — пигмент — акцептор) включает стадии, требующие диффузии компонентов. Эти результаты согласуются с общей картиной ранее предложенных схем сенсибилизации хлорофиллом в растворах. Опыты показывают, что образо-

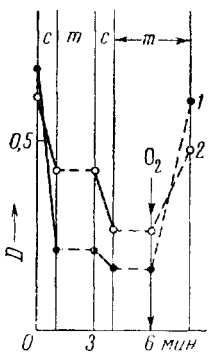


Рис. 3. Фотовосстановление рибофлавина в подвижной и неподвижной средах. Изменение оптической плотности в максимуме поглощения рибофлавина при 460 мμ при освещении белым светом. Смесь спирт—глицерин (1:2). *1* —при +20°, *2* —при —70°, *c* — свет, *m* — темнота

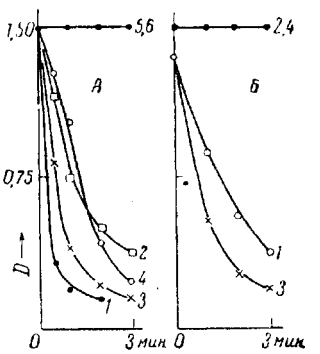


Рис. 4. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилового красного в вязких средах. Изменение оптической плотности метилового красного при 520 мμ. *А*: *1* — спирт +20°; *2* — спирт, —70°; *3* —спирт—глицерин, +20°; *4* — то же,—10°; *5* — то же, —40°, *6* —то же,—70°. *Б* : *1* —фосфорная кислота,+ 20°, *2* —то же, —20°; *3* —фосфорная кислота — глицерин, +20°; *4*— то же, —20°

вание фотовосстановленных продуктов хлорофилла аскорбиновой кислотой также требует диффузионных стадий. Однако Броди наблюдал фотовосстановление хлорофилла фенилгидразином в жестких средах при низкой температуре ([5]). В этом случае возможно образование предреакционного комплекса фенилгидразина (сильного основания и восстановителя) с хлорофиллом, в котором и идет реакция. В отличие от фотовосстановления аскорбиновой кислотой, фотоокислению хлорофилла кислородом благоприятствуют вязкие среды ([1]), что указывает на возможность предреакционного связывания хлорофилла с кислородом. Элементарные процессы переноса электрона в системе хлорофилл—донор электрона или хлорофилл—акцептор электрона могут идти через стадию предварительного образования ассоциатов, в которых участвуют либо невозбужденная молекула пигмента, либо возбужденная молекула в синглетном или триплетном состоянии ([6]).

Изучение фотохимии модельных систем в вязких растворах при низких температурах поможет в интерпретации результатов, полученных при измерении спектральных и фотохимических свойств пигментов непосредственно в фотосинтезирующих организмах.

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

Поступило
12 VIII 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1378 (1963). [2] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **114**, 1066 (1957). [3] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953). [4] H. Murray, J. Am. Chem. Soc., **73**, 4870 (1951). [5] S. S. Brody, J. Am. Chem. Soc., **82**, 1570 (1956). [6] А. А. Красновский, Усп. хим., **39**, 736 (1960).

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 152, № 5

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Ю. Е. ЕРОХИН, Б. А. ГУЛЯЕВ

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БАКТЕРИОВИРИДИНА И ЕГО СОСТОЯНИЕ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЯХ

В нашей лаборатории в 1952 г. было установлено, что спектры поглощения агрегированных форм бактериохлорофилла в твердых пленках и коллоидных растворах соответствуют спектрам поглощения этого пигмента в клетках пурпурных бактерий ([1]). Те же закономерности удалось наблюдать в случае бактериовиридина зеленых серных бактерий ([2,3]). Мы установили, что характерные низкотемпературные спектры люминесценции агрегированных форм бактериохлорофилла и бактериовиридина в твердых пленках пигмента соответствуют люминесценции этих пигментов в бактериальных клетках ([4,5]). Наши измерения люминесценции зеленых бактерий недавно подтверждены в работе ([6]).

Трудно сомневаться в том, что характерный сдвиг поглощения люминесценции бактериальных пигментов в инфракрасную область спектра объясняется агрегацией — взаимодействием близко расположенных и ориентированных молекул пигментов в хроматофорах бактерий.

Мы высказали предположение, что температурная зависимость флуоресценции объясняется условиями междумолекулярной дезактивации возбужденных молекул пигментов ([4,5]). В «мономерных» формах, где молекулы находятся на расстоянии, исключающем эффективное взаимодействие электронных облаков системы сопряженных связей, понижение температуры действует лишь на внутримолекулярные процессы дезактивации (обычно слабое действие). В случае более плотных упаковок колебания и качания молекул или отдельных ее частей ведут к междумолекулярной дезактивации за счет перекрывания электронных облаков порфиринового кольца при вхождении молекул «в контакт» при колебаниях. Понижение температуры, уменьшая колебания, ведет к «изоляции» молекул и, следовательно, к уменьшению междумолекулярной дезактивации и возгоранию люминесценции. Если принять такую модель, то можно ожидать, что в предельно плотных упаковках, где молекулы при любой температуре эффективно взаимодействуют друг с другом, понижение температуры будет относительно мало влиять на люминесценцию.

По-видимому, обычно мы имеем дело с упаковками, содержащими посторонние молекулы, отличными от предельно плотных.

В работе использована культура зеленых серных бактерий Chloropseudomonas ethylicum штамм Т. Бактериовиридин получали путем экстракции пигментов ацетоном с последующей хроматографией на бумаге. Запись спектров люминесценции проводили на установке, описанной ранее ([4]). Флуоресценцию возбуждали группой линий ртути 365—436 мμ. Объект в стеклянной вакуумной трубке Тунберга помещали в холодопровод (медную трубку-держатель), находившийся в прозрачном сосуде Дюара с жидким азотом. Температура объекта зависела от глубины погружения конца холодопровода в жидкий азот. Измерения проводили с тонкими слоями ($D = 0{,}1$ при 750 мμ) суспензии бактерий в культуральной среде в пространстве между концентрическими стеклянными трубками (в этих условиях влияние реабсорбции флуоресценции сводится к минимуму). При

комнатной температуре характерные максимумы люминесценции бактерий расположены при 680, 770 и 808 мμ. Свечение порфиринов (их очень мало в зеленых бактериях) в этих условиях регистрации (узкие щели) было незначительным.

При понижении температуры от +20 до —196° наблюдается постепенный сдвиг максимумов при 770 и 808 мμ в длинноволновую сторону и одновременное усиление флуоресценции. Максимум при 770 мμ перемещался на 8 мμ, а при 808 мμ — на 15 мμ. Положение максимума при 680 мμ от замораживания не изменялось. Флуоресценция при 680 мμ усиливается лишь в 1,2 раза, тогда как при 808—823 мμ возрастает в 2,4 раза, а при 770—773 мμ — в 2,6 раза. Была измерена температурная зависимость люминесценции в каждом из максимумов. Оказалось, что возрастание флуоресценции при 770—778 и 808—823 мμ описывается кривыми экспоненциального типа, а в максимуме 680 мμ эта зависимость близка к прямой. Скорость изменения флуоресценции с температурой оказывается наибольшей в максимуме при 808—823 мμ и достигает насыщения при —160°, тогда как в максимумах 770—778 и 680 мμ насыщение не достигается даже при —196°. При размораживании бактерий вся картина спектральных изменений наблюдается в обратном порядке.

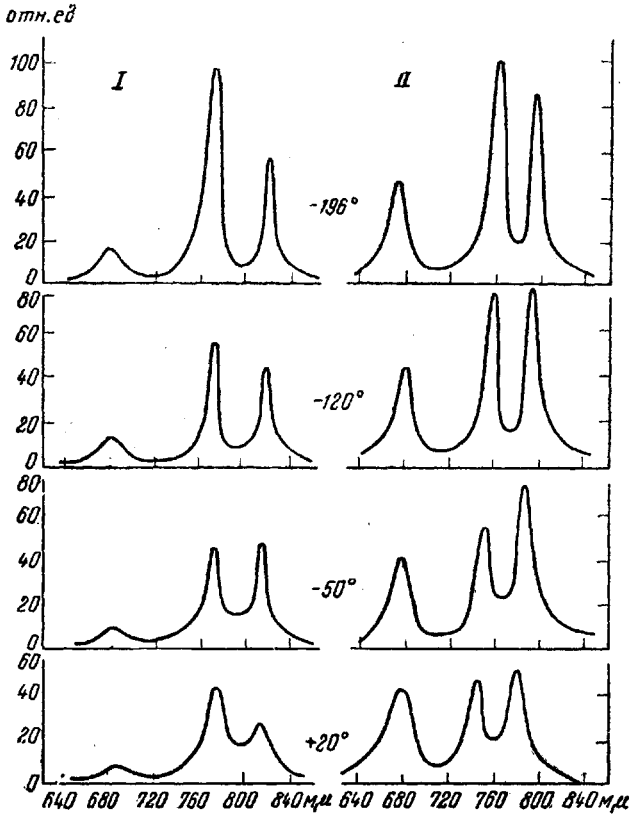


Рис. 1. Спектры люминесценции бактериовиридина в клетках зеленых серных бактерий (*I*) и в твердых пленках (*II*) при разных температурах

Повторное замораживание до —196° частично нарушает форму пигмента 770—778 мμ. Эта форма наиболее чувствительна к действию нагревания и растворителей ([3-5]).

Далее была измерена температурная зависимость люминесценции растворов, твердых пленок и адсорбатов бактериовиридина. Раствор пигмента в пиридине (D = 1,7 и 0,17 при 665 мμ) помещали в вакуумную трубку Тунберга и эвакуировали в течение 3 мин. (чтобы избежать фотоокисления пигмента во время эксперимента). Этот раствор при +25° обладает флуоресценцией при 671 и 720 мμ. При —196° люминесценция при 671 и 720 мμ в концентрированных и разбавленных растворах усиливается в 1,3 раза, причем оба максимума сдвигаются на 2—3 мμ в коротковолновую сторону.

При постепенном замораживании пиридиновых растворов уже при —40° появляется новый максимум в области 732—735 мμ. При —196° флуоресценция в этом максимуме увеличивается в разбавленных растворах в 2,5 раза, а в концентрированных — в 4,3 раза. Одновременно наблюдается

длинноволновый сдвиг нового максимума на 5—6 мμ. Таким образом, бактериовиридин легче образует агрегированные формы, чем хлорофилл а, на что мы обратили внимание ранее ([2]). Эффект сходен с наблюдавшейся Броди люминесценцией замороженных спиртовых растворов хлорофилла([7]).

Следует полагать, что как и у хлорофилла, максимумы при 671 и 720 мμ принадлежат «мономерной» форме пигмента в растворе. Зависимость этих максимумов от температуры близка к линейной. Вероятно, в растворах бактериовиридина присутствует некоторое количество агрегированной формы, флуоресценция которой при +20° слаба и скрыта вторым максимумом «мономерной» формы при 720 мμ. Понижение температуры может способствовать агрегации бактериовиридина и увеличению выхода флуоресценции этой формы, которая обладает при −196° максимумом в области 735 мμ; температурная зависимость описывается кривой, близкой к экспоненте.

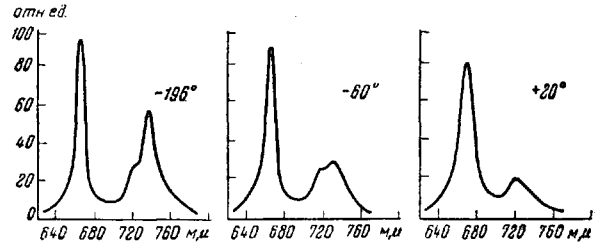
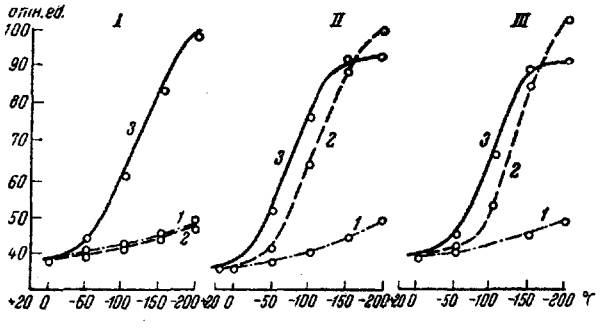


Рис. 2. Спектры люминесценции бактериовиридина в пиридиновом растворе при разных температурах

Другой модельной системой служили твердые пленки бактериовиридина. Их готовили из эфирных растворов хроматографически чистого бактериовиридина испарением растворителя под вакуумом. В зависимости от режима и степени откачивания следов растворителя (эфира) можно было получить несколько типов одновременно существующих форм пигмента, отличающихся степенью агрегации. Эти пленки при комнатной температуре обычно обладали флуоресценцией в красной области спектра с максимумами при 680; 747—750 и 775—780 мμ. При −196° люминесценция при 680 мμ усиливается лишь в 1,2—1,3 раза, а при 747—750 и 775—780 мμ в 2,9—3 раза. Усиление люминесценции при 747—750 и 775—780 мμ с понижением температуры описывается кривыми разного типа. Скорость изменения флуоресценции с температурой выше в максимуме 775—780 мμ, однако наибольшая величина люминесценций при замораживании достигается в этом случае раньше (при −120 ÷ −140°), чем в максимуме 747—750 мμ. Возрастание флуоресценции при 680 мμ с понижением температуры до −196° описывается прямой линией. При −196° сдвиг максимума при 775—780 мμ на 18 мμ в длинноволновую сторону, а максимума при 747—750 мμ на 12—13 мμ. Максимум при 680 мμ с замораживанием не изменяется.



ис. 3. Зависимость интенсивности люминесценции бактериовиридина от температуры в разных максимумах. *I* — в пиридиновом растворе (*1* — 671 мμ, *2* — 720 мμ, *3* — 735 мμ); *II* — в твердых пленках (*1*—680 мμ, *2* — 747—750 мμ, *3* — 775—780 мμ); *III* — в клетках бактерий (*1* — 680 мμ, *2* — 770—778 мμ, *3* — 808 —823 мμ)

Разделяя пигменты хроматографически, мы обнаружили возможность их агрегации на бумаге или сахарозе. Зона на хроматограмме не однородна по количеству адсорбированного на подложке пигмента (концентрация оказывается наибольшей на переднем участке зоны чистого бактериовиридина).

Люменесценция пигмента при +20° на хроматографической бумаге имеет максимумы при 690 и 780 мμ, а на сахарозе — при 680 и 782 мμ. При —196° флуоресценция при 780 (бумага) и 782 мμ (сахароза) увеличивается в 2,5 раза, а в максимумах при 690 (бумага) и 680 мμ (сахароза) — в 1,2 раза. Возрастание люминесценции при 780 и 782 мμ близко к экспоненту, а в максимуме при 690 и 680 мμ — к прямой.

В спектрах зоны с большей концентрацией пигмента преобладает длинноволновый максимум, а с меньшей — коротковолновый. Таким образом, при адсорбции наблюдаются две формы упаковки пигмента — «мономерная» (680 мμ) и агрегированная (782 и 780 мμ). Можно предполагать, что наиболее плотно упакованными являются формы с максимумом при 795—800 мμ; длительное откачивание в высоком вакууме, удаляющем следы растворителя, ведет к преобладанию этих форм.

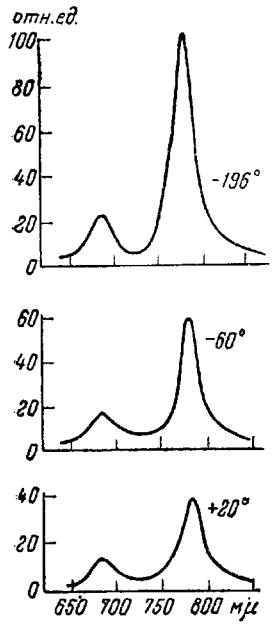


Рис.4. Спектры люминесценции адсорбированного на хроматографической бумаге бактериовиридина при разных температурах

Пленки, полученные из «сырого» эфирного экстракта бактерий (без хроматографии), обладают люминесценцией, в которой наименее выражен длинноволновый максимум по сравнению с пленками хроматографически «чистого» пигмента; достижению плотной упаковки препятствуют липоидные примеси.

Можно предположить, что различная температурная зависимость интенсивности флуоресценции связана с плотностью и типом упаковки пигмента и содержанием молекул растворителя. Более плотно упакованные формы раньше и с большей скоростью достигают максимальной величины интенсивности люминесценции при замораживании, по сравнению с менее плотно упакованными формами пигмента. С понижением температуры до —196° максимумы флуоресценции агрегированных форм бактериовиридина всегда сильно смещаются в длинноволновую сторону, тогда как положение максимума «мономерной» формы практически не зависит от температуры.

Вопрос о молекулярной структуре и ориентации молекул пигмента в разных формах — предмет дальнейшего исследования.

Приносим глубокую благодарность акад. В. Н. Шапошникову и Е. Н. Кондратьевой, любезно предоставившим нам культуру зеленых фотосинтезирующих бактерий.

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

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
29 VI 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 389 (1952). [2] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **127**, 913 (1959). [3] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, И. Б. Федорович, ДАН, **134**, 1232 (1960). [4] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, 8, № 4 (1963). [5] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун Юй-цюнь, ДАН, **143**, 456 (1962). [6] C. Sybesma, J. M. Olson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **49**, 248 (1963). [7] S. S. Brody, Science, **128**, 838 (1958).

Доклады Академии наук СССР
1963. Том 148, № 4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. В. ПАКШИНА

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФЕОФИТИНОВ ИЗ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ТЕМНОТЕ И ПРИ ОСВЕЩЕНИИ

Давно известно, что в кислых средах происходит замещение центрального атома магния в молекуле хлорофилла на два атома водорода с образованием безмагниевого производного — феофитина. Маккинней и Джослин ([1]) установили, что в водно-ацетоновом растворе в присутствии щавелевой кислоты хлорофилл а феофитинизируется гораздо быстрее, чем хлорофилл b. Е. Рабинович ([2]) в своей книге указал на неопубликованные опыты, в которых наблюдалось ускоряющее действие света на образование феофитина в кислых средах. Один из нас ([3]) наблюдал образование феофитина, сопровождающее реакцию фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в водном пиридине. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова ([4]), изучая фотовосстановление хлорофилла фенилгидразином в толуоле, нашли, что фотовосстановленная форма хлорофилла теряет магний гораздо легче, чем исходный пигмент. Баннистер ([5]) пришел к тем же выводам, изучая фотовосстановление хлорофилла и феофитина аскорбиновой кислотой; он указал на то, что в этих условиях феофитин образуется также в присутствии янтарной, яблочной и малоновой кислот. Реакция образования феофитинов из хлорофилла и его аналогов вообще изучена мало, хотя феофитины являются непременными спутниками хлорофилла и его аналогов при извлечении пигментов из фотосинтезирующих организмов.

Настоящее исследование поставлено с целью сравнительного изучения феофитинизации хлорофилла, протохлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина в разных средах и действия освещения на эту реакцию.

Хлорофилл и его аналоги выделяли из фотосинтезирующих организмов методами, принятыми в нашей лаборатории, с конечной очисткой с помощью хроматографии. Соответствующие феофитины получали обработкой эфирных растворов пигментов водными растворами соляной кислоты, контролируя превращение с помощью хроматографии на бумаге.

Реакцию феофитинизации изучали в водном ацетоне (10% H_2O) и водном пиридине (10% H_2O) в присутствии щавелевой или соляной кислоты в трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений. Опыты при освещении вели в вакууме, с тем чтобы избежать побочного фотоокисления. Освещение производили в термостатированной установке кинолампой 300 вт с конденсором через красный светофильтр КС-11 (в случае протохлорофилла через светофильтр ОС-11), интенсивность освещения ок. 10^4 эрг/см^2·сек. Кислоту приливали к раствору пигментов из бокового отвода. За скоростью феофитинизации следили путем измерения спектров поглощения на спектрофотометрах СФ-5 и СФ-10 по падению характерных максимумов поглощения исходных пигментов и появлению максимумов феофитинов.

Ниже приведены результаты измерения скорости «темновой» феофитинизации пигментов в ацетоне и пиридине. Скорость реакции мы характеризовали временем (в минутах) половинного превращения магниевого комплекса в соответствующий феофитин (концентрация пигментов 10^{-5} мол/л,

щавелевой кислоты $2 \cdot 10^{-2}$ мол/л; 22°):

	Ацетон (10% воды)	Пиридин (10% воды)
Бактериовиридин	0,5 мин.	25
Хлорофилл a	4	240
Протохлорофилл	25	>400
Бактериохлорофилл	25	>400
Хлорофилл b	105	>400

В отдельных опытах наблюдались колебания времени полупревращения; данные таблицы отражают лишь сравнительную скорость феофитинизации для разных пигментов.

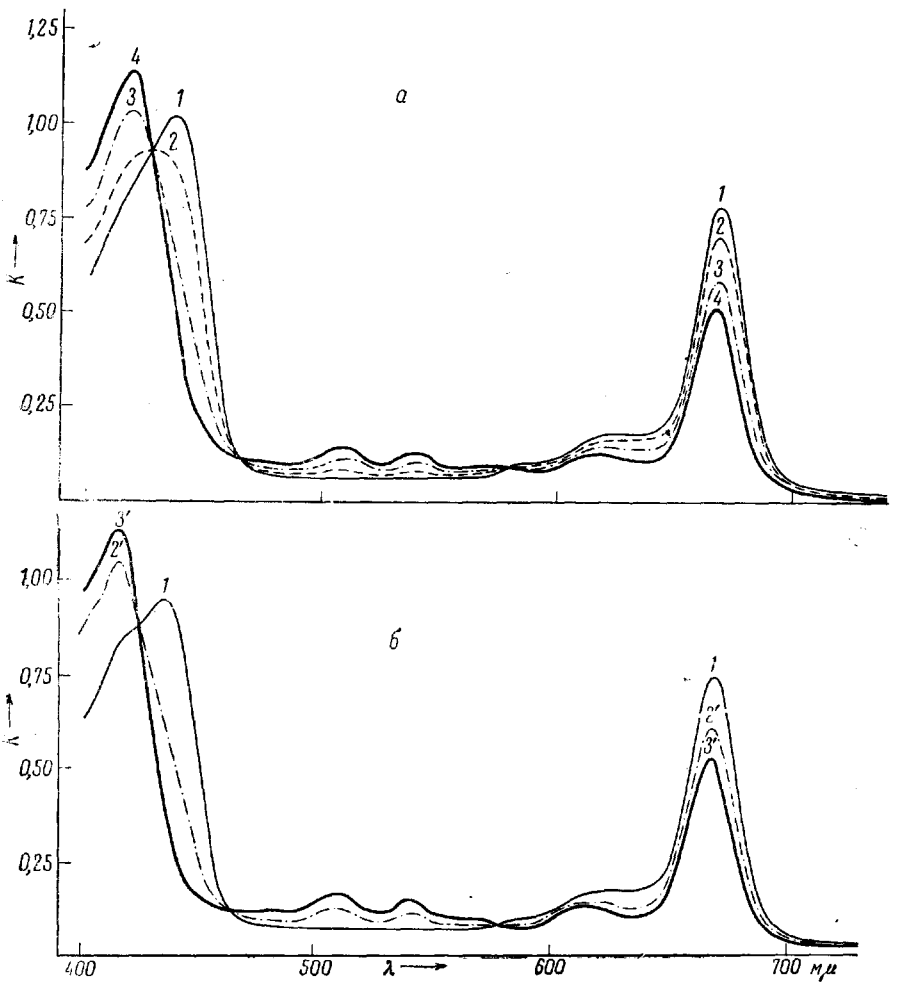


Рис. 1. Фотофеофитинизация хлорофилла a в пиридине (10% H_2O) в присутствии 1% HCl (*а*) и щавелевой кислоты ($2 \cdot 10^{-2}$ мол/л) (*б*). *1* — исходный раствор; *2* — *4* — после освещения в вакууме в течение: *2* — 10 мин., *3* — 30 мин., *4* — 50 мин., *2'* — 5 мин., *3'* — 15 мин.

Из приведенных цифр видно, что скорость реакции в ацетоне сильно различается у разных пигментов и не связана со степенью восстановленности «полуизолированных» двойных связей в молекуле исходного пигмента. Обращает на себя внимание крайне быстро идущая феофитинизация бактериовиридина, что можно поставить в связь с отсутствием циклопентанонового кольца в молекуле этого пигмента ([6]).

Влияние света на скорость феофитинизации водно-ацетоновых растворов пигментов мы изучали в присутствии щавелевой кислоты (в концентрации

$2 \cdot 10^{-2}$ и $2 \cdot 10^{-3}$ мол/л), скорость реакции измеряли при комнатной температуре и при —20°. В этих условиях не удалось наблюдать ускоряющего действия света на реакцию. Быстрая феофитинизация в пиридине наблюдалась нами только в случае наиболее легко теряющего магний пигмента — бактериовиридина, причем при освещении скорость замещения магния в молекуле этого пигмента не отличалась от скорости темновой феофитинизации.

В пиридиновых растворах хлорофилла a, хлорофилла b и протохлорофилла мы обнаружили ускоряющее действие света на феофитинизацию. За час стояния в темноте пиридиновых растворов этих пигментов со щавелевой кислотой ($2 \cdot 10^{-2}$ мол/л) темновая феофитинизация вообще не происходила. При освещении же этих растворов в присутствии щавелевой кислоты реакция фактически заканчивалась за 10—15 мин. Если реакцию проводили в пиридине, содержащем 10% воды и 1% соляной кислоты, то происходила фотофеофитинизация более медленная, чем в присутствии щавелевой кислоты; реакция практически заканчивалась за 40—50 мин. На рис. 1 представлены спектры поглощения, записанные в процессе фотофео-

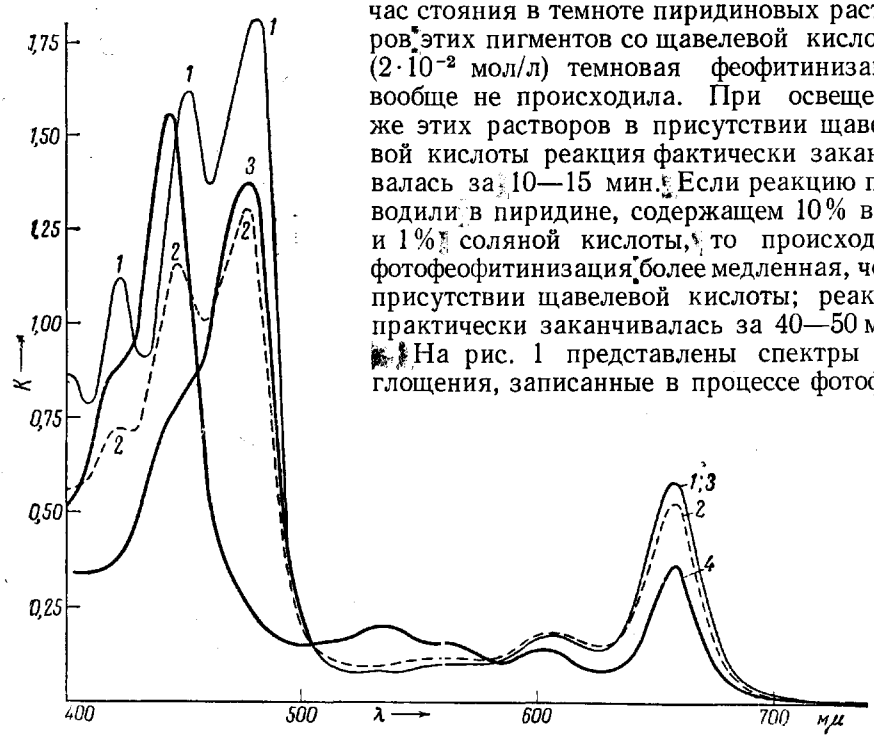


Рис. 2. Ингибирование нафтаценом фотофеофитинизации хлорофилла в пиридине с 10% H_2O в присутствии 1% HCl. *1* — исходный раствор с нафтаценом ($2 \cdot 10^{-4}$ мол/л), *2* — после 1 часа освещения, *3* — исходный раствор без нафтацена, *4* — после 30 мин. освещения

фитинизации хлорофилла a в присутствии соляной (*а*) и щавелевой (*б*) кислот в одном режиме освещения. В контрольных опытах, при освещении водно-пиридиновых растворов пигментов без соляной кислоты и без щавелевой кислоты, не наблюдалось фотофеофитинизации. Следует отметить, что различия в скорости темновой феофитинизации (в ацетоне), особенно ярко выраженные у хлорофилла a и b, нивелируются при фотофеофитинизации в пиридине. Можно было думать, что фотофеофитинизация идет через стадию образования лабильных фотовосстановленных продуктов за счет реакции возбужденных молекул пигмента со щавелевой кислотой или пиридином, играющими роль доноров электрона. Тогда следовало ожидать ингибирования реакции в присутствии акцепторов электрона (реагирующих с фотовосстановленными формами пигмента), и полиеновых соединений — каротина и тетрацена, тормозящих фотовосстановление ([7]). Для проверки этого предположения опыты были поставлены следующим образом. В раствор пигментов в пиридине с 10% воды и щавелевой или соляной кислотой вводили ингибиторы в различных концентрациях, откачивали из трубки Тунберга воздух и освещали раствор, производя измерения на регистрирующем спектрофотометре СФ-10. Действительно, опыты показали,

что метиловый красный в концентрации 10^{-3} мол/л полностью ингибирует фотофеофитинизацию. Концентрация 10^{-4} мол/л метилового красного сильно замедляет реакцию. Каротин ингибирует реакцию уже при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ мол/л, тогда как нафтацен (рис. 2) действует при более высокой концентрации ($2 \cdot 10^{-4}$ мол/л), причем наблюдается изменение спектра поглощения этого соединения за счет сенсибилизированной реакции. Изученные соединения, тормозящие фотореакцию в концентрации 10^{-3}—10^{-5} мол/л, совершенно не влияют на скорость темновой феофитинизации. Их влияние на фотопроцесс наблюдалось в опытах как со щавелевой, так и с соляной кислотой.

Трудно сомневаться в том, что реакции замещения магния предшествует связывание ионов водорода пиррольными атомами азота, обладающими «вакантными» парами электронов с последующим перераспределением связей и выходом иона магния из кольца. Пока трудно решить вопрос, происходит ли ступенчатое вхождение протонов в цикл, как это полагает Е. Рабинович ([2]), или хлорофилл «сразу» связывает два протона с последующим выходом иона магния из цикла.

Действие света наблюдается в условиях, благоприятствующих обратимому фотовосстановлению: в среде пиридина и в присутствии соединений, могущих играть роль донора электрона (пиридин, щавелевая кислота). Кроме того, как уже выше указывалось, фотовосстановленная форма хлорофилла а легче обменивает магний на водород, чем молекула исходного пигмента. Можно себе представить, что в пиридиновом растворе хлорофилла и его аналогов в силу большого сродства растворителя к протону происходит конкуренция за протон между атомами азота пиррольных колец молекулы пигмента и азотом пиридина. Появление неспаренного электрона в молекуле пигмента в результате элементарного акта фотовосстановления увеличивает сродство к протону и приводит к образованию «протонизированных» восстановленных форм, легче обменивающих магний в силу особенностей своей структуры. Кроме того, тот факт, что ингибиторы фотовосстановления ингибируют и фотофеофитинизацию, говорит о связи этих двух процессов,

Таким образом, опыты указывают на то, что фотофеофитинизация идет через стадию образования лабильных фотовосстановленных продуктов за счет реакции возбужденных молекул пигмента со щавелевой кислотой или молекулами растворителя, играющими роль доноров электрона, причем феофитин является конечным устойчивым продуктом обратимой реакции.

Существенно, что фотофеофитинизация наблюдается в системах, где до сих пор не удавалось констатировать образование устойчивых продуктов фотовосстановления. Можно выдвинуть предположение, что фотофеофитинизация является критерием промежуточного обратимого фотовосстановления пигментов в изучаемой системе.

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

Поступило
15 X 1962

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] M. A. Joslyn, J. Mackinney, J. Am. Chem. Soc., 60, 1132 (1938); 62, 230 (1940). [2] Е. Рабинович, Фотосинтез, 1, ИЛ, 1951, стр. 498. [3] А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948). [4] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 91, 899 (1953). [5] T. T. Bannister, Plant Physiol., 34, 246 (1959). [6] A. S. Holt, H. V. Morley, J. Am. Chem. Soc., 82, 500 (1960). [7] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Биохимия, 26, 859 (1961).

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 158, № 1

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

ФОТОХИМИЯ ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ И N-БЕНЗИЛНИКОТИНАМИДА

Хлорофилл энергично фотосенсибилизирует окисление восстановленных пиридиннуклеотидов кислородом воздуха; реакция идет в растворах хлорофилла, суспензиях хлоропластов и гранул ([1]). Фризел и Маккензи ([2]) наблюдали фотосенсибилизированное рибофлавином окисление НАД·H_2 кислородом воздуха и нашли, что в анаэробных условиях наблюдается фотохимическое окисление НАД·H_2 рибофлавином; предполагалось, что поглощение близкого ультрафиолета активирует оба реагирующих компонента. Возможность активации НАД·H_2 иллюстрировалась наблюдениями над ускорением реакции с пируватом при освещении.

Мы изучали следующие типы реакций, идущих с участием восстановленных пиридиннуклеотидов и их более просто построенного аналога — восстановленного N-бензилникотинамида (БНА).

1. Фотосенсибилизированное пигментами восстановление НАД и БНА в присутствии доноров водорода (AH_2) — аскорбиновой кислоты и других соединений ([1,3–6]):

$$AH_2 + НАД \xrightarrow[\text{пигмент}]{h\nu} A + НАД\cdot H_2.$$

2. Фотосенсибилизированное пигментами окисление НАД·H_2 в присутствии акцепторов электрона (В) — кислорода, сафранина и др. ([1,6]):

$$НАД\cdot H_2 + B \xrightarrow[\text{пигмент}]{h\nu} НАД + BH_2.$$

3. Прямое фотоокисление НАД·H_2 и БНА·H_2 при возбуждении светом 365 мμ с использованием в качестве акцепторов электрона — хлорофилла. сафранина Т, рибофлавин и др. ([5,6]). Мы подтвердили опыты Фризела и Маккензи ([2]) с рибофлавином. Использование в наших опытах в качестве акцептора электрона сафранина, не обладающего поглощением при 365 мμ, указывает на фотохимическую активацию БНА·H_2 и НАД·H_2.

Фотоокисление восстановленных пиридиннуклеотидов может лежать в основе ряда фотобиологических явлений и поэтому требует более детального исследования.

Фотоокисление БНА·H_2 и НАД·H_2 в присутствии акцепторов электрона. Опыты проводили в кварцевых трубках Тунберга, содержащих 5 мл раствора НАД·H_2 (в пиридине, спирте, воде) 10^{-4} *М* и в боковом отводе трубки — раствор акцептора электрона 10^{2}—10^{-4} *М*. Трубку откачивали при взбалтывании (масляным насосом), приливали из бокового отвода раствор акцептора электрона к раствору НАД·H_2 и наблюдали реакцию в темноте, а затем при освещении лампой ПРК-4 через светофильтр УФС-2 (линиями ртути 365 мμ, $2\cdot10^5$ эрг/см²·сек). О скорости реакции судили по падению оптической плотности в характерных максимумах поглощения — при 340 мμ для НАД·H_2 и при 355 мμ для БНА·H_2. Применяли 60% НАД·H_2, Light CO; БНА·H_2 — синтетический.

Использовали следующие группы соединений — акцепторов электрона: кислород воздуха, ацетальдегид, нитрат и нитрит натрия; красители — сафранин, гематопорфирин, метиловый красный; пигменты фотосинтезирующих организмов — хлорофилл, бактериохлорофилл, бактериовиридин.

Результаты приведены на рис. 1. За время опыта (5—10 мин) темновое взаимодействие с акцепторами электрона было незначительным, лишь при длительном стоянии в темноте наблюдалось медленное окисление НАД·H_2 рибофлавином и другими соединениями. При освещении наблюдается быстрая фотохимическая реакция с нитрит-ионами, менее активны нитрат и ацетальдегид. Наиболее медленна реакция с кислородом воздуха. В воде, пиридине и спирте идет быстрая реакция с сафранином с образованием лейкосоединения, из которого при пуске воздуха происходит мгновенная регенерация красителя. НАД·H_2 и БНА·H_2 при этом окисляются необратимо ([5],[6]). Реакция с гематопорфирином и метиловым красным идет более медленно.

Реакция с хлорофиллом и бактериовиридином в растворе пиридина идет

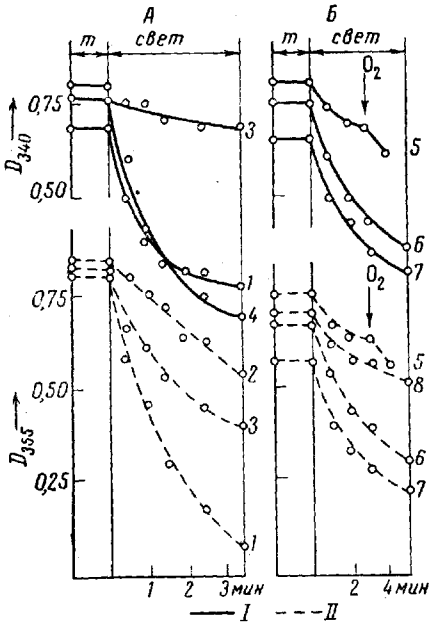


Рис. 1

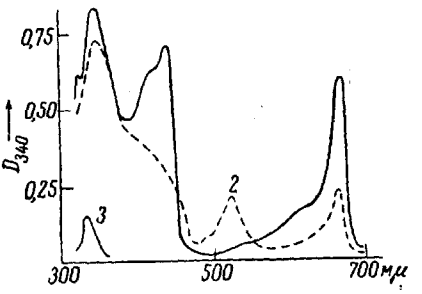


Рис. 2

Рис. 1. Фотоокисление НАД·H_2 (*I*) и БНА·H_2 (*II*) в присутствии акцепторов электрона: *1* — $NaNO_2$ (10^{-2} *M*); *2* — $NaNO_3$ (10^{-2} *M*); *3* — кислород воздуха; *4* — ацетальдегид ($5\cdot10^{-3}$ *M*); *5* — сафранин; *6* — бактериохлорофилл; *7* — бактериовиридин; *8* — хлорофилл (концентрация сафранина и пигментов 10^{-5} *M*). Освещение 365 мμ. *А* — в воде, *Б* — в пиридине с 10% воды. *т* — темнота, O_2 — пуск воздуха

Рис. 2. Сопряженное фотоокисление НАД·H_2 и фотовосстановление хлорофилла *а* в пиридине в вакууме. *1* — спектр поглощения до освещения; *2* — после 4 мин освещения у.-ф. светом (365 мμ); *3* — разность (*1*—*2*), соответствующая убыли поглощения НАД·H_2

с образованием «красной» восстановленной формы пигмента, при этом НАД·H_2 и БНА·H_2 окисляются необратимо (рис. 2). В спирте не наблюдается образования «красной» восстановленной формы пигмента, но отчетливо видно окисление НАД·H_2 и БНА·H_2. При освещении красным светом в области максимумов поглощения хлорофилла и его аналогов не удалось наблюдать образования устойчивых восстановленных форм пигментов, свидетельством обратимо идущей реакции является появление фотопотенциала в системе ([5]).

Описанные опыты свидетельствуют о том, что фотоактивированные близким ультрафиолетом молекулы НАД·H_2 приобретают способность к быстрому окислению при реакции с различными акцепторами электрона. Опыты по восстановлению нитрат- и нитрит-ионов говорят о возможном действии близкого ультрафиолета на энзиматические реакции этого типа.

Фотосенсибилизированное окисление. Мы уже указывали на то, что восстановленные формы пиридиннуклеотидов способны к другому типу реакций — сенсибилизированному к видимому свету окислению в присутствии пигментов-сенсибилизаторов; при этом реакция возбуждается светом, который не поглощается НАД·H_2 и БНА·H_2, но поглощается пигментом-сенсибилизатором.

В этих опытах использовали пигменты — хлорофилл и его аналоги, сафранин. Акцепторами электрона служили кислород воздуха и, в опытах с хлорофиллом, сафранин. Опыты ставили следующим образом. Растворы пигментов-сенсибилизаторов в пиридине, спирте и воде (сафранин 10^{-5} *М*) освещали в присутствии НАД·H_2 и БНА·H_2 (10^{-4} *М*): хлорофилл — красным светом (светофильтр КС-11), сафранин — зеленым (ЗС-2). За ходом реакции следили по изменению оптической плотности при 340 мμ для НАД·H_2 и при 355 мμ для БНА·H_2.

Испытанные пигменты во всех средах энергично сенсибилизируют окисление НАД·H_2 и БНА·H_2 к видимой области спектра (рис. 3). Одновременно происходит деструктивное окисление пигментов, наиболее энергичное —бактериохлорофилла и бактериовиридина.

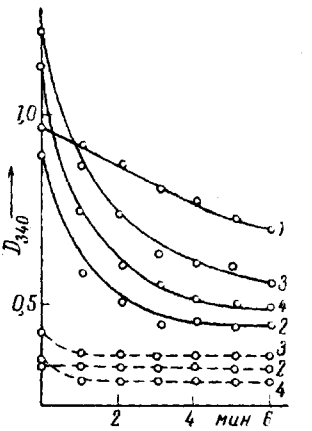


Рис. 3. Фотоокисление НАД·H_2 кислородом воздуха, сенсибилизированное: *1*—сафранином, *2*— хлорофиллом а, *3* — бактериовиридином, *4* — бактериохлорофиллом. Прерывистые линии *2—4* — соответствующие контроли (без НАД·H_2)

О б р а з о в а н и е д о л г о ж и в у щ и х ф о т о а к т и в и р о в а н н ы х ф о р м БНА·H_2 и НАД·H_2. Мы нашли, что освещение пиридиновых растворов НАД·H_2 и БНА·H_2 близким ультрафиолетом (365 мμ) в вакууме при 20° ведет к образованию долгоживущих (более 60 мин) фотоактивированных форм, способных в темноте к быстрой реакции с изученными акцепторами электрона—сафранином, хлорофиллом и его аналогами, кислородом и др.

Эти опыты ставили следующим образом. В кварцевую трубку Тунберга (с боковым отводом) вводили 4 мл раствора НАД·H_2 (в пиридине с 10% воды) 10^{-4} *М*, в боковой отвод 1 мл раствора акцептора электрона 10^{-4} *М*. Из трубки откачивали воздух, освещали лампой ПРК-4 через светофильтр УФС-2 (365 мμ) от 1 до 5 мин и сливали из бокового отвода (в темноте) раствор сафранина или рибофлавина. Происходило мгновенное обесцвечивание — восстановление этих соединений. Сливание раствора хлорофилла к освещенному НАД·H_2 также ведет к восстановлению, что видно по снижению максимума поглощения хлорофилла при 670 мμ и увеличению в области поглощения восстановленной формы при 525 мμ. При пуске воздуха происходит быстрое возвращение окраски — регенерации сафранина из лейкоформы — и более медленное образование хлорофилла из его восстановленных форм. В спирте и воде не удалось наблюдать образования «переживающих» период освещения активных продуктов, однако введение уже 1—5% пиридина в спирт приводило к эффекту, к воде же требовалось добавить 20% пиридина. Характерных полос поглощения, соответствующих «переживающим» освещение продуктам, пока обнаружить не удалось; видно лишь падение главных максимумов поглощения.

Ф о т о п о т е н ц и а л ы в р а с т в о р а х НАД·H_2 и БНА·H_2. Образованию долгоживущих активных продуктов соответствует появление отрицательного фотопотенциала инертного платинового электрода. Опыты проводили по методике, принятой в нашей лаборатории ([7]), в стеклянных сосудах в анаэробных условиях. Потенциал платинового электрода измеряли против каломельного электрода на потенциометре ЛП-5.

Освещение растворов НАД·H_2 и БНА·H_2 линиями ртути 365 мμ приводит к увеличению отрицательного потенциала платинового электрода (в пиридине). Так, в случае БНА·H_2 наблюдается увеличение потенциала до 0,5 в в «отрицательную» сторону. Пуск воздуха приводит к падению фотопотенциала до исходного значения ([8]).

О м е х а н и з м е и з у ч е н н ы х р е а к ц и й. При возбуждении светом молекул органических соединений возрастает их тенденция к отда-

че или восприятию электрона; реализация того или иного типа элементарного процесса зависит от величины сродства к электрону молекулы партнера и природы среды.

При возбуждении молекулы сильного восстановителя — НАД·H_2 растет его способность к отдаче электрона (водорода). При наличии в системе молекул, способных воспринять электрон, реализуется первичный фотопроцесс. Можно предположить, что в пиридиновых растворах вначале идет фотореакция с молекулами растворителя, ведущая к переносу электрона от возбужденного НАД·H_2 к молекуле пиридина (комплекс с переносом заряда):

$$\text{НАД}\cdot H_2 - \text{пиридин} \rightleftarrows \text{НАД}\cdot H_2^+ - \text{пиридин}.$$

Возможно, в комплексе переноса заряда образуется сольватированный электрон, обладающий высоким восстановительным потенциалом. Следующим темновым актом реакции является реакция фотоактивированного комплекса с молекулой акцептора электрона (В) — сафранином, кислородом и другими соединениями.

$$\text{НАД}\cdot H_2^+ - \text{пиридин}^- + B \rightarrow \text{НАД} + BH_2 + \text{пиридин}.$$

Таким образом, изученные нами реакции, в которых участвуют возбужденные молекулы НАД·H_2 и БНА·H_2,— это реакции фотоокисления указанных соединений, вероятно идущие с промежуточным образованием комплекса с переносом заряда и семихинонов.

В случае сенсибилизированных хлорофиллом реакций, идущих с использованием НАД·H_2 в качестве исходного донора электрона, удается наблюдать фотосенсибилизированное восстановление молекул — акцепторов электрона. Эксперименты указывают на то, что реакция в элементарных стадиях следует изученному в нашей лаборатории механизму, включающему промежуточное восстановление хлорофилла в качестве этапа переноса электрона ([8,9]).

О фотобиологической роли изученных реакций. Фотоокисление восстановленных пиридиннуклеотидов может быть связано с разнообразными фотобиологическими процессами, идущими под действием близкой ультрафиолетовой области спектра, и действием этого света на ферментативные процессы. Фотодинамическое действие красителей может быть связано с фотосенсибилизированным окислением НАД·H_2 в организмах. Наконец, реакции возбужденных пиридиннуклетидов могут быть связаны с фотореактивацией при повреждении клеток более далеким ультрафиолетом. Все эти возможности нуждаются в углубленном изучении.

В работе принимала участие С. В. Макеева (МГУ).

Приносим благодарность А. А. Ясникову за предоставление препарата N-бензилникотинамида.

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

Поступило
28 V 1964

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **24**, 1085 (1959). [2] W. R. Frisell, C. G. Mackenzie, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 1568 (1959). [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949). [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1157 (1963). [5] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **153**, 212 (1963). [6] А. А. Красновский, Г. П. Брин, Сб. Проблемы эволюционной и технической биохимии, Изд. «Наука», 1964, стр. 221. [7] Л. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953). [8] А. А. Красновский, Усп. хим., **29**, 736 (1960). [9] В. Б. Евстигнеев, Биофизика, **8**, 664 (1963).

А. А. Красновский и Г. П. Брин

ФОТОХИМИЯ СИСТЕМ ПИРИДИННУКЛЕОТИДЫ — ХЛОРОФИЛЛ И РАЗВИТИЕ ЦЕПИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Рассматривая пути эволюции обмена веществ, А. И. Опарин [1] выдвинул широко распространенную ныне гипотезу о том, что первичные организмы были анаэробами и гетеротрофами, использующими органические соединения, образованные путем абиогенных синтезов. Следует полагать, что обмен веществ этих примитивных организмов был основан на работе фрагментов цепи переноса электрона, построенных на основе каталитических систем, содержащих неорганические компоненты и органические соединения, возможно, также абиогенного происхождения.

Переход к автотрофному фотосинтетическому пути обмена потребовал включения в цепь переноса электрона активированных светом пигментных систем. Долгий путь перехода от гетеротрофного к автотрофному «световому» пути обмена веществ включал ряд промежуточных типов примитивных организмов, в которых могла иметь место световая активация компонентов биокаталитической цепи. Так, хорошо известна фотохимическая активность флавинов; получены данные о фотохимической активности восстановленных пиридиннуклеотидов [2, 3]; некоторой активностью обладают цитохромы [4]. Участие неорганических фотокатализаторов в процессах светового переноса электрона, ведущих к выделению кислорода, иллюстрируется нашими опытами, в которых была показана возможность построения неорганических моделей реакции Хилла с участием окислов титана, вольфрама и цинка [5].

В отличие от биокатализаторов, количество которых может быть очень небольшим, количество пигмента — фоторецептора должно быть значительным, чтобы обеспечить достаточно полное поглощение потока солнечной радиации и эффективное «запасание» энергии света в форме потенциальной химической энергии. Например, количество хлорофилла в клетках хлореллы достигает 5%, тогда как количество пиридиннуклеотидов не превышает долей процента. Возможное связывание организмом малого количества абиогенно образованных порфиринов не могло бы обеспечить сколько-нибудь значительного поглощения света организмами. Для перехода к автотрофному существованию организмы должны были научиться синтезировать пигмент в больших масштабах, чтобы обеспечить достаточно полное поглощение света. Мощный биосинтез порфиринов требовал в свою очередь развитой системы гетеротрофного обмена. В связи с этим любопытно, что древний тип автотрофных организмов (пурпурные фотосинтезирующие бактерии) не только обладает способностью синтезировать бактериохлорофилл, но и выделяет большое количество порфиринов в культуральную среду [6, 7].

Чрезвычайно важно установить, каким образом активированные светом пигменты — хлорофилл, бактериохлорофилл, бактериовиридин и их аналоги — могли включаться в цепь «темновых» (биохимических) реакций переноса электрона. Этому вопросу был посвящен цикл работ нашей лаборатории, в которых особое внимание уделено участию хлорофилла в процессе переноса электрона (водорода) в системах донор электрона — пигмент — акцептор электрона. В качестве доноров и акцепторов электрона были использованы окисленные и восстановительные формы пиридиннуклеотидов, флавинов, цитохромов, ряд красителей и неорганических ионов.

Еще в 1948 г. мы предположили, что фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление пиридиннуклеотидов может быть существенным звеном в цепи фотосинтетических реакций, и обосновали это опытами в модельных системах [8]. Это положение впоследствии получило всеобщее распространение.

Фотохимические взаимодействия хлорофилла и пиридиннуклеотидов разнообразны; в этой работе описаны результаты изучения следующих типов реакций: фотосенсибилизации хлорофиллом восстановления НАД · НАДФ в присутствии доноров электрона и окисления НАД · H_2 в присутствии акцепторов электрона; прямые фотохимические превращения (окисление) восстановленных пиридиннуклеотидов.

В этих работах наряду с НАД и НАДФ использовался более просто построенный аналог указанных соединений — N-бензилникотинамид (БНА) и его восстановленная форма (БНА · Н).

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НАД И БНА И ОКИСЛЕНИЯ НАД·H_2 И БНА·Н

В 1949 г. мы экспериментально установили возможность фотосенсибилизированного восстановления дифосфопиридиннуклеотида (НАД) в растворе за счет энергии света, поглощенного хлорофиллом [8]. В 1951 г. вышли работы Вишняка и Очоа [9], Толмача [10] и Арнона [11], в которых была показана возможность восстановления пиридиннуклеотидов в гомогенатах хлоропластов. В 1956 г. Сан Пьетро [12] продемонстрировал восстановление пиридиннуклеотидов в гомогенатах спектрофотометрическим методом и нашел белковый фактор, катализирующий световую реакцию. К тем же результатам пришел Арнон с сотр. [13]. Вернон получил подобные результаты для гомогенатов фотосинтезирующих бактерий [14]. В лаборатории Арнона недавно показано, что включение ферредоксина катализирует световую реакцию и что система фотосинтетической пиридиннуклеотидредуктазы, вероятно, включает в себя ферредоксин [15]. Френкель обнаружил восстановление пиридиннуклеотидов с использованием восстановленного флавинмононуклеотида в хроматофорах фотосинтезирующих бактерий [16].

В работах нашей лаборатории в 1952 г. наблюдалось фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление НАД в присутствии аскорбиновой кислоты, но бактериохлорофилл не был способен к осуществлению этой реакции [17]. Это указывает на то, что диапазон фотовосстановительного потенциала системы пигмент — аскорбиновая кислота у бактериохлорофилла меньше, чем у хлорофилла. В согласии с этими наблюдениями находятся опыты Евстигнеева и Гавриловой [18], показавшие в нашей лаборатории, что хлорофилл в присутствии аскорбиновой кислоты способен сенсибилизировать фотовосстановление бактериохлорофилла, тогда как бактериохлорофилл в этой системе не способен приводить к сенсибилизированному восстановлению хлорофилла.

В ряде работ о восстановлении пиридиннуклеотидов судили по увеличению коэффициента погашения при 340 *ммк* после освещения и по падению этой величины при введении алкогольдегидрогеназы и ацеталь-

дегида в качестве субстрата окисления. Измерение спектра поглощения восстановленных форм пиридиннуклеотидов в этих работах сделать не удалось, по-видимому, из-за сильного поглощения света гомогенатами в этой области спектра. Дюсенс и Амец [19] наблюдали восстановление пиридиннуклеотидов непосредственно в живых листьях растений, применив методы дифференциальной спектроскопии и измерения флуоресценции. В работе одного из авторов с Литвиным [20] измерение спектров флуоресценции листьев растений при низких температурах позволило обнаружить максимумы флуоресценции, соответствующие связанным и свободным формам восстановленных пиридиннуклеотидов.

В 1959 г. мы возвратились к изучению этого вопроса, желая выяснить, на каком уровне структурной организации сохраняются обнаруженные нами эффекты и как они связаны с процессами, идущими в интактных биологических структурах. Оказалось, что при воздействиях, изменяющих структуру хлоропластов и гранул, происходит нарушение сопряжения в цепи фотосинтетического переноса электрона с конечной изоляцией простых фрагментов цепи, изученных в наших работах. Мы обнаружили, что хлорофилл энергично фотосенсибилизирует окисление восстановленных пиридиннуклеотидов как в растворах, так и в гомогенатах и суспензиях хлоропластов [21].

В цикле работ Вернона [22] показано, в согласии с нашими исследованиями, что хлорофилл и другие пигменты в водных коллоидных растворах в присутствии аскорбиновой кислоты и препаратов фотосинтетической пиридиннуклеотидредуктазы способны фотосенсибилизировать восстановление пиридиннуклеотидов. Баннистер и Бернардини [23], детально изучая фотовосстановление хлорофилла в присутствии пиридиннуклеотидов, пришли к заключению, что дифференциальный спектр (свет — темнота) с максимумом поглощения при 340—380 *ммк* принадлежит конечным продуктам фотовосстановления феофитина; было высказано предположение, что описанный в нашей работе дифференциальный спектр поглощения с максимумом поглощения при 340 *ммк* имеет то же происхождение. В наших опытах дифференциальный спектр восстановленного НАД наблюдался при неизменности оптической плотности в красном и синем максимумах поглощения хлорофилла; таким образом, появление максимума при 340 *ммк* нельзя приписать продуктам фотохимического превращения хлорофилла. Кроме того, мы выделяли из реакционной среды восстановленный пиридиннуклеотид, переводя его в воду [21].

В связи с важностью изучения фотосенсибилизированных хлорофиллом превращений пиридиннуклеотидов мы решили вернуться к изучению этого вопроса на примере более просто построенного аналога этих соединений — БНА; БНА · Н был получен по методу Мозеролла и Вестхеймера [24]. Это соединение в восстановленной форме имеет максимум поглощения при 355 *ммк* (максимум НАД · H_2 при 340 *ммк*).

Сенсибилизированное хлорофиллом *а* восстановление НАД и БНА [25]. В трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, вводили 4 *мл* раствора хлорофилла *а* в пиридине, содержащем 10% воды, 5 *мг* аскорбиновой кислоты и 5 *мг* БНА. Ставили следующие варианты опытов: хлорофилл — БНА, аскорбиновая кислота — БНА, хлорофилл — БНА — аскорбиновая кислота. После эвакуации воздуха из трубки Тунберга проверяли отсутствие реакции в темноте, затем трубку освещали красным светом ($0{,}5 \cdot 10^6$ *эрг/см*^{2} · *сек*), измеряя кинетику реакции в максимуме поглощения восстановленного БНА при 355 *ммк*.

До и после реакции измеряли спектр поглощения. В присутствии БНА оптическая плотность хлорофилла в красном максимуме поглощения не изменялась при освещении. После окончания опыта, в котором происходило восстановление БНА, в трубку пускали воздух и освещали красным

светом, наблюдая окисление восстановленного БНА, сенсибилизированное хлорофиллом.

На рис. 1 показана кинетика изменения максимумов поглощения хлорофилла и БНА в этом опыте. На рис. 2 приведены дифференциальные спектры (свет — темнота), соответствующие поглощению восстановленных НАД и БНА. Кристаллический препарат восстановленного НАД и БНА вводили в трубку с реакционной смесью для сравнения с полученным в опыте спектром. Отчетливо видно сенсибилизированное хлорофиллом восстановление НАД и БНА и идентичность дифференциального спектра поглощения НАД · Н и БНА · Н.

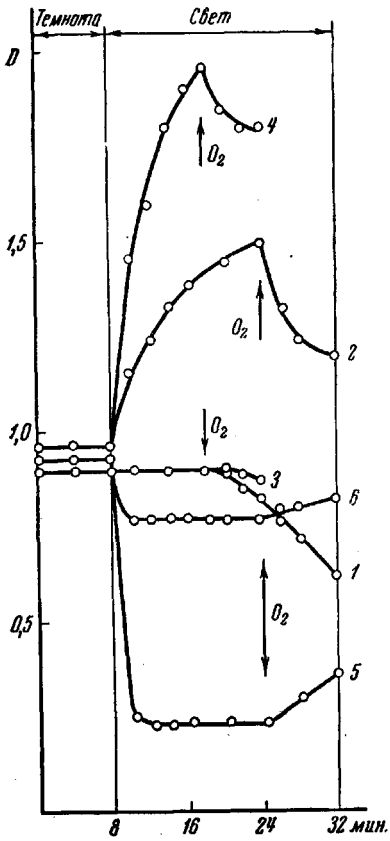


Рис. 1. Кинетика фотосенсибилизированного хлорофиллом *а* восстановления БНА и НАД

Условия опыта с БНА: 4 *мл* раствора хлорофилла *а* в пиридине с 10% воды, 5 *мг* аскорбиновой кислоты и 5 *мг* БНА; в трубке Тунберга, в вакууме; освещение красным светом (КС-11); измерения в максимумах поглощения хлорофилла при 670 *ммк* (*1*) и БНА·Н при 355 *ммк* (*2*)

Условия опыта с НАД: 3,2 *мл* раствора хлорофилла *а* в пиридине, 3 *мг* аскорбиновой кислоты и 5 *мг* НАД в 0,8 *мл* 5%-ного водного раствора аммиака; освещение красным светом; измерения в максимумах поглощения хлорофилла при 670 *ммк* (3) и НАД·H_2 при 340 *ммк* (4). Контрольный опыт: хлорофилл *а* — аскорбиновая кислота в растворе пиридина с 10% воды в тех же условиях. Измерения при 670 *ммк* (*5*) и при 355 *ммк* (*6*); O_2 — пуск воздуха

В аналогичных условиях были проведены опыты с дифосфопиридиннуклеотидом (препарат содержал 90% НАД). В этом случае в среду вводили также аммиак, препятствующий накоплению «красной» восстановленной формы хлорофилла. В опытах с БНА в этом не было необходимости. Дифференциальный спектр (свет — темнота) соответствует восстановленному НАД (НАД · H_2). Введение в реакционную смесь до освещения препарата НАД · H_2 приводит к дифференциальному спектру поглощения, идентичному спектру после освещения (см. рис. 2). Измерение флуоресценции в процессе реакции не показательно, так как продукты окисления аскорбиновой кислоты в пиридине обладают спектром флуоресценции, близким к спектру флуоресценции восстановленных пиридин-нуклеотидов (450—480 *ммк*).

После опыта проводилось выделение восстановленного НАД из реакционной среды двумя методами: по способу, описанному нами ранее [21],— осаждением восстановленного НАД из реакционной среды холодным ацетоном и переводом осадка в воду; либо отгонкой в вакууме растворителя (пиридина) в охлажденный до —70° приемник, которым служила головка трубки Тунберга (процедура, сходная с лиофильной сушкой). Сухой остаток растворяли в воде, фильтровали и измеряли спектр поглощения, при этом наблюдался максимум при 340 *ммк*, соответствующий восстановленной форме НАД. Контрольный опыт с той же смесью без освещения, прошедший ту же процедуру, не обладал этим максимумом.

Для проверки того, что максимум поглощения в воде при 340 *ммк* действительно принадлежит восстановленному НАД, в водный раствор вводили препарат алкогольдегидрогеназы и ацетальдегид, при этом наблюдалось падение максимума поглощения при 340 *ммк*. Следует указать, что в системе бактериохлорофилл — аскорбино-

вая кислота — БНА нам не удалось наблюдать сенсибилизированного восстановления этого соединения, что согласуется с опытами [17], показавшими отсутствие сенсибилизированного восстановления НАД в этой системе.

В наших работах было показано, что НАД и другие акцепторы электрона окисляют в темноте фотовосстановленный хлорофилл, приводя к регенерации исходного хлорофилла. Евстигнеев и Гаврилова [26] показали, что НАД реагирует в темноте с первичной фотовосстановленной формой феофитина. Совокупность имеющихся данных (блокирование фотовосстановления хлорофилла БНА и НАД, темновые реакции этих соединений с фотовосстановленными формами) указывает на то, что реакция в среде пиридина, вероятно, идет с промежуточным фотовосстановлением хлорофилла и взаимодействия его ионрадикальной формы с БНА и НАД.

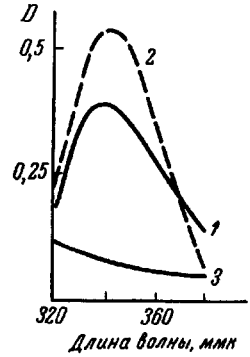


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения (свет — темнота) при фотовосстановлении НАД. Условия опытов те же, что на рис. 1. Дифференциальные спектры: *1* — после 10 мин. освещения красным светом; *2* — при добавлении кристаллического НАД·H_2 к исходной смеси; *3* — без освещения (контроль)

Фотосенсибилизированное хлорофиллом окисление восстановленного НАД·H_2 и БНА·Н. Растворы этих соединений в пиридине и в спирте в присутствии хлорофилла на воздухе освещали красным светом. Наблюдалось чрезвычайно быстро идущее окисление восстановленного *N*-бензилникотинамида, так же как и восстановленного НАД. Для того чтобы получить данные о природе фотоокисления БНА·Н, мы исследовали возможность фотовосстановления хлорофилла восстановленным БНА в пиридине. Оказалось, что освещение красным и желтым светом приводило к очень медленному фотовосстановлению хлорофилла. Однако освещение «белым» светом, покрывающим также область поглощения БНА·Н, приводило к быстрому фотовосстановлению с образованием «красной формы хлорофилла [25]. Это интересное явление показывает, что в данном случае происходит фотоактивация молекулы восстановленного БНА. Эти наблюдения привели к необходимости исследования реакций возбужденных светом молекул восстановленного дифосфопиридиннуклеотида, а также способности возбужденных и невозбужденных молекул этого соединения быть донором водорода (электрона) в разных типах фотохимических реакций.

ФОТООКИСЛЕНИЕ ВОЗБУЖДЕННЫХ МОЛЕКУЛ НАД·H_2 И БНА·Н

В качестве окислителей мы использовали кислород воздуха, ацетальдегид, сафранин Т, рибофлавин и хлорофилл. Было показано световое взаимодействие НАД·H_2 и рибофлавина [3]. Применение сафранина в качестве акцептора электрона в изучаемой системе особенно удобно, так как это соединение не поглощает в области 320—400 *ммк*, где расположены максимумы поглощения НАД·H_2 и БНА·Н. Реакцию возбуждали групной ртутных линий при 365 *ммк*, т. е. в области максимумов поглощения НАД·H_2 и БНА·Н.

Опыты вели в кварцевых трубках Тунберга, которые освещались при 20° С ртутно-кварцевой лампой ПРК-4 через светофильтр УФС-2 или кинолампой 300 *вт* через светофильтр КС-13 (10^5—10^6 *эрг/см²·сек*) и ЗС-2. В работе использовали 60% НАД·H_2 (L. Light Co) и БНА·Н, полученный по описанному методу [4]. Реакции изучали в растворах воды, пиридина и спирта. О фотоокислении судили по падению характерных для восстановленных форм максимумов поглощения при 340 *ммк* для НАД·H_2 и при 355 *ммк* для БНА·Н.

На рис. 3 показано фотоокисление НАД · H_2 в водном растворе различными акцепторами электрона (реакция идет также в спирте и пиридине). Фотореакция с кислородом воздуха (*А*) идет очень медленно. Реакция с ацетальдегидом (*Б*) идет гораздо быстрее, что указывает на возможность не только энзиматической, но и фотохимической активации НАД · H_2. Рибофлавин при освещении светом 365 *ммк* восстанавливается внутримолекулярно (в условиях нашего опыта — медленно); введение НАД · H_2 приводит к чрезвычайному ускорению световой реакции. После пуска воздуха регенерирует восстановленный рибофлавин, тогда как НАД · H_2 окисляется необратимо (*В*). Реакция с сафранином идет в области возбуждения НАД · H_2 (340 *ммк*) и сафранина (540 *ммк*). Освещение водного раствора НАД · H_2 в вакууме не приводило к изменению. В темноте за 10 мин. реакции с изученными акцепторами электрона не наблюдались. Длительное освещение (до 30 мин.) в вакууме растворов НАД · H_2 в спирте и пиридине ведет к окислению НАД · H_2, сопровождающемуся, по-видимому, более глубоким восстановлением растворителя. В пиридине появляется новый максимум поглощения при 360 *ммк*.

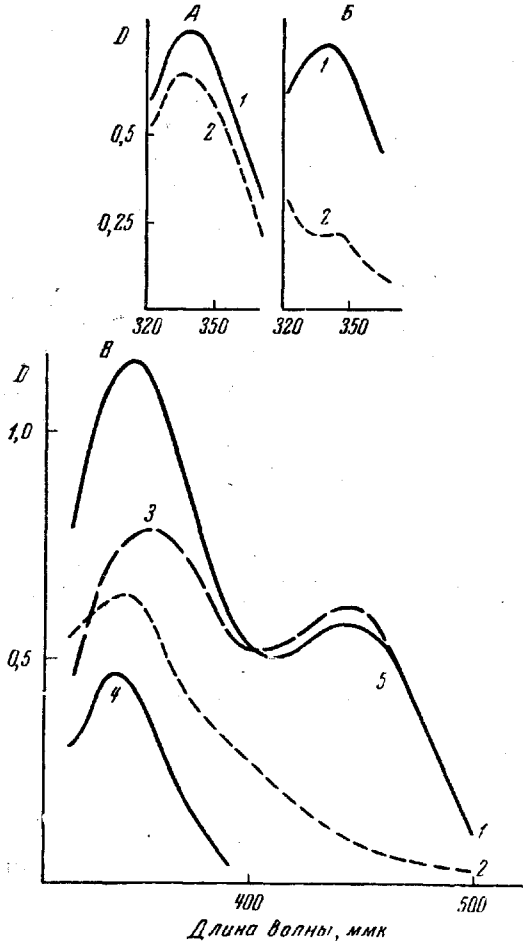


Рис. 3. Фотоокисление НАД·H_2 в воде акцепторами электрона

А — освещение раствора НАД·H_2 в присутствии воздуха; *1* — исходный спектр и контрольный опыт в вакууме; *2* — после 8 мин. освещения; *Б* — освещение раствора НАД·H_2 с ацетальдегидом (10^{-2} *М*) в вакууме; *1* —до освещения; *2* — после 8 мин. освещения; *В* — освещение раствора НАД·H_2 с рибофлавином; *1* — до освещения; *2* — после 1 мин. освещения; *3* — после пуска воздуха; *4* — разность между *1—3*, соответствующая окислению НАД·H_2; *5* — изменение максимума поглощения раствора рибофлавина за 1 мин. освещения без НАД·H_2

Окисление НАД · H_2 возбужденными молекулами пигментов. Существенно то, что окисление НАД · H_2 наблюдается не только при возбуждении в максимуме поглощения при 340 *ммк*, но и при возбуждении в максимуме поглощения пигментов — акцепторов электрона.

Реакция в вакууме с сафранином Т (рис. 4) идет быстро при возбуждении светом, поглощенным НАД · H_2 (365 *ммк*), и при возбуждении светом, поглощенным сафранином (киноламна накаливания через зеленый светофильтр ЗС-2). В темноте обратная реакция идет очень медленно, при пуске воздуха происходит полная регенерация сафранина. Продукт восстановления сафранина обладает поглощением в области 340—360 *ммк*; чтобы констатировать изменение НАД · H_2, сопутствующее фото-

восстановлению сафранина, были измерены спектры поглощения до освещения, после освещения и после пуска воздуха. Кислород обратимо окисляет восстановленный сафранин, и спектр поглощения его полностью совпадает с исходным. НАД · H_2 в этой реакции окисляется необратимо, что отчетливо видно по дифференциальному спектру поглощения до и после освещения.

Реакция с хлорофиллом изучалась в пиридине и спирте. Освещение системы хлорофилл — НАД · H_2 красным светом ведет к незначительному падению максимума поглощения хлорофилла, тогда как освещение системы в области поглощения НАД · H_2 — 340 *ммк* приводит к значительному фотовосстановлению хлорофилла с обратимым образованием красной формы. В спирте наблюдается некоторое падение максимума НАД · H_2, но образования красной восстановленной формы хлорофилла не наблюдалось.

НАД · H_2 — донор водорода (электрона) при сенсибилизированных реакциях. Рассмотрим теперь тип сенсибилизированной реакции, при которой НАД · H_2 играет роль неактивированного светом донора водорода. В качестве сенсибилизаторов были использованы сафранин и хлорофилл. Сначала изучалась система НАД · H_2 — сенсибилизатор — кислород воздуха. Мы уже указывали, что хлорофилл энергично сенсибилизирует окисление изученных соединений к красной области спектра [21]. То же действие оказывает сафранин (возбуждение в зеленой области спектра).

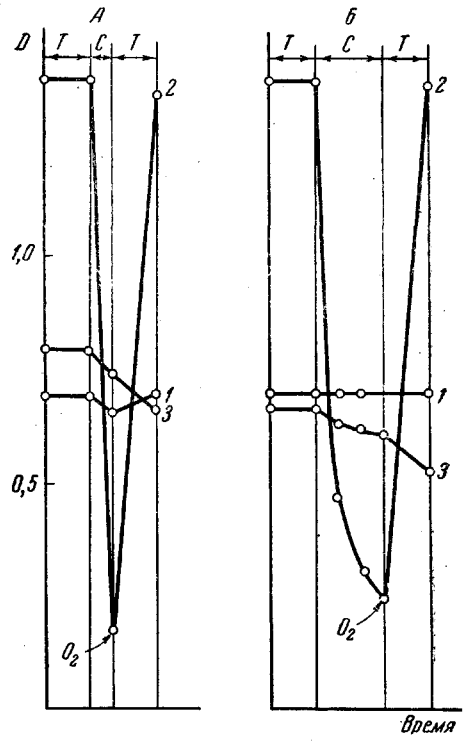


Рис. 4. Сопряженное фотосенсибилизированное окисление-восстановление в системе: хлорофилл — сафранин — НАД·H_2 в спирте

А — освещение красным светом (КС-11); *С* — свет 1 мин., Т — темнота 2 мин.; *Б* — освещение зеленым светом [ЗС-2], С — свет 3 мин.; Т — темнота 2 мин.; *1* — максимум поглощения хлорофилла при 670 ммк, *2* — максимум поглощения сафранина при 530 ммк; *3*— максимум поглощения НАД·H_2 при 340 ммк

Однако хлорофилл и сафранин могут быть не только сенсибилизаторами, но и конечными акцепторами электрона (водорода). В этом случае под действием красного цвета, поглощенного хлорофиллом, происходит сенсибилизированное восстановление сафранина. НАД · H_2 играет роль исходного донора водорода, так же как и аскорбиновая кислота в системах, изученных нами ранее.

При освещении системы хлорофилл — сафранин — НАД · H_2 зеленым светом (в области поглощения сафранина) наблюдается восстановление сафранина. Таким образом, при возбуждении красным или зеленым светом сафранин восстанавливается за счет НАД · H_2.

Фотоэлектрохимические свойства систем с НАД · H_2 и БНА · Н. Для анализа механизма реакций проведено измерение фотопотенциала изученных систем «против» стандартного каломельного электрода с помощью лампового потенциометра ЛП-5, согласно методу, принятому в нашей лаборатории [27]. Освещение раствора БНА · Н и НАД · H_2 в вакууме в пиридине и в воде светом 365 *ммк* ведет к увеличению отрицатель-

ного потенциала платинового электрода. В темноте нет обратимости. Эффект снимается кислородом воздуха (рис. 5). Наблюдаемое увеличение восстановительного потенциала следует приписать образованию электродноактивных семихинонов при реакции возбужденного НАД · H_2 с растворителем: НАД · H_2 + пиридин → НАД · H_2^+ + пиридин$^-$. Освещение НАД · H_2 в присутствии обратимого акцептора электрона — сафранина или хлорофилла ведет к обратимому появлению фотопотенциала, аналогично системе хлорофилл — аскорбиновая кислота. Существенно то, что обратимый отрицательный потенциал в системе НАД · H_2 — хлорофилл появляется при действии красного света, т. е. в условиях, когда не удалось наблюдать явного изменения хлорофилла путем спектрофотометрических измерений.

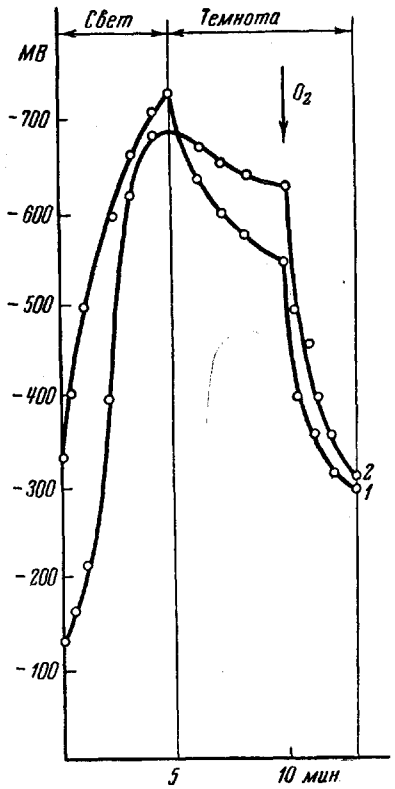


Рис. 5. Измерение фотопотенциала в пиридине с 10% воды

1 — хлорофилл *a* — БНА·Н, в вакууме, освещение красным светом; *2* — БНА·Н (без хлорофилла) в вакууме, освещение ультрафиолетовым светом (365 *ммк*)

Итак, полученные реакции можно классифицировать следующим образом (поведение НАД · H_2 и БНА · Н подобно в большинстве описанных реакций):

1. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление пиридин-нуклеотидов в присутствии доноров электрона (аскорбиновая кислота, цистеин и др.).

$$AH_2 + НАД \xrightarrow[\text{хлорофилл}]{h\nu} A + НАД \cdot H_2$$

2. Фотосенсибилизированное восстановление акцептора электрона (кислород, сафранин и др.) с использованием НАД · H_2 в качестве исходного донора электрона и пигментов (хлорофилл, сафранин) в качестве сенсибилизатора.

$$НАД \cdot H_2 + A \xrightarrow{(\text{пигмент} + h\nu)} НАД + AH_2$$

3. Фотовосстановление пигментов А (хлорофилл, сафранин) с использованием НАД · H_2 как неактивируемого светом донора водорода.

$$A + h\nu \rightarrow A^*$$

$$A^* + НАД \cdot H_2 \rightarrow AH_2 + НАД$$

4. Фотоокисление возбужденных молекул НАД · H_2 акцептором электрона А (кислород, ацетальдегид, рибофлавин, сафранин, хлорофилл).

$$НАД \cdot H_2 + h\nu \rightarrow НАД \cdot H_2^*;$$

$$НАД \cdot H_2^* + A \rightarrow НАД + AH_2.$$

О СВЯЗИ ИЗУЧЕННЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ

Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление пиридиннуклеотидов, осуществленное в моделях, является существенным этапом фотосинтетического переноса электрона в организмах, что ныне общепринято. Фотосенсибилизированное хлорофиллом окисление восстановленных пиридиннуклеотидов показано в растворах, гомогенатах и суспензиях хлоро-

пластов, но пока неясна фотобиологическая роль этой реакции; возможно, что фотоокисление НАД · H_2 сопряжено с образованием аденозинтрифосфата или, может быть, является путем вывода НАД · H_2 из системы фотосинтетических реакций при большой интенсивности света. Фотоокисление восстановленных пиридиннуклеотидов может быть связано с разнообразными фотобиолотическими процессами, идущими под действием близкой ультрафиолетовой области спектра (200—400 *ммк*), и действием этого света на ферментативные процессы. Фотодинамическое действие красителей может быть связано с фотосенсибилизированным окислением НАД · H_2. Наконец, эти реакции возбужденных пиридиннуклеотидов могут быть связаны с фотореактивацией при повреждении клеток более далеким ультрафиолетом. Все эти возможности нуждаются в углубленном изучении.

О МЕХАНИЗМЕ ИЗУЧЕННЫХ РЕАКЦИЙ

Во всех четырех типах изученных реакций участвуют либо возбужденные, либо невозбужденные молекулы хлорофилла и восстановленных пиридиннуклеотидов. В наших опытах хлорофилл возбуждался красным светом, НАД · H_2 — ультрафиолетовым (365 *ммк*).

При возбуждении молекул органических соединений возрастает их тенденция к отдаче или восприятию электрона; реализация того или иного типа элементарного процесса зависит от величины сродства к электрону молекулы-партнера [28, 29]. Возбужденный хлорофилл (вероятно, в триплетном состоянии) в присутствии молекул-доноров электрона способен к обратимому восприятию электрона — фотовосстановлению, что было установлено нами в 1948 г. и детально изучено в работах нашей лаборатории [30]. Способность хлорофилла в растворах к обратимому фотоокислению демонстрировалась в ряде работ [31]. Применяя вязкие среды, нам удалось недавно наблюдать обратимое взаимодействие хлорофилла и его аналогов с хинином [32].

При возбуждении молекулы сильного восстановителя — НАД · H_2 растет его способность к отдаче электрона (водорода). Однако реализация потенции к восприятию электрона (восстановлению) требует наличия в системе еще более сильного восстановителя. В изученных системах при возбуждении НАД · H_2 увеличивается тенденция к отдаче электрона (водорода) — фотоокислению, что и наблюдается в действительности при реакции этих соединений с акцепторами электрона — ацетальдегидом, рибофлавином и т. д. Таким образом, изученные нами реакции, в которых участвуют возбужденные молекулы НАД · H_2,— это реакции фотоокисления указанных соединений

$$НАД \cdot H_2^* + B \rightarrow НАД + BH_2,$$

вероятно, идущие с промежуточным образованием семихинонов, определяющих появление фотопотенциала инертного электрода.

В случае сенсибилизированных хлорофиллом реакций, идущих с использованием НАД · H_2 в качестве исходного донора электрона, удается наблюдать фотовосстановление хлорофилла этим соединением. Можно предполагать, что реакция в элементарных стадиях следует изученному нами механизму, включающему промежуточное фотовосстановление хлорофилла в качестве этапа переноса электрона [30].

ОБ ЭВОЛЮЦИИ ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Следуя взглядам Опарина [33], можно предположить, что первичные анаэробные гетеротрофные организмы обладали фрагментами цепи переноса электрона, включающими пиридиннуклеотиды, флавины и иные окислительно-восстановительные системы, использующие в качестве субстрата

для образования восстановленных углеродных соединений органические и неорганические доноры электрона.

Свет мог активировать отдельные звенья переноса электрона еще до образования специальной пигментной системы; в наших опытах показана активация восстановленных пиридиннуклеотидов, известна фотохимическая активация флавинов. Однако использование в процессе эволюции более инертных субстратов водородных доноров потребовало включения пигментной системы в цепь переноса электрона от субстрата к пиридиннуклеотиду. Так, в анаэробных фотосинтезирующих бактериях вероятно включение бактериохлорофилла и бактериовиридина в звене субстрат — пиридиннуклеотид или ФАД · H_2 — НАД. Это усложнение цепи переноса электрона потребовало усложнения структурной организации организмов. У фотосинтезирующих бактерий пигментная система сосредоточена в гранулах, обладающих ламеллярной белково-липоидной структурой.

В работах Сисакяна [34] было установлено, что хлоропласты являются средоточием не только пигментов, но и разнообразных ферментных систем, что является предпосылкой сопряжения фотохимических и энзиматических процессов.

В 1957 г. в докладе на Симпозиуме по происхождению жизни [35] мы сформулировали следующие представления о путях развития фотосинтетической цепи переноса электрона:

«Фотосинтезирующие бактерии еще «не умеют» выделять кислород воды в молекулярной форме и осуществлять более «дешевый» в энергетическом отношении тип фотосинтеза. Ван Нил [36] предположил, что у всех автотрофных организмов, в том числе у фотосинтезирующих бактерий, происходит элементарный фотолиз воды ($HOH \dashrightarrow H + OH$), причем исходный донатор водорода реагирует с OH-радикалами, а H используется для восстановления CO_2. В согласии с этой точкой зрения, было показано, что независимо от ΔF балансовой реакции (при различных водородных донаторах) квантовый выход бактериального фотосинтеза является постоянным (около 8 $h\nu$ на молекулу CO_2). Эти результаты свидетельствуют об одном и том же типе элементарных фотопроцессов (независимо от природы исходного донатора водорода) при фотосинтезе бактерий.

В работах нашей лаборатории было обнаружено, что бактериохлорофилл в растворе способен к фотосенсибилизированному переносу электрона от сероводорода, аскорбиновой кислоты к флавинам и другим акцепторам водорода. Участие воды в фотопроцессе, по нашему мнению, требует дальнейших доказательств. Более вероятно, что фотосинтезирующие бактерии «используют» электрон молекулы донатора (например, SH, S_2O_3, органические кислоты) и протоны (водородные ионы) воды; способность «вырывать» электрон воды или OH-ионов возникла лишь в процессе дальнейшего развития автотрофных организмов. Можно предположить, что развитие способности к выделению кислорода воды потребовало использования двух квантов света для переноса одного электрона, т. е. сопряжения двух элементарных фотопроцессов для преодоления высокого энергетического барьера на пути переноса одного электрона (водорода) от воды к углекислоте, тогда как при бактериальном фотосинтезе достаточно одного элементарного фотопроцесса (использования одного кванта света) для переноса одного атома водорода от молекулы донатора к CO_2.

Двухступенчатый перенос электрона потребовал усложнения сопряжения с ферментативными системами и образования «резерва» промежуточных донаторов водорода. Можно себе представить развитие следующих ступеней: 1) перенос электрона от воды к промежуточному акцептору электрона (например, цитохром, полифенолы, дегидроаскорбиновая кислота, дисульфиды) — реакция Хилла; 2) перенос электрона от восстановленных форм этих соединений к пиридиннуклеотидам, участвующим в реакциях восстановления CO_2 (например, в звене фосфоглицериновая кисло-

та→триозофосфат (согласно схеме Кальвина) [37]. Замыкание «накоротко второй ступени переноса водорода может быть сопряжено с фосфорилированием».

В ряде последних работ получены данные о том, что в фотосинтетической цепи электрона действительно возможно наличие двух фотопроцессов, причем один из них, вероятно, связан с фотовосстановлением пиридиннуклеотидов, а другой — с элементарным фотоокислением молекулы воды, причем вероятно, что в разных фотопроцессах участвуют разные формы хлорофилла. Таким образом, постепенное усложнение сопряжения фрагментов цепи переноса электрона привело к той современной организации фотосинтетического аппарата, которую мы наблюдаем в зеленых растениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Опарин. Происхождение жизни. М., Изд-во АН СССР, 1957.
2. А. А. Красновский и Г. П. Брин. Докл. АН СССР, **153**, 212, 1963.
3. W. R. Frisell, C. G. Mackenzie. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **45**, 1568, 1957.
4. А. А. Красновский и К. К. Войновская. Биофизика, **1**, 120, 1956.
5. А. А. Красновский и Г. П. Брин. Докл. АН СССР, **139**, 142, 1961; **147**, 666, 1962.
6. К. К. Войновская, А. А. Красновский. Биохимия, **20**, 123, 1955.
7. J. Lascelles. Biochem. J., **55**, 4, 1953.
8. А. А. Красновский, Г. П. Брин. Докл. АН СССР, **67**, 325, 1949.
9. W. Vishniak, S. Ochoa. Nature, **167**, 768, 1951.
10. L. Tolmach. Arch. Biochem. and Biophys., **33**, 120, 1951.
11. D. I. Arnon. Nature, **167**, 1008, 1951.
12. A. San Pietro. Science, **124**, 118, 1956.
13. D. I. Arnon, F. Watley, M. Allen. Nature, **180**, 182, 1957.
14. L. P. Vernon, E. D. Linen. Biochim. et biophys. acta, **24**, 115, 1957.
15. K. Tagawa, D. I. Arnon. Proc. Nat. Acad. Sci, U. S. A., **49**, 567, 1963.
16. A. M. Frenkel. J. Amer Chem. Soc., **80**, 3479, 1958.
17. А. А. Красновский и К. К. Войновская. Докл. АН СССР, **87**, 109, 1952.
18. В. Б. Евстигнеева и В. А. Гаврилова. Докл. АН СССР, **141**, 477, 1961.
19. L. M. Duysens, L. Amesz. Biochim. et biophys. acta, **24**, 199, 1957.
20. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский. Докл. АН СССР, **120**, 764, 1958.
21. Г. П. Брин, А. А. Красновский. Биохимия, **24**, 1085, 1959.
22. L. Vernon. Acta chem. scand., **15**, 1651, 1962.
23. T. Bannister, L. Bernardini. Biochim. et biophys. acta, **59**, 188, 1962.
24. D. Mauserall, F. Westheimer. J. Amer. Chem. Soc., **77**, 2261, 1955.
25. А. А. Красновский, Г. П. Брин, Н. Н. Дроздова. Докл. АН СССР, **150**, 1157, 1963.
26. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. Докл. АН СССР, **114**, 1066, 1957.
27. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. Докл. АН СССР, **92**, 381, 1953.
28. J. Weiss. Trans. Faraday Soc., **32**, 1331, 1936.
29. А. Н. Теренин. Фотохимия красителей. М.— Л., Изд-во АН СССР, 1948.
30. А. А. Красновский. Успехи химии, **29**, 736, 1960.
31. Е. Рабинович. Фотосинтез, **1—3**, М., ИЛ, 1951—1956 гг.
32. А. А. Красновский и Н. Н. Дроздова. Докл. АН СССР, **150**, 1378, 1963.
33. А. И. Опарин. Эволюционная биохимия. Труды V МБК, М., 1962.
34. Н. М. Сисакян. Биохимия обмена веществ. М., Изд-во АН СССР, 1954.
35. А. А. Красновский. Сб. «Возникновение жизни на Земле». М., Изд-во АН СССР, 1959.
36. C. Van Niel. Advances Enzymol., **1**, 263, 1936.
37. M. Calvin. III Intern. Congr. Biochim. Conferences et rapports, p. 211, 1956.

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 158, № 3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА, БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОВИРИДИНА В ВЯЗКОЙ СРЕДЕ; ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОРМ

При изучении фотохимических окислительно-восстановительных реакций пигментов в растворах удается (варьируя природу молекулы-партнера, среды и условий течения реакции) наблюдать образование промежуточных восстановленных и окисленных форм. Применение основных сред позволило обнаружить способность хлорофилла, его разнообразных аналогов и производных к реакции обратимого фотохимического восстановления ([1]). В отличие от органических оснований, спиртовые ([2]) и спирт-глицериновые ([3]) среды благоприятствуют наблюдению обратимого фотоокисления хлорофилла и бактериохлорофилла ([4]). Линшитц и Реннерт ([5]) наблюдали фотохимическое взаимодействие хлорофилла с хиноном в «жесткой» среде при —196°; фотопродукты стабилизировались в этих условиях, и регенерация хлорофилла наблюдалась после размораживания. Мы наблюдали фотореакцию хлорофилла и его аналога с хиноном при —70° в вязких прозрачных спирт-глицериновых растворах, обратимую после выключения света ([6,7]).

В связи с развитием техники дифференциальной спектроскопии в литературе оживленно обсуждается вопрос о наличии в живых фотосинтезирующих организмах фотохимически измененных форм хлорофилла и его аналогов. В таких поисках может помочь знание дифференциальных спектров поглощения продуктов фотохимического взаимодействия пигментов с окислителями и восстановителями.

В данной работе эти измерения осуществлены в вязкой спирт-глицериновой среде при реакции пигментов с хиноном и кислородом и в пиридин-глицериновой среде при реакции с аскорбиновой кислотой. В вязких средах при низкой температуре достигается стабилизация промежуточных продуктов, делающая возможной снятие спектров поглощения на регистрирующем спектрофотометре обычного типа (СФ-10).

Методика. Хлорофилл a и b, бактериохлорофилл, бактериовиридин, протохлорофилл и феофитин выделяли из фотосинтезирующих организмов методами, принятыми в нашей лаборатории, с конечным хроматографическим разделением на сахарозе. В качестве окислителей использовали: *n*-бензохинон (х. ч. возогнанный на воздухе), антрахинон (х. ч.), 2-метил-1,4-нафтохинон (менадион), 2,3-диметокси-5-метилбензохинон и убихинон(15) (коэнзим Q_3). (Последние два соединения были любезно предоставлены нам Г. И. Самохваловым и Е. А. Обольниковой.) Восстановителями служили аскорбиновая кислота и сернистый натрий.

Опыты ставили в трубках Тунберга, приспособленных для измерения на спектрофотометрах СФ-10 и СФ-4. Освещение — красным светом (светофильтр КС-13) в прозрачном сосуде Дьюара в смеси спирта с углекислотой при —70°. Источник света — лампа накаливания (300 вт) с конденсором и водяным фильтром. Интенсивность света в большинстве опытов 10^5 эрг/см^2·сек.

Опыты с окислителями. Действие разных хинонов проверяли в опытах с хлорофиллом a. Эфирный раствор хлорофилла a, снятого с сахарозы, испаряли в трубке Тунберга, вводили 3 мл этилового спирта, 5 мг исследуемого хинона и, после растворения, 2,8 мл глицерина; затем

откачивали воздух при энергичном взбалтывании, с испарением 1,5 мл спирта. Оптическая плотность (D) при 665 мμ 0,8—1,0, т. е. концентрация пигмента $\sim 10^5$ M. Трубку с раствором фиксировали в сосуде Дьюара в течение 5 мин, измеряли D при 665 мμ, освещали 2 мин при —70°, измеряли D (прямая фотореакция), погружали в сосуд Дьюара и через 2 мин снова измеряли оптическую плотность (обратная реакция в темноте).

Обратимая фотореакция наблюдалась с *n*-бензохиноном и 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном, с 2-метил-1,4-нафтохиноном реакция шла слабо, с антрахиноном и коэнзимом Q_3 реакцию наблюдать не удалось (табл. 1).

Таблица 1

Фотохимическое взаимодействие хлорофилла а с разными хинонами. Обратимое изменение оптической плотности (D) при 665 мμ ($\Delta D \pm 0{,}01$) *

Хинон	$\Delta D \cdot 10^3$ при световой реакции	$\Delta D \cdot 10^3$ при обратной реакции в темноте	Процент регенерации пигмента
n-бензохинон	—120	+110	90
2,3-диметокси-5-метилбензохинон	—110	+ 80	73
2-метил-1,4-нафтохинон	— 30	+ 20	70
Убихинон (15) (коэнзим Q_3)	0	0	0
Антрахинон	0	0	0

* Минус — падение, плюс — возрастание.

Неполную регенерацию пигмента после обратной реакции в темноте следует объяснить необратимыми реакциями, возможно с участием следов кислорода в системе.

Следует отметить, что Толлин и Грин ([8]), показавшие возникновение сигнала э. п. р. со спектром семихинона при освещении хлорофилла с различными хинонами в органических растворителях, не смогли наблюдать эффекта с коэнзимом Q_6. По-видимому, в данных условиях реакция наблюдается с окислителями, обладающими E^1_0 от +0,2 до +0,3 в. Как видно из данных табл. 1, реакция идет наиболее полно с *n*-бензохиноном. Это соединение использовалось в реакции со всеми изученными пигментами. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Обратимое изменение оптической плотности (D) в красном максимуме поглощения при фотоокислении пигментов *n*-бензохиноном ($\Delta D \pm 0{,}01$)*

Пигмент	$\Delta D \cdot 10^3$ при световой реакции (С—Т)	$\Delta D \cdot 10^3$ при темновой обратной реакции (Т—С)	Процент регенерации пигмента
Бактериохлорофилл	—170	+140	82
Бактериовиридин	—140	+110	82
Хлорофилл а	—120	+110	90
Хлорофилл b	— 50	+ 30	60
Протохлорофилл	— 30	+ 20	70
Феофитин а	0	0	0

* Минус — падение на 2 мин. света (С), плюс — возрастание за 2 мин темноты (Т).

Обратимая реакция с *n*-бензохиноном наблюдалась со всеми пигментами, кроме феофитина (табл. 2), что согласуется с известным фактом большей трудностью окисления этого пигмента кислородом; правда остается возможность быстрой обратной реакции, которая может идти и в данных условиях.

Для получения дифференциальных спектров поглощения при фотохимическом окислении пигментов в качестве окислителя использовали *n*-бензохинон (5 мг) и кислород воздуха. Опыты проводили также в вязкой спирт-глицериновой среде при —70°. Снимали спектры поглощения пигментов перед освещением (после 5—10-минутного стояния трубки с раствором в сосуде Дьюара) в области от 400 до 750 мμ на спектрофотометре СФ-10 и от 750 до 900 мμ (в опытах с бактериохлорофиллом) на спектрофотометре СФ-4. Освещали при —70° в течение 2 мин, снимали спектр, затем размораживали раствор для более быстрого и полного прохождения обратной реакции, погружали в сосуд Дьюара на 5 мин и снова снимали спектр. По этим данным строили дифференциальные спектры свет — темнота (спектр поглощения до освещения минус спектр поглощения после освещения). В опытах с кислородом спирт-глицериновые растворы пигментов освещали при +20° до уменьшения оптической плотности, соответствующего опыту с хиноном

($\Delta D \sim 0{,}1$—$0{,}2$). В этом случае доминировало необратимое окисление: часть окисленного пигмента можно было регенерировать добавлением аскорбиновой кислоты ([2]), наиболее отчетливо в случае бактериохлорофилла ([4]). Как известно, исследованные нами пигменты реагируют с кислородом с разной скоростью, поэтому в случаях быстро окисляющихся бактериохлорофилла и бактериовиридина, мы уменьшали интенсивность освещения в десять раз введением нейтрального светофильтра НС-3 и сокращали время освещения до 10 сек в опытах с бактериохлорофиллом и до 1 мин — с бактериовиридином. Хлорофилл a, хлорофилл b и феофитин освещали через красный светофильтр КС-13 более длительное время.

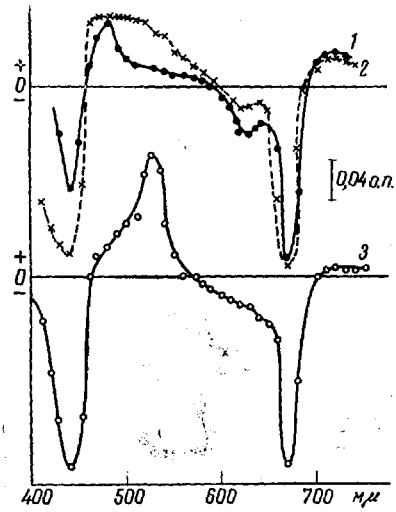


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении хлорофилла a. *1* — окисление *n*-бензохиноном, *2* — кислородом, *3* — восстановление аскорбиновой кислотой

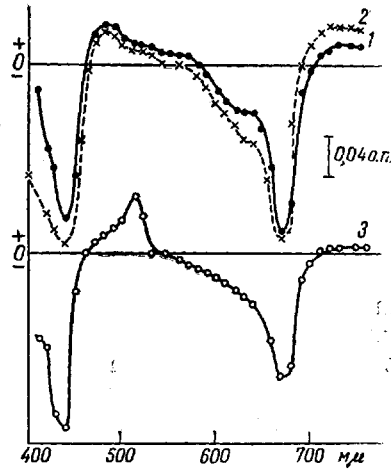


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении бактериовиридина. Обозначения те же, что на рис. 1.

Опыты с восстановителями. Образование восстановленных форм пигментов лучше наблюдается в основных средах (пиридин). Для достижения высокой вязкости пиридин смешивали с глицерином в соотношении 1 : 2. Фотовосстановление хлорофилла и бактериовиридина проводили аскорбиновой кислотой (5 мг). В случае бактериохлорофилла быстрое обратимое восстановление не удается наблюдать с аскорбиновой кислотой в вязкой среде, поэтому опыты с бактериохлорофиллом проводили в пиридине и в качестве восстановителя использовали свежеприготовленный водный раствор сернистого натрия (0,1 мл раствора, содержащего 10 мг Na_2S) ([9]). Из-за быстрой обратной реакции при комнатной температуре производили освещение и последующие измерения при —15°. Для всех пигментов снимали спектры поглощения до освещения и после него. По этим данным построены дифференциальные спектры (свет — темнота). Фотовосстановление наблюдалось со всеми пигментами.

Рассмотрим вид спектров промежуточных форм хлорофилла a (рис. 1). Для обеих реакций (окисления и восстановления) характерно падение «красного» и «синего» максимумов и появления поглощения в средней области видимого спектра при окислении — с максимумом при 480 мμ, при восстановлении — при 525 мμ. При окислении наблюдается появление полосы поглощения $\sim$740 мμ; при фотовосстановлении поглощение в близкой инфракрасной области наблюдается лишь при более длительном освещении и в особых условиях ([10]).

Спектры бактериовиридина подобны спектрам хлорофилла а; максимум окисленного продукта лежит при 480 мμ, а восстановленного — при 510 мμ (рис. 2). В случае бактериохлорофилла (рис. 3) более отчетливо выражены различия окисленных и восстановленных форм. Окисленные формы характеризуются максимумами при 430; 530 и 840 мμ, при окислении кислородом наблюдается, кроме того, увеличение поглощения при 650 мμ; для восстановленных форм характерно увеличение поглощения в красной области с максимумом при 650 мμ.

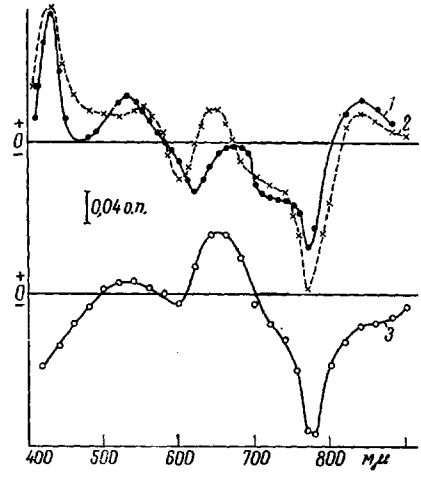


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении бактериохлорофилла. *1* — окисление *n*-бензохиноном, *2* — кислородом, *3* — восстановление сернистым натрием

Во всех случаях обращает на себя внимание сходство дифференциальных спектров поглощения при обратимом окислении пигментов хиноном и преимущественно необратимом — кислородом.

Высказывалась мысль о возможности фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления хинона с использованием в качестве донора водорода растворителя ([6,7]); при этой реакции образуется семихинон, который вообще мог бы реагировать с пигментом как путем фотоокисления, так и фотовосстановления. Сходство спектров продукта реакции с кислородом указывает на то, что в опытах с хиноном действительно наблюдается окисление. Во всех случаях мы измеряли спектры относительно устойчивых продуктов, и нет уверенности в том, что они соответствуют спектрам продуктов «одноэлектронного» окисления —восстановления. Большое сходство спектров окисленных и восстановленных форм свидетельствует о том, что в обоих случаях происходит нарушение системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента.

В поисках измененных форм хлорофилла в организмах могут помочь измерения дифференциальных спектров, сделанные в модельных системах, содержащих доноры и акцепторы электрона.

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

Поступило
16 VI 1964

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Усп. хим., **29**, 376 (1960). [2] А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947). [3] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **21**, 126 (1956). [4] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). [5] H. Linshitz, L. Rennert, Nature, **169**, 193 (1952). [6] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1378 (1963). [7] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **153**, 721 (1964). [8] G. Tollin, G. Green, Biochim. et biophys. acta, **60**, 524 (1962). [9] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **135**, 1258 (1960). [10] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **112**, 911 (1957).

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 155, № 3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. В. УМРИХИНА

ОБ АБИОГЕННОМ ОБРАЗОВАНИИ ПОРФИНА И ЕГО УЧАСТИИ В ПРОЦЕССАХ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Представления А. И. Опарина [1] о первичном образовании органического вещества на Земле из простых неорганических соединений путем абиогенных синтезов под влиянием у.-ф. радиации Солнца, тихих электрических разрядов или ионизирующей радиации получили экспериментальное обоснование в ряде работ, показавших возможность образования аминокислот и других органических соединений в смесях, моделирующих вероятный состав первичной анаэробной атмосферы [2-4].

В смесях NH_3, CO_2, H_2O, H_2, имитирующих первичную атмосферу Земли, под влиянием у.-ф. излучения вероятен синтез простых азотсодержащих циклов, в том числе пиррола; в подобных условиях наблюдалось образование формальдегида [2]. Ротемунд в 1936 г. [5] синтезировал порфин из пиррола и формальдегида в растворе метилового спирта и пиридина в запаянных ампулах при нагревании.

Мы исследовали условия реакции между пирролом и формальдегидом, используя для обнаружения порфина крайне чувствительный метод измерения характерных спектров флуоресценции порфина непосредственно в реакционной среде. При обычной процедуре опыта 0,02 мл пиррола вводили в 2 мл 2% раствора формальдегида в метиловом спирте, содержащем около 10% воды. Ампулу откачивали, запаивали под вакуумом и помещали на кипящую водяную баню. В процессе реакции записывали спектры флуоресценции на регистрирующем флуорометре при возбуждении флуоресценции линиями ртути 365 мμ. Через 8—10 час. нагревания ампул на водяной бане появляется характерная для порфиринов красная флуоресценция, которая усиливается при дальнейшем нагревании. В спектре флуоресценции раствора, измеренном после 10—20 час. нагревания, обнаружены три максимума — при 700; 644 и 620 мμ (рис. 1).

Действие кислорода воздуха. При нагревании запаянных ампул с воздухом (без предварительного откачивания) значительно ускоряется синтез порфина и увеличивается его количество. В этих опытах объем раствора составлял около $^1/_3$ объема ампулы. Если в вакууме отчетливая красная флуоресценция порфина появляется лишь через 8—10 час. нагревания при 100°, то в присутствии кислорода уже через час образуется значительное количество порфина. Увеличение выхода порфина в присутствии воздуха объясняется тем, что стехиометрия реакции определяет необходимость окислителя в реакционной среде. В вакууме, вероятно, могут образовываться восстановленные соединения, которые, однако, не окислялись до порфина после пуска воздуха. Различие спектров флуоресценции в вакууме и на воздухе, возможно, указывает на синтез хлорина, которому благоприятствуют анаэробные условия. Можно ожидать, что в анаэробной первичной атмосфере был возможен синтез наиболее восстановленного соединения — бактериохлорина.

Действие воды на синтез порфина. Введение в спирт до 80—90% воды благоприятствует начальной стадии реакции, идущей в присутствии кислорода. В случае большого количества воды образуются вещества, выпадающие в осадок. В смеси, содержащей 30—60% воды, ха-

рактерная красная флуоресценция порфина появляется после 3—5 мин. нагревания. Таким образом, наличие воды и кислорода благоприятствует реакции образования порфина из пиррола и формальдегида.

Действие катализаторов. Мы изучали действие ряда неорганических соединений в виде взвеси в спиртовом растворе пиррола с формальдегидом. Наиболее интересно исследовать действие на синтез порфина каталитически активных компонентов земной коры и прежде всего окислов кремния, алюминия, титана и т. п. В ампулу с 2 мл смеси вышеуказанного состава добавляли 5—10 мг катализатора. Оказалось, что различные образцы окислов кремния, титана, цинка ускоряли появление красной флуоресценции порфина при нагревании смеси в присутствии воздуха. Некоторое ускорение синтеза наблюдалось также в присутствии солей — хлористых калия и марганца, сульфатов магния и кобальта. В вакууме наиболее отчетливое ускоряющее действие на синтез порфина оказывала окись цинка. В присутствии окиси цинка, возможно, образуется цинковый комплекс порфина; в спектре флуоресценции почти полностью отсутствует максимум при 700 мμ, максимум при 620 мμ преобладает (см. рис. 1). С окисью цинка удалось наблюдать образование небольшого количества порфина при стоянии запаянной ампулы с раствором пиррола с формальдегидом в 50% метиловом спирте в течение нескольких дней при комнатной температуре в присутствии воздуха.

Из табл. 1 видно, что реакция ускоряется в присутствии воздуха, воды и катализатора.

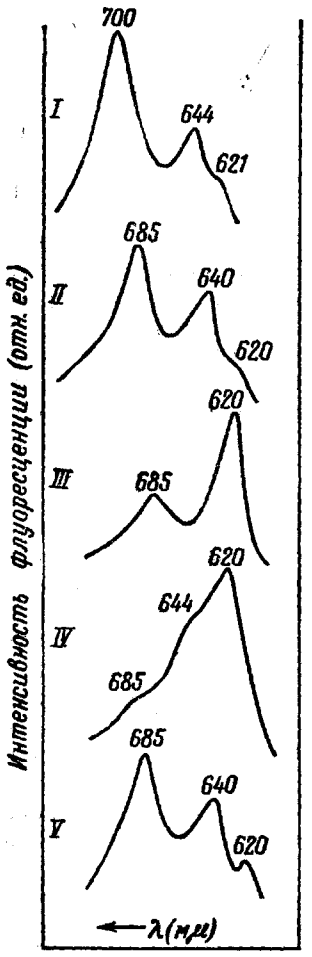


Рис. 1. Флуоресценция порфина, образовавшегося при нагревании растворов пиролла с формальдегидом. *I* — в метиловом спирте, в вакууме; *II* — в метиловом спирте, в присутствии воздуха; *III* — 50% водный метанол, в присутствии воздуха; *IV* — 50% водный метанол, в присутствии ZnO и воздуха; *V* — в метиловом спирте, в присутствии SiO_2 и воздуха

Действие у.-ф. освещения. Опыты проводили в стеклянных и кварцевых трубках Тунберга. Смесь пиррола с формальдегидом в метиловом спирте в вакууме освещали линиями ртути 265 мμ (бактерицидная лампа) через светофильтр УФС-1 или без светофильтра. При освещении раствора в течение длительного времени (до 30 час.) не удалось наблюдать образования порфина. Действительно, синтез порфина из пиррола и формальдегида термодинамически самопроизволен и не требует фотохимической активации компонентов, тогда как исходные продукты — порфин и формальдегид — могут образоваться фотохимическим путем.

Способность порфина фотосенсибилизировать процесс переноса электрона. Следовало ожидать, что образованный абиогенным путем порфин примет участие в фотокаталитических процессах переноса электрона, будучи первичным пигментом-фотосенсибилизатором. Способность более сложно построенных порфинов участвовать в фотохимическом переносе электрона показана нами ранее. Так, гематопорфирин фотосенсибилизирует восстановление красителя метилового красного

Таблица 1

Влияние условий на появление красной люминесценции порфина в смеси пиррол — формальдегид

Катализатор	Воздух *	Вода в смеси, %	Длительн. нагрев., ** мин.	Катализатор	Воздух *	Вода в смеси, %	Длительн. нагрев., ** мин.
—	—	10	480	ZnO	+	10	15
—	—	50	200	SiO_2	+	10	45
—	+	10	90	SiO_2	+	50	15
—	+	50	30	$CaCl_2$	+	10	10
ZnO	—	10	120				

* Опыты без откачивания обозначены +, с откачиванием воздуха —.
** Продолжительность нагревания ампулы, после которого появляется отчетливая красная флуоресценция (при возбуждении линиями ртути 365 мμ).

с использованием ионов двухвалентного железа в качестве донора электрона ([6]). Мы испытали способность порфина к осуществлению реакции этого типа. Для фотохимических опытов порфин был выделен из реакционной смеси в чистом виде по модифицированному нами методу Ротемунда. Пигменты экстрагировали бензолом из реакционной смеси, переводили в 5% соляную кислоту, затем снова в бензол, после нейтрализации соляной кислоты ацетатом натрия. Раствор порфина в бензоле хроматографировали на колонке с окисью алюминия. Порфин снимали с колонки бензолом. Раствор порфина в 1% водной соляной кислоте и в пиридине обладал способностью к сенсибилизированному переносу электрона от аскорбиновой кислоты и солей двухвалентного железа (сульфата и калий-оксалата) к конечному акцептору электрона — метиловому красному (рис. 2).

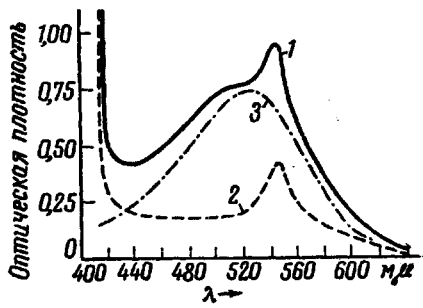


Рис. 2. Сенсибилизированное порфином восстановление метилового красного ионами Fe^{2+} (10 мг $FeSO_4$ в 4 мл раствора) в 1% соляной кислоте. *1*—спектр поглощения раствора порфина с метиловым красным; *2* — спектр поглощения после освещения «белым светом», лампы накаливания 10^5 эрг/см^2·сек. за 10 мин. — соответствует исходному спектру порфина; весь метиловый красный восстановлен; *3* — разностный спектр (*1*—*2*), соответствующий спектру поглощения метилового красного

Итак, изложенные результаты опытов подтверждают возможность абиогенного синтеза порфина; реакция ускоряется в присутствии кислорода воздуха, воды и катализаторов (окислов кремния, титана, цинка и др.). Образованный порфин может участвовать в реакциях фотохимического переноса электрона с использованием в качестве донора электрона соединений двухвалентного железа, вероятно, распространенных в первородном океане.

Приносим глубокую благодарность акад. А. И. Опарину за постоянный интерес к работе и обсуждение.

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

Поступило
24 XII 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. И. Опарин, Возникновение жизни на Земле, Изд. АН СССР, 1957. [2] С. Миллер, Тр. международн. симпозиума, Возникновение жизни на Земле, М., 1959, стр. 131. [3] Т. Е. Павловская, А. Г. Пасынский, там же, М., 1959, стр. 149. [4] А. Н. Теренин, там же, М., 1959, стр. 144. [5] P. Rothemund, J. Am. Chem. Soc., **58**, 625 (1936). [6] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **122**, 1061 (1958).

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 154, № 2

БИОФИЗИКА

Ф. Ф. ЛИТВИН, В. А. СИНЕЩЕКОВ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

О ДЛИННОВОЛНОВЫХ ФОРМАХ ХЛОРОФИЛЛА В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМАХ И АГРЕГИРОВАННЫХ СТРУКТУРАХ

Рядом исследований было установлено, что в первичных процессах фотосинтеза принимают участие несколько форм хлорофилла ([1–7]). Особый интерес представляет исследование так называемых длинноволновых форм пигмента, поглощающих в области 685—750 мμ и ответственных за такие явления, как эффект Эмерсона, эффект Блинкса и ингибирование фотосинтеза в дальней красной области. Однако природа длинноволновых форм хлорофилла остается до настоящего времени невыясненной.

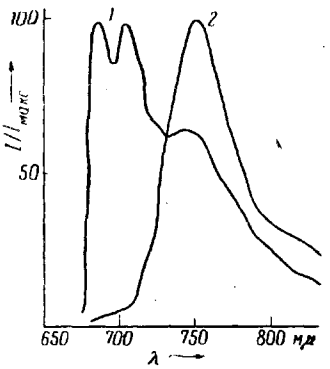


Рис. 1. Спектры люминесценции пленок хлорофилла а при —196°. *1*—«рыхлая» пленка, насыщенная растворителем; *2* — плотная пленка после удаления растворителя

Результаты изучения спектральных свойств хлорофилла в процессе его образования и накопления при зеленении этиолированных листьев и эксперименты на модельных системах позволили развить представления о существовании в фотосинтезирующих организмах мономерной и агрегированной формы пигмента, спектр которой смещен в длинноволновую сторону ([1, 2]). Для прямого спектроскопического исследования длинноволновых форм эффективными оказались чувствительные методы измерения спектров люминесценции листьев растений и водорослей при —196°. Исследование сложной структуры таких спектров указывает на существование нескольких форм пигмента, различающихся, по-видимому, по типу агрегации; и структура эта не может быть объяснена люминесценцией только двух форм хлорофилла, например, мономерной формы и димерной, известной по работам Броди с сотр. ([8]).

В данной работе нами предпринята попытка найти модельную систему, в которой могут быть воспроизведены спектрально-люминесцентные свойства нативных форм хлорофилла. Измерения низкотемпературных спектров производили на установке, описанной ранее ([9]).

В поисках системы, наиболее приближающейся по своим спектральным свойствам к хлорофиллу in vivo, мы обратились к исследованию различных типов пленок хлорофилла, содержащих некоторое количество растворителя, т. е. систем промежуточного типа — от концентрированного раствора до кристаллических слоев пигмента. Пленки получали либо на внутренней поверхности вакуумной трубки Тунберга при эвакуировании эфирных растворов хлорофилла а, либо между двумя стеклянными пластинками из капли концентрированного раствора пигмента после испарения растворителя. Эвакуирование растворов производили с помощью форвакуумного насоса.

Как видно на рис. *1*, в спектре рыхлой пленки пигмента, насыщенной парами растворителя, наблюдается ряд четко выраженных максимумов: 685; 702—705 и 740 мμ с плечом около 720—725 мμ; при этом наиболее ин-

тенсивны коротковолновые максимумы. В спектре «плотной» пленки, полученной после эвакуирования остатка растворителя, наблюдаются те же максимумы, однако коротковолновые лишь слабо намечены, а самый интенсивный — максимум 740 мμ или, в более плотных пленках, 750 мμ; на длинноволновом склоне кривой появляется максимум 815—820 мμ.

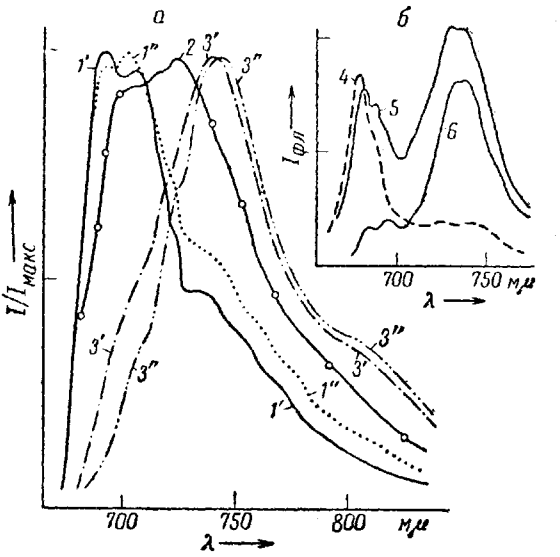


Рис. 2. Изменение спектров низкотемпературной люминесценции пленок хлорофилла а (*а*) и листьев растений (*б*) в зависимости от концентрации пигмента. *1* — спектр пленки, насыщенной растворителем; *2* — то же после эвакуирования растворителя в течение 2 мин.; *3* — то же после эвакуирования в течение 10 мин.; *4* — этиолированный лист фасоли после 6 час. освещения; *5* — то же после 12 час.; *6* — то же после 24 час.

В серии измерений, проведенных на одном и том же образце, по мере удаления растворителя из пленки удается проследить переходные типы спектров (рис. 2*а*). Уменьшение количества растворителя в пленке сопровождается уменьшением относительной интенсивности коротковолновых максимумов и усилением длинноволновых. Преобладающими в спектре последовательно становятся максимумы 690—692; 702—705; 720 и, наконец 735—740 и 750 мμ; параллельно возрастает и интенсивность самого длинноволнового максимума в области 800—820 мμ. Перераспределение интенсивности люминесценции в максимумах сопровождается падением общей интенсивности люминесценции. На рис. 2*б* для сравнения приведены результаты измерений спектров листьев растений в процессе накопления в них хлорофилла.

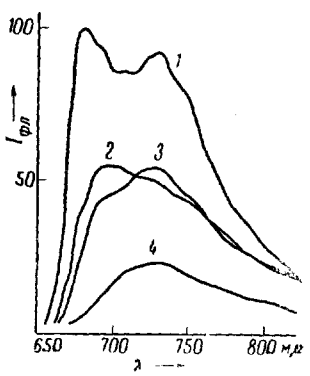


Рис. 3. Спектры люминесценции пленок хлорофилла а при —196°, полученных из эфирных растворов с добавлением различных количеств вазелинового масла. Соотношение объемов вазелинового масла и эфира в исходном растворе: *1* — 1 : 20; *2* — 1 : 100; *3* — 1 : 200; *4* — 1 : 400

С целью получения более стандартных образцов пленок к исходному эфирному раствору хлорофилла определенной концентрации добавляли различные количества вазелинового масла, после чего производили возможно более полное удаление растворителя. Как видно из приведенных спектров (рис. 3), при значительном содержании вазелинового масла в спектре преобладают коротковолновые максимумы 680 и 690 мμ; основной длинноволновый максимум 730 мμ менее интенсивен. В длинноволновой области можно заметить выступы на спектральной кривой около 705; 720; 740 и 750 мμ. Уменьшение количества нелетучего растворителя в пленке сопровождается изменениями спектра, аналогичными описанным выше (см. рис. 2 *а*).

Спектры низкотемпературной люминесценции агрегированного хлорофилла были получены также при адсорбции пигмента на хроматографической бумаге. Увеличение концентрации пигмента в пятне и в этом случае приводило к характерному изменению спектров с постепенным возрастанием интенсивности длинноволновой люминесценции.

Результаты предварительных исследований показали, что понижение температуры вызывает усиление интенсивности длинноволновых максимумов и меньше сказывается на люминесценции в коротковолновой области.

Появление дискретных максимумов в спектрах пленок хлорофилла может быть обусловлено люминесценцией различных агрегированных форм пигмента, спектральные свойства которых определяются межмолекулярным расстоянием и взаимоориентацией молекул хлорофилла.

В табл. 1 сопоставлены результаты измерений спектров пленок с полученными ранее данными о положении максимумов люминесценции в спектрах низкотемпературной люминесценции хлорофилла в фотосинтезирующих ор-

Таблица 1

Объект	Положение максимумов люминесценции (λ, мμ)						
Пленки хроматографически очищенного хлорофилла а	674 раствор хл. а в эфире	680—685	690 — 692	702 — 705	720 — 725	740—750 основн. максимум в плотн. пленке	800—825 в плотной пленке
		в пленках, насыщенных растворителем		увеличив. при эвакуир. растворителя			
Листья растений, суспензия хлореллы	675 на ранних этапах зеленения листьев	682 — 685 главный максимум при +20°	693—696 появл. при увелич. концентр. пигмента	700—705	720 главный максимум хлореллы при −196°	735—742 главный максимум листьев при −196°	810—825 при увелич. концентр. пигмента

→ Увеличение концентрации хлорофилла в пленке и в хлоропласте →

ганизмах. Это сопоставление показывает, что существует несомненное сходство описанных выше спектров со спектрами нативных форм хлорофилла. Сходство становится еще более определенным, если сравнить характер изменений спектров пленок при увеличении концентрации пигмента по мере удаления растворителя с закономерностью изменения спектров листьев в процессе накопления хлорофилла (ср. рис. 2 *а* и *б*). Полученные результаты дают основание предположить, что нативные длинноволновые формы пигмента с максимумами люминесценции 682—685; 693—696; 720; 730 и 810—825 мμ аналогичны по своей природе агрегированным формам, возникающим при определенных условиях в искусственных пленках хлорофилла. Пока трудно судить о строении агрегированных форм in vitro и in vivo; можно полагать, однако, что наряду с димерами хлорофилла в этих системах существуют более высокополимерные образования (тримеры, тетрамеры и т. д.), а также двумерные и трехмерные кристаллические структуры. Существен, по-видимому, и характер взаимоориентации молекул; так, например, максимум 702—705 мμ может принадлежать той форме пигмента, которая ответственна за эффект поляризации люминесценции хлоропластов («ориентированный хлорофилл») ([10]). В пользу предположения о том, что совпадение максимумов в спектре пленок и живых организмов не случайно, свидетельствует существование аналогичного параллелизма для бактериальных пигментов ([11]). В живой клетке условия агрегации и спектральные свойства форм пигмента должны также зависеть от характера связи пигмента с белково-липоидным носителем и от особенностей структуры хлоропласта.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
6 IX 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952); ДАН, **91**, 343 (1953). [2] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, Биохимия, **18**, 340 (1953). [3] J. S. Brown, C. S. French, Plant. Physiol., **34**, 305 (1959). [4] R. Emerson, R. Chalmers et al., Science, **123**, 673 (1956). [5] R. Emerson, E. Rabinowitch, Plant Physiol., **35**, 477 (1960). [6] C. S. French, Y. B. Myers, Carnegie Inst. Wash., **58**, 327 (1959). [7] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева, ДАН, **127**, 699 (1959); ДАН, **135**, 1528 (1960). [8] S. S. Brody, Science, **128**, 838 (1958). [9] Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещеков, Биофизика, **6**, № 4 (1963). [10] R. A. Olson, W. L. Butler, W. H. Jeninngs, Biochim. et Biophys. Acta, **54**, 615 (1961). [11] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Б. А. Гуляев, ДАН, **152**, № 5 (1963).

УДК 581.132

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕОФИТИНИЗАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА, БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА, БАКТЕРИОВИРИДИНА, ПРОТОХЛОРОФИЛЛА И ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА ЭТУ РЕАКЦИЮ

Е. В. ПАКШИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

В кислых средах происходит превращение хлорофилла в феофитин. Реакция феофитинизации представляет собой замещение центрального атома магния в молекуле пигмента на два атома водорода:

$$\text{Хлорофилл} + 2H^+ \rightarrow \text{Феофитин} + Mg^{++}$$

Феофитины почти всегда сопровождают хлорофилл и его аналоги при извлечении пигментов из фотосинтезирующих организмов. Можно предполагать, что небольшое количество феофитина может постоянно присутствовать в хлоропластах либо как продукт деструкции хлорофилла в непрерывной цепи его обновления, либо как побочный продукт окислительно-восстановительных превращений пигментов.

Еще Вильштеттер и Штоль [1] показали, что хлорофилл *a* более быстро превращается в феофитин, чем хлорофилл *b*. По данным Маккинея и Джослина [2—4], хлорофилл *a* превращается в феофитины в 8—9 раз быстрее, чем хлорофилл *b*. Эти данные подтвердил Ламорт [5].

О действии света на реакцию феофитинизации в литературе имеются разноречивые мнения. Рабинович в своей монографии [6] указал на неопубликованные опыты, в которых наблюдалось ускоряющее действие света на образование феофитина. По данным Аронова и Маккинея [7], фотоокисление не стимулирует феофитинизацию. В работе Ламорта [5] имеется указание на то, что освещение не влияет на скорость феофитинизации хлорофилла. С другой стороны, можно считать определенно установленным, что фотовосстановленная форма хлорофилла теряет магний гораздо легче, чем исходный пигмент.

Один из нас наблюдал образование феофитина при реакции фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в водном пиридине [8]. Евстигнеев и Гаврилова [9] показали, что хлорофилл, восстановленный в толуоловом растворе фенилгидразином, в случае медленной обратной реакции подвергается феофитинизации; в присутствии хинона, когда обратная реакция идет быстро, регенерирует исходный пигмент и феофитина не образуется. Баннистер [10] исследовал кинетику образования фотовосстановленной «красной формы» хлорофилла в присутствии аскорбиновой кислоты в водном пиридине и кинетику регенерации исходного пигмента, сопровождающуюся образованием феофитина. Автор высказал предположение о следующей последовательности обратных реакций: восстановленный хлорофилл либо быстро окисляется в исходный пигмент под действием окислителя (например, сафранина), либо, реагируя с ионами водорода, образует восстановленный феофитин, который медленно регенерирует в феофитин.

Далее, измеряя квантовые выходы образования феофитина в воднопиридиновых растворах хлорофилла под действием аскорбиновой, янтарной, яблочной и малоновой кислот, Баннистер [11] отметил быстрое образование феофитина при освещении лишь в присутствии аскорбиновой кислоты, являющейся донором электрона в данной системе. В фотосинтезирующих организмах феофитин в заметных количествах накапливается лишь в особых условиях. Так, давно известно, что в листьях растений феофитин накапливается при старении, когда происходит нарушение упорядоченной структуры хлоропластов и связанное с этим образование из хлорофилла различных продуктов деструкции.

Гринблат и Шифф [12] обнаружили, что хлорофилл *Euglena gracilis*, выращенной на свету, превращается в вещество подобное феофитину при помещении культуры

в темноту. Образование феофитина в интактных клетках в данном случае авторы связывают с изменением условий питания.

При продолжительном экспонировании на сильном свету в анаэробных условиях зелено-голубых мутантов *Rhodopseudomonas spheroides* бактериохлорофилл последних превращается в бактериофеофитин, причем световые реакции в выделенных из этих «феофитинизированных» клеток хроматофорах сохраняют тот же характер, что и в исходных бактериях [13]. В клетках *Rhodopseudomonas spheroides*, богатых каротиноидами, подобного превращения бактериохлорофилла в бактериофеофитин не происходило. Это соответствует нашим наблюдениям о торможении каротином процесса фотофеофитинизации.

Из двухдневной культуры *Rhodospirillum rubrum* методом дифференциального центрифугирования были изолированы частицы, содержащие бактериофеофитин и не содержащие бактериохлорофилла [14]. Авторы полагают, что эти частицы не являются артефактом.

В данной работе было проведено сравнительное исследование скорости феофитинизации хлорофилла и его аналогов, обладающих различной структурой, и изучено действие света на эту реакцию в связи с исследуемыми в нашей лаборатории окислительно-восстановительными превращениями пигментов фотосинтезирующих организмов. Краткое изложение некоторых результатов данной работы было приведено нами ранее [15].

МЕТОДИКА

Хлорофиллы *a* и *b* получали из листьев крапивы по модифицированному в нашей лаборатории методу Цшейле и Комар [16] с заключительной хроматографической очисткой на сахарозе. Протохлорофилл извлекали ацетоном из внутренних оболочек тыквенных семян, предварительно очищенных от внешних оболочек и смоченных водой; пигмент далее переводили в серный эфир и хроматографировали на сахарной колонке из смеси петролейного и серного эфиров (7 : 3).

Бактериохлорофилл выделяли из культуры *Rhodopseudomonas palustris*, для чего взвесь бактерии фильтровали через тальк на воронке Бюхнера, экстрагировали пигменты из осадка метиловым спиртом, переводили их далее в эфир и хроматографировали на сахарозе, используя в качестве растворителя смесь петролейного и серного эфиров (7 : 3). Бактериовиридин выделяли из культуры зеленых бактерий *Chloropseudomonas ethylicum*, также используя фильтрацию бактериальной взвеси через тальк, пигменты извлекали из осадка ацетоном, переводили их далее в серный эфир и хроматографировали на сахарозе (растворитель — смесь серного и петролейного эфиров в соотношении 1 : 1). Хлорофиллиды *a* и *b* выделяли из соответствующих хлорофиллов, для чего раствор пигмента в 65%-ном ацетоне встряхивали в течение 6 час. с ацетоновым препаратом хлорофиллазы из листьев сахарной свеклы, полученным по методу Холден [17]. От негидролизованного хлорофилла освобождались путем его экстракции легким петролейным эфиром [18].

При изучении влияния света на реакцию феофитинизации опыты проводили в вакууме в трубках Тунберга во избежание побочного фотоокисления. Освещение производили в термостатированной установке киноламповой мощностью 500 *вт* с конденсором через красный светофильтр КС-11 (в случае протохлорофилла — через светофильтр ОС-11); интенсивность света составляла 3×10^5 *эрг/см²·сек*.

Феофитинизацию хлорофилла и его аналогов изучали в водно-спиртовых, водно-ацетоновых и водно-пиридиновых растворах при разных значениях pH. Требуемое значение pH создавали добавлением щавелевой или соляной кислот. За скоростью феофитинизации следили путем измерения спектров поглощения на спектрофотометре СФ-5 и на регистрирующем спектрофотометре СФ-10.

На рис. 1 приведены спектры поглощения исследуемых пигментов в процессе их феофитинизации. Запись спектров обнаруживает четкое постоянство изобестических точек, что позволяет судить об отсутствии в данном случае каких-либо побочных, отличных от феофитинизации процессов. Количество образовавшегося феофитина вычисляли либо на основании измерения падения оптической плотности при максимумах поглощения, характерных для исходных пигментов (уравнение I), либо по увеличению оптической плотности при максимумах поглощения феофитинов (уравнение II).

$$a = \frac{(K_t - K_ф) \cdot 100}{K_x - K_ф} \quad \text{(I)} \qquad a = \frac{(K_t - K_x) \cdot 100}{K_ф - K_x} \quad \text{(II)}$$

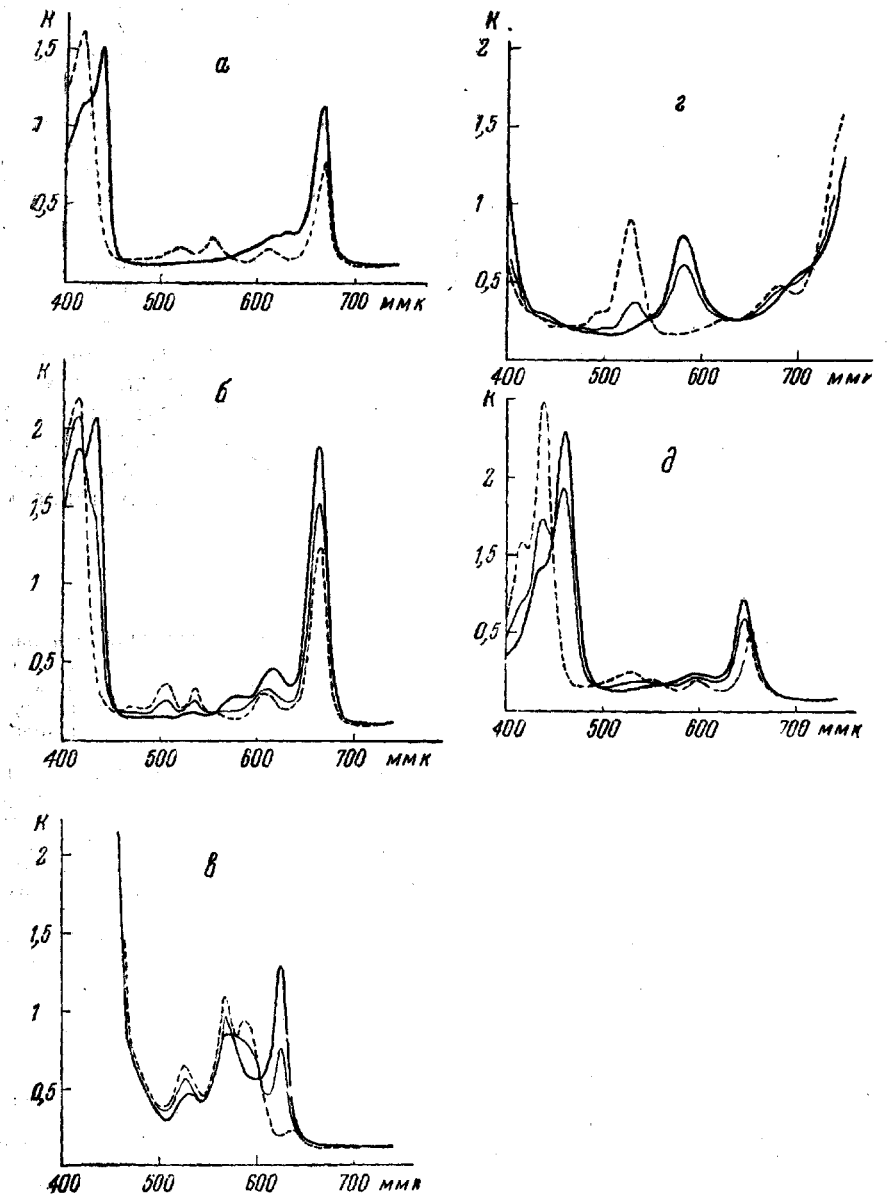


Рис. 1. Спектры поглощения исследуемых пигментов в водном ацетоне в процессе феофитинизации

а — бактериовиридин; *б* — хлорофилл *а*; *в* — протохлорофилл; *г* — бактериохлорофилл; *д* — хлорофилл *b*. Жирные линии — спектры поглощения исходных пигментов: пунктир — образовавшиеся из них феофитины

(a — % образовавшегося из хлорофилла феофитина в данный момент реакции, K_t — оптическая плотность в точке измерения в данный момент реакции, K_x — поглощение в точке измерения до реакции, $K_ф$ — поглощение в измеряемой точке, когда весь хлорофилл превратился в феофитин).

Длины волн света, при которых производили измерение образовавшегося из различных пигментов феофитина, следующие:

Пигмент	Точки измерения в ацетоновом растворе, *ммк*
Бактериовиридин	435 ↓
Хлорофилл *a*	430 ↓ 665 ↓
	505 ↑ 537 ↑
Протохлорофилл	625 ↓ 435 ↓
	590 ↑
Бактериохлорофилл	772 ↓ 580 ↓
	525 ↑
Хлорофилл *b*	460 ↓ 645 ↓
	530 ↑

Примечание. Стрелки, направленные вниз, означают, что при данной длине волны измерялось падение величины поглощения исходного пигмента, вверх — увеличение величины поглощения образующегося феофитина.

Измерения величины pH водно-ацетоновых и водно-спиртовых растворов HCl проводили на потенциометре ЛП-58 со стеклянным электродом. При этом величины pH водного ацетона были близки к значениям pH соответствующих по концентрации растворов кислоты в воде; значения pH водно-спиртовых растворов были сдвинуты в щелочную сторону. Пигменты брали в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$—$3 \cdot 10^{-5}$ *M*. Изменение концентрации пигмента в указанном диапазоне не влияло на скорость феофитинизации, которая зависела лишь от концентрации кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение скоростей феофитинизации хлорофилла и его аналогов. Изучали хлорофиллы *a*, *b*, протохлорофилл, бактериохлорофилл и бактериовиридин. Мы пытались установить корреляцию между наблюдаемыми различиями в скорости феофитинизации и известными отличия-

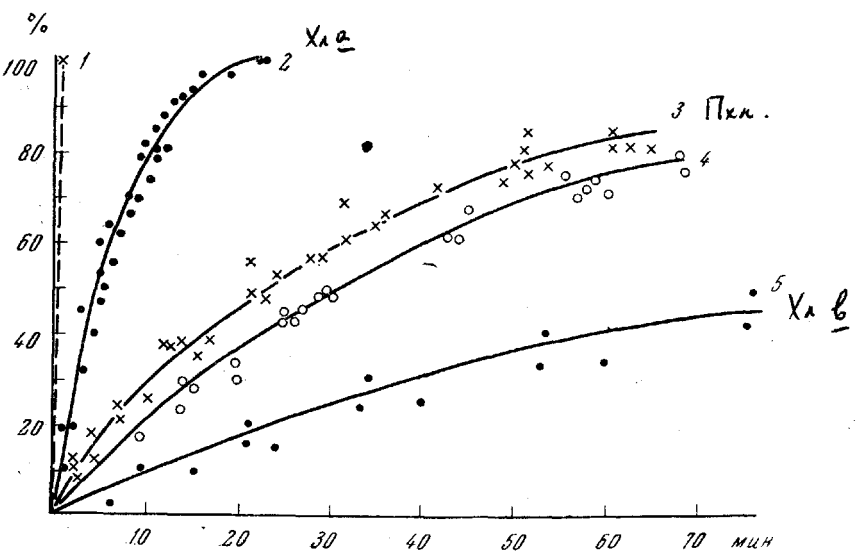


Рис. 2. Скорость образования безмагниевых производных различных пигментов

1 — бактериовиридин; *2* — хлорофилл *a*; *3* — протохлорофилл; *4* — бактериохлорофилл; *5* — хлорофилл *b* в среде, содержащей 90% ацетона+10% воды+$2 \cdot 10^{-2}$ *M* щавелевой кислоты (pH 2,2); температура 22°. По оси ординат — процент превращения исходного пигмента в феофитин

ми в строении молекул названных пигментов: с наличием различных заместителей в пиррольных ядрах, с различным уровнем восстановленности «полуизолированных» двойных связей у протохлорофилла, хлорофилла, бактериохлорофилла, с наличием или отсутствием циклопентанового кольца, с присутствием в молекуле бактериовиридина фарнезола в отличие от фитола хлорофилла.

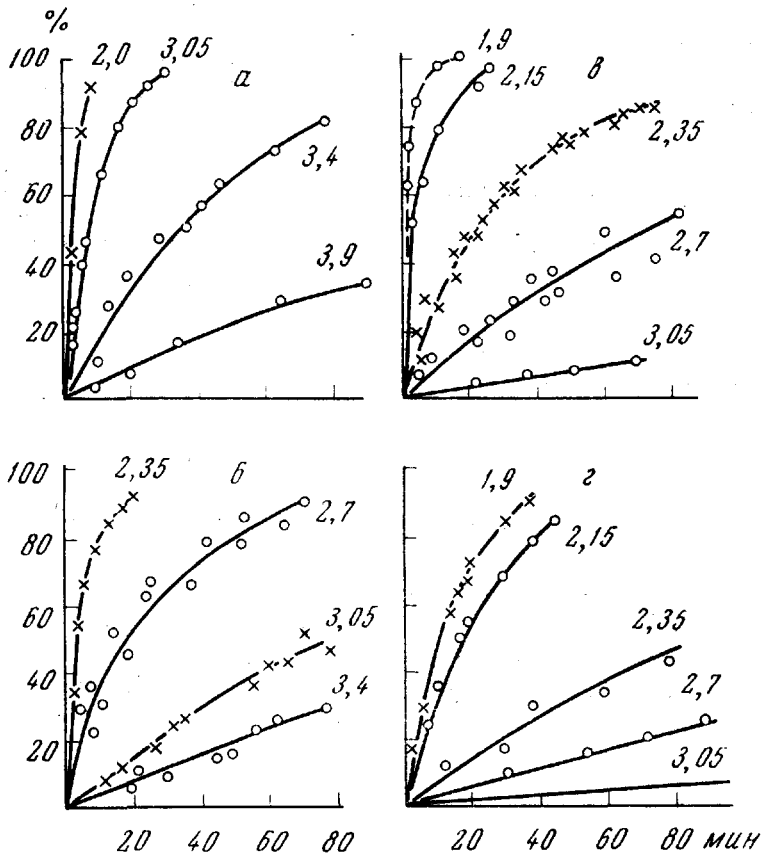


Рис. 3. Скорость превращения в соответствующие феофитины исследуемых пигментов

а — бактериовиридин; *б* — хлорофилл *а*; *в* — протохлорофилл; *г* — хлорофилл *b*. В процентах образующихся феофитинов (в водном ацетоне при разных значениях pH); температура 22°

На рис. 2 представлены результаты опытов, где все исследуемые пигменты превращали в феофитин в следующих стандартных условиях: 90% ацетона, 10% воды, $2 \cdot 10^{-2}$ *М* щавелевой кислоты (pH 2,2); температура 22°. Как видно из рис. 2, крайне быстро феофитинизировался бактериовиридин, далее следовал хлорофилл, а затем протохлорофилл и бактериохлорофилл; медленнее всего магний замещался водородом в молекуле хлорофилла *b*.

В следующей серии опытов, результаты которых представлены на рис. 3, мы изучали кинетику феофитинизации хлорофилла и его аналогов при различных значениях pH (от 4 до 2) через интервалы, равные 0,3 единицы. Именно в этом диапазоне pH удобно было сравнивать по скорости феофитинизации все исследуемые пигменты. Для этого 0,2 *мл* концентрированного ацетонового раствора пигмента приливали в пробирку к 4,5 *мл* водного ацетона (80% ацетона+20% воды), под-

кисленного до нужного значения pH соляной кислотой, и следили за скоростью образования феофитинов. За исходный спектр принимали кривую поглощения хлорофилла и его аналогов в неподкисленном водном ацетоне. «Стандартный» спектр феофитина снимали в водном ацетоне, подкисленном до pH 1,05. Феофитин бактериовиридина при этом значении pH изменял свою спектральную характеристику; спектр этого пигмента изучали при значениях pH не ниже 1,9. Установленная нами последовательность скорости феофитинизации пигментов при pH 2,2 (рис. 2) сохранялась при всех других исследованных значениях pH как в водно-ацетоновых, так и в водно-спиртовых растворах.

Кривые, отражающие кинетику превращения хлорофилла и его аналогов в соответствующие феофитины, подчинялись уравнению первого порядка, что согласуется с данными предыдущих исследователей [2—5]. В табл. 1 даны значения констант скорости феофитинизации пигментов в водно-ацетоновом растворе. Подкисление до указанных значений

ацетон : H_2O = (90 : 10%) Таблица 1

Константы скорости феофитинизации пигментов в водном ацетоне, вычисленные по уравнению реакции первого порядка (K, мин.$^{-1}$)

Пигмент	pH				
	2,2 ($2 \cdot 10^{-2}$ M щавелевой кислоты)	2,7 ($1 \cdot 10^{-2}$ M HCl)	3,1 ($5 \cdot 10^{-4}$ M HCl)	3,4 ($3 \cdot 10^{-4}$ M HCl)	3,9 ($1 \cdot 10^{-4}$ M HCl)
Бактериовиридин	—	$2{,}8 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Хлорофилл *a*	$1{,}5 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	—
Протохлорофилл	$3 \cdot 10^{-2}$	$7{,}6 \cdot 10^{-3}$	$1{,}7 \cdot 10^{-3}$	—	—
Бактериохлорофилл	$2 \cdot 10^{-2}$	—	—	—	—
Хлорофилл *b*	$4 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	—	—

pH производили соляной кислотой, за исключением графы со значением pH 2,2, где приведены константы, рассчитанные из кривых, представленных на рис. 2 (ацетон + 10% воды + $2 \cdot 10^{-2}$ M щавелевая кислота). За скоростью феофитинизации бактериохлорофилла следили в присутствии щавелевой кислоты, так как соляная кислота наряду с феофитинизацией вызывала необратимое разрушение пигмента. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что константы скорости наиболее быстро феофитинизирующегося бактериовиридина и самого устойчивого хлорофилла *b* отличались на два порядка. Соотношения между константами скоростей реакций исследованных пигментов при различных значениях pH изменялись, однако установленная последовательность пигментов по их скорости феофитинизации при этом сохранялась. Отсутствие данных в некоторых графах таблицы означает, что константы при указанных значениях pH не рассчитывали, так как реакция протекала слишком быстро, либо потому, что за 60—80 мин., в течение которых следили за реакцией, феофитин практически не образовывался.

Каким же образом можно связать наблюдаемые различия в скорости феофитинизации со строением молекулы хлорофилла и его аналогов? Строение молекулы наиболее быстро феофитинизирующегося бактериовиридина, к сожалению, окончательно еще не известно. Прежде считали, что молекула бактериовиридина отличается от хлорофилла *a* лишь наличием ацетильной группы вместо винильной в первом пиррольном ядре [19]. В работах Холта [20] было высказано мнение об отсутствии в молекуле бактериовиридина циклопентанонового кольца; позднее [21] он пришел к заключению об изменении структуры циклопентанонового кольца, а именно отсутствии при C_{10} карбометоксильной группы. Очевидно, именно это обстоятельство и определяет легкую

атакуемость магния ионами водорода в молекуле данного пигмента. Есть все основания считать, что установленное в работах Холта [20] наличие в молекуле бактериовиридина фарнезола вместо фитола не влияет заметно на прочность связи магния. Полученные нами безфитольные формы (хлорофиллиды *a* и *b*) не отличались по скорости феофитинизации в ацетоне от исходных хлорофиллов. Это согласуется с данными Шандерля и др. [22] о том, что хлорофиллиды очень мало отличаются по скорости феофитинизации от хлорофиллов. Константы скорости феофитинизации хлорофиллидов превышали константы скорости соответствующих хлорофиллов не более чем в полтора раза. В этой же работе имеется указание на то, что эстерификация хлорофиллида пропионовой кислоты в 7-ом положении очень мало влияла на скорость, с которой ион магния в центре порфиринового кольца замещался на два иона водорода.

Анализируя ряд исследуемых пигментов по убывающей скорости феофитинизации (бактериовиридин, хлорофилл *a*, протохлорофилл, бактериохлорофилл, хлорофилл *b*), можно отметить, во-первых, отсутствие прямой зависимости скорости феофитинизации от степени восстановления «полуизолированных» двойных связей в молекуле пигмента и, во-вторых, тот факт, что наличие электроотрицательных заместителей в пиррольных ядрах (альдегидная группа во втором пиррольном ядре у хлорофилла *b* и ацетильная группа в первом пиррольном ядре бактериохлорофилла) затрудняет реакцию обмена магния на ионы водорода. Наличие подобной замены в первом пиррольном ядре бактериовиридина, очевидно, нивелируется вследствие отсутствия при C_{10} карбометоксильной группы.

Действие света на реакцию феофитинизации. Мы исследовали действие света на феофитинизацию хлорофилла и его аналогов в водном пиридине (10% воды) в присутствии соляной или щавелевой кислоты, т. е. в системе, где ранее не удавалось обнаружить образование устойчивых продуктов фотовосстановления. О скорости феофитинизации судили на основании изучения времени «полупревращения», необходимого для прохождения реакции наполовину. Результаты этой серии опытов приведены в табл. 2. Из данных первой графы, характеризую-

Таблица 2

Время полупревращения пигментов в феофитины (растворитель—пиридин)

Пигмент	Щавелевая кислота, $2 \cdot 10^{-2}$ *M*+10% H_2O		10% H_2O+ +1% HCl
	темнота	свет	свет
Бактериовиридин	~25 мин.	~25 мин.	
Хлорофилл *a*	~ 3 час.	<10 »	20 мин.
Протохлорофилл	~10 »	<10 »	10 »
Бактериохлорофилл	~16 »	~16 час.	
Хлорофилл *b*	~24 »	<10 мин.	10—20 »

щих скорость феофитинизации в темноте, следует, что в пиридине для пигментов сохраняется та же последовательность скорости реакции, которая была установлена нами в водно-спиртовых и водно-ацетоновых растворах. Следует отметить, что темновая реакция в пиридине протекала гораздо медленнее, чем в ацетоне. Скорость феофитинизации бактериовиридина и бактериохлорофилла при освещении была такой же, как в темноте. Ускоряющее действие света наблюдали в случае хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и протохлорофилла, причем различия в скорости темновой феофитинизации пигментов, особенно резко выра-

женные у хлорофиллов *a* и *b*, нивелировались при «фотофеофитинизации». Есть основания полагать, что механизм фотофеофитинизации пигментов в водно-пиридиновом растворе отличается от механизма темновой феофитинизации. В пиридине в силу большого сродства молекул растворителя к протону, очевидно, существует конкуренция за заряд между молекулами пигмента и молекулами растворителя, вследствие чего феофинитизация в темноте идет крайне медленно.

Мы предположили, что фотофеофитинизация проходит через стадию образования лабильных фотовосстановленных форм хлорофилла. При этом роль доноров электрона могли играть щавелевая кислота и пиридин. Можно себе представить, что возбужденная молекула пигмента, приняв электрон, приобретает несравненно большее сродство к протону. Если донором электрона в системе служит аскорбиновая кислота, то вслед за принятием электрона происходит образование протонизированных восстановленных форм, стабилизирующихся в комплексе аскорбиновая кислота — пиридин — пигмент. Если донорами служат пиридин или щавелевая кислота, то такой стабилизации, видимо, не происходит, хлорофилл приобретает прежний уровень восстановленности, отдавая принятый им электрон, а вошедшие в молекулу хлорофилла протоны, вначале, очевидно, связанные с пиррольными атомами азота, обладающими «вакантными» парами электронов, после перераспределения связей замещают атом магния в кольце.

Что касается бактериохлорофилла и бактериовиридина, феофитинизация которых в пиридине не ускоряется под действием света, то можно предположить, что ни пиридин, ни щавелевая кислота не являются для них подходящими донорами электронов. Иначе говоря, сродство к электрону возбужденных молекул бактериальных пигментов, вероятно, меньше, чем пигментов зеленых растений. Это согласуется с данными, полученными в нашей лаборатории о различиях в фотосенсибилизации хлорофилла и бактериохлорофилла [23] и фотосенсибилизированными превращениями пигментных пар [24]. В соответствии с предполагаемым механизмом фотофеофитинизации можно думать, что последняя является критерием промежуточного обратимого фотовосстановления пигментов в изучаемой системе.

Следует отметить, что в наших опытах освещение водно-ацетоновых и водно-спиртовых растворов пигментов в вакууме не ускоряло феофитинизацию по сравнению с реакцией, идущей в темноте. Исключение составлял протохлорофилл, который, по предварительным данным, в водно-спиртовых растворах при освещении феофитинизировался скорее, чем в темноте. За ходом реакции в данном случае следили по снижению максимума поглощения при 625 *ммк*. В синей части спектра при освещении наблюдали, помимо спектральных изменений, связанных с феофитинизацией, общее уменьшение поглощения, т. е. не отмечалось постоянства изобестической точки исследуемого процесса. Возможно, и здесь мы имели дело не с прямым ускорением «темновой» реакции феофитинизации, а наблюдали образование феофитина из каких-то очень лабильных фотопродуктов другой реакции, возможно, фотовосстановления. Этот вопрос требует дальнейшего исследования.

Действие на фотофеофитинизацию соединений, ингибирующих реакцию фотовосстановления. Если при освещении раствора хлорофилла в водном пиридине в присутствии соляной или щавелевой кислоты феофитин образуется из лабильных продуктов фотовосстановления, то следовало ожидать, что вещества, тормозящие фотовосстановление, будут ингибировать исследуемую реакцию. К числу таких соединений относятся полиены (β-каротин), полициклические соединения (тетрацен) и реагирующие с фотовосстановленными формами пигмента акцепторы электронов (например, метиловый красный, сафранин, рибофлавин).

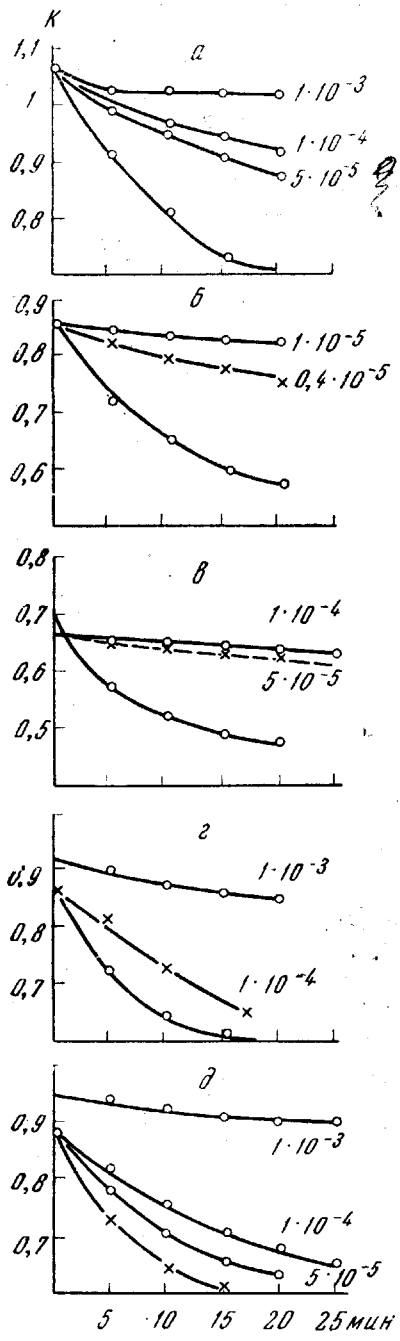


Рис. 4. Влияние на фотофеофитинизацию ингибиторов фотовосстановления

а — метиловый красный; *б* — β-каротин; *в* — нафтацен; *г* — рибофлавин; *д* — сафранин. Показано изменение *K* в красном максимуме поглощения пиридинового раствора хлорофиллов *a*+*b* по мере фотофеофитинизации. Числа на кривых показывают концентрацию ингибиторов в *M*. Кривые без числовых обозначений — фотофеофитинизация без ингибитора

Было исследовано действие указанных соединений в концентрации от $5 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ *M* на реакцию фотофеофитинизации хлорофиллов *a*, *b* и протохлорофилла, протекающую под действием красного света. Каротин практически полностью ингибировал фотофеофитинизацию в концентрации 10^{-5} *M*; несколько менее эффективно действовал нафтацен, который полностью угнетал фотофеофитинизацию в концентрации 10^{-4} *M*. Метиловый красный, сафранин и рибофлавин заметно замедляли фотофеофитинизацию в концентрации 10^{-4} *M* и полностью угнетали реакцию в концентрации 10^{-3} *M*. На рис. 4 приведены данные по снижению поглощения при 670 *ммк*, что отражает скорость фотофеофитинизации при освещении пиридинового раствора хлорифиллов *a*+*b* в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ *M* щавелевой кислоты и 10% воды без ингибиторов и с ингибиторами.

Одним из нас было высказано предположение, что ингибирующее действие каротина и нафтацена на фотовосстановление хлорофилла определяется обратимым восприятием электронов системой сопряженных двойных связей данных веществ [25]. Если в цепи сопряжения ингибитора есть гетероатом (азот, кислород), то при этом могут образовываться устойчивые продукты фотосенсибилизированного восстановления (необратимое сенсибилизированное восстановление метилового красного и обратимое — сафранина и рибофлавина).

При восстановлении хлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе в присутствии метилового красного наблюдается индукционный период: сначала в результате сенсибилизированной хлорофиллом реакции восстанавливается метиловый красный. При этом в области максимума поглощения красителя можно наблюдать снижение оптической плотности без изменения поглощения в максимуме хлорофилла; после того как метиловый красный восстановился, происходит восстановление хлорофилла. Сенсибилизированное хлорофиллом фотовосстановление рибофлавина и сафранина в пиридиновом растворе является обратимой реакцией, в ходе которой устанавливается определенное соотношение между восстановленным и невосстановленным красителями. В присутствии данных веществ уменьшение

оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла, характеризующее его фотовосстановление, происходит медленнее, чем в контроле. Индукционный период, который бы соответствовал полному необратимому восстановлению акцепторов электрона (как, например, в случае с метиловым красным), при этом отсутствовал.

Следует обратить внимание на то, что при ингибировании метиловым красным фотофеофитинизации (рис. 4, *а*) не наблюдается индукционного периода. Далее нами было отмечено, что ни в максимуме поглощения метилового красного, ни в максимуме поглощения сафранина при ингибировании ими фотофеофитинизации не наблюдается никаких спектральных изменений. Возможно, механизм действия этих соединений на фотовосстановление и фотофеофитинизацию является различным; в случае ингибирования ими фотофеофитинизации не образуется относительно устойчивых продуктов фотосенсибилизированного восстановления, а ингибирующее действие этих соединений определяется лишь обратимым восприятием электрона согласно схеме:

$$X^* + AH \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH^+$$
$$\cdot X^- + И \rightarrow X + \cdot И^-$$
$$\cdot И^- + \cdot AH^+ \rightarrow И + AH$$

где X — хлорофилл, AH — восстановитель, И — ингибитор.

Таким образом, ингибитор, обратимо воспринимающий электрон, приводит систему в исходное положение и стационарная концентрация восстановленной формы пигмента (в которой магний замещается водородом легче, чем в исходном пигменте) снижается до предела, определяемого скоростями составляющих цикл реакций и концентрацией ингибитора — акцептора электрона.

ВЫВОДЫ

Сравнительное изучение феофитинизации хлорофилла и его аналогов в растворах показало, что по скорости реакции исследуемые пигменты могут быть расположены в следующем убывающем ряду: бактериовиридин; хлорофилл *а*, протохлорофилл и бактериохлорофилл, хлорофилл *b*. Скорость исследуемой реакции не связана со степенью восстановленности «полуизолированных» двойных связей молекулы пигмента, и бо́льшее влияние оказывают электроотрицательные заместители в пиррольных ядрах молекулы. Факт крайне быстрой феофитинизации бактериовиридина, в молекуле которого, по имеющимся данным, видоизменено циклопентаноновое кольцо и отсутствует карбометоксильная группа в положении C_{10}, свидетельствует о стабилизирующем действии этого радикала на связь магния в молекуле пигмента.

Путем сравнения скорости феофитинизации хлорофиллов *а* и *b* и полученных из них хлорофиллидов было показано, что наличие или отсутствие фитола не влияет существенно на прочность связи магния.

В водно-пиридиновых растворах хлорофиллов *а*, *b* и протохлорофилла освещение ускоряло феофитинизацию. Высказывается предположение, что «фотофеофитинизация» идет по механизму, отличному от «темновой» феофитинизации. Названные пигменты феофитинизируются при освещении с одинаковой скоростью, тогда как скорость их феофитинизации в темноте различна. Соединения, ингибирующие фотовосстановление хлорофилла (каротин, нафтацен, метиловый красный, сафранин, рибофлавин) ингибируют и фотофеофитинизацию. Есть основания полагать, что фотофеофитинизация связана с промежуточным фотовосстановлением хлорофилла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Willstätler R., Stoll A., Assimilation der Kohlensäure. Julius Springer, Berlin, 1919
2. Joslyn M. A., Mackinney G., J. Amer. Chem. Soc. **60**, 1132, 1938
3. Joslyn M. A., Mackinney G., J. Amer. Chem. Soc. **62**, 230, 1940
4. Mackinney G., Joslyn M. A., J. Amer. Chem. Soc. **63**, 2530, 1941
5. Lamort C., Rev. ferment et inds. aliment **11**, 34, 1956
6. Рабинович Е., Фотосинтез, т. 1, стр. 498. ИЛ, 1951
7. Aronoff S., Mackinney G., J. Amer. Chem. Soc. **65**, 956, 1943
8. Красновский А. А., Докл. АН СССР **60**, 421, 1948
9. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **91**, 899, 1953
10. Bannister T. T., Plant Physiol. **34**, 246, 1959
11. Bannister T. T., в кн.: Photochemistry of Liquid and Solid State, N. Y.— L., 1960
12. Greenblatt C. L., Schiff J. A., J. Protozool. **6**, 23, 1959
13. Clayton R. K., Biochim. et biophys. acta **75**, 312, 1963
14. Kihara T., Frenkel W., в кн.: Bacterial Photosynthesis, стр. 115. The Antioch. Press Yellow Spring Ohio, 1963
15. Красновский А. А. и Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **148**, 935, 1963
16. Zscheile F. R., Comar C. L., Bot. Gaz. **102**, 463, 1941
17. Holden M., Biochem. J. **78**, 359, 1961
18. Weast C. A., Mackinney G., J. Biol. Chem. **133**, 551, 1940
19. Fischer H., Stern A., Die Chemie des Pyrrois, т. 2, стр. 311. Akad. Verlag, Leipzig, 1940
20. Holt A. S., Morley H. V., J. Amer. Chem. Soc. **82**, 500, 1960
21. Holt A. S., Hughes D. W., Kende H. J., Purdie J. W., Plant Cell Physiol. **4**, 49, 1963
22. Schanderl S. H., Chichester C. O., March G. L., J. Organ. Chem. **27**, 3865, 1962
23. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР **81**, 879, 1951
24. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **141**, 477, 1961
25. Красновский А. А. и Дроздова Н. Н., Биохимия **26**, 859, 1961

Поступила в редакцию
14.V 1964

THE STUDY OF PHEOPHYTINIZATION OF CHLOROPHYLL, BACTERIOCHLOROPHYLL, BACTERIOVIRIDINE, PROTOCHLOROPHYLL AND THE EFFECT OF LIGHT UPON THIS REACTION

E. V. PAKSHINA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Comparative study of pheophytinization of chlorophyll and its analogs in solutions has shown that as regards the reaction rate, the investigated pigments may be arranged in the following decreasing order: bacterioviridine, chlorophyll *a*, protochlorophyll, bacteriochlorophyll, chlorophyll *b*.

The study of the connection of the rate of pheophytinization with the structure of the pigment has shown that the rate of the reaction under study is not connected with the degree of reduction of «semi-isolated» double bonds in the pigment molecule and that a significant influence is effected by the presence of electronegative substituents in phytol bears no substantial effect upon the strength of magnesium bond.

The fact of extremely rapid pheophytinization of bacterioviridin, in the molecule of which, according to the data available, the cyclopentane ring is modified and the carbometoxy group in C_{10} position is absent, testifies to the stabilizing effect of this radical upon the magnesium bound in the pigment molecule.

By comparing the rate of pheophytinization of chlorophylls *a* and *b* and that of the chlorophyllides obtained from them it has been shown that the presence of absence of phytol bears no substantial effect upon the strength of magnesium bond.

In aqueous-pyridine solutions of chlorophylls *a*, *b* and protochlorophyll exposure to light accelerated pheophytinization. A hypothesis is suggested that the «photopheophytinization» mechanism differs from that of «dark» pheophytinization. The above-mentioned pigments are pheophytinized when exposed to light at equal rates, while their rates of pheophytinization in the dark are different. Compounds, inhibiting photoreduction of chlorophyll (carotin, naphtacene, methylene red, saphranine, riboflavin) inhibit photopheophytinization as well. There are reasons to believe photopheophytinization to be connected with the intermediate photoreduction of chlorophyll.

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 159, № 1

БИОФИЗИКА

Г. Т. РИХИРЕВА, З. П. ГРИБОВА, Л. П. КАЮШИН, А. В. УМРИХИНА,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

НАБЛЮДЕНИЕ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА

После удачной попытки наблюдать триплетные состояния порфиринов [1] представляло интерес выяснить возможность изучения в аналогичных условиях триплетного состояния хлорофилла и его участия в фотосенсибилизированных реакциях переноса электрона.

Исследовали замороженные (77° К) 10^{-4} — 10^{-3} M растворы хроматографически чистых препаратов хлорофилла a + b, a, b в этиловом спирте (использовали дважды перегнанный спирт). Растворы пигментов помещали в тонкостенные кварцевые трубки и подвергали продолжительной вакуумной тренировке при многократном чередовании замораживания и размораживания растворов.

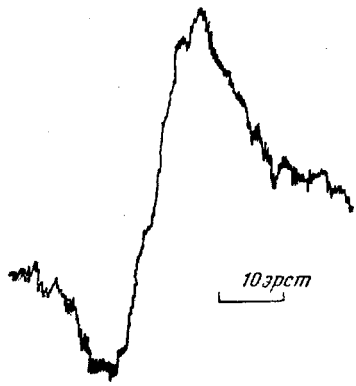


Рис. I. Спектр э.п.р. (поле ~ 1600 эрст) триплетного состояния хлорофилла b 10^{-3} M в спирте (77° К) при освещении красным светом

Измерение спектров электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.) производили на 3-сантиметровом радиоспектрометре (с отражательной схемой) с высокочастотной модуляцией. Ампулы с растворами освещали непосредственно в резонаторе сфокусированным светом ртутно-кварцевой лампы ДРШ-1000 со светофильтром БС-8, пропускающим свет с длинами волн больше 370 мμ, или ксеноновой лампы ДКсШ-1000 со светофильтром КС-10, пропускающим свет с длинами волн более 580 мμ. В качестве теплового фильтра применяли кварцевую кювету со слоем воды в 6 см. При исследовании зависимости выхода свободных радикалов от интенсивности возбуждающего света как нейтральные фильтры использовали металлические сетки с разным пропусканием света.

При освещении спиртовых растворов хлорофилла a + b, b (10^{-4}—10^{-3} M) всей видимой областью спектра излучения источников (фильтр БС-8) или только красным светом (фильтр КС-10) удалось проследить образование триплетного состояния хлорофилла. Триплетное э.п.р.-поглощение было зарегистрировано в поле~1600 эрст и представляло собой синглетную линию с полушириной 14 эрст (рис. 1) Триплетный сигнал э.п.р. мгновенно исчезал при выключении света. В аналогичных условиях (концентрации, растворителя, условий освещения и т. п.) в растворах хлорофилла a триплетного э.п.р.-поглощения не наблюдали. По-видимому, регистрируемое в растворах хлорофила a + b триплетное э.п.р.-поглощение обязано только хлорофиллу b. В очень концентрированных растворах хлорофилла b, a + b ($5 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-2}$ M) имело место падение амплитуды сигнала э.п.р., что связано, повидимому, с концентрационным тушением триплетных состояний. Пуск воздуха (в размороженную ампулу) практически не влиял на амплитуду триплетного сигнала, измеренного после вторичного замораживания образца. Наблюдение образования триплетного состояния хлорофилла соответ-

ствует известному факту наличия фосфоресценции хлорофилла b в замороженном растворе ЭПА ([2]).

При измерении спектров э.п.р. в поле~3300 эрст обнаружено, что после 10—30 сек освещения растворов хлорофилла a, b, a + b полным спектром ртутной лампы (только с водяным фильтром) появляется синглетная полоса э.п.р.-поглощения с g-фактором, близким по значению к g-фактору свободного электрона. Сигнал сохранялся длительное время после выключения света и исчезал после размораживания образца до комнатной температуры. При последующих экспозициях (1—5 мин) появляются многокомпонентные сигналы, подобные описанным и идентифицированным в литературе как сигналы свободнорадикальных продуктов превращения спирта ([1-4]).

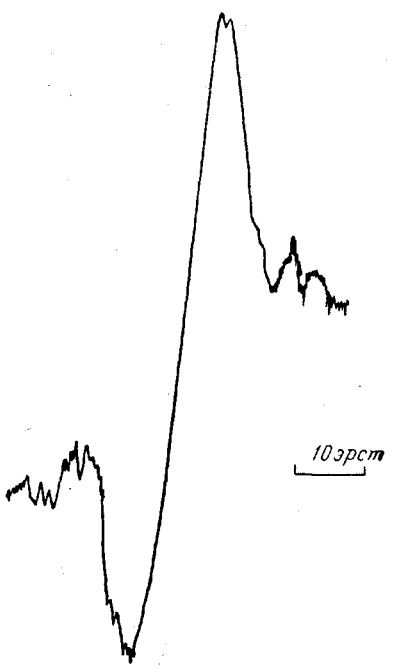


Рис. 2. Спектр э.п.р. (поле~3300 эрст) свободного радикала пигмента в 10^{-3} M растворе хлорофилла b в спирте (77°K) при освещении красным светом

Для всех растворов (хлорофилл a, b, a + b) получена близкая к квадратичной зависимость выхода свободных радикалов от интенсивности света.

В 10^{-3} M растворах хлорофилла b фотоиндуцированное образование синглетной линии (рис. 2) происходило также при возбуждении видимой областью света (фильтр БС-8) или только красным светом (фильтр КС-10).

О происхождении синглетного сигнала можно высказать следующие соображения. Маловероятно, чтобы сигнал э.п.р., не имеющий сверхтонкой структуры, принадлежал молекуле спирта. Более вероятно, что это свободнорадикальные формы пигмента, образующиеся либо при фотоокислении пигмента (при фотохимическом взаимодействии возбужденного хлорофилла с остающимся в системе кислородом), либо при восстановлении пигмента.

Образование при фотовосстановлении хлорофилла и его аналогов — радикалов пигмента и донора водорода было показано ранее ([5,6]).

Институт биологической физики
Академии наук СССР

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

Поступило
14 VII 1964

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] З. П. Грибова, Р. П. Евстигнеева и др., Биофизика, 8, в. 5, 550 (1963). [2] R. S. Becker, M. Kasha, J. Am. Chem. Soc., 77, 3669 (1955). [3] В. Е. Холмогоров, Э. В. Баранов, А. Н. Теренин, ДАН, **149**, 142 (1963). [4] А. К. Пискунов, В. Е. Холмогоров и др., ДАН, **154**, 910 (1964). [5] Н. Н. Бубнов, А. А. Красновский и др., Биофизика, **5**, в. 2, 121 (1960). [6] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, Биофизика, **3**, в. 5, 547 (1958).

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ЗЕЛЕНЫХ БАКТЕРИЙ

Г. Т. РИХИРЕВА, Л. П. КАЮШИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биологической физики АН СССР, Москва
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Использование метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в исследованиях фотосинтетических систем уже позволило получить ряд экспериментальных данных, существенных для выяснения механизма первичных процессов фотосинтеза [1; 2]. Особый интерес представляют исследования ЭПР в сравнительном аспекте у высших растений и фотосинтезирующих бактерий. Значение такого рода исследований обусловлено тем, что в настоящее время существует точка зрения об участии в первичных процессах фотосинтеза высших растений двух фотохимических реакций и только одной в бактериальном фотосинтезе.

С этими представлениями, по-видимому, можно связать некоторую специфичность ЭПР, наблюдаемую в клетках бактерий и высших растений. Так, в листьях растений и в зеленых водорослях обнаружены два типа фотоиндуцированных сигналов ЭПР, у одного из которых частично разрешена сверхтонкая структура [1; 3]. В пурпурных бактериях до сих пор удалось наблюдать только одну неструктурированную полосу [4]. Калвин обнаружил различие в характере затухания фотоиндуцированных сигналов ЭПР при низкой температуре, а также в зависимости от присутствия воды в фрагментах хлоропластов и хроматофорах пурпурных бактерий [5].

Нам представлялось интересным исследовать другую группу фотосинтезирующих бактерий — зеленые бактерии (Chloropseudomonas ethylicum), содержащие бактериальный пигмент бактериовиридин, который более близок по спектральным свойствам к хлорофиллу *a*, чем бактериохлорофилл пурпурных бактерий. Исследования спектральных свойств бактериовиридина в клетках бактерий и твердых пленках пигмента показали наличие различных форм пигмента с максимумами поглощения при 680, 740—750 и 800 *ммк* [6].

В задачу нашего исследования входило установить, существуют ли парамагнитные продукты в неосвещенной и освещенной культурах зеленых бактерий и исследовать влияние ряда факторов (присутствие воздуха, действие предварительного нагревания и добавления растворителя) на интенсивность фотоиндуцированных сигналов ЭПР.

Измерение спектров ЭПР проводили при помощи 3-сантиметрового ЭПР-спектрометра с высокочастотной модуляцией (465 *кгц*). В резонаторе имелось отверстие для освещения образцов во время измерения. В качестве источника света использовали лампу накаливания (340 *вт*, 24 *в*). Свет фокусировали на входное отверстие резонатора системой из двух линз. На пути луча устанавливали водный тепловой фильтр с проточной дистиллированной водой (толщина 6 *см*). В ряде случаев спектральную область возбуждения выделяли при помощи светофильтра КС-10 ($\lambda > 580$ *ммк*). Измерения проводили при комнатной температуре и при —196°. Для низкотемпературных измерений в полость резонатора помещали тонкостенный кварцевый сосуд Дьюара с жидким азотом. Перед измерением бактериальные клетки отмывали (троекратно) от культуральной среды водопроводной водой. Концентрирование клеток проводили центрифугированием (по 10 мин. при 8000 *g*). Исследуемую суспензию клеток помещали в тонкостенные кварцевые трубки диаметром 2,5—3,5 *мм*. Спектры ЭПР влажных образцов измеряли при температуре жидкого азота. Для измерений при комнатной температуре бактериальные клетки высушивали путем эвакуирования на форвакуумном насосе при комнатной температуре в течение 1,5—2 час. (Суспензия высыхала в виде плотной пленки на стенках трубки.) Измерения проводили в присутствии воздуха или в вакуумированных (10^{-2} *мм рт. ст.*) запаянных трубках.

При исследовании влажных бактериальных клеток (в открытых трубках при температуре жидкого азота) в темноте был обнаружен синглетный сигнал со значением *g*-фактора, близким к значению *g*-фактора свободного электрона и полушириной ~12 *э*. При освещении образца полным излучением источника наблюдали увеличение амплитуды сигнала ЭПР (при отсутствии насыщения сигнала ЭПР в зависимости от мощности излучения клистрона) приблизительно в два раза (рис. 1).

Аналогичную синглетную полосу удалось наблюдать в спектрах ЭПР высушенных клеток, измеренных при комнатной температуре. При освещении таких образцов красным светом амплитуда сигнала увеличивалась примерно в четыре раза (рис. 2).

Было исследовано изменение амплитуды сигнала ЭПР при включении света (с фильтром КС-10) и после выключения в сухих образцах при комнатной температуре (рис. 3). Сразу же после включения света интенсивность сигнала ЭПР быстро увеличивалась, достигая к 12—15 сек. состояния насыщения. Затухание сигнала после выключения света происходило с гораздо меньшей скоростью (время полузатухания ~20—30 сек).

По достижении светового насыщения амплитуды на кинетической кривой в области плато (насыщения) намечаются изменения (седловидная форма плато) величины

сигнала ЭПР с минимумом через 1 мин. после включения света. Эти изменения воспроизводятся при повторных измерениях. Общий вид кинетических кривых для зеленых бактерий несколько отличается от вида кривых, полученных при измерении пурпурных бактерий в аналогичных условиях [5].

При выяснении вопроса о влиянии воздуха на поведение фотоиндуцированного сигнала в высушенных образцах было обнаружено, что амплитуда сигнала ЭПР в значительной степени зависит от присутствия воздуха. В ряде случаев в вакуумированных ампулах вообще не удавалось наблюдать ЭПР-поглощения ни в темноте, ни при освещении. Пока не ясно, чем вызывается этот эффект — отсутствием O_2 или паров H_2O. Выяснение этого вопроса представляет интерес в связи с тем, что имеются данные о необходимости присутствия кислорода и воды для возникновения или увеличения фотоиндуцированного сигнала ЭПР в чистых твердых препаратах хлорофилла [7; 8], высушенных ацетоновых экстрактах из хлоропластов шпината [4] и в самих хлоропластах [9].



Рис. 1. Спектр ЭПР клеток Chloropseudomonas ethylicum при —196°

1 — измерения на рассеянном свету; *2* — измерения при освещении конденсированным светом лампы накаливания

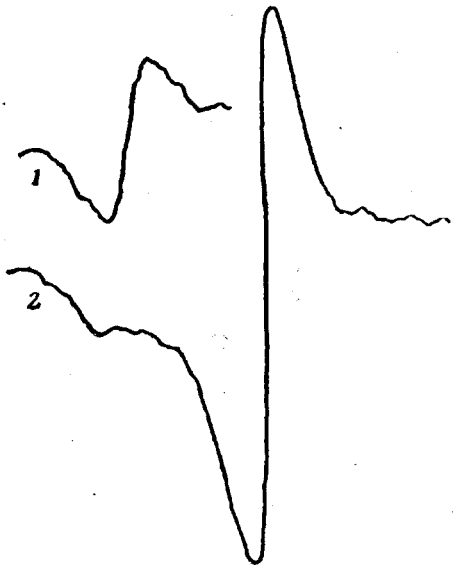


Рис. 2. Спектры ЭПР зеленых бактерий при комнатной температуре

1 — измерения на рассеянном свету; *2* — измерения при освещении красным светом (КС-10); полуширина сигнала ~12 э

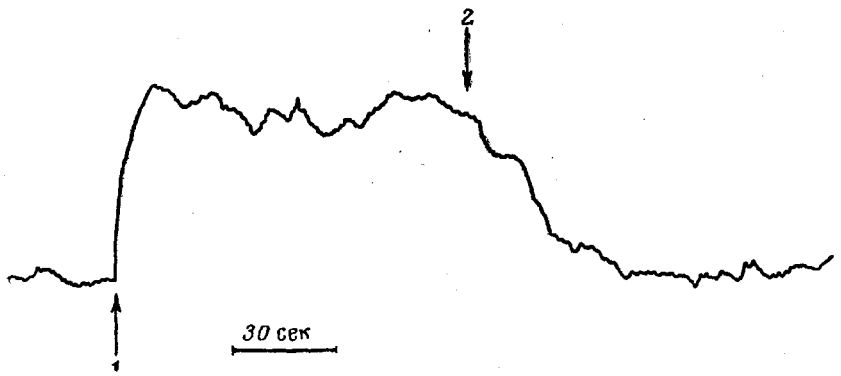


Рис. 3. Изменение амплитуды сигнала ЭПР во времени в сухих клетках бактерий при +20° С

1 — включение света (фильтр КС-10); *2* — выключение света

При исследовании влияния факторов, нарушающих естественное состояние клетки, было обнаружено (рис. 4), что интенсивность фотоиндуцированных сигналов ЭПР (в открытых трубках) увеличивается после предварительного нагревания образцов (5 мин. при 100°) или обработки их пиридином (20% по отношению к объему концентрированной суспензии). Более детальное исследование влияния тепловой обработки клеток (клетки выдерживали на водяной бане по 10 мин.) на интенсивность фотоиндуцированных сигналов показало, что кривая зависимости концентрации радикалов от температуры предварительной обработки бактерий имеет хорошо выраженный максимум в области 60—70° С.

Естественно предположить, что эффекты увеличения концентрации фотоиндуцированных радикалов после нагревания клеток и добавления пиридина обусловлены изменением состояния пигментов in vivo (дезагрегацией, денатурацией белковой части пигмент-белкового комплекса), вследствие чего увеличивается доступность молекул самого пигмента по отношению к фотоокислению, которое может быть ответственно за увеличение сигнала ЭПР. Другое возможное объяснение увеличения сигнала в этих случаях может быть связано с предположением, что нагревание или добавление растворителя нарушает функционирование последующих звеньев системы передачи элек-

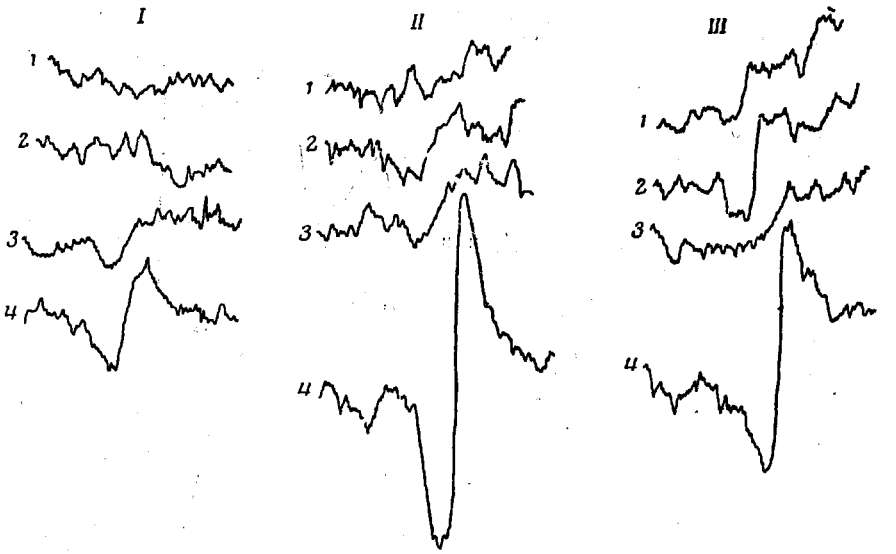


Рис. 4 Влияние предварительной обработки клеток на спектры ЭПР сухих бактерий

I — контрольные клетки; *II* — клетки, к которым перед высушиванием добавляли 20% (от объема суспензии) пиридина; *III* — клетки, которые перед высушиванием нагревали на водяной бане в течение 5 мин. при 100°; *1* — перед освещением (давление в ампуле 10^{-2} *мм рт. ст.*); *2* — на свету (давление в ампуле 10^{-2} *мм рт. ст.*); *3* — в темноте (на воздухе); *4* — на свету (на воздухе)

трона, разобщая эти звенья от первичных парамагнитных продуктов. Это также может приводить к увеличению наблюдаемых стационарных концентраций первичных парамагнитных продуктов.

* * *

Авторы приносят благодарность Ю. С. Малинину и Л. М. Калининой за помощь в проведении эксперимента, а также Е. Н. Кондратьевой (кафедра микробиологии МГУ) за предоставление культуры бактерий.

Поступила в редакцию
3.IV.1963

ЛИТЕРАТУРА

1. Commoner B., Sympos. «Light and Life», Baltimore, 1960. Baltimore, John Hopkins Press, 356, 1961
2. Calvin M., Androes G. M., Science **138**, N 3543, 867, 1962
3. Аллен М. (Allen M.), Тр. V Междунар. биохим. конгр., симпоз. VI, М., 1962
4. Androes G. M., Calvin M., Biophys. J. **2**, N 2. Part 2, 217, 1962
5. Calvin M., Sympos. «Light and Life», Baltimore, 1960. Baltimore, John Hopkins Press, 1961
6. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Федорович И. Б., Докл. АН СССР **134**, 1232, 1960
7. Холмогоров В. Е., Сидоров А. Н., Теренин А. Н., Докл. АН СССР **147**, 954, 1962
8. Умрихина А. В., Голубев И. Н., Биофизика **9**, № 4, 1964
9. Storey W. H., Monita C. M., Cadena D. G., Nature **195**, N 4845, 963—965, 1962

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 156, № 6

БИОФИЗИКА

Г. Т. РИХИРЕВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Л. П. КАЮШИН

СВЯЗЬ МЕЖДУ СОСТОЯНИЕМ ХЛОРОФИЛЛА И СПЕКТРАМИ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ

Исследование образования первичных парамагнитных продуктов фотосинтеза методом электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.) представляет интерес для выяснения вопроса об участии отдельных компонентов пигментной системы в различных фотохимических реакциях фотосинтеза. Изучение спектров э.п.р. фотосинтезирующих организмов в связи с изменением состояния пигментов может привести к получению данных о функциональном значении отдельных пигментов или форм пигмента в процессе образования первичных продуктов фотосинтеза. Исследования такого рода тесно связаны со сравнительным изучением э.п.р. мутантов или фотосинтезирующих организмов разных систематических групп с различающимся набором компонентов пигментных систем. В этом направлении уже получены данные по специфичности спектров э.п.р., не содержащих хлорофилла b мутантов Chlorella и ряда других водорослей ([1]), а также по спектрам э.п.р. бескаротиноидных мутанто-Rhodopseudomonas spheroides ([2, 3]).

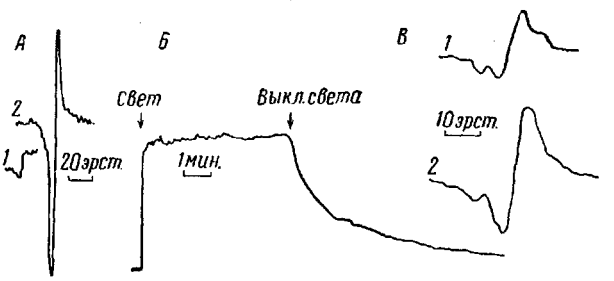


Рис. 1. Спектры э.п.р. листьев фасоли. *А* — спектры при комнатной температуре; *Б* — изменение амплитуды сигнала (+20°) при включении и выключении света; *В* — спектры при —196°. *1* — в темноте, *2* — на свету

В настоящей работе описаны два типа экспериментов: исследование спектров э.п.р. в процессе образования хлорофилла и формирования фотосинтетического аппарата в зеленеющих листьях и измерение спектров э.п.р. зеленых листьев при воздействиях (нагревание, добавление растворителя), нарушающих нативное состояние пигментов (дезагрегация хлорофилла, изменение состояния пигмент-белкового комплекса). В ряде экспериментов было проведено измерение люминесценции исследуемых образцов. Кроме того, данные по спектрам э.п.р. сопоставляли с данными измерений спектров люминесценции, проведенных в наших предыдущих работах ([4]).

Измерения спектров э.п.р. производили на 3 см ЭПР-спектрометре. Образцы во время измерения освещали в резонаторе сфокусированным светом лампы накаливания (340 вт, 24 в). В большинстве опытов спектральную область возбуждения выделяли с помощью светофильтра КС-10 ($\lambda > 580$ мμ). Измерения проводили в присутствии воздуха или в вакууме (10^{-2} мм рт. ст.). Э.п.р. «влажных» (невысушенных) листьев измеряли при —196°. Для измерений при комнатной температуре листья высушивали в вакууме при комнатной температуре. Объектом исследования служили листья 14—20-дневных проростков этиолированных и зеленых растений фасоли и кукурузы.

При измерении спектров э.п.р. «влажных» листьев (в открытых труб-

ках при — 196°) в темноте был обнаружен сигнал со сверхтонкой структурой, аналогичной той, которую наблюдал Коммонер при комнатной температуре в препаратах хлоропластов ([5]). При освещении сигнал увеличивался (рис. 1*В*), несколько изменялась его структура, и в таком виде он длительное время сохранялся после выключения света. Разность двух сигналов (свет — темнота) представляла собой синглет.

При измерении спектров высушенных листьев нам не удалось наблюдать сверхтонкой структуры сигналов э.п.р. В ряде случаев эвакуированные препараты вообще не давали сигнала в темноте. При освещении появлялся синглетный сигнал, который обратимо исчезал через 1,5—3 мин. после выключения света. Пуск воздуха в эти образцы иногда способствовал появлению небольшого темнового сигнала. При последующем освещении амплитуда появляющегося светового сигнала всегда была больше амплитуды сигнала, возникавшего под действием света в отсутствие воздуха. В открытой ампуле скорость затухания фотоиндуцированного сигнала была меньше, чем в вакууме. Аналогичное влияние воздуха на фотоиндуцированные сигналы э.п.р. ранее наблюдали при комнатной температуре в препаратах влажных хлоропластов шпината ([6]). Следует также указать на имеющиеся данные о влиянии кислорода и воды на появление сигнала э. п. р. в препаратах твердого хлорофилла, которое было обнаружено в лаборатории А. Н. Теренина ([7]).

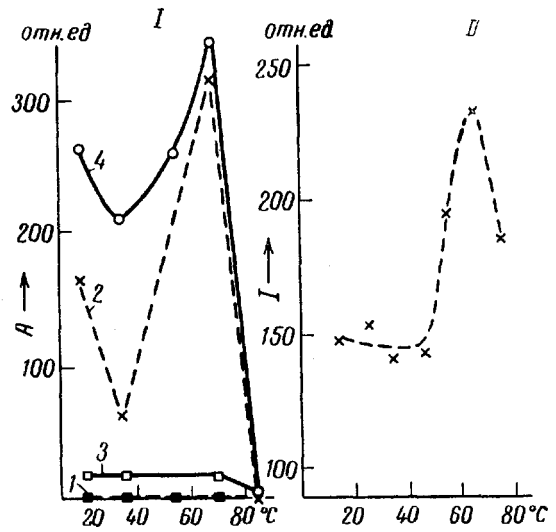


Рис. 2. *I* — зависимость амплитуды (*A*) сигнала э.п.р. от температуры предварительного нагревания листьев кукурузы (измерения при +20°): *1* — темновой сигнал в закрытой ампуле (10^{-2} мм рт. ст.), *2* — световой сигнал в закрытой ампуле (10^{-2} мм рт. ст.), *3* — темновой сигнал на воздухе, *4* — световой сигнал на воздухе; *II* — зависимость от температуры интенсивности (*I*) фотолюминесценции зеленеющих (4,5 часа) листьев фасоли в максимуме 685 мμ

Анализ зависимости увеличения амплитуды сигнала на свету и уменьшения в темноте показал, что в сухих листьях увеличение сигнала на свету происходит очень быстро (время достижения половины максимальной амплитуды < 2 сек.). Уменьшение сигнала после выключения света происходит с меньшей скоростью (время «полузатухания» ~ 1 мин.). Интересно отметить, что в первые две минуты после выключения света кривая затухания приближенно описывается уравнением второго порядка, а начиная со второй минуты имеет экспоненциальный характер (рис. 1 *Б*).

В спектрах частично инфильтрированных пиридином листьев, которые затем были высушены, в темноте наблюдался небольшой сигнал э.п.р., который мало изменялся под действием света. В одном из опытов в спектрах эвакуированных образцов обработанных листьев на фоне обычного сигнала удалось наблюдать появление более узкого синглетного сигнала, который исчезал после пуска воздуха. Эти предварительные данные о влиянии пиридина, являющегося дезагрегирующим агентом ([8]), могут свидетельствовать о том, что его воздействие глубоко изменяет состояние фотосинтетического аппарата листа. Уменьшение амплитуды фотоиндуцированного сигнала э. п. р. при действии пиридина можно объяснить частичной потерей способности определенных структур обработанного листа образовывать первичные продукты фотосинтеза.

Следует отметить, что в зеленых бактериях после аналогичной обработки клеток пиридином мы наблюдали увеличение стационарной концентрации, образующихся при освещении парамагнитных продуктов ([9]). При детальном исследовании термоинактивации процесса образования фотопродуктов оказалось, что кривая зависимости амплитуды фотоиндуцированных сигналов от температуры предварительной обработки листьев имеет сложный характер (рис. 2*I*). В интервале температур 20—50° амплитуда сигнала относительно постоянна. В интервале 50—70° наблюдается резкое увеличение ее, а затем к 80° резкое падение (иногда до нуля). Полученная кривая весьма близка к кривой, описывающей зависимость интенсивности фотолюминесценции листьев в максимуме 685 мμ при их нагревании (рис. 2*II*).

Эти данные можно объяснить следующим образом. В области температур 20—40° происходит образование фотопродуктов и нормальное функционирование последующих звеньев фотосинтетической системы передачи электрона. При более высоких температурах, вероятно, имеет место нарушение цепи фотосинтетического переноса электрона и разобщение фотохимических звеньев и последующих энзиматических стадий, что приводит к увеличению стационарных концентраций «неиспользуемых» фотохимических продуктов. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты предварительных измерений кинетики затухания фотоиндуцированных сигналов: при 20° время полузатухания примерно в 3 раза меньше, чем в листе, нагретом до 70°. Интервал значений температуры (~ 50—70°), при которых наблюдается накопление фотопродуктов, может указывать на нарушение белково-липоидных структур фотосинтетического аппарата. Падение амплитуды сигнала при температурах больше 70° связано, по-видимому, с необратимой деструкцией хлорофиллового звена, в котором идет образование первичных фотопродуктов, возможно, вследствие дезагрегации пигмента или нарушения пигмент-белково-липоидного комплекса. Интересно отметить, что в препаратах кристаллического хлорофилла a + b также наблюдали ([10]) резкое уменьшение амплитуды фотоиндуцированного сигнала э.п.р. при температурах выше 60—70°.

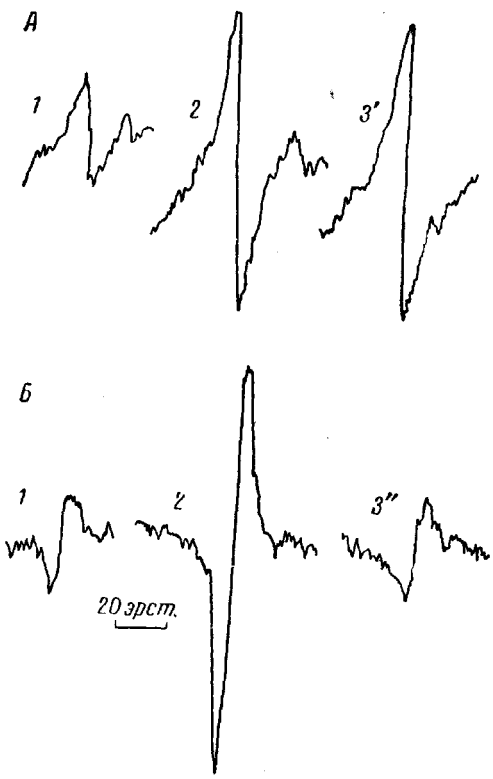


Рис. 3. Спектры э.п. р. высушенных зеленеющих листьев кукурузы (измерения при +20°). *А* — листья, экспонированные 2,5 часа; *Б* — листья, экспонированные 24 часа. *1* — в темноте, *2* — на свету, *3'* — после выключения света через 3—40 мин., *3''* — после выключения света через 3 мин.

При исследовании спектров э.п.р. высушенных этиолированных листьев кукурузы до освещения* и после 2,5; 7 и 24 час. экспонирования на свету был обнаружен темновой сигнал (g-фактор ≈ 2), который увеличи-

* Строго говоря, эти листья нельзя считать этиолированными, так как во время сушки их подвергали слабому освещению. На наличие сигнала э.п.р. у этиолированных листьев также указывал Коммонер ([11]).

вался при освещении белым светом. Возможно, что в кратковременно экспонированных листьях мы наблюдаем парамагнитные продукты, возникающие в процессе превращения протохлорофилл → хлорофилл, так как в спектрах влажных этиолированных листьев (при —196°) также имеется сигнал, но мало изменяющийся при освещении. В этиолированных и зеленевших 2,5 часа листьях фотоиндуцированные сигналы практически не затухали после выключения света (через $\geqslant$ 20 мин.), тогда как в листьях, зеленевших 7 и 24 часа, наблюдалось быстрое уменьшение амплитуды фотоиндуцированного сигнала после выключения света (время «полузатухания» $\sim$ 5 сек.) (рис. 3).

Сопоставление полученных результатов с данными о спектрах люминесценции листьев разной степени зеленения дает возможность предположить, что в описанных опытах удается разделить фотопродукты, образующиеся при участии различных форм хлорофилла. Так, в листьях, зеленеющих 2—3 часа, доминирует коротковолновая «мономерная» форма хлорофилла с максимумом поглощения при 670—672 мμ, к 24 часу зеленения накапливаются и длинноволновые агрегированные формы ([12], [4]). Одновременно идет постепенный процесс формирования ламеллярной структуры хлоропластов и энзиматического аппарата. Можно думать, что тип сигнала э.п.р. в первые часы зеленения соответствует одному типу фотореакции «коротковолнового» хлорофилла, тогда как при длительном зеленении вступает в сопряжение реакция «длинноволнового» хлорофилла, и кинетика изменения сигнала преобретает «обычный тип», характерный для зеленых листьев.

Таким образом, описанные эксперименты указывают на тесную связь между состоянием хлорофилла в листьях растений и типом сигнала э.п.р., кинетикой его появления на свету и спада в темноте.

Авторы приносят благодарность Ю. С. Малинину и Л. М. Калининой за помощь в проведении эксперимента

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

Поступило
14 III 1964

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] М. Б. Аллен, Тр. V Международн. биохим. конгресса, Симпозиум VI, М., 1962, стр. 145. [2] M. Calvin, Symp. Light and Life, Baltimore, 1961, p. 317. [3] G. M. Androes, M. F. Singleton et al., Biochem. et biophys. acta, **66**, № 2, 180 (1963). [4] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева, ДАН, **135**, 1528 (1960); Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский, Биофизика, 7, в. 5, 578 (1962). [5] B. Commoner, Symp. Light and Life, Baltimore, 1961, p. 356. [6] W. H. Storey, C. M. Monita et al., Nature, **195**, № 4845, 263 (1962). [7] В. Е. Холмогоров, А. Н. Теренин, ДАН, **137**, 199 (1961). [8] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, **18**, 340 (1953). [9] Г. Т. Рихирева, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский, Биофизика, **9**, в. 3 (1964). [10] А. В. Умрихина, И. Н. Голубев, А. А. Красновский, Биофизика, **9**, в. 4 (1964). [11] B. Commoner, J. Towsend, G. E. Pake, Nature, **174**, 689 (1954). [12] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, 177 (1952); ДАН, **91**, 343 (1953).

БИОФИЗИКА
Том IX, вып. 4 1964

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМАГНИТНЫХ СВОЙСТВ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

А. В. УМРИХИНА, И. Н. ГОЛУБЕВ, Л. П. КАЮШИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биологической физики АН СССР, Москва
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Броди с соавторами [1] обнаружили в образцах твердого хлорофилла сигнал электронного парамагнитного резонанса (ЭПР): при освещении появлялась узкая полоса, накладывающаяся на широкую полосу «темнового» сигнала. Сигналы ЭПР обнаружены в образцах метилхлорофиллида и пиридиновых растворах хлорофилла [1]. Теренин и Холмогоров [2] наблюдали полосу поглощения ЭПР в твердых образцах хлорофилла, этилхлорофиллида и феофитина в вакууме в темноте; сигнал незначительно увеличивался при освещении. Узкий сигнал при освещении появлялся только в присутствии воздуха. Сухой кислород вызывал незначительное повышение интенсивности «темновой» полосы, тогда как пары воды активировали появление на свету в вакууме узкого сигнала ЭПР, обнаруживаемого в хлорофилле в присутствии воздуха. Тот факт, что светоиндуцированный сигнал ЭПР пигментов в кристаллическом состоянии в присутствии паров воды существенно зависит от кислорода, привел Холмогорова, Сидорова и Теренина [3] к предположению, что световой узкий сигнал обусловлен взаимодействием следов кислорода с хлорофиллом в кристаллическом состоянии, сорбировавшим молекулы воды. В образцах «аморфного» хлорофилла светоиндуцированный сигнал не был обнаружен.

Мы исследовали спектры ЭПР хлорофилла и некоторых его аналогов и производных, имеющих те или иные структурные отличия по сравнению с хлорофиллом. Феофитин характеризуется отсутствием магния в его молекуле, этилхлорофиллид — отсутствием фитола; гематопорфирин и протопорфирин отличаются отсутствием циклопентанового кольца, иными, по сравнению с хлорофиллом, боковыми заместителями и количеством «полуизолированных» двойных связей, отсутствием центрального атома магния. Мы исследовали также синтетические аналоги хлорофилла: фталоцианин магния и фталоцианин без металла.

Измерение спектров ЭПР проводилось на радиоспектрометре, собранном по схеме с двойной модуляцией магнитного поля (высокочастотная модуляция — 465 *кгц*). Опыты проводились при малой мощности излучения клистрона. Исследовались спектры ЭПР твердых кристаллических образцов пигментов, помещенных в стеклянные ампулы. Обычно из ампул удаляли воздух откачиванием на форвакуумном насосе в течение 15—20 минут и под вакуумом ампулы запаивались. В ряде случаев опыты проводились в присутствии воздуха.

Измерение спектров ЭПР исследованных пигментов показало, что все пигменты давали в темноте сигнал ЭПР, который представлял симметричный синглет с g-фактором, близким к g-фактору свободного электрона (рис. 1). Полуширина этого сигнала несколько различалась у

разных пигментов, но варьировала в небольших пределах от 4 до 6 *э*. Концентрация свободных радикалов на грамм вещества была порядка 10^{17}—10^{18} частиц.

Наличие сигнала ЭПР у пигментов, отличающихся по своему строению, свидетельствует о том, что обнаруживаемые неспаренные электроны не связаны с наличием магния, фитола, циклопентанового кольца и определенных боковых группировок в молекуле пигмента и, очевидно, обусловлены главным образом их порфириновой структурой, системой сопряженных двойных связей, или взаи-



Рис. 1. Спектр ЭПР кристаллического порфирина в вакууме, в темноте

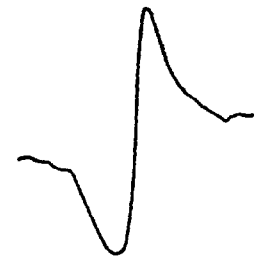


Рис. 2. Спектр ЭПР пленки хлорофилла $a+b$ из эфира (вакуум, темнота)

модействием порфириновых скелетов молекул в агрегатах и кристаллах.

Чтобы выяснить, связан ли наблюдаемый сигнал с определенной степенью агрегации молекул, мы измеряли спектры ЭПР пленок и растворов хлорофилла [1]. Пленки хлорофилла $a+b$ и хлорофилла a приготовлялись испарением под вакуумом (в ампуле) эфирных и пиридиновых растворов этих пигментов (хлорофилл a был получен путем хроматографирования хлорофилла $a+b$ на сахарозе из смеси серного



Рис. 3. Спектр ЭПР пленки хлорофилла a из эфира (вакуум)
a — в темноте; $б$ — освещение 10 мин. светом лампы накаливания (340 *вт*, 24 *а*), через светофильтр КС-11

и петролейного эфира). Оказалось, что пленки хлорофилла $a+b$, полученные из эфирных и пиридиновых растворов пигмента, в темноте давали сигнал ЭПР (рис. 2), сходный со спектром, наблюдаемым у кри-

[1] Твердые пленки хлорофилла, полученные из различных растворителей, отличаются разной степенью упорядоченности; электронографическое исследование пленок хлорофилла проводилось в работе [4].

сталлических пигментов (симметричный синглет, с полушириной 6 э и концентрацией парамагнитных частиц на 1,5 порядка ниже, чем в образцах твердых пигментов). В пленке хлорофилла *а*, полученной из эфира, в темноте сигнал наблюдать не удалось; при освещении появляется отчетливый сигнал (рис. 3), который затем долгое время сохраняется в темноте.

Растворы хлорофилла *а*+*b* в эфире и пиридине давали в темноте отчетливый сигнал (рис. 4). Нужно указать, что сигнал ЭПР в растворах хлорофилла обнаруживался только при высоких концентрациях хлорофилла в растворе (10^{-2} *М* и выше), т. е. в таких условиях, когда возможно образование димеров.

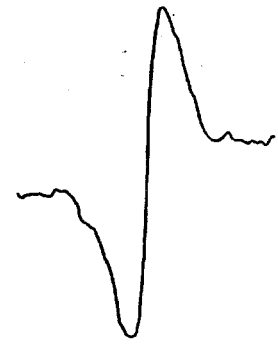


Рис. 4. Спектр ЭПР раствора хлорофилла *а* + *b* (10^{-2} *М*) в эфире (вакуум, темнота)

Следующим этапом нашей работы было изучение действия света, температуры и кислорода на характер и величину обнаруженного сигнала ЭПР. Действие света было изучено на всех пигментах, тогда как температурная зависимость и влияние кислорода исследовались только на примере хлорофилла.

Образцы пигментов в стеклянных ампулах освещали непосредственно в резонаторе конденсированным светом лампы накаливания (340 *вт*, 24 *а*).

Во избежание перегрева образца ставили теплоизолирующий водяной фильтр. При исследовании хлорофилла и гематопорфирина использовали соответственно светофильтры КС-11 и СЗС-7. Результаты опытов показывают, что при комнатной температуре освещение твердых пигментов в вакууме приводило к увеличению сигнала ЭПР, который достигал максимальной величины за 5—10 мин. Обычная величина изменения 10—25%. Величина изменения зависела не только от природы пигмента, но также и от характера объекта (кристаллы, пленки, растворы) и условий освещения. Очевидно, в условиях высокой концентрации пигмента в агрегированных структурах только малая доля молекул поглощает свет. Этим можно объяснить незначительное увеличение сигнала при освещении. В темноте активируемый светом сигнал медленно возвращался к исходной величине. Увеличение сигнала под действием света и уменьшение после выключения света многократно повторимо с одним и тем же объектом. В опытах с пленкой хлорофилла *а*, как уже указывалось выше, было показано, что при освещении появляется сигнал ЭПР, который затем сохраняется в темноте. При действии света на пиридиновые растворы хлорофилла *а*+*b* сигнал увеличивался в первые минуты освещения, а затем уменьшался. В темноте сигнал довольно быстро (за 2—3 мин.) возвращался к исходной величине.

Четкой картины действия света на эфирные растворы хлорофилла наблюдать не удалось, хотя также можно отметить, что сигнал ЭПР увеличивался при освещении.

Нужно отметить, что свет оказывал иное действие на фталоцианин магния и фталоцианин без металла. При освещении наблюдаемый в темноте сигнал ЭПР уменьшался на 5—10% и в темноте возвращался к исходной величине. Природа этого явления остается неясной.

Зависимость интенсивности сигнала от температуры проверялась только в препаратах хлорофилла *а*+*b*. Измеряемая область температур лежала в пределе от —130° до +100° С. При понижении температуры образца в вакууме от комнатной до —130° С наблюдалось значительное уменьшение величины сигнала (до 50%). При повышении температуры от —130° до комнатной и выше сигнал увеличивался. Од-

нако при температурах выше 60—70° сигнал резко уменьшался, что, возможно, связано с плавлением хлорофилла (рис. 5). При повторном понижении температуры до —130° С вновь наблюдается уменьшение сигнала примерно такого же порядка, если образец нагревали до 60° С. Интересно отметить, что если освещать образец при —130° С, то величина изменения значительно больше, чем при комнатной температуре; индуцируемый светом сигнал долгое время сохраняется в темноте (рис. 6).

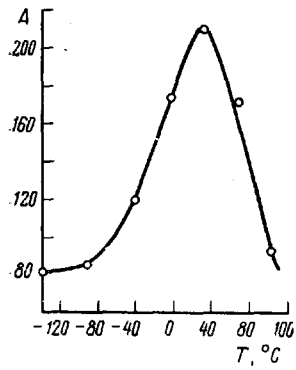


Рис. 5. Температурная зависимость величины сигнала (A) ЭПР твердого хлорофилла $a+b$ (вакуум, темнота)

Как уже указывалось выше, большинство опытов проводилось с образцами, из которых был удален воздух (однако без тренировки в высоком вакууме). Если в ампулу с твердым хлорофиллом пустить воздух, то наблюдаются два явления. Во-первых, сигнал ЭПР после пуска воздуха значительно возрастал (в полтора-два раза). Во-вторых, при действии света на образцы хлорофилла в присутствии воздуха сигнал возрастал гораздо значительнее, чем в вакууме. Кроме того, сигнал ЭПР при освещении образцов в присутствии воздуха становился асимметричным, вероятно, за счет наложения на широкий темновой сигнал более узкого светового сигнала. Эти данные согласуются с результатами Холмогорова и Теренина [2].

Рассматривая полученные результаты, можно отметить, что все исследованные пигменты: хлорофилл $a+b$, хлорофилл a, этилхлорофиллид, феофитин, протопорфирин, гематопорфирин, фталоцианин магния, фталоцианин без металла давали сигнал ЭПР, сходный по величине g-фактора и ширине линии. Природа темнового сигнала ЭПР в образцах твердых пигментов не ясна. Прежде всего следует отметить, что мы не можем гарантировать

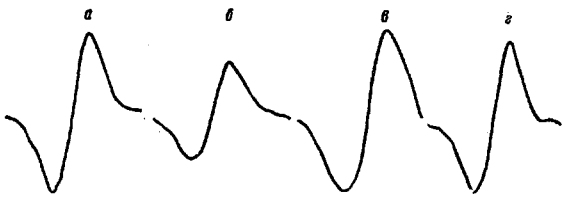


Рис. 6. Влияние температуры на величину сигнала ЭПР в темноте и при освещении (вакуум)

а — ЭПР хлорофилла $a+b$ при +20° С; *б* — при —130° С, темнота; *в* — при —130°С, свет 5 мин.; *г* — при —130°С, через 15 мин. после выключения света

достаточную чистоту препаратов пигментов. Расчеты показывают, что число парамагнитных центров в образце представляет примерно 0,1% от числа присутствующих молекул. Парамагнитная примесь в таком количестве, даже в хроматографически чистых препаратах пигментов, вполне возможна. Однако то, что все исследуемые пигменты давали один и тот же тип сигнала ЭПР (одинаковый — по g-фактору, ширине линии), дает возможность предположить, что наблюдаемые неспаренные электроны принадлежат пигментам.

Следует полагать, что сигнал ЭПР на свету обязан возникновению неспаренных электронов в молекуле пигмента. Как уже указывалось выше, при освещении образцов в вакууме сигнал увеличивался на 15—20%. Если мы учтем, что в твердых образцах пигментов поглощают свет только поверхностные молекулы кристаллов, то процент моле-

кул, дающих неспаренный электрон, из числа молекул, поглотивших фотон, значительно возрастает.

Природа светоиндуцированного сигнала более детально не исследовалась. Вероятно, этот сигнал такой же природы, что и наблюдавшийся Терениным и Холмогоровым [2], т. е. обязан неспаренным электронам, возникающим в кристаллах хлорофилла, при взаимодействии возбужденных молекул пигмента с молекулами кислорода. Из наших результатов следует, что сигнал ЭПР наблюдался со всеми исследованными пигментами, имеющими структурные отличия. Общее для всех исследованных пигментов — порфириновая структура молекулы с замкнутой системой конъюгированных двойных связей.

Можно предположить, что наблюдаемые неспаренные электроны делокализованы в системе конъюгированных двойных связей или в «активных центрах» и нарушениях кристаллической решетки пигментных кристаллов. Конечно, все изложенное — результаты качественных опытов, и в дальнейшем следует оценить квантовый выход образования неспаренных электронов.

Поступила в редакцию
10.VI.1962

ЛИТЕРАТУРА

1. Brody S. S., Newell G. a. Casther T., J. of Phys. Chem. **64**, 554, 1960
2. Холмогоров В. Е., Теренин А. М., Докл. АН СССР **137**, 199, 1961
3. Холмогоров В. Е., Сидоров А. М., Теренин А. М., Докл. АН СССР **147**, 954, 1962
4. Белавцева Е. М., Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика **4**, 521, 1959

Доклады Академии наук СССР
1964. Том 155, № 4

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. В. УМРИХИНА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИНИЦИИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ МЕТИЛМЕТАКРИЛАТА ВОССТАНОВЛЕННЫМИ ФОРМАМИ ХЛОРОФИЛЛА И ГЕМАТОПОРФИРИНА

При реакции обратимого фотовосстановления хлорофилла и его аналогов ([1]) следовало ожидать образования свободных радикалов — семихинонов в результате переноса электрона от молекулы-донора (АН) к возбужденной молекуле хлорофилла (Х): $X + AH \rightleftarrows \dot{X}^- + \dot{A}H^+$.

Чтобы обнаружить образование свободных радикалов при реакции фотовосстановления, мы изучали фотосенсибилизированную полимеризацию мономеров, энергично идущую в системе пигмент — донор электрона — метилметакрилат под действием красного света, поглощенного пигментом ([2]). В этих работах были получены данные по инициированию полимеризации пигментными и перекисными радикалами. Методом измерения электронного парамагнитного резонанса при освещении системы пигмент— аскорбиновая кислота обнаружен сигнал, принадлежащий радикалу донора электрона — монодегидроаскорбиновой кислоте ([3]). Таким образом, при реакции фотовосстановления образуются разные типы свободных радикалов: пигмента, донора электрона и продуктов их взаимодействия с кислородом.

Для того чтобы изучить действие радикалов восстановленного пигмента, следует исключить из системы радикал донора электрона. Это возможно в таких системах, где используется восстановитель, который, отдавая электрон, не превращается в свободный радикал и остается в другой фазе, например, металлический цинк.

В предыдущих работах нашей лаборатории исследовалось восстановление хлорофилла и его аналогов цинком по Тимирязеву ([4]) и показано образование (в оптимуме кислотности для данного пигмента) восстановленных форм, сходных по спектру поглощения с фотовосстановленными формами ([5]). Мы нашли ([6]), что в случае применения амальгамы цинка вместо цинковой пыли или стружек удается осуществить восстановление хлорофилла и его аналогов в пиридине без добавления кислоты (в темноте), т. е. в тех условиях, когда в растворе можно было ожидать накопления апротонных восстановленных форм — анион-радикалов (Х).

Хлорофилл и другие пигменты получали методами, принятыми в нашей лаборатории. Подготовка к опытам мономера метилметакрилата описана нами ранее ([2]). Использовали реактивный пиридин, перегнанный без предварительного высушивания. Амальгаму цинка получали ([7]) растворением 3 г гранулированного химически чистого цинка в 100 г ртути с добавлением 3—5 мл 0,1 *N* серной кислоты. Ртуть с цинком нагревали до 100° на водяной бане до растворения цинка. Полученную амальгаму охлаждали и тщательно отмывали дистиллированной водой от кислоты.

Опыты проводили в вакуумных трубках Тунберга с боковым отводом, приспособленных для измерения на спектрофотометре (рис. 1). В боковой отвод наливали 4 мл раствора пигмента в пиридине и 0,1 — 0,2 мл амальгамы цинка, отвод закрывали ватным фильтром и удаляли воздух откачиванием на форвакуумном насосе. Затем пигмент восстанавливали при энергичном встряхивании пиридинового раствора с амальгамой (без освещения) в боковом отводе в течение нескольких минут. После полного восстановления пигмента, видного по изменению окраски, раствор отфильтровывали (в вакууме) через ватный фильтр в нижнюю часть трубки Тунберга и измеряли спектр поглощения.

Хлорофилл в этих условиях восстанавливается с образованием формы с максимумом поглощения около 520 мμ (рис. 2), сходной с фотовосстанов-

ленной формой. При взаимодействии феофитина с амальгамой цинка вначале образуется цинковый комплекс феофитина, который восстанавливается. Гематопорфирин восстанавливается амальгамой с образованием продукта желтого цвета с максимумом поглощения при 460 мμ (рис. 3). Полученный спектр отличается от спектра поглощения гемотопорфирина, фотовосстановленного аскорбиновой кислотой при комнатной температуре в пиридине, где продукт восстановления имеет максимумы поглощения в области 650—740 мμ ([8]). В водных кислых растворах максимум фотовосстановленной формы гематопорфирина лежит при 500 мμ ([9]). Фотовосстановление при —40° приводило к увеличению поглощения (соответствующее «первичной» фотовосстановленной форме гематопорфирина) в области 450—480 мμ ([10]). Импульсная спектроскопия гематопорфирина обнаружила продукт с максимумом в области 400—500 мμ ([11]). Добавление к раствору хлорофилла 2—3 капель ледяной уксусной кислоты не оказывало влияния на спектр восстановленного амальгамой хлорофилла. Восстановление гематопорфирина в присутствии кислоты приводило к образованию продукта восстановления с максимумом поглощения в области 670—680 мμ.

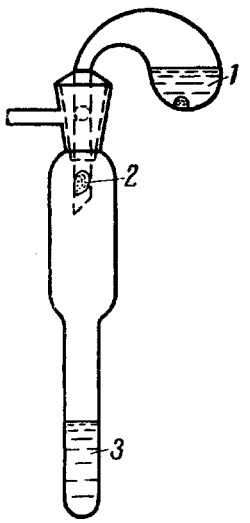


Рис. 1. Вакуумная трубка для проведения опытов по восстановлению пигментов амальгамой цинка и инициированию полимеризации восстановленными формами: *1* — раствор пигмента в пиридине в боковом отводе, на дне отвода — амальгама цинка, *2* — ватный фильтр, *3* — метилметакрилат

Восстановленные амальгамой цинка формы пигментов чрезвычайно неустойчивы. В вакууме восстановленная форма хлорофилла за 5—6 мин. превращается в исходный хлорофилл. При пуске воздуха происходит мгновенная регенерация хлорофилла. Восстановленный (в отсутствие кислоты) гематопорфирин в вакууме довольно устойчив, но после пуска воздуха превращается в исходный порфирин практически мгновенно. Продукт восстановления гематопорфирина, полученный в присутствии кислоты, при обратной реакции вначале переходит в форму «460 мμ», а затем в исходную. Обратная реакция в вакууме идет медленно, с воздухом — очень быстро.

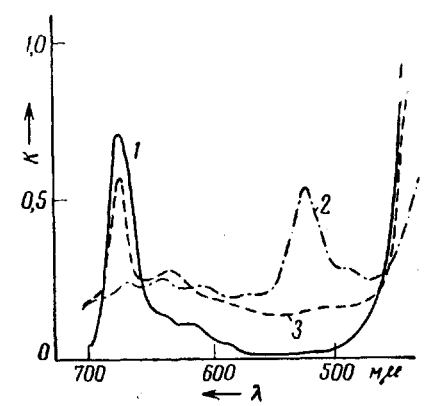


Рис. 2. Обратимое восстановление хлорофилла а амальгамой цинка в пиридине: *1* — спектр хлорофилла а в пиридине (исходный), *2* — после восстановления амальгамой цинка, *3* — после обратной реакции

Неустойчивость и высокая реакционная способность восстановленных амальгамой цинка форм пигментов отличает их от фотовосстановленных форм, устойчивых в вакууме и медленно реагирующих с кислородом. Поэтому, несмотря на спектральное сходство тех и других форм, они, вероятно, имеют различную природу. Действительно, нами было показано, что «красная» фотовосстановленная форма хлорофилла в присутствии избытка аскорбиновой кислоты не инициировала полимеризацию метилметакрилата ([2]) и в соответствии с опытами Вейсмана и Линшитца ([12]) не давала сигнала э.п.р. ([3]). Очевидно, «красная» фотовосстановленная форма является не свободным радикалом, а скорее всего валентно насыщенным продуктом.

В реакции пигмента с амальгамой цинка мы ожидали образование радикальных восстановленных форм. Для обнаружения свободных радикалов

мы изучали инициирование цепной полимеризации метилметакрилата восстановленными амальгамой цинка формами. Опыты проводились с хлорофиллом и гематопорфирином в вакуумных трубках Тунберга с боковым отводом. Пигмент в растворе пиридина в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ *М* восстанавливали в боковом отводе амальгамой цинка вышеописанным способом (в вакууме, в темноте). Затем раствор восстановленного пигмента отфильтровывали в нижний конец трубки, куда предварительно был налит метилметакрилат (3 мл). Конечное соотношение объемов пиридина и метилметакрилата было

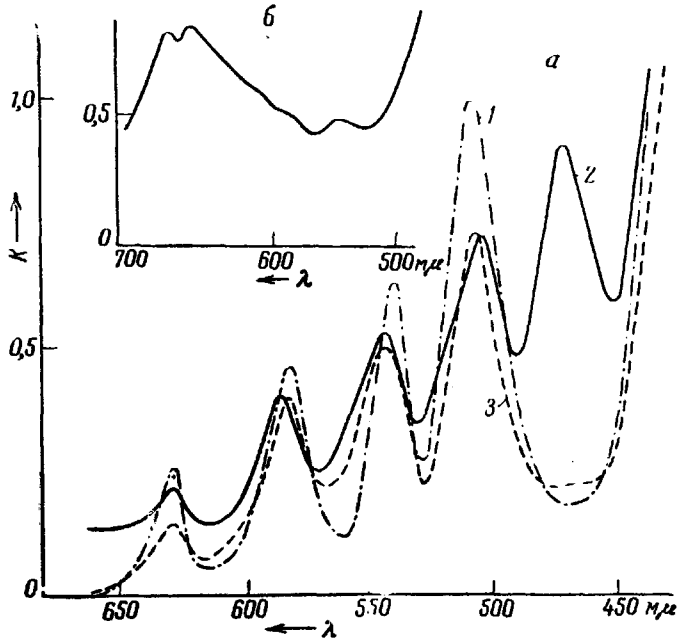


Рис. 3. Обратимое восстановление гематопорфирина амальгамой цинка в пиридине. *а* — спектральные изменения гематопорфирина в отсутствие кислоты: *1* — исходный спектр, *2* — после восстановления, *3* — после обратной реакции; *б* — спектр гематопорфирина, восстановленного в присутствии уксусной кислоты (0,04 мл на 4 мл раствора)

1 : 3. После смешения метилметакрилата с пиридиновым раствором восстановленного пигмента испытуемый раствор выдерживали в вакууме в темноте при комнатной температуре в течение часа для развития цепной полимеризации. Затем трубку открывали, выливали раствор в избыток метилового спирта (1 : 10) и по количеству и характеру осадка полимера судили о прохождении полимеризации. Опыты ставились в нескольких вариантах, результаты опытов приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что наиболее активная полимеризация наблюдается в том случае, когда к метилметакрилату в вакууме добавляется раствор пигмента, восстановленного амальгамой цинка. Наибольший эффект был получен в опыте с восстановленным в присутствии 2—3 капель уксусной кислоты хлорофиллом. В этом случае образуется большой хлопьевидный осадок полимера в метиловом спирте. Встряхивание неэвакуированного раствора пигмента с амальгамой цинка с последующей темновой выдержкой с метилметакрилатом в вакууме не приводило к полимеризации. Это свидетельствует о том, что инициирующие полимеризацию радикалы образуются в результате восстановления пигмента в вакууме. В следующем варианте опыта раствор восстановленного пигмента выдерживали в вакууме в течение 5—10 мин. до фильтрования в метилметакрилат. За это время восстановленный хлорофилл почти полностью регенерировал. Как видно из данных табл. 1, в этом случае полностью отсутствовала и полимеризация. В таком же опыте с гематопорфирином, восстановленная форма которого более устойчива в ва-

Таблица 1

Инициирование полимеризации метилметакрилата продуктами взаимодействия пигментов с амальгамой цинка

Концентрация пигмента $5 \cdot 10^{-5}$ *M*, 0,1 мл амальгамы цинка, 1 мл пиридина и 3 мл метилметакрилата. Опыты при комнатной температуре, темновая выдержка 1 час. б. к. — без кислоты. к — 0,02 мл ледяной CH_3COOH

Условия опыта	Хлорофилл		Гематопорфирин		Без пигмента	
	б.к.	к.	б.к.	к	б.к.	к
Восстановление пигмента в вакууме и приливание к метилметакрилату в вакууме	+++	+++	+++	+++	—	—
Встряхивание раствора пигмента с амальгамой цинка на воздухе, эвакуирование, приливание к метилметакрилату	+	+	+	+	—	—
Восстановление в вакууме, обратная реакция в вакууме в течение 5 мин., приливание к метилметакрилату	—	—	++	++	—	—
Восстановление в вакууме, пуск воздуха к восстановленной форме, эвакуирование, приливание к метилметакрилату	—	++	—	++	—	—

Примечание. +++ большой хлопьевидный осадок полимера в метиловом спирте. ++ однородная взвесь полимера в метиловом спирте, промеряемая на спектрофотометре. + следы полимера в метиловом спирте. — полное отсутствие полимера в метиловом спирте.

кууме, полимеризация имела место. В ином варианте опыта к раствору восстановленного пигмента пускали воздух, после чего быстро отфильтровывали пиридиновый раствор регенерировавшего пигмента в метилметакрилат и вновь эвакуировали. После темновой выдержки полимер обнаружен как с хлорофиллом, так и с гематопорфирином в том случае, если пигменты восстанавливались в присутствии кислоты. Очевидно, реакция водородной восстановленной формы с кислородом приводит к образованию перекисных радикалов, инициирующих полимеризацию. Встряхивание пиридина с амальгамой цинка без пигмента в вакууме и в присутствии воздуха (с кислотой и без кислоты) не приводило к образованию продуктов, инициирующих полимеризацию метилметакрилата.

Таким образом, результаты опытов показывают, что при взаимодействии пигментов с амальгамой цинка в вакууме, в темноте образуются продукты восстановления, сходные по спектру поглощения с фотовосстановленными пигментами. В присутствии продуктов восстановления наблюдается активная полимеризация метилметакрилата. Весьма вероятно, что восстановленные амальгамой пигменты — ион-радикалы, образование которых можно ожидать при переносе электрона от цинка к молекуле пигмента. Неустойчивость и высокая реакционная способность восстановленных амальгамой пигментов дает возможность предположить их химическое отличие от фотовосстановленных форм пигментов, не инициирующих полимеризацию, устойчивых в вакууме и на воздухе. Тот факт, что сходные по своим спектральным свойствам восстановленные формы пигментов могут различаться по своей природе (быть радикалами или валентно насыщенными продуктами), следует учитывать при анализе результатов исследования фотореакций хлорофилла методами и импульсной и дифференциальной спектроскопии.

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

Поступило
24 XII 1963

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). Усп. хим., **29**, 736 (1960). [2] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **104**, 882 (1955); Биофизика, **3**, 547 (1958). [3] Н. Н. Бубнов, А. А. Красновский, А. В. Умрихина, В. Ф. Цепалов, В. Я. Шляпинтох, Биофизика, **5**, 121 (1960). [4] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, ДАН, **74**, 103 (1950). [5] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **108**, 507 (1956). [6] А. В. Умрихина, Диссертация, Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1960. [7] Ю. В. Карякин, Чистые химические реактивы, Л., 1947, стр. 582. [8] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **96**, 1209 (1954). [9] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **122**, 1061 (1958). [10] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **118**, 1146 (1957). [11] A. N. Terenin, Trans. Farad. Soc., Gen. Discussion, 1959. [12] H. Linschitz, S. I. Weissmann, Arch. Biochem. and Biophys., **67**, 491 (1957).

БИОФИЗИКА
Том X, вып. 3 1965

УДК 577.3

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА И ПРОТОФЕОФИТИНА В РАЗНЫХ СОСТОЯНИЯХ

М. И. БЫСТРОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследование спектров флуоресценции неповрежденных этиолированных листьев при низкой температуре [1] позволило установить существование в них различных форм предшественника хлорофилла с максимумами флуоресценции при 655 и 635 *ммк*. В гомогенатах этиолированных листьев обнаружены формы протохлорофилловых пигментов [2], характеризующиеся максимумами флуоресценции при 655, 640 и 630 *ммк*. Наибольшей фотохимической активностью в листьях и гомогенатах обладает форма «655 *ммк*», являющаяся вместе с тем и наиболее лабильной. Однако вопрос о специфике связи пигмента с белком в разных формах и структуре пигментно-белковых комплексов остается открытым.

С целью подхода к выяснению состояния протохлорофилловых пигментов в листьях растений и моделированию различных форм мы систематически изучали флуоресценцию протохлорофилла и его безмагниевого аналога в различных состояниях — растворах, адсорбатах, твердых пленках при комнатной и низкой температурах.

Можно было надеяться, что сопоставление люминесцентных свойств протохлорофилловых пигментов вне организма с флуоресценцией неповрежденного этиолированного листа принесет новые сведения о состоянии предшественника хлорофилла в живом растении.

Изучение спектральных свойств протохлорофилла в различных модельных системах представляет интерес также с точки зрения сравнения его с хлорофиллом. В то время как по вопросу о состоянии хлорофилла в различных условиях накоплен большой экспериментальный материал, подобные сведения о его предшественнике и аналоге недостаточны [3].

Методика

Протохлорофилл выделяли из внутренних оболочек семян тыквы с хроматографическим разделением на бумаге [3], протофеофитин получали обработкой раствора протохлорофилла в серном эфире 10%-ной HCl с последующим промыванием водой.

Спектры флуоресценции в области 600—800 *ммк* регистрировались фотоэлектрически на установке [4] с последующим внесением поправки на спектральную чувствительность прибора. В некоторых опытах применяли фотографическую регистрацию спектров, описанную нами ранее [2]. На рисунках по оси ординат показана интенсивность флуоресценции в относительных единицах.

I. Спектры флуоресценции протохлорофилла и протофеофитина в растворах

Протохлорофилл в растворах при комнатной температуре обладает характерным спектром флуоресценции с двумя максимумами в области 623—642 и 683—702 *ммк* в согласии с измерениями лаборатории Френча [5] и нашей предыдущей работой [3]. Положения максимумов меняются в зависимости от природы растворителя. Наиболее длинноволновый сдвиг наблюдается у растворов протохлорофилла в пиридине и спирте. Флуоресценция растворов пигмента в этих растворителях резко меняется при глубоком охлаждении.

Спектр флуоресценции раствора протохлорофилла в спирте представлен на рис. 1 (*1*). При температуре —196° относительно возрастает длинноволновая флуоресценция, в спектре появляются новые максимумы при 651 и 630 *ммк* (рис. 1, *2*). На том же рисунке представлен спектр флуоресценции пиридинового раствора протохлорофилла

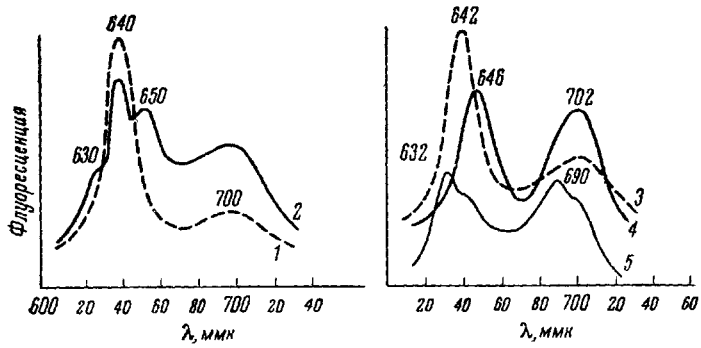


Рис 1 Спектры флуоресценции растворов протохлорофилла
В спирте при комнатной температуре (*1*) и при —196° (*2*), в пиридине при комнатной температуре (*3*), при —196° (*4*) и ~— 120° (*5*)

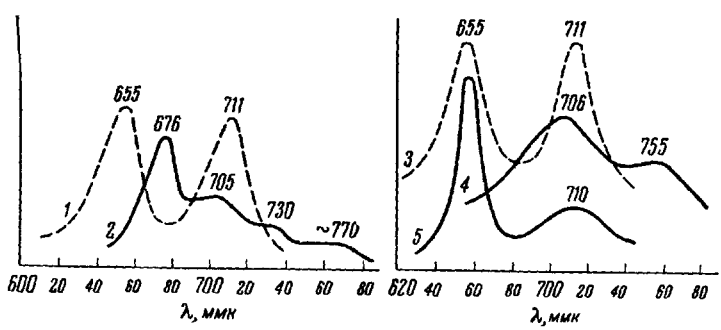


Рис 2 Спектры флуоресценции растворов протофеофитина
В спирте при комнатной температуре (*1*) и при —196° (*2*), в пиридине при комнатной температуре (*3*), при —196° (*4*) и ~—120° (*5*)

при комнатной температуре (*3*) и при —196° (*4*). Появление максимума в области ~630 *ммк* и соответствующего ему максимума ~690 *ммк* удается заметить в пиридиновом растворе протохлорофилла при —100÷—120° с применением фотографической регистрации флуоресценции (*5*).

Ранее [3] мы наблюдали появление интенсивного максимума около 655 *ммк* при освещении возбуждающим светом растворов протохлорофилла, охлажденных до —100÷—120°. Однако пока не представляется возможным решить, какова природа происхождения максимума

655 *ммк* в этих условиях. Возможно, в данных условиях происходит обратимая фотофеофитинизация пигмента [3].

Френч и сотр. [5] обнаружили у раствора протофеофитина в ацетоне флуоресценцию с двумя максимумами в области ~640 и ~740 *ммк*. По нашим данным, протофеофитин в органических растворителях при комнатной температуре обладает характерным спектром флуоресценции с двумя максимумами — в области 640—655 *ммк* и 700—720 *ммк* соответственно. Положения максимумов зависят от природы растворителя. Наиболее длинноволновые положения максимумов свойственны растворам протофеофитина в спирте и пиридине. Глубокое охлаждение спиртовых и пиридиновых растворов протофеофитина приводит к изменению спектров флуоресценции. На рис. 2, *1* представлен спектр флуоресценции протофеофитина в этиловом спирте при комнатной температуре. Охлаждение до —196° резко изменяет спектр: обнаруживается максимум при 676 *ммк*, длинноволновая флуоресценция относительно снижается, появляются новые длинноволновые максимумы в области ~735 *ммк* и ~775 *ммк*.

В пиридиновом растворе протофеофитина при —196° также появляется новый длинноволновый максимум в области 750 *ммк*, что видно из того же рисунка (кривые *3*, *4*). Охлаждение до —100÷—120° вызывает резкое изменение соотношения интенсивностей обоих максимумов флуоресценции без изменения их положения, коротковолновый максимум (655 *ммк*) становится основным в спектре, и весь спектр приобретает вид, сходный с флуоресценцией «активного протохлорофилла» в живых листьях, охлажденных до той же температуры.

II. Спектры флуоресценции адсорбатов протохлорофилла и протофеофитина

Изучались спектры флуоресценции пигментов, адсорбированных на порошкообразной целлюлозе, фильтровальной бумаге, поролоне. Адсорбаты получали нанесением раствора пигмента в серном эфире на адсорбент с последующим испарением эфира и удалением следов растворителя при эвакуации форвакуумным насосом. Мы пользовались серным эфиром, высушенным металлическим натрием и свежеперегнанным, освобожденным от перекисей. Исходные концентрации пигментов составляли 10^{-4} *М*.

При адсорбции протохлорофилла изменяется его спектр флуоресценции по сравнению с исходным раствором, оба максимума сдвигаются в длинноволновую сторону, интенсивность длинноволнового максимума относительно возрастает, что видно из рис. 3, где представлен типичный спектр адсорбата протохлорофилла на целлюлозе (*2*) по сравнению с исходным раствором пигмента в серном эфире (*1*). Адсорбат протохлорофилла, полученный погружением адсорбента в спиртовый раствор с последующим отмыванием спирта водой, обнаруживает аналогичную флуоресценцию.

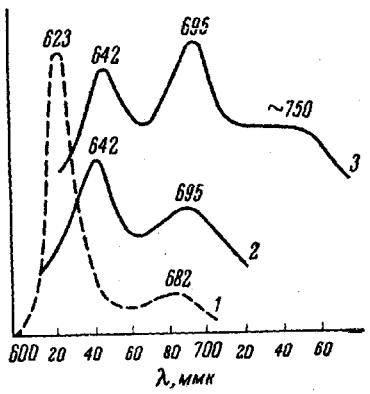


Рис. 3. Спектры флуоресценция протохлорофилла

В серном эфире (*1*); адсорбата на целлюлозе (*2*) и «плотного» (исходная концентрация 10^{-3} *М*) адсорбата на фильтровальной бумаге (*3*)

Точные положения максимумов флуоресценции адсорбатов протохлорофилла и соотношения их интенсивностей могут варьировать в зависимости от концентрации пигмента, качества адсорбента и других факторов, которые трудно поддаются контролю (например, скорость

испарения эфира с поверхности адсорбента, характер поверхности адсорбента, температура, при которой происходит адсорбация пигмента, и, возможно, содержание воды в растворителе и адсорбенте).

Так, в ряде случаев очень «плотные» адсорбаты протохлорофилла на бумаге, целлюлозе обнаруживали спектр с резко возросшей интенсивностью длинноволнового максимума и появлением нового максимума ~750 *ммк* (рис. 3, *3*). Положения коротковолнового максимума флуоресценции у адсорбатов протохлорофилла могут колебаться от 630 до 650—655 *ммк*, а длинноволнового — соответственно от 682 до 700—710 *ммк*. Наиболее коротковолновые максимумы (630 и ~680 *ммк*) часто обнаруживаются у адсорбатов протохлорофилла на поролоне при первоначальной регистрации флуоресценции, когда еще не проявляется действие возбуждающего света. При длительном действии возбуждающего света у адсорбатов протохлорофилла на целлюлозе, поролоне, в ряде случаев наблюдается появление нового максимума в области 655—662 *ммк*, свойственного адсорбатам протофеофитина в этих условиях (кривая *3* на рис. 4).

Добавление воды к адсорбатам протохлорофилла сильно снижает интенсивность флуоресценции без спектральных изменений. Охлаждение этих адсорбатов до —196° также не вызывает спектральных изменений. Мы нашли, что хлорофилл «а» в проявлении спектральных свойств адсорбатов в различных условиях обнаруживает сходство с поведением протохлорофилла.

Протофеофитин при адсорбции обнаруживает резкое изменение спектра флуоресценции по сравнению с раствором, сводящееся к относительному возрастанию интенсивности коротковолнового максимума и смещению обоих максимумов в длинноволновую сторону. Соотношение интенсивностей максимумов флуоресценции, их точные положения варьируют в зависимости от тех же факто-

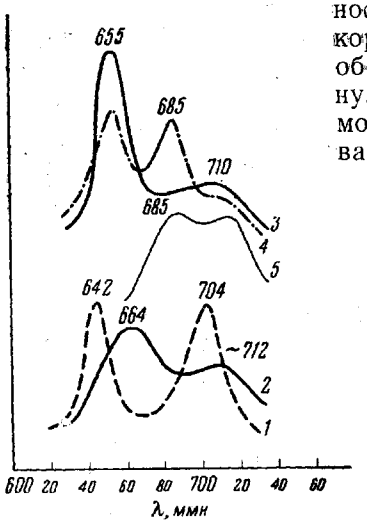


Рис. 4. Спектры флуоресценции протофеофитина

В серном эфире (*1*); адсорбатов на целлюлозе (*2*), поролоне в присутствии воды (*3*); на фильтровальной бумаге после добавления воды (*4*) и «плотного» адсорбата на фильтровальной бумаге (*5*)

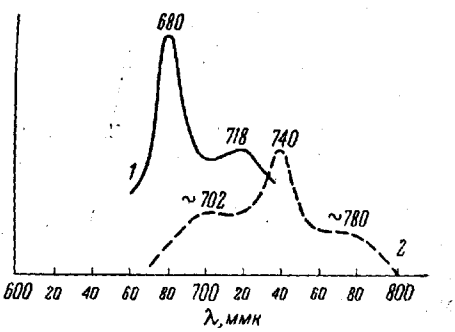


Рис. 5. Спектр флуоресценции адсорбата феофитина (*а*+*b*)

На фильтровальной бумаге (*1*) и того же адсорбата после добавления воды (*2*)

ров, которые были указаны для протохлорофилла. Положения двух основных максимумов флуоресценции у различных адсорбатов протофеофитина могут колебаться в пределах 653—663 и 705—715 *ммк*. На рис. 4, *2* представлен типичный спектр флуоресценции адсорбата протофеофитина на целлюлозе. Пигмент, адсорбированный на других органических адсорбентах (бумага, поролон), обладает идентичным спектром флуоресценции.

Добавление воды к адсорбатам протофеофитина на порошкообразной целлюлозе, поролоне сдвигает максимумы флуоресценции до 655 и 710 *ммк*; и весь спектр в этих условиях приобретает вид, сходный с флуоресценцией «активного протохлорофилла» в живых листьях (рис. 4, *3*).

В нашей предыдущей работе [3] мы наблюдали и у «безводных» адсорбатов протофеофитина флуоресценцию, сходную с флуоресценцией этиолированных листьев. Это можно объяснить тем, что в предыдущей работе мы пользовались для получения адсорбатов влажным серным эфиром.

При погружении адсорбатов протофеофитина на бумаге в воду обнаруживается новый интенсивный максимум в их спектре флуоресценции при 685 *ммк* (рис. 4, *4*). Появление сходного максимума удавалось наблюдать и у очень «плотных» адсорбатов протофеофитина на бумаге (рис. 5, *5*).

Интересно, что адсорбаты феофитина (*a*+*b*) на бумаге при погружении их в воду также обнаруживают резкое изменение флуоресценции с появлением новых длинноволновых максимумов около 740 и 780 *ммк*, что видно на рис. 5, *1* и *2*.

III. Люминесценция пленок протохлорофилла и протофеофитина

Изучение люминесценции твердых пленок интересовало нас с точки зрения выявления у молекул названных пигментов способности к взаимодействию с образованием агрегатов пигмент-пигментного характера.

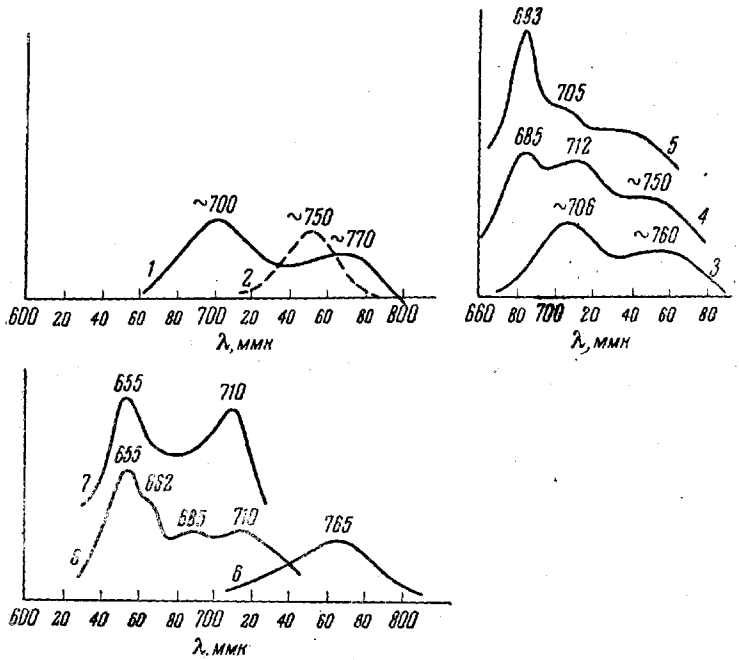


Рис. 6. Пленки протохлорофилла (*1*) и хлорофилла (*2*) при —196°, а также варианты пленок протофеофитина при —196° (спектры *3*, *4*, *5*) и при комнатной температуре (спектры *6*, *7*, *8*)

Если для хлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина в этом направлении получен соответствующий материал [6—9], то протохлорофилл и протофеофитин с этой точки зрения еще не исследовались.

Пленки пигментов получали при испарении эфира из растворов пигментов (концентрация $\sim 10^{-4}$ *M*) в трубках Тунберга с эвакуацией в течение 30 мин.

Нам не удалось наблюдать флуоресценции у пленок протохлорофилла при комнатной температуре. При —196° пленки протохлорофилла обнаруживают длинноволновую флуоресценцию с размытым и неотчетливым максимумами в области ~700 и ~760—770 *ммк* (новый длинноволновый максимум) (рис. 6, *1*). Точные положения максимумов, соотношение их интенсивностей меняются в зависимости от концентрации пигментов в пленке, содержания воды, температуры. Хлорофилл «а» в пленке, полученной в тех же условиях при —196°, обнаруживает длинноволновый максимум флуоресценции при 750 *ммк*, что соответствует данным работ [8; 9].

Протофеофитин в пленках при низкой температуре обнаруживает довольно интенсивную длинноволновую флуоресценцию с появлением новых максимумов. Структура спектров флуоресценции пленок определяется содержанием воды, концентрацией пигмента. В известных условиях пленки протофеофитина по низкотемпературной флуоресценции полностью сходны с пленками протохлорофилла (рис. 6, *3*). В других случаях (возможно, в присутствии воды) пленки протофеофитина обнаруживают флуоресценцию, представленную на рис. 6 (*4*, *5*), с появлением новых максимумов в области ~680—685 и ~750 *ммк*.

В отличие от протохлорофилла пленки протофеофитина флуоресцируют и при комнатной температуре. На рис. 6 (кривые *6*, *7*, *8*) представлены возможные варианты флуоресценции пленок протофеофитина при комнатной температуре в процессе откачивания следов растворителя.

Обсуждение результатов

Однозначная трактовка природы низкотемпературной люминесценции протохлорофилла и протофеофитина в полярных растворителях пока затруднительна. При интерпретации описанных наблюдений следует учитывать: 1) возможность образования агрегатов (вероятно, димеров между молекулами пигмента); 2) взаимодействие между молекулами пигмента и полярного растворителя с образованием комплексных ассоциатов и 3) возможное изменение структуры этих ассоциатов при глубоком охлаждении, а также связанное с ним изменение состояния пигмента.

Особенности люминесценции адсорбированных пигментов можно связать с «двумерной» агрегацией пигмента на адсорбенте, хотя взаимодействие пигмента с адсорбентом также не может быть полностью исключено. Сходство спектров люминесценции пиридиновых растворов протохлорофилла при низкой температуре с флуоресценцией его адсорбатов наводит на мысль о близких типах ассоциации пигментов в этих условиях. (Протофеофитин в пиридине при —100÷—120° также обнаруживает сходство с флуоресценцией соответствующих адсорбатов.)

Обращает на себя внимание тот факт, что добавление воды изменяет спектральные свойства только у безмагниевых адсорбатов (протофеофитина и феофитина). Влияние воды, по-видимому, не ограничивается только удалением следов растворителя и увеличением степени агрегации пигмента, так как даже длительное откачивание адсорбатов не приводит к сходному эффекту. Можно думать, что роль воды связана с действием ее полярных молекул на структуру молекулярных агрегатов у безмагниевых пигментов и изменением состояния последних.

Обнаружение длинноволновой люминесценции у пленок протохлорофилла и протофеофитина дало основание считать, что молекулы этих пигментов в определенных условиях могут взаимодействовать

между собой с образованием ассоциатов пигмент-пигментного характера, проявляя в этом отношении сходство с хлорофиллом «а». Протохлорофилл в агрегированном состоянии, так же как и хлорофилл «а», не люминесцирует при комнатной температуре, что, вероятно, также связано с тепловой дезактивацией энергии электронного возбуждения в этих условиях. Резко различный характер свечения протохлорофилла (и протохлорофиллида) в пленке, с одной стороны, и протохлорофиллида в этиолированном листе — с другой, позволяет считать, что в проявлении спектральных свойств «активного протохлорофилла» агрегация пигмент-пигментного характера не играет решающей роли. Хлорофилл, накапливающийся в листе, в отличие от своего предшественника, в довольно больших концентрациях, образует здесь разного порядка агрегаты, низкотемпературное свечение которых обнаружено в работах ряда авторов. Поэтому спектральные особенности хлорофилла в листе определяются главным образом наличием агрегации пигмент-пигментного характера. Что касается предшественника хлорофилла, то его спектральные свойства в листьях в большей степени обусловлены специфической связью с белком, нативной структурой липопротеидных комплексов.

Обнаруженное сходство спектров флуоресценции безмагниевого аналога протохлорофилла в пиридиновом растворе при —100÷—120° и некоторых его адсорбатов с флуоресценцией «активного протохлорофилла» в этиолированных листьях наводит на мысль о том, что в живом листе при образовании естественной связи с белком атом магния в молекуле пигмента испытывает напряжение с возможным его перемещением из центра молекулы и созданием «квазифеофитиновой» структуры [3].

Обнаружение в спектрах флуоресценции адсорбатов протохлорофилла максимумов при ~630 и 640 *ммк*, свойственных «неактивной форме» пигмента (гомогенаты), дает возможность предполагать, что спектральные особенности коротковолновой формы протохлорофилла в листьях могут быть обусловлены связью с белком и липоидами другого типа по сравнению с нативной специфической связью «активного протохлорофилла».

Выводы

Изучали спектры флуоресценции протохлорофилла и протофеофитина в растворах, адсорбатах и твердых пленках при комнатной и низкой температурах.

Показано, что структура спектров спиртовых и пиридиновых растворов резко меняется при глубоком охлаждении с появлением новых максимумов ~651, 630 *ммк* (протохлорофилл в спирте, —196°); 676, ~735, ~770 *ммк* (протофеофитин в спирте, —196°); ~630 *ммк* (протохлорофилл в пиридине, —120°); в области ~750 *ммк* (протофеофитин в пиридине, —196°).

Пигменты при адсорбции обнаруживают флуоресценцию, отличающуюся от исходных растворов по положению максимумов и соотношению их интенсивностей в зависимости от плотности упаковки и типа адсорбента.

Смачивание водой адсорбатов протофеофитина и феофитина (*а*+*l* вызывает глубокие изменения спектров с появлением новых максимумов ~685 *ммк* (протофеофитин) и ~740 *ммк* (феофитин).

У пленок протофеофитина и протохлорофилла при —196° наблюдается флуоресценция в красной области с максимумами ~700 ~760 *ммк* (протохлорофилл) и 685, ~760 *ммк* (протофеофитин). В отличие от пленок протохлорофилла, флуоресценция которых наблюдается лишь при низких температурах, пленки протофеофитина флуоресцируют и при комнатной температуре.

Сходство спектров флуоресценции протофеофитина в пиридиновом растворе при —120° и его адсорбатов с флуоресценцией активного протохлорофиллового пигмента в листьях позволяет обосновать предположение о «квазифеофитиновой» структуре активного предшественника хлорофилла в листьях.

Поступила в редакцию
24.II.1964

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. Докл. АН СССР **117**, 106, 1957, Докл. АН СССР **120**, 764, 1958
2. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия **25**, 168, 1960
3. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия **27**, 958, 1962
4. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика **6**, 392, 1961
5. French C. S., Smith J. H. C., Vigin H. C., Airth R., Plant Physiol. **31**, 369, 1956
6. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй цюнь, Докл. АН СССР **143**, 456, 1962
7. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР **152**, 1231, 1963
8. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т. АН СССР **135**, 1528, 1960
9. Литвин Ф. Ф., Рихирева Г. Т., Красновский А. А., Биофизика **7**, 578, 1962

УДК 581.132

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА, БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОВИРИДИНА В ВЯЗКИХ СРЕДАХ

Н. Н. ДРОЗДОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследования обратимых фотохимических окислительно-восстановительных превращений хлорофилла и его аналогов, которые могут быть звеном в цепи фотосинтетического переноса электрона, ведутся в течение многих лет. При этом наибольший интерес привлекали такие превращения, которые сопровождаются «запасанием» энергии света в продуктах реакции [1].

Изучению окислительных превращений хлорофилла и его аналогов посвящен ряд работ. Давно известно, что при интенсивном освещении растворов хлорофилла на воздухе происходит деструктивное фотоокисление. Связанное с этим выцветание пигмента происходит через стадию образования окрашенных промежуточных продуктов [2; 3]. Однако, наряду с продуктами необратимого окисления, образуются промежуточные лабильные продукты, из которых частично регенерируется пигмент при добавлении восстановителей. Способность хлорофилла и некоторых его аналогов к частичному обратимому (при добавлении аскорбиновой кислоты) фотохимическому окислению кислородом воздуха и темновому окислению перекисью бензоила была показана в нашей лаборатории в 1947 г. [4]. Эти процессы наиболее отчетливо идут в спиртовых растворах. Явление обратимости наиболее ясно выражено в опытах с бактериохлорофиллом [5]. Эти данные были подтверждены в исследованиях Годхера, показавшего возможность обратимого окисления бактериохлорофилла некоторыми другими соединениями [6].

Рабинович и Вейс [7] полагают, что реакция хлорофилла с окисными соединениями железа представляет собой обратимое окисление. Изучение этой реакции в работах лаборатории Б. Я. Даина [8] показало, что в определенных условиях происходит замещение атома магния в молекуле хлорофилла на железо, а в других условиях наблюдается фотовосстановление хлорофилла ионами Fe^{++}, образующимися при фотохимической реакции [9].

Евстигнеев и Теренин нашли, что знак потенциала твердых пленок хлорофилла и его аналогов связан с окислительно-восстановительными свойствами среды, окружающей пленку [10]. При измерении фотопотенциалов пленок пигментов, нанесенных на металлический электрод и опущенных в раствор электролита, содержащего окислитель или восстановитель, при освещении обнаружено обратимое изменение потенциала, что свидетельствует о способности пигментов обратимо отдавать или воспринимать электрон [11].

Качан и Даин [12], освещая хлорофилл ультрафиолетовым светом в «жестких» средах при температуре —190° нашли изменения поглощения хлорофилла, которое они объяснили элементарным фотоокислением. Линшитц и Реннерт [13] нашли, что при освещении хлорофилла красным светом при температуре жидкого азота (—190°) в смеси эфир — изопентан — спирт происходит выцветание, которое усиливается в присутствии хинона и объясняется фотоокислением. Процесс обратим при размораживании раствора.

Толлин и Грин [14] наблюдали при освещении системы хлорофилл — хинон в той же «жесткой» среде появление сигнала ЭПР со спектром семихинона, что служит указанием на одновременно идущее «одноэлектронное» фотоокисление хлорофилла. Эти результаты можно также интерпретировать как сенсибилизированное хлорофиллом восстановление хинона с использованием компонентов растворителя в качестве донора электрона. Мы нашли, что в вязкой спирто-глицериновой среде при —70° наблюдается

обратимое фотоокисление хлорофилла *a* и его аналогов *n*-бензохиноном [15]. Тушение флуоресценции хлорофилла кислородом, хиноном [16; 17] и нитросоединениями [18], при котором не удалось обнаружить обратимых фотохимических изменений пигмента, может рассматриваться как обратимое «одноэлектронное» окисление возбужденной молекулы хлорофилла молекулами окислителя.

Целью настоящей работы явилось систематическое исследование фотоокисления хлорофилла и его аналогов в растворах и сравнение спектров поглощения продуктов фотохимического взаимодействия пигментов с окислителями и восстановителями. В связи с этим были изучены фотохимическое восстановление пигментов и фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода в вязких средах.

МЕТОДИКА

В работе использовали хлорофилл *a* и *b*, полученные путем хроматографии на сахарозе смеси хлорофиллов *a*+*b*, выделенной из крапивы. Бактериохлорофилл выделяли из пурпурных серобактерий *Rhodopseudomonas palustris* путем экстрагирования пигмента метиловым спиртом, бактериовиридин — из зеленых серобактерий *Chlorobium thiosulfutophilum* и *Chloropseudomonas ethylicum* — экстрагированием ацетоном с последующим переводом пигментов в серный эфир и очисткой хроматографированием на сахарозе. Протохлорофилл экстрагировали ацетоном из увлажненных семян тыквы с последующим переведением пигмента в серный эфир и хроматографической очисткой на бумаге с использованием смеси Годнева. Феофитин *a* получали из хлорофилла *a* по методу Фишера и Штерна.

В качестве окислителей использовали кислород воздуха, *n*-бензохинон (х. ч., возогнанный на воздухе), антрахинон, 2-метил-1,4-нафтохинон (х. ч., менадион), 2,3-диметокси-5-метил-бензохинон и убихинон [15] (коэнзим Q_3). Восстановителями служили аскорбиновая кислота и сернистый натрий.

Опыты проводили в вакуумных трубках Тунберга. В трубку вводили требуемое количество эфирного раствора исследуемого пигмента, снятого с соответствующей зоны хроматограммы на сахаре, эфир удаляли испарением в вакууме, приливали этиловый спирт или пиридин и затем глицерин. В некоторых опытах перед приливанием глицерина добавляли различные хиноны или аскорбиновую кислоту. Оптическая плотность (E) в красном максимуме поглощения пигментов была 0,8—1,0, т. е. концентрация $\sim 10^{-5}$ *M*. Освещение раствора производили красным светом кинолампы 300 *вт*, сфокусированным при помощи двухлинзового конденсора на трубку с раствором. Применяли красный светофильтр КС-13, пропускающий свет длиннее 630 *ммк* (интенсивность освещения $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ *эрг/см²·сек* в области 710—630 *ммк*).

В опытах с хлорофиллом *b* и протохлорофиллом применяли светофильтр ОС-12. Между источником света и исследуемым раствором помещали тепловой водяной фильтр толщиной 40 *мм*. О ходе реакции судили по изменению E в красном максимуме поглощения пигментов при непрерывном освещении или при чередующихся периодах света и темноты. Опыты с хинонами и аскорбиновой кислотой проводили в вакууме; перед добавлением глицерина растворяли 5 *мг* хинона в спиртовом и 5 *мг* аскорбиновой кислоты в пиридиновом растворе; общий объем 4 *мл*. Перед откачкой воздуха отмечали меткой объем, приливали 1,5 *мл* спирта или 1 *мл* пиридина и эвакуировали при сильном взбалтывании до прекращения кипения раствора с испарением дополнительно добавленного растворителя. С парами растворителя удалялся растворенный кислород воздуха.

Опыты проводили при температуре 20° и —70°; в последнем случае трубку с раствором помещали в прозрачный сосуд Дьюара, содержащий охлаждающую смесь (спирт с твердой углекислотой). Измерение производили на спектрофотометрах СФ-4 и СФ-10 в специальной колодке, допускающей измерения непосредственно в трубках Тунберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фотохимическое окисление

Реакция с кислородом. В первой серии опытов мы исследовали фотохимическое окисление хлорофилла *a* и *b*, бактериохлорофилла, бактериовиридина, протохлорофилла и феофитина *a* растворенным кислородом воздуха в спирто-глицериновых растворах. Опыты проводили при 20° и при —70°. Для всех исследуемых пигментов при понижении температуры наблюдалось некоторое увеличение оптической плотности. По мере освещения наблюдали падение оптической плотности и изме-

нение ее в темноте (в опытах при 20° трубку помещали в колодку спектрофотометра; в опытах при —70° трубку держали в сосуде с охлаждающей смесью). После периода освещения до момента измерения обычно проходило 15—20 сек. В этих опытах нам не удалось обнаружить заметных обратимых эффектов. Явный эффект обратимости наблюдался только после добавления в опытную смесь аскорбиновой кислоты или при введении аскорбиновой кислоты в среду до начала освещения. Результаты сравнительного изучения скорости выцветания исследуемых пигментов при деструктивном окислении кислородом воздуха приведены на рис. 1. Так как скорость выцветания бактериальных пигментов несоизмеримо выше, чем у пигментов зеленых растений, масштаб времени дан в логарифмическом выражении.

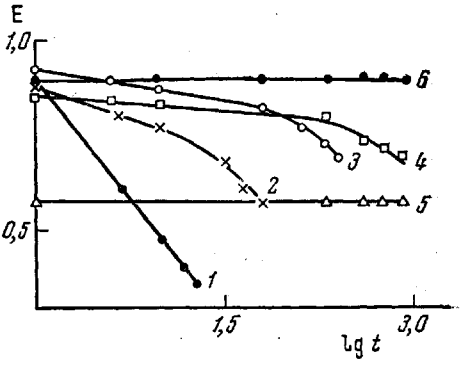


Рис. 1. Скорость фотоокисления пигментов кислородом воздуха в спирто-глицериновой среде (1 : 2) при 28°

Падение оптической плотности в красном максимуме поглощения пигментов при освещении через светофильтры КС-13 и НС-3 в опытах с хлорофиллом *a*, бактериохлорофиллом, бактериовиридином и феофитином *a*, а также через светофильтры ОС-12 и НС-3 в опытах с хлорофиллом *b* и протохлорофиллом. *1* — бактериохлорофилл; *2* — бактериовиридин; *3* — хлорофилл *a*; *4* — хлорофилл *b*; *5* — протохлорофилл; *6* — феофитин *a*. *t* — в мин.

Анализ влияния температуры на скорость фотоокисления исследованных пигментом показал, что понижение температуры до —70° приводит к ускорению реакции в опытах с хлорофиллом *a* и незначительному замедлению в опытах с бактериохлорофиллом и бактериовиридином. Наши опыты показали также, что понижение температуры до —70° не ведет к увеличению эффекта тушения флуоресценции хлорофилла растворенным кислородом; можно думать поэтому, что в этих условиях не происходит стабилизации комплексов кислорода с невозбужденными или синглетными возбужденными молекулами хлорофилла. Это указывает на возможную стабилизацию при низкой температуре предреакционных комплексов хлорофилла (вероятно, в триплетном состоянии) с кислородом. Возможно также, что хлорофилл *a* при низких температурах склонен вступать в темновое взаимодействие с кислородом с образованием лабильного молекулярного комплекса, внутри которого и осуществляется перенос электрона при поглощении кванта света [19].

Реакция с хинонами. В следующей серии опытов мы наблюдали за обратимым выцветанием исследуемых пигментов в присутствии *n*-бен-

Таблица 1

Обратимое изменение оптической плотности (ΔE) в красном максимуме поглощения при окислении пигментов *n*-бензохиноном (ΔE ± 0,01)

Знаки: минус — падение E за 2 мин. света (*C*), плюс — возрастание за 2 мин. темноты (*T*)

Пигмент	ΔE·1000 при световой реакции (*C* — *T*)	ΔE·1000 при темновой обратной реакции (*T* — *C*)	Регенерация пигмента, %
Бактериохлорофилл	—170	+140	82
Бактериовиридин	—140	+110	82
Хлорофилл *a*	—120	+110	90
Хлорофилл *b*	—50	+30	60
Протохлорофилл	—20	+20	33
Феофитин *a*	0	0	0

зохинона в спирто-глицериновой среде при температурах 20° и —70°. Освещая опытную смесь при комнатной температуре и при обычной процедуре измерения, мы не наблюдали изменений в максимуме поглощения пигмента (во всех случаях измерение через 10—15 сек. после освещения); проводя опыты при —70°, нам удалось обнаружить обратимые эффекты; стояние в темноте при той же температуре ведет к значительной регенерации пигмента (табл. 1).

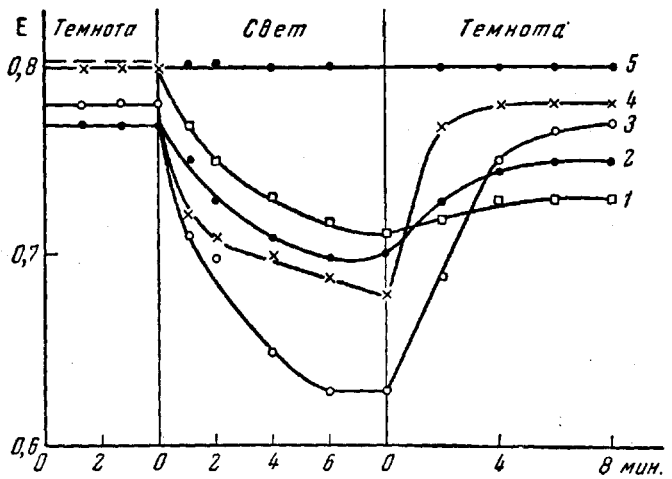


Рис. 2. Обратимое фотохимическое взаимодействие пигментов с *n*-бензохиноном

Изменение оптической плотности (E) в красном максимуме поглощения при прямой (световая) и обратной (темновая) реакциях. *1* — хлорофилл *b* (645 *ммк*); *2* — хлорофилл *a* (665 *ммк*); *3* — бактериохлорофилл (770 *ммк*); *4* — бактериовиридин (665 *ммк*); *5* — феофитин *a* (665 *ммк*)

Из данных табл. 1 видно, что обратная реакция с *n*-бензохиноном наблюдалась со всеми пигментами, кроме феофитина, что согласуется с известным фактом большей трудности окисления этого пигмента кислородом (правда, остается возможность быстрой обратной реакции, которая может иметь место и в данных условиях). Неполную регенерацию пигмента после обратной реакции в темноте следует объяснить необратимыми реакциями, возможно с участием следов кислорода в системе.

На рис. 2 приведены результаты опытов по сравнению скорости взаимодействия исследуемых пигментов с *n*-бензохиноном при освещении красным светом в течение 8 мин. при —70°. Из хода кривых ясно видно, что изменение E в красном максимуме поглощения пигментов имеет место только при освещении; при выключении света идет обратная реакция. Наблюдается некоторое различие в скорости реакции. По скорости взаимодействия с *n*-бензохиноном пигменты располагаются в следующем порядке: бактериохлорофилл, бактериовиридин, хлорофилл *a*, хлорофилл *b*; с феофитином *a* реакция совсем не наблюдалась. Эти результаты согласуются с данными, полученными в опытах по изучению скорости фотохимического окисления этих пигментов молекулярным кислородом. Контрольные опыты показали, что в отсутствие кислорода или хинона в вакууме растворы пигментов в данной среде устойчивы к воздействию света, 15-минутное освещение не приводит к изменениям поглощения.

При действии красного света происходит обратимое фотохимическое

взаимодействие пигмента (X) с хиноном (Хин) с образованием семихинона, предположительно согласно реакции

$$X + Хин \rightleftarrows .X^{+} + .Хин^{-}. \qquad (1)$$

Действие красного и «белого» света. Существенно отметить, что обратимый эффект в этой реакции наблюдается только при действии красного света определенной длины волны. На рис. 3 приведен один из опытов, где видна разница в ходе реакции при освещении светом разных

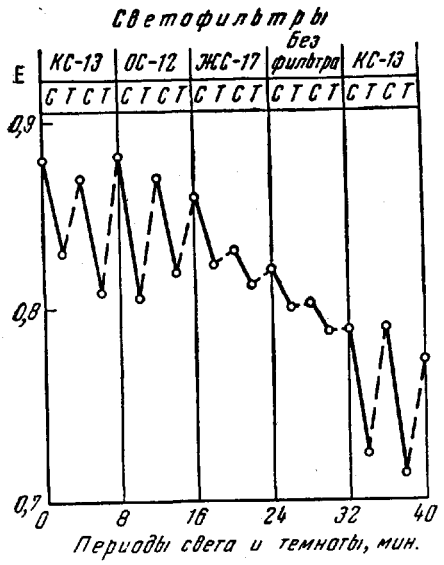


Рис. 3. Изменение оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла *a* системы хлорофилл *a*—*n*-бензохинон при освещении светом разных длин волн

Температура — 70°. Здесь и далее *С* — свет; *Т* — темнота

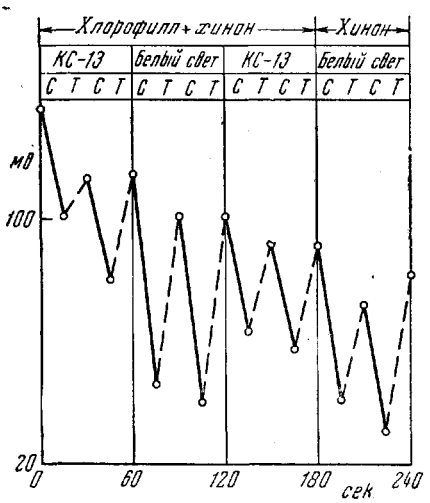


Рис. 4. Изменение фотопотенциала системы хлорофилл — *n*-бензохинон при освещении красным и белым светом

длин волн. Проводя поочередное освещение опытной смеси хлорофилла *a* с *n*-бензохиноном красным (КС-13) и оранжевым (ОС-12) светом, мы наблюдали и в том и в другом случае явную картину обратимости. При действии желтого (фильтр ЖО-17, пропускающий свет от 480 *ммк*) и «белого» света наблюдается необратимое падение оптической плотности в максимуме поглощения. Чтобы показать, что это не вызвано затуханием реакции, опять освещали красным светом и наблюдали обратимый эффект. Это явление может быть объяснено тем, что продукт окисления хлорофилла *a* *n*-бензохиноном имеет максимум поглощения около 480 *ммк* (см. рис. 6) и действие «белого» света вызывает быстрые необратимые превращения этого продукта; одновременно происходит фотохимическое взаимодействие хинона (Хин) со средой (АН) с образованием семихинона по уравнению

$$Хин + АН \rightarrow .Хин^{-} + .АН^{+} \qquad (2)$$

с последующей реакцией превращенных форм пигмента (см. уравнение (1)) с семихиноном:

$$.Хин^{-} + .X^{+} \rightarrow Хин + X. \qquad (3)$$

Для проверки этой возможности мы провели измерение фотопотенциала по методике, принятой в нашей лаборатории [20], в системе хлорофилл — хинон в спирто-глицериновом растворе при освещении красным и «белым» нефильтрованным светом, а также измерение фотопотенциала хинона без хлорофилла в том же растворителе. Эти опыты показали (рис. 4), что освещение «белым» светом хинона без хлорофилла ведет к быстрому, обратимому в темноте появлению фотопотенциала (обратимое уменьшение положительного потенциала), что указывает на образование семихинона при фотовосстановлении хинона спиртом или глицерином. Эта система в присутствии хлорофилла при освещении красным светом дает меньший сдвиг потенциала в ту же сторону. Сдвиг фотопотенциала в отрицательную сторону в этом случае можно приписать образованию семихинона (.Хин$^-$) согласно реакции (1) или сенсибилизированному хлорофиллом образованию семихинона с использованием растворителя как исходного донора водорода (уравнение (2)).

Кроме того, следовало выяснить, нельзя ли приписать наблюдаемые обратимые изменения оптической плотности в красном максимуме поглощения фотовосстановлению пигмента гидрохиноном, который мог бы образоваться при реакции хинона с глицерином и спиртом за счет фотосенсибилизированной реакции или в темноте. В контрольных опытах, поставленных с хлорофиллом *а* и гидрохиноном, а также с хиноном в присутствии аскорбиновой кислоты, нам не удалось обнаружить изменений хлорофилла *а*.

В следующей серии опытов мы изучали взаимодействие разных хинонов с хлорофиллом *а*. Опыты ставили по той же методике при температуре —70°. Обратимая фотореакция наблюдалась с *п*-бензохиноном и с 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном; с 2-метил-1,4-нафтохиноном реакция шла слабо; с антрахиноном и коэнзимом Q_3 она не наблюдалась вообще (табл. 2).

Таблица 2

Фотохимическое взаимодействие хлорофилла *а* с разными хинонами

Обратимое изменение E_{665} ($\Delta E+0{,}01$). Знаки: минус — падение E, плюс — возрастание

Хинон	ΔE·1000 при световой реакции	ΔE·1000 при обратной реакции в темноте	Регенерация пигмента, %
п-Бензохинон	—120	+110	90
2,3-Диметокси-5-метилбензохинон	—110	+80	73
2-Метил-1,4-нафтохинон	—30	+20	70
Убихинон [15] (коэнзим Q_3)	0	0	0
Антрахинон	0	0	0

Толлин и Грин [14], показавшие возникновение сигнала ЭПР со спектром семихинона при освещении хлорофилла с различными хинонами в органических растворителях при —196°, не наблюдали эффекта с коэнзимом Q_6. Известно, что величина E_0^1 убихинона (близкого по структуре соединения) составляет +0,122 *в* [21], т. е. ниже, чем у *п*-бензохинона (+0,3 *в*). По-видимому, в данных условиях реакция наблюдается с окислителями, обладающими E_0^1 от +0,2 до +0,3 *в*. Из данных табл. 2 видно, что реакция взаимодействия хлорофилла *а* наиболее полно идет с *п*-бензохиноном и с 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном. Подобные результаты были получены и в опытах с бактериохлорофиллом. Учитывая все полученные результаты, наблюдаемый эффект можно приписать фотоокислению пигментов хиноном.

В системе этиловый спирт — глицерин [1; 2] при данной постановке эксперимента (измерение оптической плотности в красном максимуме поглощения пигмента через 15 сек. после действия света при температуре от 20 до —70°) не удалось наблюдать образования обратимо реагирующих продуктов фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой. При 20° освещение ведет к постепенному падению оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла, которое следует приписать необратимому фотовосстановлению. Без аскорбиновой кислоты этот эффект не наблюдается. В системе пиридин — глицерин (1 : 2) в присутствии аскорбиновой кислоты освещение вело к обратимому образованию красной фотовосстановленной формы, тогда как при —70° в «леденце» эта реакция не идет. В пиридине при —70° наблюдается фотовосстановление с образованием красной формы, которое протекает значительно медленнее, чем при комнатной температуре (табл. 3).

Таблица 3

Скорость фотовосстановления хлорофилла *a* аскорбиновой кислотой в вакууме в разных средах при 20° и —70°

Скорость выражена отношением $100 \cdot \Delta E/t$ за первые 3—6 мин. фотореакции в красном максимуме

°С	Спирт	Спирт + глицерин	Пиридин	Пиридин + глицерин	Фосфорная кислота	Фосфорная кислота + глицерин
20	93	13	270	187	15	18
—70	0	0	35	0	0	0

Евстигнеев и Гаврилова [22] нашли, что скорость образования «первичной» фотовосстановленной формы феофитина не зависит от температуры, если вязкость среды меняется мало. Если вязкость увеличивается за счет введения глицерина, скорость реакции уменьшается. При замерзании раствора реакция вообще не идет, что указывает на необходимость кинетических соударений.

В растворителях без аскорбиновой кислоты реакция практически не идет. Из табл. 3 видно, что фотовосстановление при комнатной температуре идет во всех средах с разной скоростью. Однако в высоковязких средах при —70° реакция практически останавливается, что может служить указанием на диффузионные стадии при образовании устойчивых продуктов фотовосстановления.

Измерение фотопотенциала в системе хлорофилл — аскорбиновая кислота показало, что в пиридине и в смеси пиридина с глицерином наблюдается обратимое появление фотопотенциала. В этой смеси при 20° сильно замедляется обратная реакция. При —70° в смеси пиридина с глицерином эффект появления потенциала полностью отсутствует, что указывает на необходимость диффузии фотопродуктов и перемещения ионов для наблюдения фотопотенциала электрода.

Реакции в фосфорной кислоте. Хлорофилл и феофитин хорошо растворяются в ортофосфорной кислоте с образованием растворов сине-зеленого цвета с яркой красной флуоресценцией [15]. Спектры поглощения и флуоресценции хлорофилла *a* и феофитина *a* в этой среде одинаковы (рис. 5, *A*), что свидетельствует о феофитинизации хлорофилла в ортофосфорной кислоте. Измерение фотопотенциала раствора хлорофиллов $a+b$ с аскорбиновой кислотой в фосфорной кислоте показало, что при чередующихся коротких периодах света и темноты вначале про-

исходят обратимые изменения фотопотенциала (уменьшение положительного потенциала). При более длительном освещении обратимость исчезает и наблюдается постепенное уменьшение положительного потенциала (рис. 5, *Б*). Проводя измерения на спектрофотометре, мы также смогли обнаружить небольшие (в пределах ±0,02 Е) обратимые изменения поглощения пигмента в красном максимуме поглощения при чередующихся периодах света и темноты. При понижении температуры до —20° в переохлажденной прозрачной высоковязкой фосфорной кислоте фотореакция прекращается.

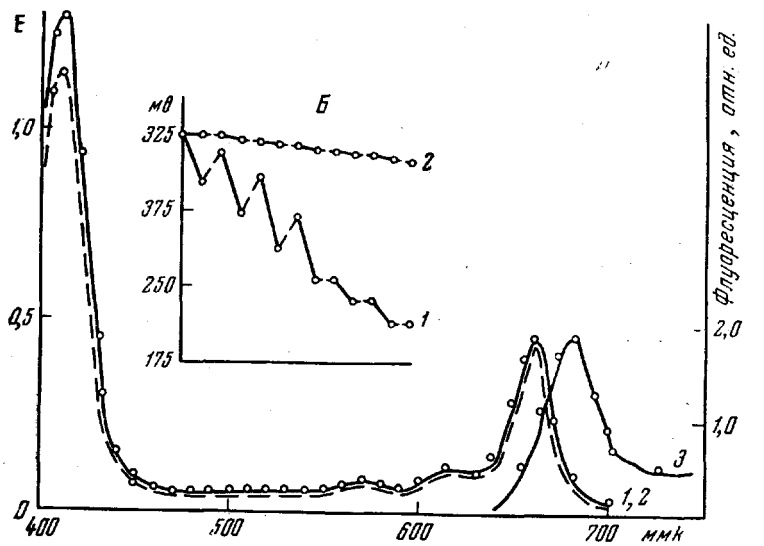


Рис. 5. Спектральные и фотохимические свойства хлорофилла в ортофосфорной кислоте

А: 1 — спектры поглощения хлорофилла *а*; *2* — феофитина *а*; *3* — флуоресценция в отн. ед. (возбуждение синими линиями ртути, выделяемыми светофильтром СЗС-3). *Б*: изменение фотопотенциала в той же системе: *2* — хлорофиллы *а+b*; *1* — хлорофилл *а+b*+аскорбиновая кислота. Свет — 1 мин.; темнота — 2 мин.

В изученных вязких средах наблюдаемая фотореакция связана со стадиями, требующими диффузии; для сравнения представляло интерес измерить фотовосстановление рибофлавина, идущее внутримолекулярно. Растворы рибофлавина в спирте и в смеси спирта с глицерином освещали «белым» светом при температурах 20 и —70° (рис. 6). Во всех случаях наблюдали фотовосстановление, даже в практически неподвижной среде (спирт — глицерин при —70°), что подтверждает внутримолекулярный механизм процесса. В тех же условиях хлорофилл, сафранин и метиловый красный без донора водорода не изменяются.

Дифференциальные спектры поглощения окисленных и восстановленных форм. В связи с развитием техники дифференциальной спектроскопии в литературе обсуждается вопрос о наличии в живых фотосинтезирующих организмах фотохимически измененных форм хлорофилла и его аналогов. В поисках этих форм может помочь знание дифференциальных спектров поглощения продуктов фотохимического взаимодействия пигментов с окислителями и восстановителями.

В данной работе эти измерения осуществлены в вязкой спирто-глицериновой среде при реакции пигментов с хиноном и кислородом и в пиридин-глицериновой среде при реакции с аскорбиновой кислотой.

В вязких средах при низкой температуре достигается стабилизация промежуточных продуктов, делающая возможным снятие спектров поглощения на регистрирующем спектрофотометре (СФ-10).

Для получения дифференциальных спектров поглощения при фотохимическом окислении пигментов в качестве окислителя использовали *n*-бензохинон (5 *мг*) и кислород воздуха. Опыты с *n*-бензохиноном проводили также в спирто-глицериновой среде при —70°. Снимали спектры поглощения пигментов перед освещением (после 5—10-минутного стояния трубки с раствором в сосуде Дюара) в области от 400 до 750 *ммк* на спектрофотометре СФ-10 и от 750 до 900 *ммк* (в опытах с бактериохлорофиллом) на спектрофотометре СФ-4. Освещали при —70° 2 мин., снимали спектр, затем размораживали для более быстрого и полного прохождения обратной реакции, погружали в сосуд Дюара на 5 мин. и снова снимали спектр. По этим данным строили дифференциальные спектры свет — темнота (спектр поглощения до освещения минус спектр поглощения после освещения). В опытах с кислородом спирто-глицериновые растворы пигментов освещали при 20° до уменьшения оптической плотности, соответствующей опыту с хиноном ($\Delta E \sim 0{,}1$—$0{,}2$). В этом случае преобладало необратимое окисление: часть окисленного пигмента можно регенерировать добавлением аскорбиновой кислоты, что мы наблюдали ранее [4], наиболее отчетливо в случае бактериохлорофилла [5]. Как известно, исследуемые нами пигменты реагируют с кислородом с разной скоростью, поэтому в случае быстро окисляющихся бактериохлорофилла и бактериовиридина мы уменьшили интенсивность освещения в десять раз введением нейтрального светофильтра НС-3 и сократили время освещения до 10 сек. в опытах с бактериохлорофиллом и до 1 мин.— с бактериовиридином. Хлорофиллы *a* и *b* и феофитин освещали через красный светофильтр КС-13 более длительное время.

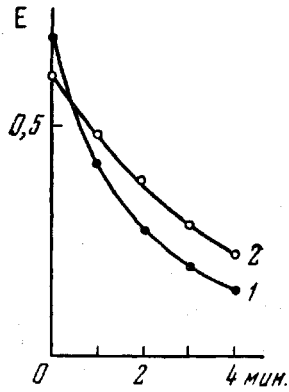
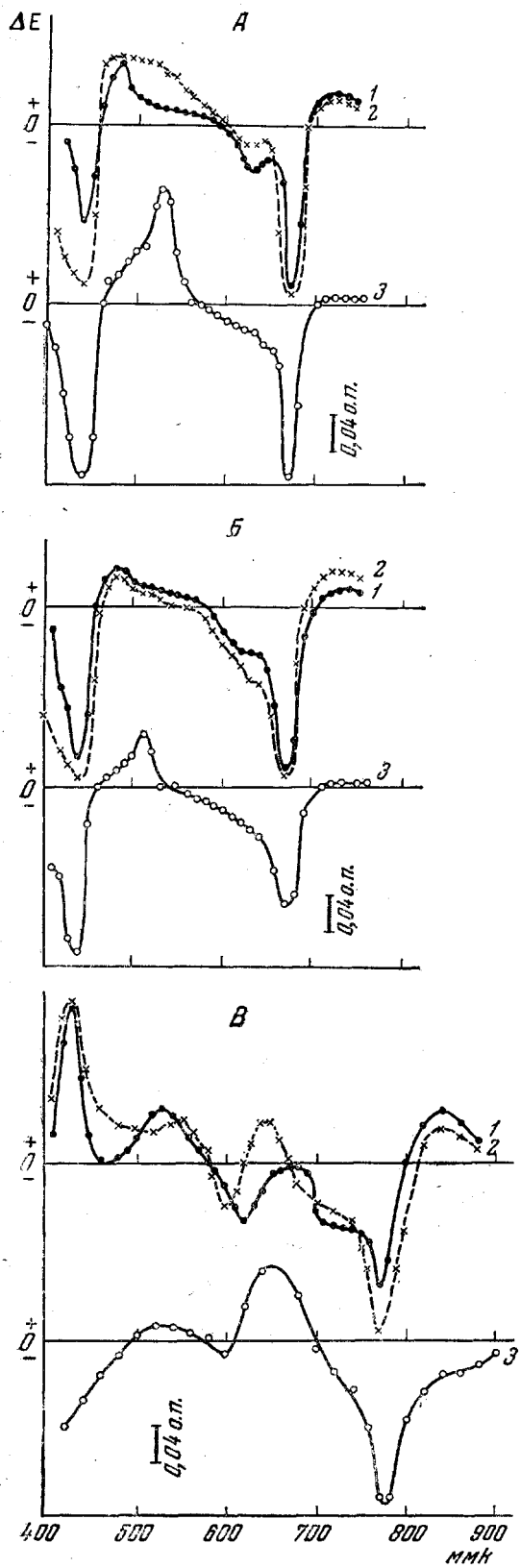


Рис. 6. Фотовосстановление рибофлавина в подвижной и неподвижной средах

Изменение оптической плотности при освещении белым светом дано в максимуме поглощения рибофлавина при 460 *ммк*. Смесь спирт — глицерин (1:2). *1* — при 20°, *2* — при —70°

Фотовосстановление хлорофилла *a* и бактериовиридина проводили аскорбиновой кислотой (5 *мг*) в пиридин-глицериновом растворе. В случае бактериохлорофилла быстрое обратимое восстановление с аскорбиновой кислотой не удается наблюдать в вязкой среде, поэтому опыты с бактериохлорофиллом проводили в пиридине и в качестве восстановителя использовали свежеприготовленный водный раствор сернистого натрия (0,1 *мл* раствора, содержащего 10 *мг* Na_2S) [23]. Из-за быстрой обратной реакции при комнатной температуре производили освещение и последующие измерения при —15°. Для всех пигментов снимали спектры поглощения до освещения и после освещения. По этим данным построены дифференциальные спектры (свет — темнота). Фотовосстановление наблюдалось со всеми пигментами.

Рассмотрим вид спектров промежуточных форм хлорофилла *a* (рис. 7, *А*). Для обеих реакций (окисления и восстановления) характерно падение «красного» и «синего» максимумов и появления поглощения в средней области видимого спектра при окислении с максимумом при 480 *ммк*, при восстановлении — при 525 *ммк*. При окислении наблюдается появление полосы поглощения ~740 *ммк*; при восстановлении поглощение в близкой инфракрасной области наблюдается лишь при более длительном освещении и в особых условиях [24]. Спектры бактериовиридина подобны хлорофиллу *a*; максимум окисленного продукта лежит при 480 *ммк*, а восстановленного — при 510 *ммк*



(рис. 7, *Б*). В случае бактериохлорофилла (рис. 7, *В*) более отчетливо выражены различия окисленных и восстановленных форм. Окисленные формы характеризуются максимумами при 430, 530 и 840 *ммк*. При окислении кислородом наблюдается, кроме того, увеличение поглощения при 650 *ммк*; для восстановленных форм характерно увеличение поглощения в красной области с максимумом при 650 *ммк*. Во всех случаях обращает на себя внимание сходство дифференциальных спектров поглощения при обратимом окислении пигментов хиноном и преимущественно необратимом — кислородом.

Мы высказывали ранее мысль о возможности фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления хинона с использованием в качестве донора водорода растворителя [15]. При этой реакции образуется семихинон, который вообще мог бы реагировать с пигментом путем как фотоокисления, так и фотовосстановления. Сходство спектров продукта реакции с кислородом указывает на то, что в опытах с хиноном действительно происходит окисление. Во всех случаях мы измеряли спектры относительно устойчивых продуктов и нет уверенности в том, что они соответствуют спектрам

Рис. 7. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении хлорофилла *а* (*А*), бактериовиридина (*Б*) и бактериохлорофилла (*В*)

1 — окисление *п*-бензохиноном; *2* — окисление кислородом, *3* — восстановление аскорбиновой кислотой (в случае бактериохлорофилла—сернистым натрием). 1 *см* по оси ординат соответствует 0,04 ед. оптической плотности

продуктов «одноэлектронного» окисления-восстановления. Большое сходство спектров окисленных и восстановленных форм указывает на то, что в обоих случаях происходит нарушение системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента.

Фотосенсибилизация. В следующей серии опытов мы исследовали фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода в вязких средах различной природы. Для этой цели использовали тройные системы, изученные ранее в работах нашей лаборатории: аскорбиновая кислота — хлорофилл — акцептор электрона (метиловый красный, сафранин и рибофлавин). Изучали сенсибилизированное восстановление акцепторов электрона (преимущественно метилового красного) в разных средах при температуре от 20° до —70°. В системе спирт — глицерин (1 : 2) сенсибилизированное восстановление метилового красного становится все менее эффективным с увеличением вязкости по мере понижения температуры (рис. 8). Так, из хода кривых рис. 8 видно, что реакция при —10° идет медленнее, чем при 20°, а при —40° в этой системе уже не удается наблюдать сенсибилизированной реакции. Существенно, что в этиловом спирте даже при —70° наблюдается быстрая сенсибилизация. Таким образом, эффект связан не с замедлением реакции при понижении температуры, а с увеличением вязкости системы. Сенсибилизированное фотовосстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в системе пиридин — глицерин дает ту же картину. В фосфорной кислоте и в смеси фосфорной кислоты с глицерином наблюдается эффективно идущая сенсибилизация при комнатной температуре, а при —20° (в переохлажденной вязкой системе) процесс полностью останавливается. Сенсибилизированное восстановление сафранина и рибофлавина показывает те же закономерности.

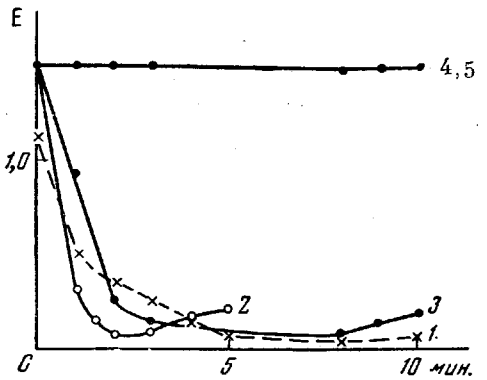


Рис. 8. Изменение оптической плотности (520 *ммк*) при фотосенсибилизированном хлорофиллом восстановлении метилового красного в спирте (*1* и *2*) и в спирто-глицериновой среде (*3*—*5*) при разных температурах

1 — при —70°; *2* — при +20°; *3* — при —10°; *4* — при —40°; *5* — при —70°

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальный материал, полученный при изучении фотохимического восстановления и окисления хлорофилла и его аналогов в вязких средах, свидетельствует о том, что образование фотовосстановленных (аскорбиновой кислотой) продуктов хлорофилла требует диффузионных стадий, так как реакция восстановления не идет в высоковязкой среде при —70°; однако Броди наблюдал фотовосстановление хлорофилла фенилгидразином в жестких средах при низкой температуре [25]. По-видимому, в этом случае возможно образование предреакционного комплекса фенилгидразина (сильного основания и восстановителя) с хлорофиллом, в котором и идет реакция. В отличие от фотовосстановления аскорбиновой кислотой, фотоокислению пигментов благоприятствуют вязкие среды, что указывает на возможность предреакционного связывания хлорофилла с кислородом [19]. Элементарные процессы переноса электрона в системе хлорофилл — донор электрона

или хлорофилл — акцептор электрона могут идти через стадию предварительного образования ассоциатов, в которых участвует либо невозбужденная молекула пигмента, либо возбужденная молекула в синглетном или триплетном состоянии [1].

Изучение взаимодействия пигментов с различными хинонами показало возможность обратимого окисления хлорофилла и его аналогов рядом хинонов в спиртоглицериновой среде при —70° при освещении красным светом. Применение вязких сред в сочетании с низкой температурой дало возможность наблюдать обратимые взаимодействия возбужденных молекул пигментов с молекулами — акцепторами и молекулами — донорами электрона. Пользуясь этой методикой, мы получили дифференциальные спектры поглощения продуктов окисления и восстановления пигментов. Большое сходство этих спектров указывает на то, что при окислении и восстановлении пигментов происходит нарушение системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента.

Исследование короткой цепи фотохимического переноса водорода (донор электрона — пигмент — акцептор электрона) показало, что этот процесс также включает в себя стадии, требующие диффузии компонентов, поскольку реакция этого типа не идет в высоковязкой среде. Эти результаты согласуются с общей картиной ранее предложенных схем сенсибилизации хлорофиллом в растворах.

В каких случаях можно наблюдать накопление измененных — восстановленных или окисленных форм пигментов в организмах? В работающей цепи фотосинтетического переноса электрона акты «восприятия» или «отдачи» электрона хлорофиллом следуют быстро, что затрудняет накопление и обнаружение измененных форм пигмента. Продукты фотохимического превращения хлорофилла могут накапливаться в измеримых количествах лишь при нарушении «нормальной» системы переноса электрона. Например, замораживание организмов до —196° выключает ферментативные стадии и позволяет наблюдать элементарный фотопроцесс; так, в работе Чанса [26] в этих условиях наблюдалось окисление цитохромов при освещении фотосинтезирующих бактерий. В работе Витта [27] применение мощных световых импульсов, при которых фотопродукты накапливаются и не успевают использоваться в ферментативных стадиях процесса, позволило обнаружить разнообразные спектральные изменения пигментов. Введение избытка окислителей или восстановителей, которые блокируют отдельные ветви переноса электрона, а также ферментативных ядов, нарушающих сопряжение отдельных участков цепи переноса электрона, позволяет наблюдать накопление измененных форм пигментов. Освещение хроматофоров в присутствии кислорода и Fe^{+++} позволило Годхеру [6] выявить окислительные превращения бактериохлорофилла.

Однако при всех фотохимических изменениях хлорофилла независимо от типа элементарного процесса должны наблюдаться обратимые изменения в «красном» максимуме поглощения хлорофилла. В нашей лаборатории было показано, что изменения такого рода значительно осложнены эффектом сильного увеличения флуоресценции хлорофилла (возбуждаемой измеряющим монохроматическим пучком) под действием сильного светового импульса [28]. При этом разные формы хлорофилла обладают различной фотохимической активностью.

При рассмотрении природы первичного превращения хлорофилла следует указать на аналогию с работой цитохромов в цепи переноса электрона в митохондриях. В работающей циклической или открытой системе теряет значение вопрос о том, что первично — окисление или восстановление цитохрома. При спектроскопическом наблюдении накопление восстановленного или окисленного цитохрома зависит от метаболического режима — наличия субстратов — доноров электрона, степени аэрации. Равным образом наблюдение за накоплением измененных

форм хлорофилла будет зависеть от условий эксперимента. Работа цепи фотосинтетического переноса электрона будет такой же независимо от порядка чередования элементарных процессов (обратимое восстановление или окисление хлорофилла). В соответствии с современными представлениями, в цепи переноса электрона при фотосинтезе существуют ветви, работающие в окислительной и восстановительной областях, которым соответствуют два типа фотореакций. В окислительной и восстановительной ветвях переноса электрона при фотосинтезе можно искать оба типа элементарных реакций хлорофилла — обратимое фотовосстановление ($X \rightleftarrows .X^-$) и обратимое фотоокисление ($X \rightleftarrows .X^+$).

ВЫВОДЫ

Изучали фотохимические реакции хлорофилла, бактериохлорофилла, бактериовиридина и других аналогов хлорофилла в вязких средах — смеси спирта и пиридина с глицерином и в ортофосфорной кислоте. Быстрое фотоокисление исследованных пигментов кислородом воздуха наблюдается как при 20°, так и при —70°, что указывает на возможность предреакционного связывания пигментов с кислородом. Бактериохлорофилл и бактериовиридин подвергаются окислению быстрее других пигментов.

Изучено обратимое фотохимическое окисление хлорофилла и его аналогов хинонами в вязких средах при низких температурах. Реакция наблюдается при действии света, $\lambda > 530$ *ммк*. При освещении желтым или «белым» светом происходит необратимое падение оптической плотности, что связано, по-видимому, с необратимыми превращениями фотоокисленных форм пигментов или же с прямым фотохимическим восстановлением хинона и реакцией превращенных форм пигментов с семихиноном.

Изучение фотовосстановления спектрофотометрическим и потенциометрическим методами показало, что в изученных высоковязких средах реакция практически останавливается, что может служить указанием на наличие диффузионных стадий при образовании продуктов фотовосстановления.

Измерены дифференциальные спектры поглощения продуктов фотохимического окисления (*n*-бензохиноном и кислородом) и восстановления (аскорбиновой кислотой и сернистым натрием в случае бактериохлорофилла) хлорофилла *a*, бактериохлорофилла и бактериовиридина. Во всех случаях наблюдается сходство дифференциальных спектров поглощения при обратимом окислении пигментов хиноном и преимущественно необратимом — кислородом.

Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление ряда акцепторов электрона становится все менее эффективным с увеличением вязкости по мере понижения температуры. Работа короткой цепи переноса электрона (донор электрона — пигмент — акцептор электрона) включает стадии, требующие диффузии компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Успехи химии **29**, 376, 1960
2. Aronoff S., Mackinney G., J. Amer. Chem. Soc. **65**, 956, 1943
3. Дилунг И. И., Укр. хім. ж. **24**, 202, 1958
4. Красновский А. А., Докл. АН СССР **58**, 617; 835, 1947
5. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР **81**, 879, 1951
6. Годхер Г. К., Структура и функция фотосинтетического аппарата, стр. 330 (пер. с англ.). ИЛ, М., 1962
7. Rabinowitch E., Weiss J., Proc. Roy. Soc. **162**, 251, 1937
8. Ашкинази М. С., Гликман Г. С. и Даин Б. Я., Докл. АН СССР **73**, 743, 1950
9. Буцко С. С., Даин Б. Я., Укр. хім. ж. **27**, 314, 1961
10. Евстигнеев В. Б. и Теренин А. Н., Докл. АН СССР **81**, 223, 1951

11. Евстигнеев В. Б., Биофизика **8**, 664, 1963
12. Качан А. А. и Даин Б. Я., Докл. АН СССР **80**, 619, 1951
13. Linsaitz H., Rennert J., Nature **169**, 193, 1952
14. Tollin G., Green G., Biochim. et biophys. acta **60**, 524, 1962
15. Красновский А. А. и Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР **150**, 1378, 1963; **153**, 721, 1963
16. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А. и Красновский А. А., Докл. АН СССР, **74**, 315, 1950
17. Евстигнеев В. Б. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **60**, 623, 1948
18. Дилунг И. И. и Чернюк И. И., Докл. АН СССР **140**, 162, 1961
19. Дилунг И. И. и Карпитская В. Е., Докл. АН СССР **152**, 367, 1963
20. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **92**, 381, 1953
21. Redfearn E. R., Symposium on Quinones in Electron Transport, стр. 357. Ciba Foundation, L., 1961
22. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Ж. физ. хим. **32**, 969, 1958; Докл. АН СССР **114**, 1066, 1957
23. Красновский А. А. и Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **135**, 1258, 1960
24. Красновский А. А. и Войновская К. К., Докл. АН СССР **112**, 911, 1957
25. Brody S. S., J. Amer. Chem. Soc. **82**, 1570, 1960
26. Chance B., Nishimura M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **46**, 19, 1960
27. Витт Х., Тр. V Междунар. биохим. конгресса, т. 6, стр. 67. Изд. АН СССР, 1962
28. Карапетян В. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР **144**, 1428, 1963; Биофизика **8**, 191, 1963

Поступила в редакцию
14.IX 1964

REVERSIBLE PHOTOCHEMICAL OXIDATION AND REDUCTION OF CHLOROPHYLL, BACTERIOCHLOROPHYLL AND BACTERIOVIRIDIN IN VISCOUS MEDIA

N. N. DROSDOVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Photooxidation of the pigments studied by molecular oxygen proceeds rapidly at either +20° or —70°. Bacteriochlorophyll and bacterioviridin are oxidized at a higher rate than the other pigments. Reversible photochemical oxidation of chlorophyll and of its analogues by quinones occurs in viscous medium at —70°. The reaction proceeds upon illumination with the light with wavelengths longer than 530 *mμ*.

In highly viscous media the photoreduction reaction is practically blocked which may be indicative of diffusion stages upon formation of photoreduction products.

Differential absorption spectra of the products of photooxidation (by *p*-benzoquinone and oxygen) and reduction (by ascorbic acid and sodium sulphide in the case of bacteriochlorophyll) show that the oxidation and reduction of chlorophyll *a* and of bacterioviridin are accompanied by a drop in the «red» and «blue» maxima and the appearance of absorption in the «medium» range of the visible spectrum with oxydation maximum at 480 *mμ* and reduction at 525 *mμ* for chlorophyll *a*, and 510 *mμ* for bacterioviridin. Oxidation of chlorophyll *a* is accompanied by appearance of an absorption band at 740 *mμ*. In the case of bacteriochlorophyll the oxidized forms are distinguished by maxima at 430, 530 and 840 *mμ*. The reduced forms are characterized by increased absorption in the red range at 650 *mμ*.

Reduction of a variety of electron acceptors photosensitized by chlorophyll becomes less effective with increase in viscosity caused by a decrease in temperature.

БИОФИЗИКА

Том X, вып. 2 1965

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.37

ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ СПЕКТРОВ ЗЕЛЕНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Н. В. КАРАПЕТЯН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В последние годы при помощи метода дифференциальной спектрофотометрии фотосинтезирующих организмов получено большое количество данных о природе световых реакций фотосинтеза. В настоящее время исследованы дифференциальные спектры поглощения свет — темнота листьев высших растений, различных водорослей и пурпурных бактерий. В интактных организмах обнаружены фотосенсибилизированные хлорофиллом и бактериохлорофиллом превращения пиридиннуклеотидов, цитохромов и хинонов, связанные с участием этих соединений в фотосинтетических реакциях. Однако вопрос о превращениях самого хлорофилла остается пока открытым.

При освещении пурпурных бактерий Дейзенс [1] обнаружил уменьшение основных максимумов поглощения бактериохлорофилла и появление нового максимума при 790 *ммк*. Мы нашли, что изменения в красной области спектра, наблюдаемые при освещении зеленых растений и водорослей, обусловлены преимущественно изменениями флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом, под действием интенсивного освещения [2]; к тем же выводам пришли Рубинштейн и Рабинович [3]. У пурпурных бактерий, помимо изменений поглощения, при освещении также было обнаружено усиление флуоресценции [2; 4].

Мало исследованы зеленые бактерии, содержащие аналог хлорофилла — бактериовиридин. Олсон и Сибесма [5] сообщили об изменениях в коротковолновой области видимого спектра, приписанных превращениям цитохрома *c*; Сибесма и Вреденберг [6] описали изменение поглощения при 840 *ммк*, обусловленное, по их мнению, бактериовиридином в особом состоянии. При этом не было обнаружено изменений в «красном» (750 *ммк*) и «синем» (460 *ммк*) максимумах поглощения бактериовиридина. Представляло интерес исследовать дифференциальные спектры зеленых бактерий в красной области с конечной целью обнаружить превращения бактериовиридина при фотосинтезе и определить природу этих превращений.

Исследования проводили на зеленых бактериях *Chloropseudomonas ethylicum* [1]. Бактерии выращивали на минеральной среде с добавлением 0,1%-ного этанола. 2-дневные культуры бактерий концентрировали

[1] Культуры бактерий были любезно предоставлены Е. Н. Кондратьевой (кафедра микробиологии МГУ).

центрифугированием при 12 000 *об/мин* в течение 10 мин., суспендировали в культуральной среде до необходимой плотности и помещали в кювету толщиной 5 *мм*. Измерения проводили на установке для дифференциальной спектрофотометрии, описанной нами ранее [2]. Интенсивность «белого» импульсного действующего света была выше 10^6 *эрг/см²·сек*. Установка позволяла регистрировать изменения поглощения до 0,1%, протекающие за время порядка 0,01 сек.

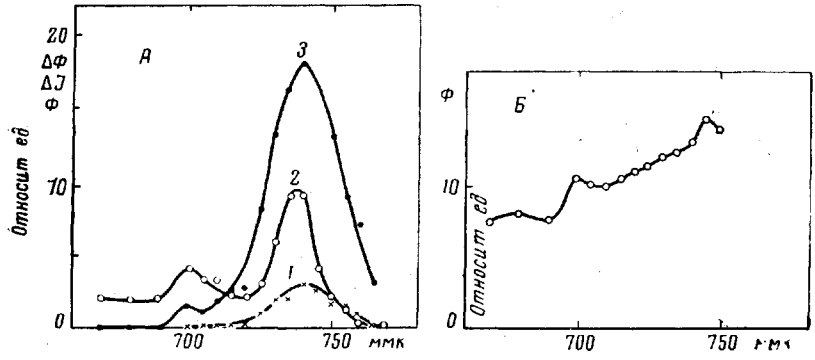


Рис. 1.

А — спектральные кривые изменения флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом, под действием интенсивных световых импульсов у *Chloropseudomonas ethylicum*. *1* — спектральная кривая изменений флуоресценции (ΔФ), измеренная со светофильтром ИКС-1, помещенным после объекта; *2* — изменения флуоресценции (Δ*J*), измеренные без светофильтра ИКС-1; *3* — спектральная кривая величины флуоресценции (Ф) в зависимости от длины волны измеряющего света, возбуждающего флуоресценцию. *Б* — спектр возбуждения флуоресценции *Chloropseudomonas ethylicum*, измеренный на той же установке

При измерении дифференциальных спектров зеленых бактерий (в отличие от пурпурных) спектральные изменения обнаруживались лишь при использовании бактериальных суспензий с оптической плотностью >2 при 750 *ммк* (в используемой кювете). Эти изменения происходили в течение 1—2 сек. и были также быстро обратимы в темноте. При измерении в области 680—760 *ммк* освещение бактерий вызывало увеличение фототока фотоумножителя, которое должно было отражать увеличение интенсивности прошедшего через объект измеряющего света, т. е. уменьшение поглощения; максимум этих изменений расположен при 740 *ммк* (кривая *2*, рис. 1, *А*). Поскольку в исследуемой спектральной области поглощает только бактериовиридин, наблюдаемые изменения можно было бы объяснить выцветанием бактериовиридина. Однако эти изменения не наблюдались, если после объекта (перед фотоумножителем) помещали интерференционные светофильтры с максимумами пропускания при 700, 725 и 750 *ммк* при соответствующей длине волны монохроматического измеряющего света (рис. 2, *Б*). Следовательно, наблюдаемые изменения не связаны с изменениями поглощения суспензии бактерий при 700, 725 и 750 *ммк* под влиянием световых импульсов. Изменения, хотя и меньшие по величине, наблюдались, если после объекта помещали стеклянный светофильтр ИКС-1, пропускающий свет с длиной волны >760 *ммк* (рис. 2, *В*). Было показано, что при измерении дифференциальных спектров поглощения зеленых бактерий, как и при измерении дифференциальных спектров свет — темнота листьев высших растений и пурпурных бактерий, измеряющий свет, на несколько порядков более слабый, чем действующий, возбуждает измеримую флуоресценцию объекта. Изменениями интенсивности этой флуоресценции под действием световых импульсов обусловлены наблюдаемые спектральные изменения. Флуоресценция зеленых бактерий под действием освещения увеличивается

лишь на 10—20% от исходной величины в отличие от зеленых растений и пурпурных бактерий, у которых относительное изменение флуоресценции достигает 100% и более. Интенсивность возбуждаемой измеряющим лучом флуоресценции, как и величина изменений флуоресценции при освещении, чрезвычайно сильно зависит от физиологического состояния бактерий, их возраста, условий роста, оптической плотности используемой суспензии и т. д.

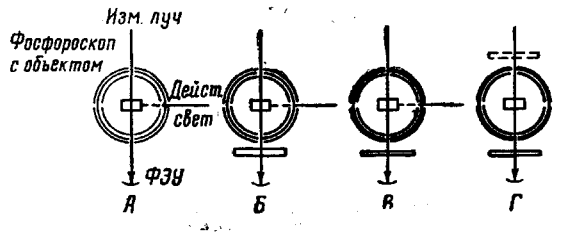


Рис. 2. Схема опытов при регистрации изменений поглощения и изменений флуоресценции у *Chloropseudomonas ethylicum*

А — без светофильтров регистрируются ΔD и $\Delta\Phi$; *Б* — с интерференционным светофильтром (после объекта) регистрируется изменение поглощения (ΔD); *В* — при помещении после объекта светофильтра ИКС-1 регистрируется изменение флуоресценции ($\Delta\Phi$); *Г* — при помещении светофильтра ИКС-1 до и после объекта по разнице отсчетов регистрируется величина флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом (действующий свет в этом случае выключен)

Наблюдаемые изменения не могут быть вызваны попаданием на фотоумножитель рассеянного действующего света или флуоресценции, возбуждаемой действующим светом, так как в конструкции установки использован принцип фосфороскопа (рис. 2). Под действием интенсивного светового импульса могут происходить изменения внутренней структуры клеток бактерий, ведущие к изменениям условий светорассеяния монохроматического света. Белл [7] указал на возможность таких явлений в листьях растений. Однако в этом случае мы должны были бы наблюдать эффект при помещении интерференционных фильтров перед фотоумножителем (при соответствующих длинах волн измеряющего света), т. е. наблюдаемые эффекты нельзя объяснить изменениями светорассеяния.

Следовательно, при освещении зеленых бактерий происходят изменения флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом. Поскольку изменения поглощения не были зарегистрированы (нам не удалось найти изменений поглощения и при 840 *ммк*), то показанная на рис. 1, *А* кривая *2* представляет собой «дифференциальный спектр возбуждения флуоресценции» (ΔI) без соответствующих поправок на интенсивность возбуждающего флуоресценцию света. «Спектр возбуждения флуоресценции» (Φ, кривая *3*, рис. 1, *А*) измеряли лишь под действием монохроматического измеряющего света, без включения действующего света; в этом случае регистрировалась разница в показаниях гальванометра (величины фототока фотоумножителя) при каждой длине волны при помещении светофильтра ИКС-1 до и после кюветы с суспензией бактерий (рис. 2, *Г*). На рис. 1, *А* представлена спектральная кривая *1* ($\Delta\Phi$) изменений флуоресценции со светофильтром ИКС-1, помещенным перед фотоумножителем. При каждой длине волны интенсивность прошедшего через объект измеряющего света (как при измерении дифференциальных спектров поглощения) приводили к постоянной величине. Как видно из кривых *1* и *2*, спектральные кривые, измеренные со светофильтром ИКС-1 и без него, сходны по виду и положению максимумов, но первый гораздо ниже, так как пропускание светофильтра в области максимумов флуоресценции бактерий при 783 и 820 *ммк* [8] очень мало и составляет около 15%. Максимум спектральных кривых несколько сдвинут в коротковолновую область (до 740 *ммк*) по сравнению со спектром поглощения бактерий; при использовании менее плотных суспензий максимум располагался при 745 *ммк*, но при этом величина изменений была меньше.

Приведенные на рис. 1, *А* «спектр возбуждения флуоресценции» и «дифференциальный спектр возбуждения флуоресценции» зеленых

бактерий получены в режиме измерения дифференциальных спектров поглощения, когда интенсивность падающего на объект измеряющего света изменяется в широких пределах, в зависимости от поглощения объекта и спектральной чувствительности фотоумножителя. Поэтому на той же установке был измерен обычный спектр возбуждения флуоресценции; в этом случае интенсивность пропущенного объектом света не приводилась к постоянной величине, а интенсивность падающего на объект измеряющего света изменялась незначительно, в зависимости от дисперсии установки. В спектре возбуждения флуоресценции (рис. 1, *Б*) обнаруживаются максимумы при 680, 700 и 745 *ммк*. Все измеренные спектры воспроизводят спектр поглощения бактериовиридина *in vivo* и свидетельствуют о том, что наблюдаемые эффекты обусловлены изменениями флуоресценции бактериовиридина.

Таким образом, нам не удалось обнаружить обратимых изменений поглощения бактериовиридина в зеленых бактериях в красной области спектра. Возможно, эти изменения настолько малы, быстры и быстро обратимы, что не могут быть зарегистрированы при помощи используемой аппаратуры. Обнаружение изменений флуоресценции, возбуждаемой слабым (измеряющим) светом, под воздействием интенсивного (действующего) освещения у фотосинтезирующих организмов различных систематических групп: зеленых растений, водорослей, пурпурных и зеленых бактерий — свидетельствует об универсальности этого явления. Наблюдаемые эффекты связаны с изменениями состояния фотосинтетического аппарата под действием светового импульса. Дальнейшие исследования должны выяснить природу этого явления.

Поступила в редакцию
29.IX.1964

ЛИТЕРАТУРА

1. Duysens L. N. M., Thesis, Utrecht, 1952
2. Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Биофизика 8, 191, 1963; Докл. АН СССР **149**, 1428, 1963
3. Rubinstein D., Rabinowitch E., Science **142**, 681, 1963
4. Карапетян Н. В., Канд. дис. М., 1963
5. Olson J. M., Sybesma C., Bacterial Photosynthesis. Ed. H. Gest., Yellow Springs, Ohio, 413, 1963
6. Sybesma C., Vredenberg W. J., Biochim. et biophys. acta **75**, 439, 1963
7. Белл Л. Н., Докл. АН СССР **95**, 669, 1954
8. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй-цюнь, Докл. АН СССР **143**, 456, 1962

А. А. Красновский

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА В ЦЕПИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

(Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва)

Преобразование энергии света при фотосинтезе происходит в фотосинтетической цепи переноса электрона, в которой фотохимические реакции хлорофилла и его аналогов сопряжены с работой биохимических окислительно-восстановительных систем.

Рассмотрение типов переноса электрона в филогенетическом плане [1] привело к представлению, что более древние организмы — фотосинтезирующие бактерии, живущие в «восстановительной» среде, использовали более простой «одноквантовый» способ фотохимического переноса электрона от донора к акцептору, и эволюция от бактерий к растениям шла по линии приобретения еще одной ветви фотосинтетического переноса электрона, работающей в более «окислительной» области. Это потребовало усовершенствования пигментных и энзиматических систем. Зеленые растения, которые приобрели способность использовать в качестве исходного водородного донора воду, сочетают согласно современным гипотезам две фотохимических ступени переноса электрона: одну — от воды к цитохромам (хинонам) и другую — от восстановленных цитохромов к пиридиннуклеотидам.

Цепь фотосинтетического переноса электрона работает в сложно организованных хлоропластах растений или в гранулах — хроматофорах бактерий. Перенос электрона (водорода) идет от молекулы воды (или иных доноров электрона при бактериальном фотосинтезе) к пиридиннуклеотидам, приводя в конечном итоге к их восстановлению. Путь переноса электрона в хлоропластах и хроматофорах сопряжен с образованием аденозинтрифосфата из аденозиндифосфата и неорганического фосфата. Восстановленные пиридиннуклеотиды и аденозинтрифосфат, запасающие энергию света, поступают в углеродный цикл.

Наименее выяснен механизм фотоокисления воды; до сих пор не удалось «поймать» промежуточные соединения, предшествующие молекулярному кислороду, и изучить биохимические системы, участвующие в этой стадии. Более выяснены конечные этапы «восстановительной» ветви переноса электрона,

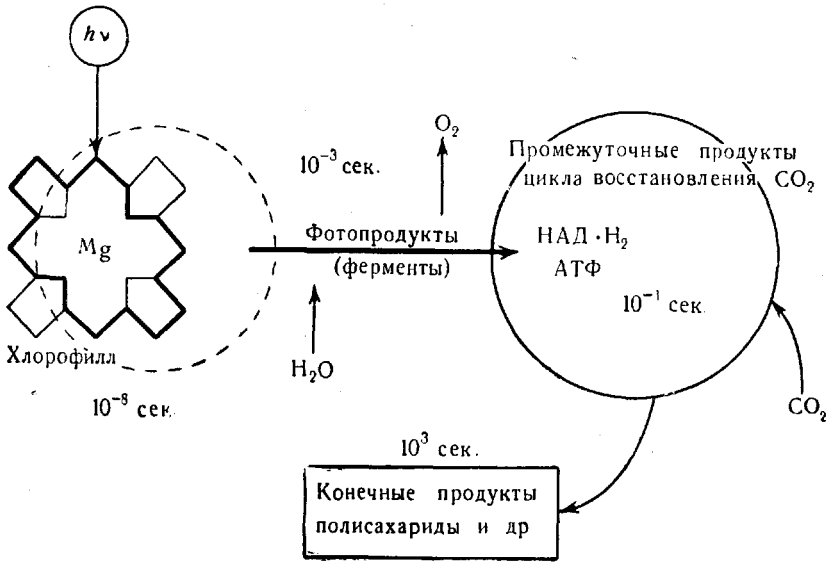


Рис. 1. Длительность жизни промежуточных продуктов фотосинтеза

завершаемой восстановлением пиридиннуклеотидов. Большое внимание привлекает фотосинтетическое фосфорилирование, в котором перенос электрона сопряжен с образованием АТФ.

Преобразование энергии квантов света при фотосинтезе идет путем последовательных стадий, в которых образуются запасающие энергию света молекулы с различной длительностью жизни (рис. 1). Процесс начинается актом поглощения кванта света хлорофиллом, возбужденное состояние которого «живет» 10^{-8} сек.; конечные продукты фотосинтеза, запасающие энергию света (кислород и полисахариды), устойчивы и могут «жить» часами, медленно вовлекаясь в дыхательный обмен. Между «началом» и «концом» процесса существует целый ряд промежуточных соединений, «удерживающих» энергию квантов света в течение разного времени. Так, продукты световых превращений хлорофилла, по некоторым данным, «живут» 10^{-3}—10^{-4} сек., а продукты углеродного цикла, вероятно, 10^{-1} сек.

Трудность изучения механизма фотосинтеза в значительной мере определяется нестойкостью разнообразных промежуточных

продуктов, несущих энергию кванта света. Эти продукты легко ускользают из рук экспериментатора при попытке их изолировать и при нарушениях нормального состояния фотосинтетического аппарата. Успехи в изучении фотосинтеза за последние годы во многом определяются применением спектральных методов, позволяющих изучать короткоживущие активные вещества, и изотопных методов, дающих возможность установить химическую природу более долгоживущих промежуточных продуктов. До сих пор не ясен целый ряд вопросов структурной организации и механизма действия цепи фотосинтетического переноса электрона.

Один из путей исследования ведет к выделению отдельных фрагментов цепи, изучаемых в более простых системах, с последующей реконструкцией цепи переноса электрона из ее отдельных частей.

ФРАГМЕНТЫ ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Рассмотрим последовательное нарушение естественной структуры организма и построение моделей отдельных звеньев процесса. Цепь переноса электрона будем рассматривать в масштабе перепада окислительно-восстановительных потенциалов ($\Delta E_0'$), пропорционального изменению свободной энергии процесса. Диапазон E_0' фотосинтеза растений лежит в пределах между потенциалом кислородного электрода (E_0' для системы O_2/H_2O при pH 7 составляет —0,8 *в*) и потенциалом, близким к водородному электроду, при котором идет восстановление пиридиннуклеотидов при участии ферредоксина (E_0' для системы H_2/H^+ при pH 7 составляет + 0,42 *в*). Энергетической моделью фотосинтеза было бы фотосенсибилизированное к видимому свету разложение воды на кислород и водород.

Итак, в интактных растениях идет «полный» фотосинтез в диапазоне окислительно-восстановительных потенциалов около 1,2 *в* (от —0,8 до +0,4 *в*), чему соответствует увеличение свободной энергии системы $\Delta F = +120$ *ккал* (при балансовой реакции: $CO_2 + H_2O \rightarrow {}^1/_6\, C_6H_{12}O_6 + O_2$).

Фотосинтез бактерий, использующих более богатые энергией водородные доноры (сероводород, тиосульфаты, органические спирты и кислоты и также водород), идет в анаэробных условиях в восстановительной ветви цепи переноса электрона и сопровождается гораздо меньшим «запасанием» энергии света, чем фотосинтез растений. Отдельные типы бактериального фотосинтеза вообще не «запасают» энергию света (например, при использовании водорода в качестве донора электрона), которая расходуется лишь для преодоления активационных барьеров. На рис. 2 показан диапазон бактериального фотосинтеза в слу-

чае использования аскорбиновой кислоты в качестве исходного донора водорода [2].

В 1937 г. Хилл нашел, что в изолированных хлоропластах фотохимическое выделение кислорода может быть сопряжено с восстановлением ряда экзогенных акцепторов электрона; это привело к получению более простой системы, работающей в «окислительной» ветви фотосинтетического переноса электро-

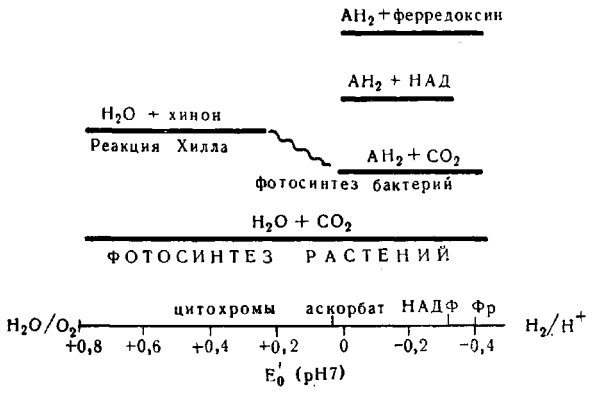


Рис. 2. Окислительно-восстановительный диапазон фрагментов цепи фотосинтетического переноса электрона

на. Пока не удалось создать модельную систему с хлорофиллом, в которой осуществлялось бы фотосенсибилизированное выделение кислорода воды. С использованием таких фотокатализаторов, как двуокись титана, окись цинка, вольфрамовая кислота, созданы системы, в которых фотохимическое выделение кислорода воды сопряжено с восстановлением соединений окисного железа [3]. Эти реакции идут в области спектра (360—450 *ммк*), соответствующей спектрам поглощения перечисленных фотокатализаторов, и могут рассматриваться как неорганические модели реакции Хилла.

Хлоропласты и гомогенаты растений способны участвовать в фотореакциях переноса водорода, идущих и в «восстановительной» части цепи. В строго анаэробных условиях Гуд и Хилл [4] наблюдали фотовосстановление флавинмононуклеотида и бензилвиологена хлоропластами. При использовании в качестве исходного донора электрона аскорбиновой кислоты удалось наблюдать восстановление рибофлавина, метилового красного, сафранина [5], Вернону — восстановление дихлорфенолиндофенола и индигокармина [6] и недавно в лаборатории Арнона — фотовосстановление самого «отрицательного» члена цепи — ферредоксина [7].

Таким образом, в энергетическом плане сочетание реакции Хилла и бактериального фотосинтеза представляет собой «полный» фотосинтез растений. Представление о двух фотореакциях при фотосинтезе высказывалось давно. Так, например, Дж. Франк [8] в 1941 г. предположил, что при фотосинтезе сочетаются две фотореакции хлорофилла: обратимое дегидрирование — фотоокисление и фотовосстановление окисленной формы. В то время отсутствовали эксперименты, доказывающие это предположение.

Изучая действие на фотосинтез двух монохроматических световых пучков, Эмерсон [9] нашел, что малоэффективный фотосинтез в далекой красной области усиливается при наложении света более коротких длин волн. Это явление изучалось в ряде лабораторий. Недавно Арнон [7] наблюдал фотовосстановление ферредоксина в далекой красной области, тогда как спектральный максимум выделения кислорода лежал в области 650 *ммк*.

Френч и Форк [10] нашли, что свет длиной волны 690 *ммк* способствует поглощению кислорода, а 670 *ммк* — его выделению после периода освещения.

Совокупность работ ряда лабораторий привела к выводу, что в «коротковолновую» пигментную систему следует включить форму хлорофилла *a* с максимумом поглощения 670 *ммк*, хлорофилл *b* и фикобилины, а в «длинноволновую» систему — формы хлорофилла с поглощением в области 680—700 *ммк*. Наиболее распространена та точка зрения, что две пигментные системы действуют последовательно в цепи переноса электрона (рис. 3).

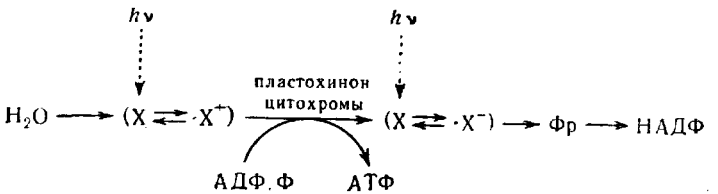


Рис. 3. Схема переноса электрона при фотосинтезе
X — хлорофилл, Фр — ферредоксин

Другой вариант объяснения предполагает образование специфических продуктов при действии «коротковолнового» и «длинноволнового» света и последующую темновую реакцию между этими соединениями с образованием более устойчивых промежуточных продуктов [10].

Итак, наиболее вероятно, что фотохимические стадии заключаются в перемещении электрона от акцептора к донору за счет энергии света, поглощенного пигментами. Вне структуры хлоропластов хлорофилл и его аналоги в растворах способны фотосенсибилизировать реакции переноса водорода (электрона) от донора к акцептору, идущие с некоторым «запасанием» энер-

зуемых акцепторов высота синглетных и, возможно, триплетных уровней лежит выше соответствующих уровней пигмента-сенсибилизатора.

Это блокирование следует объяснить взаимодействием фотовосстановленных форм пигмента с акцептором электрона. Действительно, такие реакции удается осуществить раздельно в темновом акте процесса. При взаимодействии накопленных при освещении фотовосстановленных форм с акцептором электрона наблюдается их окисление, ведущее к регенерации хлорофилла.

Следует полагать, что в механизме реакций, идущих в основных средах, доминирует промежуточное фотовосстановление пигмента [17, 19]. Величина потенциала системы донор электрона — хлорофилл при освещении близка к потенциалу водородного электрода (выше 0,35 *в*).

Наши опыты в модельной системе хлорофилл-цитохром [20] привели к предположению о возможности первичного процесса переноса электрона от восстановленного цитохрома к хлорофиллу:

$$X^* + \text{цитохром } Fe^{++} \rightarrow \cdot X^- + \text{цитохром } Fe^{+++}.$$

Камен [21], в согласии с этими опытами, указывает на возможность фотореакции в комплексе переноса заряда хлорофилл — цитохром с образованием восстановленной формы хлорофилла [X^-].

Обратимое фотоокисление рассматривалось в работах ряда авторов с применением достаточно сильных окислителей — ионов окисного железа (в исследованиях Рабиновича и Вейса [22], и Даина с сотрудниками [23]). Реакция с кислородом при освещении и обратная реакция в темноте (при взаимодействии с донором электрона) наблюдалась в наших опытах [24], наиболее отчетливо — в случае бактериохлорофилла [25]. В системе хлорофилл — хинон в жестких средах при температуре жидкого азота Линшитц и Реннерт [26] наблюдали падение оптической плотности хлорофилла с возвратом ее к исходному уровню после размораживания. Для изучения реакции хлорофилла и аналогов с окислителями мы применили спиртоглицериновые вязкие среды [27]. При —70° С в вязкой прозрачной среде этого типа удалось наблюдать обратимое изменение хлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина при взаимодействии с *п*-хиноном.

В наших опытах с Н. Н. Дроздовой [28] измерены дифференциальные спектры свет-темнота при взаимодействии хлорофилла и его аналогов с восстановителями (аскорбиновая кислота) и окислителями (хинон) с использованием вязких сред, в которых стабилизируются промежуточные фотопродукты. Мы видим из рис. 6, 7, 8, что восстановленные и окисленные формы хлорофил-

ла и бактериовиридина обладают поглощением в зеленой области спектра. Это следует объяснить нарушением системы сопряженных по кругу двойных связей порфиринового кольца в обоих случаях. Окисленные продукты обладают также поглощением в близкой инфракрасной области спектра, тогда как у фотовос-

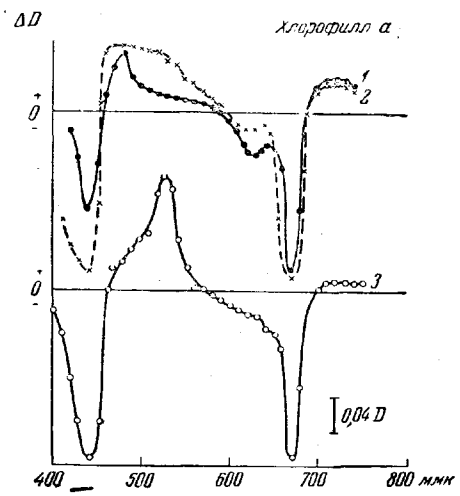


Рис. 6. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении хлорофилла *a*

1 — окисление *n*-бензохиноном; *2* — кислородом; *3* — восстановление аскорбиновой кислотой

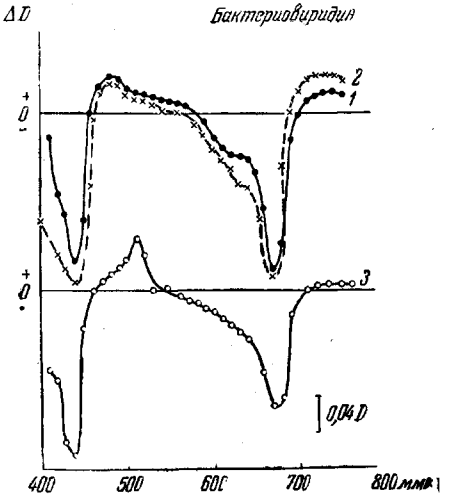


Рис. 7. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении бактериовиридина

1 — окисление *n*-бензохиноном; *2* — кислородом; *3* — восстановление аскорбиновой кислотой

становленных продуктов значительные спектральные изменения в этой области наблюдаются лишь в особых условиях. Наиболее различаются оба типа промежуточных продуктов у бактериохлорофилла: восстановленный с максимумом при 640 *ммк* и окисленный с поглощением в области 650—700 *ммк* и при 850 *ммк*.

Реакции в жестких средах и образование ассоциатов. При изучении реакций хлорофилла в растворах первичный перенос электрона осложнен возможными реакциями переноса протона, дисмутацией, образованием ряда побочных продуктов.

Чтобы наблюдать первичную стадию фотопереноса электрона, применяется изучение фотореакций в «жестких» стеклообразных средах при —196° С, начатое в работах Дж. Льюиса.

В системе хлорофилл — аскорбиновая кислота в пиридине и спирте при освещении красным светом в этих условиях не об-

наруживается спектральных изменений. В случае применения фенилгидразина в качестве донора электрона Броди [29] наблюдал образование фотовосстановленных продуктов. Известно, что фенилгидразин — сильное основание, образующее комплексы с хлорофиллом. Мало вероятно, чтобы аналогичные комплексы хлорофилла и аскорбиновой кислоты возникали в пиридиновом растворе, в котором пигмент сольватирован молекулами пиридина по атому магния.

Реакции с окислителями — хиноном и кислородом также наблюдаются в жестких средах, что указывает на образование ассоциатов хлорофилла с молекулами — акцепторами электрона. При низкой температуре эти ассоциаты стабилизируются и фотореакция с кислородом в ряде случаев идет быстрее, чем при комнатной температуре. Таким образом, помимо определенной величины сродства к электрону молекул — доноров и акцепторов условием осуществления реакции является образование предреакционных ассоциатов, в которых могут участвовать как невозбужденные, так и возбужденные молекулы хлорофилла в синглетном или триплетном состоянии.

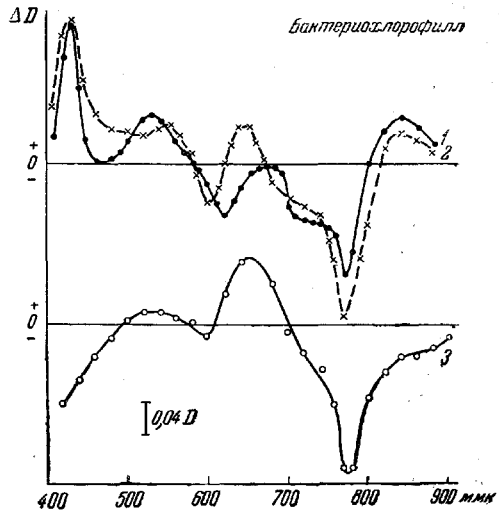


Рис. 8. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении бактериохлорофилла

1 — окисление *п*-бензохиноном; *2* — кислородом; *3* — восстановление сернистым натрием

Природа доноров и акцепторов электрона в фотореакциях хлорофилла. Фотовосстановление хлорофилла наблюдается при реакции с диэнолами (аскорбиновая кислота и др.), фенилгидразином [17], соединениями двухвалентного железа [30]. Любопытно, что восстановленные пиридиннуклеотиды не реагируют фотохимически с хлорофиллом при возбуждении в красной области спектра, но приводят к фотовосстановлению хлорофилла и аналогов при возбуждении близким ультрафиолетом в максимуме поглощения НАД-H_2 (340 *ммк*). При этом образуется «красная» восстановленная форма хлорофилла, а НАД-H_2 окисляется необратимо [14,31]. Освещение раствора НАД-H_2 в пиридине в вакууме линиями ртути (365 *ммк*) ведет к образованию фотоактивированных продуктов,

переживающих период освещения и способных в темноте к восстановлению хлорофилла, сафранина, рибофлавина и др. Вероятно, к фотоактивации системы ведет перенос электрона в комплексе НАД-H_2 — пиридин [31].

С фотовосстановленными формами хлорофилла и его аналогов реагирует широкий круг соединений: пиридиннуклеотиды и N-бензилникотинамид, соединения окисного железа, красители (сафранин Т, рибофлавин, метиловый красный, хиноны), кислород и многие другие. При фотореакции в тройной системе донор — хлорофилл — акцептор наблюдается сенсибилизированное восстановление этих акцепторов электрона.

Как уже указывалось, прямая фотореакция в растворах хлорофилла с акцептором электрона наблюдалась путем спектрофотометрических измерений с хинонами, соединениями окисного железа, кислородом. В ряду хинонов не удалось наблюдать реакцию с антрохиноном; реакция с нафтохиноном была незначительна [28].

Электронный парамагнитный резонанс в пигментных системах. С помощью этого метода было показано образование неспаренных электронов при освещении систем, содержащих хлорофилл и его аналоги. Так, при освещении в резонаторе радиоспектрометра системы хлорофилл — аскорбиновая кислота установлено образование радикала монодегидроаскорбиновой кислоты [32]. Толлин и Грин при освещении системы хлорофилл — хинон обнаружили сигнал ЭПР семихинона [33]. В описанных опытах пока не удалось уловить сигнал радикальной формы пигмента, образование которой при фотовосстановлении пигментов показано методами инициирования цепной полимеризации [34]. При освещении замороженных спиртовых растворов хлорофилла удалось наблюдать образование триплетного состояния хлорофилла (в магнитном поле 1500 *гс*) и радикального состояния (в магнитном поле 3000 *гс*) [35].

Хемилюминесценция. Используя счетчик фотонов, удалось наблюдать свечение при окислении фотовосстановленного хлорофилла и при фотоокислении хлорофилла кислородом воздуха [36]. Хемилюминесценция при фотоокислении бактериохлорофилла изучалась в работе Гудхера [37].

После освещения пиридинового раствора хлорофилла с аскорбиновой кислотой или фенилгидразином обратная реакция в темноте (без воздуха) сопровождается слабым послесвечением (рис. 9).

Введение воздуха увеличивает эффект, ускоряя обратную реакцию. Аммиак, чрезвычайно ускоряющий превращение «красной» восстановленной формы хлорофилла, еще больше усиливает свечение [36]. Можно предположить, что при реакции восстановленной формы хлорофилла (XH_2) с кислородом происходит об-

разование триплетного состояния, переходящего в синглетное возбужденное состояние с последующим излучением, которое спектрально идентично флуоресценции:

$$XH_2 + O_2 \rightarrow XH_2O_2 \rightarrow X^* + H_2O_2.$$

Возможно образование возбужденного хлорофилла и при обратных реакциях ион-радикальных фотопродуктов по «обратному пути» фотовосстановления: $\cdot XH + \cdot AH \rightarrow X^* + AH_2$.

Дальнейшие опыты должны показать, можно ли объяснить фотосинтетическую люминесценцию Стрелера — Арнольда хемилюминесценцией, возникающей при фотоокислении хлорофилла или его восстановленной формы.

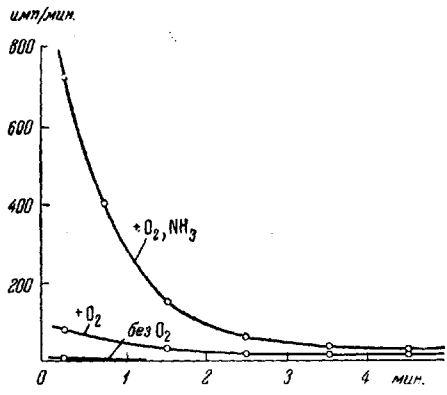


Рис. 9. Хемилюминесценция, возникающая при окислении фотовосстановленной формы хлорофилла (измерения при помощи счетчика фотонов) [36]

Без O_2 — после освещения системы хлорофилл *a* — аскорбиновая кислота без воздуха; + O_2 — пуск воздуха в темноте после реакции фотовосстановления; + O_2, NH_3 — пуск воздуха и введение раствора аммиака после фотовосстановления

Фотоэлектрические явления. В работах лаборатории А. Н. Теренина было показано, что хлорофилл в твердых пленках обладает фотопроводимостью, имеющей «дырочный» характер — в электрическом поле движется электронная вакансия от молекулы к молекуле пигмента [38]. Если твердая пленка фталоцианина или хлорофилла наносится на электрод и погружена в раствор, то, как показали опыты В. Б. Евстигнеева и А. Н. Теренина [39], а затем Е. К. Пуцейко [40], можно наблюдать эффект Беккереля с появлением отрицательного или положительного заряда электрода в зависимости от наличия в растворе, окружающем пленку, доноров или акцепторов электрона. Это явление детально изучалось в работах В. Б. Евстигнеева [41], показавшего зависимость знака и кинетики потенциала от pH, природы пигмента и наличия в растворе различных соединений.

Основной выход из этих опытов состоит в том, что твердые пленки пигмента могут при освещении в зависимости от условий отдавать или воспринимать электрон, т. е. участвовать в элементарном акте фотовосстановления и фотоокисления.

Образование фотовосстановленного хлорофилла в гетерогенных условиях — на поверхности твердой пленки — иллюстрируется опытами Е. К. Пуцейко [40], показавшей появление максимума фотоэлектрической чувствительности в спектральной области фотовосстановленной формы хлорофилла (при 520 *ммк*).

«Полупроводниковая» модель действия хлорофилла описывает разделение электрона и дырки в квазикристаллическом слое пигмента под действием света. Однако и электрон и дырка связаны в молекуле хлорофилла, образуя соответственно восстановленную ($\cdot X^-$) и окисленную ($\cdot X^+$) формы пигмента, участвующие в дальнейших реакциях.

Механизм сенсибилизации. Установленное в прямых экспериментах обратимое фотохимическое взаимодействие хлорофилла и его аналогов с донорами и акцепторами электрона определяет возможность того, что реакции этого типа лежат в основе фотосенсибилизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакций. В нашей лаборатории найдены экспериментальные доводы в пользу того, что сенсибилизация хлорофиллом в основных средах определяется обратимым фотовосстановлением пигмента и темновым актом взаимодействия восстановленной формы с акцептором электрона [17, 19]. Изучая фотосенсибилизированное феофитином восстановление метилового красного (донор электрона — аскорбиновая кислота и фенилгидразин) в зависимости от pH раствора, В. Б. Евстигнеев показал, что эффективность реакции увеличивается в области pH 7—8 и pH 2—3, предположительно соответствующих первичному восстановлению и окислению пигмента [42]. В реакциях того и другого типа возможно участие синглетных и триплетных молекул хлорофилла. Известно, что окислители тушат флуоресценцию хлорофилла, что служит указанием на их взаимодействие с синглетным возбужденным состоянием. Восстановители (например, аскорбат) слабо тушат флуоресценцию, но энергично фотохимически реагируют с хлорофиллом, что указывает на их возможное взаимодействие с триплетным состоянием.

ПОИСКИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ХЛОРОФИЛЛА В ОРГАНИЗМАХ

Итак, опыты в модельных системах показывают возможность обратимого восстановления хлорофилла (схематически изображаемого в виде $X^* \rightleftarrows \cdot X^-$) или обратимого его окисления ($X^* \rightleftarrows \cdot X^+$), если в системе присутствует достаточно сильный акцептор электрона (хинон, кислород, окисное железо). Если хлорофилл принимает участие в фотохимическом переносе электрона при фотосинтезе, то возникает возможность обнаружить его обратимые изменения.

нового компонента без ясно видимой структуры. Измерения в лаборатории Калвина [50] при температуре жидкого азота показали, что кинетика появления и спада сигнала в темноте различна у зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий; в последнем случае выключение света не ведет к спаду светового сигнала. Изучение сигнала ЭПР в процессе образования хлорофилла — при зеленении этиолированных листьев в опытах Рихиревой и Каюшина [49] — показало, что на первой ступени образования хлорофилла, пока еще не сформирована структура гранул, наблюдается «бактериальный» тип сигнала, возможно, соответствующий одному типу фотореакций; по мере накопления хлорофилла и формирования фотосинтетического аппарата под действием света появляется характерный для растений обратимый тип сигнала ЭПР.

Во взрослых зеленых организмах максимум спектра действия сигнала ЭПР лежит при 690 *ммк* [50], что указывает на активность «длинноволновых» форм хлорофилла. Однако не ясно, в какой степени связано появление сигнала ЭПР с фотосинтетической активностью и какова природа образований, несущих неспаренный электрон. Исследование светового сигнала ЭПР в суспензиях хроматофоров в разных окислительно-восстановительных условиях показало появление сигнала как в окислительной, так и в восстановительной среде. Происхождение сигналов гипотетически приписывается отрицательному и положительному ион-радикалам хлорофилла; эта точка зрения сейчас наиболее распространена.

Для понимания природы сигнала ЭПР в организмах большое значение имеет изучение фотопроводимости и ЭПР у твердого хлорофилла, а также у его аналогов (см. статью А. Н. Теренина и В. Е. Холмогорова в этом сборнике). Для появления сигнала ЭПР необходимо наличие связанной воды и кислорода; световой сигнал можно приписать переносу электрона от хлорофилла к молекуле кислорода [51]. В опытах Умрихиной и других [52] показано, что при исследовании всех аналогов и производных хлорофилла наблюдается появление сигнала ЭПР в темноте; освещение в большинстве случаев ведет к появлению светового сигнала. Эффект наблюдается у всех пигментов независимо от наличия атома магния, фитольной группировки, циклопентанового кольца, количества полуизолированных двойных связей.

ФОРМЫ ПИГМЕНТОВ В ОРГАНИЗМАХ И АГРЕГАЦИЯ В ПЛЕНКАХ

Чтобы понять природу состояния пигментов в организмах, изучались спектральные свойства индивидуальных пигментов в различных модельных системах: растворах, коллоидах, твердых пленках, монослоях.

Растворы хлорофилла и его аналогов в полярных органических растворителях содержат главным образом «мономерные» формы пигментов. Разбавление водой растворов пигментов (в спирте, ацетоне, пиридине, диоксане) и коагуляция, например, хлористым магнием ведут к агрегации со сдвигом максимума поглощения пигментов в длинноволновую область спектра. Варьируя степень коагуляции и pH раствора, можно получить коллоидные агрегаты с желаемым положением максимумов поглощения: в случае хлорофилла и бактериовиридина от 660 до 760 *ммк* и для бактериохлорофилла от 770 до 900 *ммк*.

В нашей лаборатории [54] и независимо в работах Ливингстона [53] было найдено, что в сухих неполярных органических растворителях, не содержащих полярных примесей, наблюдается частичная агрегация — вероятно, образование димеров. Однако и в более концентрированных растворах пигментов в полярных растворителях удается наблюдать полосы поглощения в близкой инфракрасной области спектра, соответствующие агрегированным формам. Наиболее отчетливо это видно в случае бактериовиридина, вообще более склонного к агрегации, вероятно, потому, что в его молекуле карбоксил этерифицирован более «коротким» спиртом — фарнезолом [55] вместо фитола у хлорофилла. Так, в эфирном или ацетоновом растворе бактериовиридина с концентрацией 10^{-4} *M* наблюдается максимум поглощения 730 *ммк*, увеличивающийся при охлаждении. Чтобы наблюдать эту форму у хлорофилла *a* требуется гораздо большая концентрация пигмента.

При испарении в вакууме растворов хлорофилла и его аналогов образуются твердые пленки, в которых наблюдаются максимумы поглощения, смещенные в инфракрасную область, соответствующие разным видам упаковки. Так, в твердых пленках бактериохлорофилла мы наблюдали максимумы при 800 и 850—890 *ммк* [56], у бактериовиридина при 740 *ммк*, соответствующие поглощению пигментов в живых бактериях [57]. Изучение монослоев хлорофилла позволило обнаружить упаковки с максимумами от 670 до 740 *ммк* [63]. Электронографическое исследование показало кристаллическую структуру форм хлорофилла с максимумами при 690 и 740 *ммк* [58].

Броди [59] наблюдал в замороженных растворах хлорофилла длинноволновую люминесценцию, соответствующую агрегированной форме пигмента.

Измерение люминесценции твердых пленок пигментов при —196° С позволило обнаружить ряд максимумов, соответствующих мономерным формам и разным типам агрегации [60—63]. Соотношение между ними зависело от способа приготовления пленки и степени удаления растворителя. Целый ряд агрегированных форм хлорофилла *a* и сопровождающих пигментов получен в модельных системах: концентрированных растворах, моно-

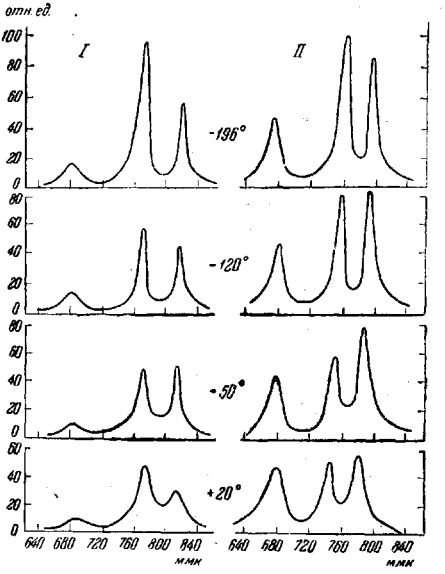


Рис. 13. Спектры люминесценции бактериовиридина в клетках зеленых серных бактерий (*I*) и в твердых пленках (*II*) при разных температурах

Литвин и Гуляев [63] изучали люминесценцию и поглощение монослоев и тонких пленок хлорофилла и нашли максимумы, во многом аналогичные максимумам, наблюдаемым в твердых пленках, где ориентация молекул происходит «наугад».

Предполагается, что температурная зависимость люминесценции объясняется условиями межмолекулярной дезактивации возбужденных молекул пигментов. В мономерных формах, где молекулы находятся на расстояниях, исключающих эффективное взаимодействие электронных облаков системы сопряженных связей, понижение температуры действует преимущественно на внутримолекулярные процессы дезактивации (слабое действие), при более плотных упаковках колебания и качания молекул ведут к межмолекулярной дезактивации за счет перекрывания электронных облаков порфиринового кольца при вхождении молекул в контакт при колебаниях. Понижение температуры, уменьшая колебания, ведет к изоляции молекул и, следовательно, к уменьшению межмолекулярной дезактивации и возгоранию люминесценции (рис. 14).

Итак, опыты показывают, что спектральные свойства пигментов в организмах в значительной мере определяются условиями пигмент-пигментного взаимодействия. Сравнительно слабое взаимодействие пигмента с белками и липоидами не приводит к значительным спектральным эффектам. Исключение составляют бесфитольные формы — протохлорофиллид и хлорофиллид, спектральные свойства которых определяются спецификой связи с белками [64].

Состояние пигментов в процессе зеленения этиолированных листьев. В 1952 г. в нашей лаборатории было найдено, что свежеобразованный хлорофилл находится в мономерной форме с максимумом поглощения при 670 *ммк*; дальнейшее накопление хлорофилла в процессе зеленения листьев ведет к агрегации с постепенным перемещением максимума до 678 *ммк* [65]. Мономерные формы в отличие от агрегированных быстро выцветают при сильном освещении (рис. 15).

Литвин и Рихирева [66] измеряли люминесценцию при —196° в процессе зеленения этиолированных листьев. Отчетливо видно, что начальные — мономерные формы хлорофилла мало меняют люминесценцию при охлаждении, тогда как свечение агрегированных форм при 740 *ммк* резко усиливается по мере их накопления в листьях (рис. 16). Этот опыт также иллюстрирует постепенную агрегацию по мере накопления хлорофилла в листьях.

В некоторых организмах обнаруживались формы хлорофилла с максимумом поглощения при 690 и 710 *ммк* [67]. Применив

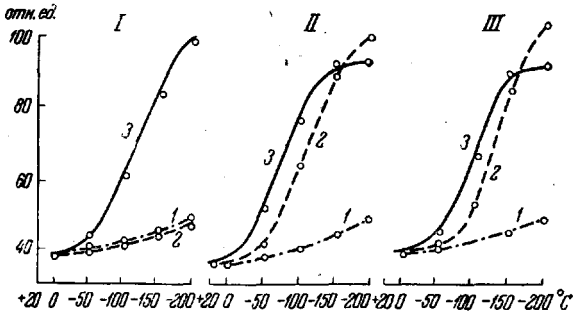


Рис. 14. Зависимость интенсивности люминесценции бактериовиридина от температуры в разных максимумах [62]

I — в пиридиновом растворе (*1* — 671 *ммк*, *2* — 720 *ммк*, *3* — 735 *ммк*); *II* — в твердых пленках (*1* — 680 *ммк*, *2* — 747 — 750 *ммк*, *3* — 757 — 780 *ммк*); *III* — в клетках бактерий (*1*—680 *ммк*, *2*—770—778 *ммк*, *3*—808—823 *ммк*)

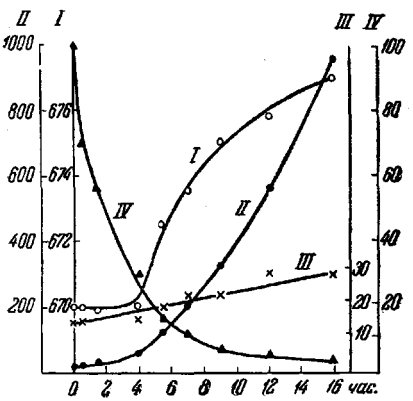


Рис. 15. Изменение спектральных и фотохимических свойств хлорофилла в естественном состоянии по мере его образования в этиолированных листьях [65]

I — положение главного красного максимума поглощения, в *ммк* (±1 *ммк*); *II* — количество образовавшегося хлорофилла, в относительных единицах; *III* — количество выцветающего хлорофилла, в относительных единицах; *IV* — процент фотохимически разрушенного через 5 мин. хлорофилла (по изменению оптической плотности в максимуме); по оси абсцисс — продолжительность освещения листьев, в час.

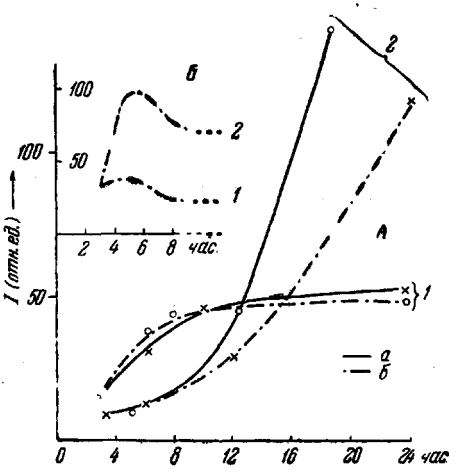


Рис. 16. Изменение интенсивности флуоресценции при —196° С в процессе зеленения этиолированных листьев фасоли (*а*) и их гомогенатов (*б*) [66]

А — 12-дневные и *Б* — 7-дневные растения

1 — при 682 *ммк*, *2* — при 730 *ммк*

метод производной спектроскопии, Френч [68] измерил различные формы пигментов у широкого круга объектов.

Применяя низкотемпературную фиксацию и измерение люминесценции при температуре жидкого азота на начальных этапах зеленения этиолированных листьев [69], удалось обнаружить формы протохлорофилла с люминесценцией при 633 и 655 *ммк* и промежуточные формы хлорофилла с максимумом при 675, 694 и 680 *ммк*. Эти данные согласуются с измерениями поглощения промежуточных форм в работе Шибата [70].

Исследования ряда лабораторий [71, 72, 73] показали, что активная форма протохлорофилла представляет собой белковое соединение протохлорофиллида и первично образуется хлорофиллид. Сопоставление измерений спектров люминесценции пигментов в зеленеющих листьях и их разделение с помощью бумажной хроматографии показали, что «активная» форма протохлорофилла и первичная «длинноволновая» форма хлорофилла представляют собой преимущественно бесфитольные формы пигментов [74].

В спектрах поглощения и люминесценции листьев обнаруживаются наряду с доминирующими формами хлорофилла также и формы хлорофиллида, участие которого в фотосинтезе требует исследования. При растирании листьев растений, обладающих активной хлорофиллазой (сахарная свекла, лебеда), в гомогенатах и хлоропластах накапливается хлорофиллид, быстро выцветающий при сильном освещении наряду с мономерной формой хлорофилла [75]. Превращение предшественников хлорофилла в листьях и гомогенатах показаны на схеме.

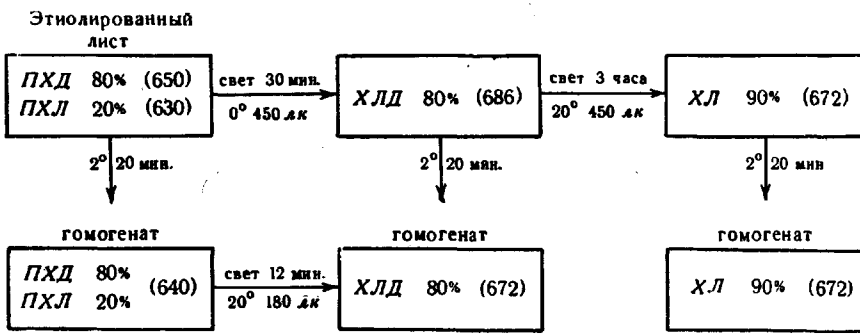


Схема превращения пигментов в этиолированных листьях и гомогенатах [75]

Цифры в скобках — положение максимума поглощения; *ПХД* — протохлорофиллид; *ПХЛ* — протохлорофилл; *ХЛД* — хлорофиллид; *ХЛ* — хлорофилл.)

Хлорофилл-белковый комплекс. Выделение хлорофилл-белкового комплекса постоянного состава давно привлекает внимание исследователей. В работах Смита [76] из

этиолированных листьев выделен «протохлорофилл-голохром», содержащий наряду с протохлорофиллид-белковым соединением также неактивные формы протохлорофиллида и протохлорофилла; молекулярный вес белка составляет около 1 млн. При освещении комплекс протохлорофиллид — белок переходит в хлорофиллид-белковый комплекс.

Такашима [77] описал выделение кристаллического хлорофилл-белково-липоидного комплекса из смеси пиколин — диоксан — вода. Мы нашли [78], что из этой смеси кристаллизуется хлорофилл, не связанный с белком, обладающий «диоксановым» типом упаковки с максимумом поглощения при 690 *ммк*. Такая форма хлорофилла получается и при испарении в вакууме растворов хлорофилла в диоксане, и электронографические исследования свидетельствуют о кристаллической структуре этой формы. В опытах Такашима, по-видимому, происходило совместное осаждение кристаллов хлорофилла с белком хлоропластов. В работах Баннистера и Лове [79] продолжено изучение «диоксановой» формы хлорофилла.

Недавно описан способ выделения водорастворимого хлорофилл-белкового комплекса из листьев лебеды [80]. В нашей лаборатории найдено, что листья этого растения содержат чрезвычайно активную хлорофиллазу и растирание листьев ведет к быстрому накоплению хлорофиллида [75]. Так, за сутки стояния в гомогенате листьев лебеды до 70% хлорофилла превращается в бесфитольную форму. Можно думать поэтому, что в работе [72] выделено не хлорофилл-белковое соединение, как полагают авторы, а хлорофиллид-белковый комплекс, возможно являющийся артефактом [75].

Методы, основанные на применении детергентов по существу приводят к дезагрегации белков и в ряде случаев к нарушению связи хлорофилла. Наконец, мелкие частицы, получаемые при звуковом диспергировании хлоропластов и скоростном центрифугировании (Кальвин называет эти препараты квантосомами), содержат все компоненты гранул: хлорофилл, каротиноиды, цитохромы, белки, липоиды и, конечно, не могут рассматриваться как индивидуальные хлорофилл-белковые соединения.

Таким образом, до сих пор не удалось выделить хлорофилл-белково-липоидное соединение постоянного состава, сохраняющее способность к осуществлению частичных реакций фотосинтеза.

О миграции энергии между формами пигментов.

Энергия света, поглощенная большей частью форм пигментов, используется для фотосинтеза. Это установлено в случае зеленых растений, где наиболее эффективно используется свет при сочетании, например, длинноволновой и коротковолновой областей спектра. Обнаружение в работах Кока изменений по-

глощения при 700 *ммк* в водорослях привело к предположению, что эта длинноволновая форма является наиболее низко расположенной энергетической ловушкой, куда мигрирует энергия квантов света, поглощенных разными формами хлорофилла. Однако этому противоречит представление о двух типах фотореакций, управляемых разными формами пигмента. Более вероятна независимая люминесценция разных форм хлорофилла — коротковолновой, проявляющейся при комнатной температуре, и длинноволновой, наблюдаемой при низких температурах. Изучение сенсибилизированной флуоресценции хлорофилла in vivo затрудняет тот факт, что второй максимум люминесценции мономерного хлорофилла близок к люминесценции агрегированного, а поглощение большей части форм лежит в близкой области (от 670 до 690 *ммк*) и их спектры взаимно перекрываются. Изучение условий миграции энергии между формами тесно связано с общими вопросами структурной организации гранул и цепи фотосинтетического переноса электрона.

Структурная организация гранул. В гранулах содержатся пигменты в различных типах упаковки и биохимические системы, участвующие в транспорте электрона. Электронная микроскопия пока не дает достоверной информации о молекулярной структуре слоев в гранулах. Несмотря на это, в литературе нет недостатка в гипотетических картинах, рисующих расположение молекул, участвующих в цепи фотосинтетического переноса электрона; впрочем, то же относится и к молекулярной организации митохондрий.

Каким образом представить механизм переноса электрона и сопряженных с ним процессов в цепи фотосинтетического переноса электрона? Структура гранул, понятно, отличается от раствора, и трудно объяснить весь эффективно идущий и организованный в пространстве процесс беспорядочной диффузией промежуточных продуктов по типу реакций, характерных для растворов. При этом нельзя исключить, что функционирование отдельных звеньев переноса электрона подчиняется закономерностям, известным для «диффузионного» механизма. Следует указать на опыты нашей лаборатории, в которых было показано, что фотосенсибилизация в модельной системе донор электрона — пигмент — акцептор электрона практически прекращается в высоковязкой системе — нужны стадии, связанные с диффузией промежуточных продуктов [27].

Не менее натянуты теории рассматривающие перенос электрона в грануле с позиций физики твердого тела — «полупроводниковая модель» — с общими электронными уровнями (зонами), объединяющими все компоненты цепи фотосинтетического переноса электрона. Нужно начать с того, что хлоропласт является не кристаллической структурой, а гелеобразной слоистой «полужидкой» и гетерогенной системой.

Уподобление хлоропласта «полупроводнику» является слишком грубой моделью, хотя участки цепи переноса электрона, содержащие агрегированный хлорофилл, могут обладать «квазиполупроводниковыми» свойствами, что иллюстрируется, например, опытами по фотопроводимости твердого хлорофилла и других пигментов.

Как представить себе перенос электрона от пигмента к биохимическим системам, например цитохрому? Для объяснения аналогичных явлений в митохондриях выдвинута гипотеза направленного маятникового движения компонентов цепи на фазовых границах, заменяющего «беспорядочную» диффузию. Можно предполагать, что молекулы липопротеинов принимают участие в переносе электрона; эта гипотеза, выдвигалась ранее при изучении цепи переноса электрона в митохондриях [81]. Чтобы понять механизм взаимодействия систем фотосинтетического переноса электрона, необходимо знать молекулярную организацию хроматофоров и гранул.

ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА НЕХЛОРОФИЛЛОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Среди участников цепи есть ряд компонентов, поглощающих свет в видимой и близкой ультрафиолетовой области солнечного спектра. Это — прежде всего каротиноиды и фикобилины, фикоцианин и фикоэритрин.

Работами ряда исследователей установлено, что энергия квантов света, поглощенных фикобилинами, мигрирует к хлорофиллу. Можно считать наиболее вероятным, что фикобилины не принимают непосредственного участия в переносе электрона, а передают энергию хлорофилла «коротковолновым» формам. В отношении каротиноидов это положение не совсем ясно. Если, в случае фукоксантина бурых водорослей наблюдается эффективная миграция энергии на хлорофилл, то в случае других каротиноидов эффективность процесса относительно мала. Сапожников [82] выдвинул гипотезу об участии каротиноидов в процессах выделения кислорода при фотосинтезе. Возможно, что каротиноиды наряду с липопротеинами участвуют в переносе энергии и электрона в отдельных звеньях цепи фотосинтетического переноса водорода.

Среди других компонентов поглощают видимый свет цитохромы и флавины. Цитохромы фотохимически неактивны; мы наблюдали [20] небольшое ускорение окислительно-восстановительных превращений цитохрома *с* при действии «белого» света [20]. Флавины фотохимически активны, и световая активация этого звена в синей области спектра вполне вероятна.

Восстановленные пиридиннуклеотиды обладают поглощением при 340 *ммк* и под действием близкого ультрафиолета активируются — увеличивается их способность к фотоокислению [31].

Особого рассмотрения заслуживает вопрос о фотохимической активности измененных форм хлорофилла — окисленной и восстановленной. Эти формы обладают поглощением в близкой инфракрасной и зеленой областях спектра и, поглощая квант света, могут фотохимически активироваться. Мы наблюдали, например, что красный свет сильно действует на окисление фотовосстановленного порфирина [83]. Это явление детально изучалось в недавних работах Гуриновича с соавторами [84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя изложенный материал, мы хотели бы выделить следующие положения.

Изучение фрагментов цепи фотосинтетического переноса электрона указывает на то, что фотохимические стадии заключаются в переносе электрона (водорода) от донора к акцептору; этот перенос фотосенсибилизируется разными формами пигментов. В качестве доноров и акцепторов используются компоненты биохимических систем цепи фотосинтетического переноса электрона. Следует полагать, что обратимое фотохимическое взаимодействие хлорофилла и его аналогов с донорами и акцепторами электрона определяет течение этих фотохимических стадий.

Изучение фотохимических превращений пигментов непосредственно в организмах позволило обнаружить значительные изменения флуоресценции хлорофилла под влиянием светового импульса, вероятно, связанные с фотохимическим процессом и изменением состояния пигмента в комплексе.

Хотя до сих пор неясна пространственная молекулярная организация цепи фотосинтетического переноса электрона в хлоропластах и хроматофорах, трудно сомневаться в том, что бóльшая часть хлорофилла и его аналогов находится в агрегированных формах, обладающих разными типами упаковки, что особенно отчетливо видно на примере пигментов фотосинтезирующих бактерий. Типы молекулярных упаковок, т. е. взаимодействия между молекулами пигментов в агрегированных формах, в значительной мере определяются структурой и свойствами молекул хлорофилла и его аналогов. В твердых пленках и концентрированных растворах пигментов обнаруживаются типы пигментных упаковок, обладающих теми же спектральными характеристиками, что и пигменты в организмах.

Способ участия мономерных и агрегированных форм пигментов в реакциях фотосинтеза требует дальнейшего углубленного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Красновский. Возникновение жизни на Земле. Изд-во АН СССР, 1957, 355.
2. В. Э. Успенская, Е. Н. Кондратьева. Микробиология, 1962, вып. 3, 31.
3. А. А. Красновский, Г. П. Брин. Докл. АН СССР, 1962, **147**, 666.
4. N. Good, R. Hill. Arch. Biochem. and Biophys., 1955, **57**, 355.
5. Л. М. Воробьева, А. А. Красновский. Биохимия, 1958, **23**, 760.
6. L. P. Vernon, M. O. Hobbs. Arch. Biochem. and Biophys., 1957, **72**, 25.
7. K. Tagawa, D. J. Arnon. Nature, 1962, **195**, 537.
8. J. Frank, K. Herzfeld. J. Phys. Chem.. 1941, **45**, 978.
9. R. Emerson. Ann. Rev. Plant Physiol., 1958, **9**, 1.
10. К. С. Франч, Д. К. Фок. Труды V МБК. Симпозиум VI. Изд-во АН СССР, 1962.
11. А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1948, **61**, 91.
12. А. А. Красновский, Г. П. Брин.— Докл. АН СССР, 1949, **67**, 325.
13. А. А. Красновский, Г. П. Брин, Н. Н. Дроздова. Докл. АН СССР, 1963, **150**, 1157.
14. А. А. Красновский, Г. П. Брин. Докл. АН СССР, 1963, **153**, 212.
15. Г. П. Брин, А. А. Красновский. Биохимия, 1959, **24**, 1085.
16. A. A. Krasnovsky. J. Chem. Phys., 1958, 55, 968; Ann. Rev. Plant Physiol., 1960, **11**, 363.
17. А. А. Красновский. Усп. химии, 1960, **29**, 736.
18. А. А. Красновский. Н. Н. Дроздова. Биохимия, 1961, **26**, 859.
19. В. Б. Евстигнеев. ЖФХ, 1958, **32**, 969.
20. А. А. Красновский и К. К. Войновская. Докл. АН СССР, 1955, **103**, 283; Биофизика, 1956, **1**, 120.
21. М. Камен, в кн.: Труды V МБК. Симпозиум VI. Изд-во АН СССР, 1962, 293.
22. E. Rabinowitch, J. Weiss. Proc. Roy. Soc. A, 1937, **162**, 25.
23. Б. Я. Даин, М. С. Ашкинази. Проблемы фотосинтеза. Изд-во АН СССР, 1959.
24. А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1947, **58**, 617, 835.
25. А. А. Красновский, К. К. Войновская. Докл. АН СССР, 1951, **81**, 879.
26. H. Linchitz, J. Rennert. Nature, 1952, **169**, 193.
27. А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Докл. АН СССР, **150**, 1378; 1963, **153**, 721.
28. А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова. Докл. АН СССР, 1964, **158**, 730.
29. S. S. Brody. J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 1570.
30. С. С. Буцко, Б. Я. Даин. Укр. хим. ж., 1961, **27**, 314.
31. А. А. Красновский, Г. П. Брин. Докл. АН СССР, 1964, **158**, 225.
32. A. A. Krasnovsky. In: Progress in photobiology. Elsevier Publ., 1960, p. 561.
33. G. Tollin, G. Green. Biochim. et Biophys. Acta, 1962, **60**, 524.
34. А. А. Красновский, А. В. Умрихина. Биофизика, 1958, **3**, 547.
35. Г. Т. Рихирева, З. П. Грибова, А. В. Умрихина, Л. П. Кашин, А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1964, **159**, 196.
36. Ф. Ф. Литвин, Ю. А. Владимиров, А. А. Красновский. Усп. физ. наук, 1960, **71**, 149.
37. Goedheer J. C., Vegt G. R. Nature, 1962, **193**, 875.
38. A. H. Terenin, E. K. Putzeiko, J. A. Akimov. J. Chem. Phys., 1957, **54**, 716.
39. В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин. Докл. АН СССР, 1951, **81**, 223.
40. Пуцейко Е. К. Докл. АН СССР, 1963, **150**, 343.
41. В. Б. Евстигнеев. Биофизика, 1963, **8**, 664.
42. В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова. Докл. АН СССР, 1963, **151**, 227.

43. Б. Ченс, М. Нишимура. Труды V МБК, Симпозиум VI. Изд-во АН СССР, М., 1962.
44. J. Coleman, Rabinowitch E. J. Phys. Chem., 1959, **63**, 30.
45. В. Кок. Труды V МБК. Симпозиум VI. Изд-во АН СССР, 1962, 67.
46. Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1963, **149**, 1428; Биофизика, 1963, **8**, 191.
47. D. Rubinshtein, E. Rabinowitch. Science, 1963, **142**, 681.
48. B. Commoner. In: «Light and Life». Baltimore, 1961, 356.
49. Г. Т. Рихирева, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1964, **156**, 1451.
50. M. Calvin. In: «Light and Life». Baltimore, 1961, 317.
51. В. Е. Холмогоров, А. Н. Теренин. Докл. АН СССР, 1961, **137**, 199.
52. А. В. Умрихина, И. Н. Голубев, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский. Биофизика, 1964, **9**, 423.
53. R. Livingston et al. J. Amer. Chem. Soc., 1949, **71**, 1542.
54. В. Б. Евстигнеев, А. В. Гаврилова, А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1949, **66**, 1133; 1950, **70**, 261.
55. Holt A. S., Morley H. W. J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 500.
56. А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая. Докл. АН СССР, 1952, **85**, 389.
57. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина. Докл. АН СССР, 1959, 127, 913.
58. Е. В. Белавцева, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский. Биофизика, 1959, **4**, 521.
59. S. S. Brody. Science, 1958, **128**, 838.
60. Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский. Биофизика, 1962, **7**, 578.
61. А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун Юй-цюнь. Докл. АН СССР, 1962, 143; 456.
62. А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Б. А. Гуляев. Докл. АН СССР, 1963, **152**, 1231.
63. Ф. Ф. Литвин, Б. А. Гуляев. Докл. АН СССР, 1964, **158**, 461.
64. А. А. Красновский, М. И. Быстрова. Биохимия, 1960, **25**, 168.
65. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая. Докл. АН СССР, 1952, **85**, 177; 1953, **91**, 343.
66. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева. Докл. АН СССР, 1960, **135**, 1528.
67. А. А. Красновский, Е. А. Нестеровская, А. Б. Гольденберг. Биофизика, 1956, **1**, 328.
68. C. S. French, A. B. Church. Carnegie Inst. Wash., Year Book, 1954—1955, № 54, 162.
69. Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский. Докл. АН СССР, 1957, **117**, 106.
70. K. Shibata. J. Biochem. (Japan) 1957, **44**, 147.
71. J. K. Loeffler. Carnegie. Inst. Wash., Year Book 1954—1955, **54**, 159.
72. J. B. Wolf, L. Price. Plant Physiol., 1956, **31**, 30.
73. Т. Н. Годнев, А. А. Шлык, Я. П. Ляхнович. Физиология растений, 1957, **4**, 393.
74. А. А. Красновский, М. И. Быстрова, А. Д. Сорокина. Докл. АН СССР, 1960, **136**, 1227.
75. Л. М. Воробьева, М. И. Быстрова, А. А. Красновский. Биохимия, 1963, **28**, 524.
76. Дж. Смит. В сб.: Структура и функции фотосинтетического аппарата. ИЛ, 1962, 300.
77. S. Takashima. Nature, 1952, **169**, 182.
78. А. А. Красновский, Г. П. Брин. Докл. АН СССР, 1954, **95**, 611.
79. B. B. Love, T. T. Bannister. Biophys. J., 1963, **3**, 99.
80. E. Yakushiji, K. Uchino, Y. Sigimura, J. Schrateri, F. Takamiya. Biochim. et Biophys. Acta, 1963, **75**, 293.
81. Д. Грин. Труды V МБК. Пленарная лекция. М., Изд-во АН СССР, 1962.
82. Д. И. Сапожников, Н. А. Божанова. Докл. АН СССР, 1958, **120**, 1141.
83. А. А. Красновский, К. К. Войновская. Докл. АН СССР, 1957, **112**, 911.
84. Г. П. Гуринович. Докл. АН СССР, 1964, **156**, 125.

Доклады Академии наук СССР
1965. Том 163, № 3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА КАК АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНА ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ХЛОРОФИЛЛА И ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ

Работы последних лет показали, что в цепи фотосинтетического переноса электрона конечными акцепторами могут быть системы с величиной окислительно-восстановительного потенциала (E_0), близкой к E_0 водородного электрона — ферредоксин и метилвиологен. Так, Гуд и Хилл [1] указали на восстановление бензилвиологена хлоропластами при освещении в анаэробных условиях. Арнон [2] обнаружил и исследовал восстановление метилвиологена и ферредоксина хлоропластами в присутствии ряда доноров электрона.

В нашей лаборатории было показано, что хлорофилл в присутствии аскорбиновой кислоты сенсибилизирует восстановление рибофлавина и сафранина Т [3], пиридиннуклеотидов и N-бензилникотинамида [4, 5]. Следовало выяснить, можно ли в модельных реакциях этого типа наблюдать восстановление акцепторов электрона, обладающих потенциалом водородного электрода. Исследованная нами недавно [6, 7] фотохимическая активация восстановленных пиридиннуклеотидов привела к тому же вопросу.

В настоящей работе изучено поведение в реакциях описанного типа метилвиологена (МВ), обладающего $E_0 = -0{,}446$ в. Восстановленная форма МВ синего цвета (максимум поглощения в воде 600, в пиридине 605 мμ), окисленная — неокрашена.

Прежде всего следовало изучить «темновое» взаимодействие МВ с донорами электрона, которые мы использовали в модельных реакциях, идущих в разных средах, преимущественно в пиридине, спирте и воде.

Влияние природы среды на взаимодействие метилвиологена с донорами электрона. Опыты вели в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для измерения на спектрофотометре СФ-4. В трубку вводили раствор донора электрона в 4 мл испытуемого растворителя, в головку (боковой отвод) 1 мл 10^{-3} M раствора МВ. После откачивания воздуха раствор МВ приливали к раствору донора электрона, измеряли оптическую плотность при 600—605 мμ после достижения равновесия и пускали в трубку воздух с целью обратного окисления образованной восстановленной формы МВ. Величина ΔD (разность оптической плотности при 600 мμ до и после пуска воздуха) характеризует степень восстановления МВ.

Степень посинения (т. е. количество восстановленного МВ) в системах, содержащих пиридин, зависит от количества воды и аскорбиновой кислоты; чем больше воды и аскорбиновой кислоты, тем меньшее количество МВ находится в восстановленной форме. Так, например, при 20—30% воды в пиридине (т. е. в условиях, благоприятствующих фотовосстановлению хлорофилла) почти весь МВ находится в окисленной форме. При 10% воды в пиридине раствор синий: ΔD составляет около 1,0. Максимум восстановления при 5% воды в пиридине, по-видимому, связан с оптимальными условиями диссоциации аскорбиновой кислоты и «основности» среды (рис. 1). В спирте с 10—20% воды (в пределах pH от 4 до 9)

равновесие сдвинуто в сторону окисленной формы МВ, и лишь введение 1—2 капель 1 н NaOH ведет к посинению раствора.

Фенилгидразин ведет к посинению МВ в пиридине; так, при 20% воды ΔD составляет 0,34, а в спирте с 20% воды лишь 0,03. Восстановленные пиридиннуклеотиды и N-бензилникотинамид не приводят к восстановлению МВ.

Описанные явления следует объяснить тем, что в основных средах увеличивается восстановительный потенциал аскорбиновой кислоты ([8]),

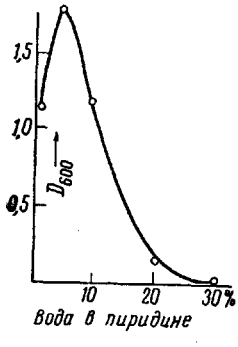


Рис. 1

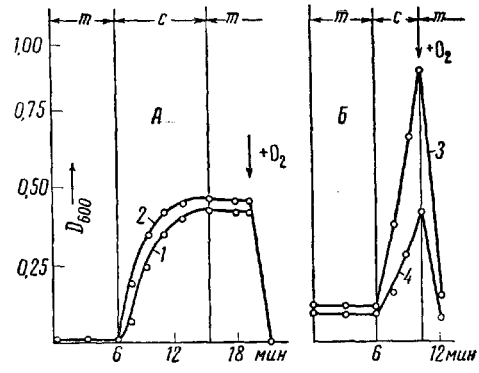


Рис. 2

Рис. 1. Восстановление метилвиологена аскорбиновой кислотой (5 мг в 4 мл раствора) в зависимости от количества воды в пиридине (исходный пиридин содержит около 0,3% воды)

Рис. 2. Фотовосстановление метилвиологена НАД·H_2 и БНА·Н в воде (*А*) и в пиридине (*Б*). с — свет, т — темнота. *1*, *3* — БНА·Н, *2* — НАД·H_2, *4* — без донора электрона

тогда как МВ является «электронным» редокс-индикатором, величина E_0 которого не зависит от pH ([9]). Нужно полагать, что в сильно щелочных средах E_0 аскорбиновой кислоты приближается к E_0 водородного электрода. Действие пиридина как среды специфично. Пиридин влияет, по-видимому, не только на ионизацию аскорбиновой кислоты, но и на величину сродства к электрону МВ.

Действие света на реакцию метилвиологена с восстановленными пиридиннуклеотидами и N-бензилникотинамидом (БНА·Н). Освещение в максимуме поглощения этих соединений ртутно-кварцевой лампой ПРК-4 через светофильтр УФС-2 (линиями 365 мμ) ведет к быстрому фотовосстановлению сафранина, хлорофилла и других соединений ([6]). Опыты с МВ ставили следующим образом: в трубку Тунберга вводили 4 мл раствора НАД·H_2 (D_{340} ~1,0) и 1 мл раствора МВ в воде 10^{-3} *М*, откачивали воздух и освещали трубку. В течение 1 мин наблюдалось появление синей окраски восстановленного МВ во всех растворителях — пиридине, спирте и воде. Введение из бокового отвода трубки окисленной формы НАД приводило к обратной реакции. Пуск воздуха приводил к быстрому исчезновению синей окраски раствора (рис. 2).

Предварительное освещение растворов НАД·H_2 и БНА·Н в пиридине с последующим сливом МВ из головки трубки в темноте также приводило к его восстановлению, в согласии с описанными ранее опытами по образованию в этих условиях долгоживущей «фотоактивированной» формы НАД·H_2 и БНА·Н ([6, 7]).

Освещение растворов БНА·Н и НАД·H_2 в вакууме ведет к повышению отрицательного потенциала платинового электрода ([7]). При введении метилвиологена (10^{-4} *М*) в эту систему (в пиридине) фотопотенциал

устанавливается быстрее, тогда как в водных растворах этот эффект отчетливо не выражен.

Таким образом, фотохимическая активация увеличивает восстановительный потенциал НАД·H_2 и БНА·Н до величины не меньшей, чем потенциал водородного электрода.

Действие метилвиологена на реакцию фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой. Введение МВ (10^{-3}—10^{-4} *M*) в систему аскорбиновая кислота — хлорофилл — пиридин — вода (10%) ведет к блокированию фотовосстановления хлорофилла и образования «красной» восстановленной формы, вероятно за счет быстрой реакции фотовосстановленных форм хлорофилла с МВ по механизму, изученному в нашей лаборатории ([10]). Приливание МВ из бокового отвода трубки Тунберга к фотовосстановленному хлорофиллу по методике, описанной ранее ([11]), ведет к темновой реакции «красной» восстановленной формы хлорофилла с МВ.

Таким образом, введение МВ в систему хлорофилл — аскорбиновая кислота (АН) ведет к быстрой обратимости реакции, вероятно, за счет переноса электрона в цикле, составленном компонентами реакции. В благоприятных условиях можно ожидать накопления фотовосстановленной формы МВ, т. е. наблюдать фотосенсибилизированную реакцию.

Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена в пиридине. При использовании как донора водорода аскорбиновой кислоты в пиридине с 10% воды часть МВ находится в восстановленной форме, и освещение красным светом ведет к сдвигу равновесия в сторону увеличения количества восстановленного МВ (рис. 3*A*).

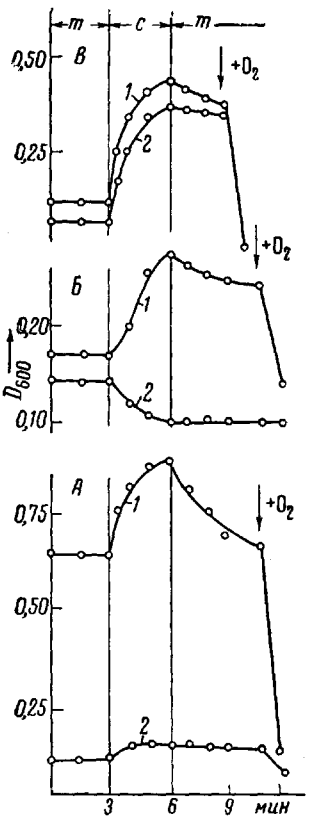


Рис. 3. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена. *А*: *1* — система хлорофилл а (10^{-5} *M*) — аскорбиновая кислота ($5 \cdot 10^{-3}$ *M*) — МВ ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*) в пиридине (10% воды) при 20°; *2* — то же без аскорбиновой кислоты. *Б*: *1* — система хлорофилл а — аскорбиновая кислота — МВ в спирте (20% воды) при — 60°; *2* — то же без аскорбиновой кислоты. *В*: система хлорофилл а — фенилгидразин ($2 \cdot 10^{-2}$ *M*) — МВ. *1* — при 20°, *2* — при — 60°. т — темнота, с — свет

При выключении света реакция идет обратно с установлением «темнового» равновесия. Введение воздуха ведет к полному обратимому окислению восстановленного МВ. При использовании фенилгидразина и БНА·Н как доноров водорода также наблюдается фотосенсибилизированное восстановление МВ, в темноте и после пуска воздуха реакция идет обратно. Реакция с фенилгидразином идет глубже, чем с аскорбиновой кислотой.

Фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена в этиловом спирте (с 20% воды). Опыты ставили следующим образом: в трубку Тунберга вводили 4 мл спиртового раствора хлорофилла а (10^{-5} *M*) и 5 мг аскорбиновой кислоты, в головку трубки 1 мл раствора МВ 10^{-3} *M* в водном спирте. После откачивания воздуха приливали раствор МВ из головки в трубку.

При освещении красным светом при комнатной температуре реакция шла слабо; ΔD при 600 мμ достигало 0,03—0,05. Полагая, что это явление связано с быстрой обратимостью процесса, мы поставили опыты при —70°, с тем чтобы замедлить течение обратных реакций восстановлен-

ного МВ; для этого трубку освещали в прозрачном сосуде Дьюара со смесью спирта с твердой углекислотой. Действительно, в этих условиях реакция шла глубже, и ΔD при 600 мμ достигало 0,1 за 1 мин освещения (рис. 3*Б*).

Использование фенилгидразина как донора электрона в спиртовом растворе ведет к более глубокому восстановлению МВ при освещении. Этот опыт особенно демонстративен: освещение красным светом (в области поглощения хлорофилла) ведет к быстрому посинению раствора; в случае фенилгидразина, в отличие от аскорбиновой кислоты, понижение температуры мало влияет на глубину реакции (рис. 3*В*).

Фотопотенциалы. Измерение фотопотенциала инертного электрода в изучаемой системе, характеризующее появление «электродноактивных» соединений, проводили в вакууме по методу, принятому в нашей лаборатории ([12]).

В системе хлорофилл а (10^{-4} *M*) — МВ (10^{-3} *M*) в водном спирте и пиридине при освещении красным светом наблюдалось изменение потенциала платинового электрода в «отрицательную» сторону на 150—200 мв, свидетельствующее о появлении отрицательно заряженных электродноактивных фотопродуктов, вероятно восстановленного метилвиологена. В пиридине фотопотенциал устанавливается быстро (до 30 сек), в водном спирте — медленно (минуты).

Роль донора электрона в этой реакции могут играть молекулы растворителя (спирт, пиридин) или хлорофилла. Пуск воздуха приводит систему в исходное состояние.

Система хлорофилл а ($3 \cdot 10^{-4}$ *M*) — фенилгидразин ($4 \cdot 10^{-2}$ *M*) в водном спирте и пиридине в вакууме при освещении показывает увеличение фотопотенциала в «отрицательную» сторону на 150—200 мв; при выключении света потенциал обратимо падает; введение метилвиологена (10^{-4} *M*) в эту систему существенно не изменяет эффекта; наблюдается лишь замедление обратной темновой реакции.

Данные о величине темнового и светового равновесия между окисленной и восстановленной формами МВ дают возможность приближенно рассчитать величину светового сдвига редокспотенциала системы (ΔE) в условиях опыта в согласии с уравнением

$$\Delta E = \frac{RT}{n}\left[\ln\left(\frac{O}{B}\right)_{\text{с}} - \ln\left(\frac{O}{B}\right)_{\text{т}}\right],$$

где отношение O/B представляет собой соотношение концентраций окисленной (O) и восстановленной (B) форм метилвиологена в темноте (т) и при освещении (с). Приближенный подсчет для системы хлорофилл — аскорбиновая кислота — МВ в спирте показывает, что ΔE лежит в пределах нескольких десятков милливольт. Вопрос о согласовании данных прямых измерений фотопотенциала и расчетной величины по изменению фотостационарной концентрации МВ требует дальнейших исследований.

Таким образом, в изученных модельных системах под действием света удается наблюдать фотовосстановление метилвиологена — акцептора электрона с потенциалом, близким к водородному электроду.

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

Поступило
1 IV 1965

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] N. Good, R. Hill, Arch. Biochem. and Biophys., **57**, 355 (1955). [2] D. Arnon, Photosynthetic Mechanismus of Green Plants, Ed. B. Kok, A. Jagendorf, 1963, p. 195. [3] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948). [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **150**, 1157 (1963). [5] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **24**, 1085 (1959). [6] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **153**, 212 (1963); **158**, 225 (1964). [7] А. А. Красновский, Г. П. Брин, в сборн. Проблемы эволюционной и технической биохимии, «Наука», 1964. [8] E. Ball, J. Biol. Chem., **118**, 219 (1937). [9] L. Michaelis, J. Gen. Physiol., **16**, 859 (1933). [10] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Биохимия, **26**, 859 (1961). [11] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950). [12] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953).

Доклады Академии наук СССР
1965. Том 163, № 2

БИОФИЗИКА

Г. Т. РИХИРЕВА, А. В. УМРИХИНА, Л. П. КАЮШИН,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАЗОВАНИЕ ТРИПЛЕТНЫХ И РАДИКАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ПОРФИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Интерпретация природы фотоиндуцированных парамагнитных центров, возникающих непосредственно в фотосинтезирующей клетке, крайне затруднительна. Это заставляет обращаться к исследованию относительно более простых модельных систем, содержащих хлорофилл [1]. В связи с этим представляет интерес изучение при помощи метода электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.) фотохимических превращений порфина, производными которого являются все хлорофилловые пигменты.

В настоящей работе описывается исследование методом э.п.р. образования триплетных и радикальных состояний под действием видимого света в замороженных растворах порфина и его более сложных производных — протопорфирина и гематопорфирина — в этаноле и пиридине. Э.п.р. последних двух соединений при у.-ф. освещении изучался ранее [2].

Порфин был получен по модифицированному нами методу Ротемунда [3]. В случае порфина и протопорфирина как растворитель использовали этанол, содержащий HCl (к 1 мл спирта добавляли 0,06 мл концентрированной соляной кислоты).

Измерение спектров э.п.р. проводили на установке, описанной ранее [1]. Источником освещения служила ртутная лампа ДРШ-1000 с фильтром ЖС-4, пропускающим свет с длинами волн больше 400 мμ. Для измерений э.п.р. использовали растворы пигментов в концентрации 10^{-3} *М*. Растворы помещали в кварцевые трубки и подвергали вакуумной тренировке. Все измерения спектров э.п.р. проводили при 77° К. При изучении влияния на спектры э.п.р. размораживания растворов образцы нагревали вне резонатора. Нужную температуру устанавливали регулированием тока испаряемого жидкого азота. Температуру измеряли с помощью откалиброванной медь-константановой термопары. Образцы выдерживали при заданной температуре 5 мин, затем быстро переносили в жидкий азот.

Спектры поглощения измеряли на регистрирующем спектрофотометре, сконструированном на основе СФ-4. Кюветная часть спектрофотометра была снабжена кварцевым сосудом Дьюара. Измерения спектров поглощения растворов пигментов (10^{-5} *М*) проводили при 77° К в таких же кварцевых трубках, как и для измерения э.п.р. Освещение образцов осуществляли в резонаторе э.п.р.-спектрометра. Размораживание образцов производили вне спектрофотометра.

Измерения спектров э.п.р. в области $\sim$1600 эрст показали, что при освещении исследуемых растворов видимым светом удается наблюдать образование триплетных состояний порфина, гематопорфирина и протопорфирина в замороженных спиртовых матрицах, что соответствует уже описанным ранее данным [1, 2], а также гематопорфирина и протопорфирина в замороженных пиридиновых матрицах. Синглетные полосы триплетного э.п.р.-поглощения мгновенно исчезали после выключения света.

При измерении спектров э.п.р. в поле 3300 эрст обнаружено, что освещение видимым светом этанольных растворов гематопорфирина и протопорфирина и пиридиновых растворов всех трех пигментов индуцирует появление синглетных полос э.п.р. поглощения ($g = 2$; $\Delta H \approx 9 - 13$ эрст).

Максимальное увеличение полос достигалось за 5—10 мин освещения. Эти сигналы сохранялись длительное время после выключения света и исчезали после размораживания образцов до комнатной температуры.

При изучении растворов гематопорфирина в этаноле было обнаружено, что амплитуда фотоиндуцированной синглетной полосы э.п.р. значительно больше в присутствии кислоты (5% HCl), чем в нейтральном спирте или в присутствии щелочи (5% KOH).

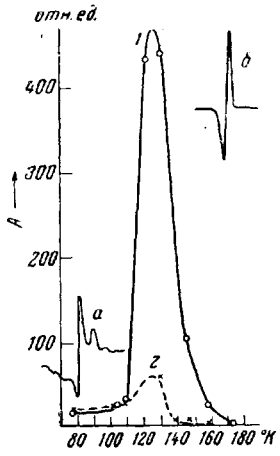


Рис. 1. Изменение амплитуды (A) синглетной компоненты спектров э.п.р., освещенных 10 мин видимым светом ($\lambda \geqslant \geqslant 400$ мμ) спиртовых растворов порфина при размораживании: *1* — в вакууме, *2* — в присутствии воздуха. *а* — исходный (77° K) спектр э.п.р., *б* — спектр э.п.р. растворов, нагретых до 125—170° K

При освещении спиртовых растворов порфина появлялся многокомпонентный спектр э.п.р. (рис. 1*а*). По мере увеличения времени освещения соотношение амплитуд компонент спектра изменялось в сторону преобладания центрального синглета ($g = 2$; $\Delta H \approx 12$ эрст). Этот факт свидетельствует о том, что полученный спектр обусловлен более чем одним радикальным продуктом. Сопоставление полученного спектра со спектром растворителя, облученного 15 мин полным светом ртутной лампы, позволило установить, что структура спектра, за исключением центрального синглета, обусловлена свободнорадикальными продуктами превращения спирта.

Интересно отметить, что в спектре э.п.р. освещенного подкисленного раствора тетраметилпорфирина в этаноле имелась только синглетная компонента *. Более четкое разделение компонент фотоиндуцированного спектра спиртовых растворов порфина удалось проследить при исследовании спектров в процессе постепенного нагревания образцов от 77 до 200° K.

При нагревании от 77 до 110—120° K полосы спектра, обусловленные спиртовыми радикалами, полностью исчезали, и спектр был представлен синглетной линией (рис. 1*б*). В интервале последующих 20—30° наблюдали резкое увеличение амплитуды синглетного сигнала (в 10—25 раз) и затем резкое падение ее до полного исчезновения сигнала э.п.р. при 180—190° K. На рис. 1 представлены кривые изменения амплитуды синглетной компоненты спектров эвакуированного и неэвакуированного образцов этанольных растворов порфина. Очевидно, что в присутствии кислорода воздуха увеличение амплитуды синглетного сигнала при промежуточных температурах выражено значительно слабее.

По мере размораживания спиртовых растворов протопорфирина также наблюдали увеличение (но менее выраженное) амплитуды сигнала при 120—130° K. В пиридиновых растворах протопорфирина при размораживании происходило постепенное уменьшение амплитуды сигнала.

Было проведено измерение спектров поглощения в области 370—650 мμ спиртовых растворов порфина и протопорфирина в условиях, аналогичных измерению спектров э.п.р.

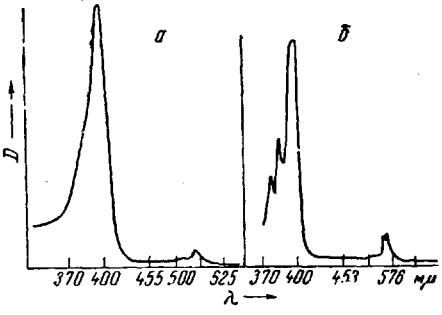


Рис. 2. Спектры поглощения раствора порфина в этаноле (вакуум): *а* — 300° K, *б* — 77° K

* Тетраметилпорфирин был любезно предоставлен Р. П. Евстигнеевой, за что авторы приносят ей глубокую благодарность.

При измерении спектра порфина при 77° К появлялась сверхтонкая структура в области основных полос поглощения (рис. 2 *а, б*). Характер исходного спектра порфина указывает на то, что пигмент в кислом этаноле находится в катионной форме (4) с двумя основными полосами поглощения: в области 400 мμ и дублета при 540 мμ. После освещения раствора при 77° К происходили резкие изменения спектра: полное исчезновение дублета и, по-видимому, основного поглощения в области Соре, а также появление максимума при 430—435 мμ (рис. 3). При размораживании растворов в интервале 120—130° К наблюдалось небольшое увеличение (на 25—40%) поглощения в максимуме 430—435 мμ, затем при более высоких температурах уменьшение его и полное исчезновение при нагревании до комнатной температуры. Одновременно происходило неполное восстановление интенсивности дублетной полосы. В области полосы Соре происходили изменения резкие, но трудно интерпретируемые, вследствие сильного перекрывания нескольких полос. В частности, при промежуточных температурах появлялась интенсивная узкая полоса при 398 μ. В процессе размораживания при 150—160° К наблюдалось появление максимумов при 410 и 610 мμ, которые, по всей вероятности, принадлежали одному и тому же продукту реакций, происходящих в системе. Эти максимумы не исчезали при нагревании растворов до комнатной температуры. Появление продукта с красной полосой поглощения, по-видимому, может свидетельствовать об имевшем место частичном гидрировании порфина (4).

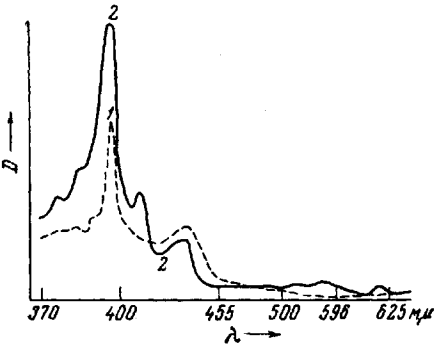


Рис. 3. Спектры поглощения освещенного раствора порфина: *1* — 77° К, *2* — после нагревания до 163° К

Интересно отметить, что на промежуточных стадиях процесса фотовосстановления порфина при комнатной температуре в 5%-м водном растворе HCl в присутствии аскорбиновой кислоты также наблюдается появление полосы поглощения при 433 мμ (рис. 4).

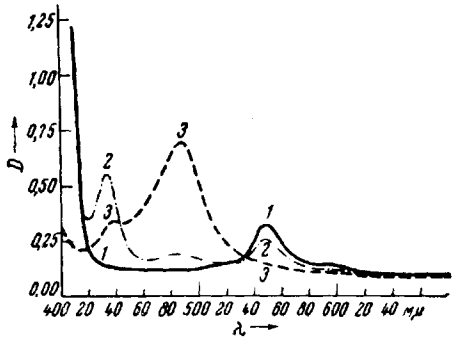


Рис. 4. Фотохимическое восстановление порфина аскорбиновой кислотой в 5%-м водном растворе HCl (комнатная температура, вакуум, освещение кинолампой 300 вт). *1* — исходный спектр, *2* — после 10 сек освещения, *3* — после 3 мин освещения

В спектре поглощения протопорфирина при освещении (77° К) происходило исчезновение длинноволновых максимумов (555 и 610 мμ), ослабление поглощения в области Соре и появление нового максимума при 455 мμ. При нагревании образца от 115 до 130° К поглощение в этом максимуме было больше, чем при 77° К. Полоса 455 мμ полностью исчезала при температурах, близких к 273° К; одновременно происходила регенерация исходного (до освещения) спектра. Никаких необратимо образующихся продуктов по спектрам обнаружено не было.

Сопоставляя данные измерений спектров поглощения и измерений э.п.р., следует подчеркнуть тот факт, что, во-первых, образование свободнорадикальных состояний в системе прослеживается по спектрам э.п.р. одновременно с сильным изменением спектра поглощения пигмента; во-вторых, очевидной является одинако-

вая направленность изменений тех и других спектров при нагревании образцов (исчезновение э.п.р.-поглощения и восстановление исходного спектра поглощения). Пока еще трудно сказать, принадлежит ли какой-нибудь максимум в спектре поглощения освещенного раствора радикальной форме пигмента, так как не установлено полной количественной корреляции между данными измерений э.п.р. и измерениями поглощения. Сходство максимума 435 мμ и максимума, появляющегося на начальных стадиях фотовосстановления порфина аскорбиновой кислотой, влияние присутствия кислорода воздуха на ход изменения спектров э.п.р. при размораживании образцов, а также характер спектра поглощения необратимо образующегося продукта в растворах порфина позволяют предположить, что в регистрируемый спектр э.п.р. делают вклад промежуточные свободнорадикальные продукты реакции фотовосстановления пигмента.

Бóльшая сложность спектра э.п.р. (наличие полос радикалов спирта) и изменений спектра поглощения раствора порфина (по сравнению с остальными порфиринами) позволяют предположить наличие нескольких стадий фотоиндуцированных превращений в исследуемых системах. Создается впечатление, что возбужденная молекула порфин-иона более активно реагирует с молекулами матрицы, чем гематопорфирин, протопорфирин и тетраметилпорфирин.

Таким образом, синглетная компонента спектра э.п.р. освещенного порфина может принадлежать ион-радикалу пигмента, возникшему в результате восприятия электрона катионом порфина от молекулы спирта, иначе говоря является результатом фотопереноса электрона в комплексе пигмент — растворитель. Элементарный механизм описанных реакций нуждается в дальнейшем изучении.

Авторы приносят благодарность Т. Л. Сметанниковой за помощь в измерении спектров поглощения.

Институт биологической физики
Академии наук СССР

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

Поступило
30 III 1965

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Г. Т. Рихирева, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. В. Умрихина, А. А. Красновский, ДАН, 159, 196 (1964). [2] З. П. Грибова, Р. П. Евстигнеева, А. Ф. Миронова, Л. П. Каюшин, В. Н. Лузина, А. К. Пискунов, Биофизика, 8, в. 5, 550 (1963). [3] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, 155, 691 (1964). [4] Е. Рабинович, Фотосинтез, 2, ИЛ, 1953.

Доклады Академии наук СССР
1965. Том 161, № 2

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Г. В. ХУТАРЕВА, Г. П. БРИН, Б. Э. ДАВЫДОВ, Б. А. КРЕНЦЕЛЬ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПОЛИСОПРЯЖЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

Для полимеров с системой сопряженных связей характерно (1) наличие полупроводниковых свойств. Фотосенсибилизирующее действие кристаллических органических красителей также, по-видимому, связано с их полупроводниковыми свойствами. А. А. Красновский и Г. П. Брин показали, что кристаллические фталоцианины — органические полупроводники обладают фотосенсибилизирующим действием в реакции окисления аскорбиновой кислоты кислородом (2). Поэтому можно было ожидать, что и полисопряженные системы будут обладать фотосенсибилизирующими свойствами.

Настоящее сообщение посвящено изучению влияния фотосенсибилизирующего действия полимеров с системой сопряженных связей в реакции окисления аскорбиновой кислоты. Для наблюдения кинетики окисления был использован микроманометрический метод Варбурга — Баркрофта. Опыты велись с водным раствором аскорбиновой кислоты при освещении * красным (длиннее 600 мμ), белым светом лампы накаливания и ультрафиолетовым (линия ртути 365 мμ) светом. Перед опытами полимеры растирались и просеивались через сито с размером отверстий 0,1—0,05 мм.

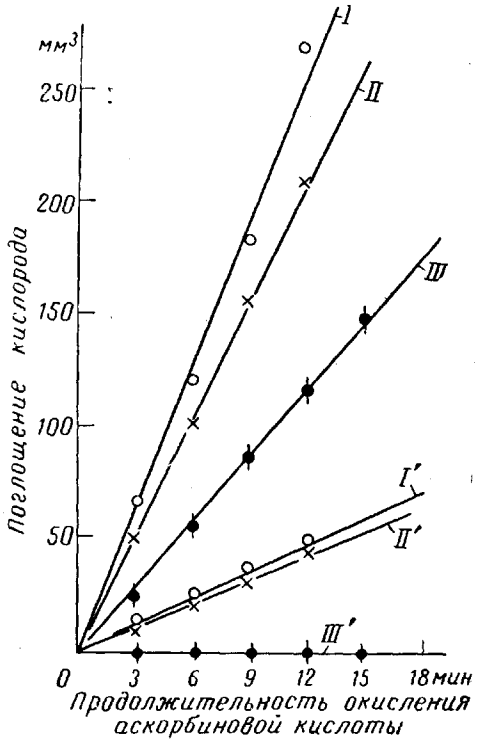


Рис. 1. Кинетические кривые поглощения кислорода аскорбиновой кислотой в присутствии полимеров, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами, при освещении ультрафиолетовым (*I*, *II*, *III*) и белым (*I′*, *II′*, *III′*) светом. *I*, *I′* — полиакрилонитрил термообработанный; *II*, *II′* — полишиффовое основание; *III*, *III′* — полипропиоловая кислота

К навеске полимера (100 мг), помещенной в реакционный сосуд прибора, снабженный манометрической трубкой, добавлялась дистиллированная вода (10 мл). Сосуд термостатировался в темноте при встряхивании в течение 15 мин, а затем в темноте и при освещении измерялось поглощение кислорода во времени. Аналогичные измерения производились и в присутствии аскорбиновой кислоты. Скорость окисления

* Интенсивность света: красного $I_к = 2{,}5 \cdot 10^4$, белого $I_б = 3{,}7 \cdot 10^4$, ультрафиолетового $I_{у.ф.} = 2{,}6 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек.

Таблица 1

Фотосенсибилизирующие свойства продуктов термического превращения полиакрилонитрила (ПАН)

№№ образцов	Наименование образца	Условия термообработки		Электрофизические данные		Скорость окисления мм³/мин·10	
		т-ра, °С	время, час	электропроводность, σ_{20} ом$^{-1}$·см$^{-1}$	энергия активации проводимости, E, эв	белый свет	у.-ф.
1	Исходный ПАН	—	$<10^{-20}$	—	—	0	0
2	ПАН, термообработанный	200	10^{-19}	2,0	—	1,1	2,5
3		200	10^{-19}	1,8	—	2,1	5,0
4		350	3	10^{-14}	1,0	0	6,0
5		450	3	10^{-7}	0,25	3,5	26,0
6		720	3	$0{,}5\cdot10^{-1}$	0,17	0	1,3
7	ПАН, термообработанный в растворе	220	18 мин	—	—	7,5	13,7
8	ПАН, термообработанный в атмосфере аммиака	330	6	10^{-9}	0,87	4,2	16,5

рассчитывалась по наклону кинетической кривой фотосенсибилизации поглощения кислорода, следующей нулевому порядку. В качестве фотосенсибилизатора использовались полимеры, относящиеся к следующим классам: полишиффовы основания, полиазины, полипропиловая кислота; полихинолин, полученный полимеризацией хинолина с раскрытием гетероцикла; продукты термического превращения полиакрилонитрила. Методы получения и свойства этих полимеров описаны в работах ([3–6]). Указанные полимеры представляют собой нерастворимые окрашенные вещества, имеющие максимум поглощения в ультрафиолетовой области. Длинноволновый спад спектра поглощения для некоторых из них охватывает всю видимую область. Указанные полимеры на воздухе являются полупроводниками p-типа ([1]).

Таблица 2

Фотосенсибилизирующие свойства полихинолина, полученного полимеризацией хинолина с раскрытием гетероцикла

Наименование образца	Условия полимеризации		Скорость окисления в у.-ф., $\frac{мм^3}{мин}\cdot10$
	температура, °С	продолжительность, час	
Полихинолин	370	2	7,5
	370	5	25,4
	370	10	31,7
	370	15	29,3

Специально было показано, что аскорбиновая кислота ни в темноте, ни при освещении в условиях опыта не поглощает кислорода (длинноволновая граница поглощения водных растворов аскорбиновой кислоты лежит при 300 мμ). Рассматриваемые полимеры следует разделить на две группы: одни из них оказывают сенсибилизирующее действие толь-

Таблица 3

Наименование образца	Электропроводность. σ_{20} ом$^{-1}$·см$^{-1}$	Энергия активации проводимости, эв	Скорость окисления, $\frac{мм^3}{мин}\cdot10$	
			белый свет	у-ф.
Полипропиоловая кислота	$6{,}0\cdot10^{-15}$	2,0	0	7,5
Полишиффовое основание на основе:				
парафенилендиамина с глиоксалем	$7{,}1\cdot10^{-19}$	2,0	2,5	8,9
парафенилендиамина с диацетилом (исходный)	$1{,}2\cdot10^{-17}$	2,0	3,4	15,6
парафенилендиамина с диацетилом (термообработанный при $t = 450°$)	$1{,}1\cdot10^{-6}$	0,64	2,4	5,6
парафенилендиамина с бензилом (исходный)	$1{,}3\cdot10^{-15}$	2,6	0,8	5,3
парафенилендиамина с бензилом (термообработанный при $t = 500°$)	—	—	0	0

) при освещении, т. е. являются типичными фотосенсибилизаторами, других освещение сопровождается ослаблением сенсибилизирующих ойств.

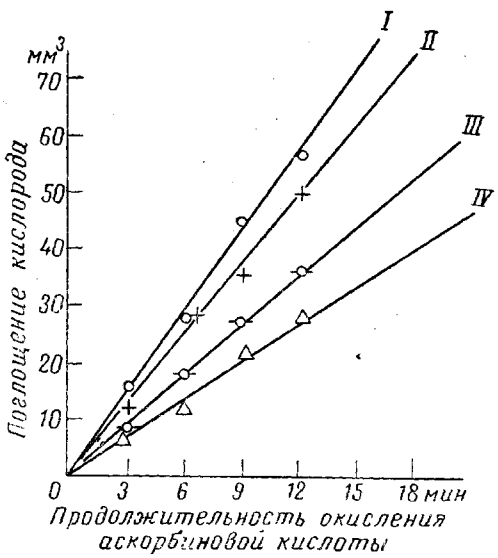
На рис. 1 приведены кинетические кривые поглощения кислорода скорбиновой кислотой в присутствии веществ, являющихся фотосенибилизаторами.

Как видно из этих данных, фосенсибилизирующим действием при кислении аскорбиновой кислоты обладают продукты термического превращения полиакрилонитрила, полипропиоловая кислота и некоторые полишиффовые основания. Во всех случаях активность этих полимеров как фотосенсибилизаторов в ближнем ультрафиолете (λ 365 мμ) больше, чем в видимой области. В табл. 1 сопоставлены скорости фотохимического окисления аскорбиновой кисло- в присутствии продуктов термического превращения полиакрилонитрила с некоторыми полупроводниковыми свойствами этих веществ.

Таблица 4

Влияние освещения на сенсибилизирующие свойства полинитрилов и парацианогена

Наименование образца	Скорость окисления аскорбиновой кислоты, $\frac{мм^3}{мин} \cdot 10$			
	в темноте	в красном свете	в белом свете	в у.-ф.
Полипропионитрил	5,0	4,0	3,2	2,7
Парацианоген	17,0	7,0	0	2,2
Полиацетонитрил	5,1	3,7	5,0	2,3



с. 2. Кинетические кривые поглощения кислорода аскорбиновой кислотой в присутствии полипропионитрила, *I* — в темноте, *II* — в красном свете, *III* — в белом свете, *IV* — в у.-ф. свете

По мере углубления термического превращения полиакрилонитрила его активность как фотосенсибилизатора проходит через максимум, причем максимальное значение скорости характерно для полимера, имеющего темновую проводимость 10^{-7}ом$^{-1}\cdot$см$^{-1}$ при энергии активации электропроводности 0,25 эв. Тот факт, что образец № 6 не проявлял фотосенсибилизирующей активности, свидетельствует о том, что наблюдаемое явление не связано с образованием углерода, так как возникновение углеродоподобных структур при высокотемпературной деструкции полиакрилонитрила наиболее характерно.

Как было показано ранее [1], термические превращения на первых стадиях сопровождаются образованием полисопряженной системы по C=N-связям. Углубление термообработки приводит к дегидрированию, возникновению межмолекулярных связей с последующим образованием сшитых структур. Термическое превращение полиакрилонитрила в атмосфере аммиака сопровождается повышением электропроводности с сохранением значительной энергии активации (0,87 эв). Характерно, что в присутствии полиакрилонитрила, полученного при термическом превращении в растворе, т. е. в условиях, исключающих образование сшитых структур, окисление аскорбиновой кислоты идет с довольно высокой скоростью.

Как видно из данных табл. 2, по мере увеличения продолжительности термической полимеризации хинолина резкое возрастание скорости фотоокисления аскорбиновой кислоты имеет место лишь на ранних стадиях.

Заметной активностью в качестве фотосенсибилизатора обладает т же полипропиоловая кислота, полишиффовые основания на базе пара нилендиамина с глиоксалем, бензилом и диацетилом.

Как видно из табл. 3, при термическом превращении полишиффов оснований, сопровождающимся повышением электропроводности и сн жением энергии активации, скорость фотосенсибилизации уменьшает

В отличие от рассмотренных полимеров полиацетонитрил, полипр пионитрил, поли-1-2-дибромпропионитрил и парацианоген, являясь темн выми катализаторами окисления аскорбиновой кислоты, на свету сн жают свою каталитическую активность. Это выражается в том, что ск рость окисления аскорбиновой кислоты в присутствии этих веществ в те ноте значительно выше, чем на свету (табл. 4).

Характерно, что во всех случаях при переходе от красного света к б лому и далее к ультрафиолетовому этот эффект возрастает. На рис. приведены кинетические кривые поглощения кислорода аскорбиновой ки лотой в присутствии полипропионитрила.

Таким образом, термообработанный полиакрилонитрил, полихинолин полипропиоловая кислота и полишиффовые основания, в отличие от поли нитрилов, катализирующих темновое окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха, обладают способностью фотосенсибилизировать э реакцию. Освещение в случае полинитрилов ведет к торможению реакции окисления аскорбиновой кислоты. Дальнейшие исследования будут посвя щены изучению механизма описанных явлений.

Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук

Поступило
21 X 1964

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Органические полупроводники, Изд. АН СССР, 1963. [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 53, № 5, 447 (1946). [3] А. В. Топчиев, Ю. В. Коршак и др., ДАН, 147, 645 (1962). [4] Б. Э. Давыдов, Ю. А. Попов и др., Изв. АН СССР, ОХН, 1963, № 4, 759; 1963, № 11, 2014. [5] Г. В. Хутарева, М. В. Шишкина и др., Нефтехимия, № 1 (1965). [6] Д. А. Топчиев, В. Г. Попов и др., Изв. АН СССР, ОХН, 1963, № 2, 387.

Photochemistry and Photobiology. 1965 Vol. 4, pp. 641–655. Pergamon Press Ltd. Printed in Great Britain

PHOTOCHEMISTRY AND SPECTROSCOPY OF CHLOROPHYLL, BACTERIOCHLOROPHYLL AND BACTERIOVIRIDIN IN MODEL SYSTEMS AND PHOTOSYNTHETIZING ORGANISMS

A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, U.S.S.R., Moscow.

(*Received* 28 *July* 1964)

Abstract—In the system (electron donor—pigment—electron acceptor), the photosensitising pigment transfers an electron (hydrogen) from the donor to the acceptor by converting light energy, absorbed by the pigment, into the potential chemical energy of the products. The dependence of the reaction of excited pigments with electron donors or acceptors on the magnitude of the electron affinity of the reacting molecules, the nature of the medium, and the experimental conditions was observed. The initial photo-process was seen to involve the formation of free radicals, with the subsequent formation of compounds with saturated valencies. The reverse reaction of the photoproducts was accompanied by chemiluminescence. The study of systems containing pyridinenucleotides showed the possibility of photosensitised oxidation—reduction of these compounds by a pigment, and of direct photooxidation of reduced pyridinenucleotides by an electron acceptor of a different kind. In order to understand the specific photo-transfer of an electron in organisms, the spectral properties of pigments in organisms were compared with the properties of model pigments in monomeric and aggregated forms. It was established that the main role in the spectroscopic properties shown by bacteriochlorophyll, bacterioviridin and chloropyll in organisms is played by various types of intermolecular interactions (aggregations). Different forms of pigment may be involved in different stages of the phototransfer of an electron.

CONVERSION of light energy during photosynthesis proceeds in the chain of electron transfer where photochemical reactions of chlorophyll and its analogs are coupled with the work of biochemical oxido-reductive systems. An analysis of the type of electron transfer in the phylogenetic aspect[1] led to the concept that ancient organisms, photosynthetizing bacteria existing in a "reducing" medium had applied a simpler "one-quantum" mode of photochemical electron transfer and that the evolution from bacteria to green plants had proceeded along the acquirement of one more line of photosynthetic electron transfer working in more oxidative regions[1]. This required a further improvement of pigment and enzymic systems. Green plants utilizing water as the initial hydrogen donor, combine, according to recent hypotheses, two photochemical steps of electron transfer: one from water to cytochromes, and the second from reduced cytochromes to pyridine nucleotides.

Several problems on the structural organization and on the mechanism of action of the chain of photosynthetic electron transfer are still unclear. One of the ways leads to the investigation of the chain fragments studied in simple systems, along with the study of the state and transformation of pigments in the organisms; these problems have been studied in our laboratory and are discussed in the paper presented.

1. *Fragments of the photosynthetic chain of electron transfer*

In 1937 R. Hill revealed that in isolated chloroplasts photochemical liberation of oxygen could be coupled with the reduction of several exogenous electron acceptors; this lead to a simpler system working in the "oxidative" part of the photosynthetic electron transfer. No model system with chlorophyll in which photosensitized evolution of water oxygen would proceed could be made thus far. Systems are studied with the utilization of such photocatalysts as titanium dioxide, zinc oxide, tungstic acid, in which photochemical evolution of water oxygen is coupled with the reduction of ferric compounds.[2] These reactions proceed in the spectral region (360–450 mμ) absorbed by the catalysts mentioned and can be regarded as inorganic models of the Hill reaction.

Chloroplasts and leaf homogenates are able to participate in photoreactions of hydrogen transfer also in the "reductive" part of the chain. Under strict anaerobic conditions Good and Hill[3] observed photoreduction of flavin mononucleotides and benzylviologen by chloroplasts. When using ascorbic acid as the initial electron donor, we succeeded in observing reduction of riboflavin, methyl red, safranin[4], while Vernon observed that of dichlorphenolindophenol and indigo carmin[5], and Arnon described photoreduction of ferredoxin, the most "negative" link in the whole chain[6].

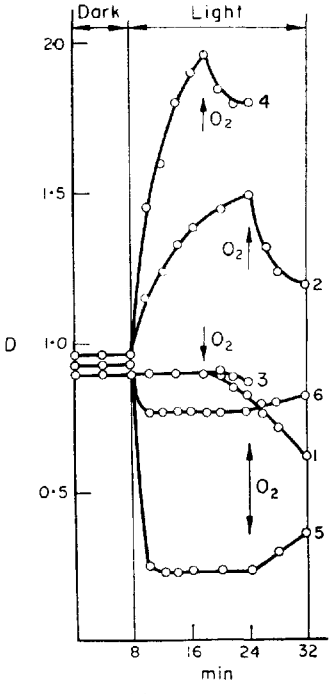


FIG. 1. Kinetics of chlorophyll a photosensitized BNA and NAD reduction.[9,10]

Experimental conditions with BNA: 4 ml chlorophyll a solution in pyridine with 10% water, 5 mg ascorbic acid and 5 mg BNA; in Tunberg tube, in vacuum; illumination with red light (KS–11); measurements in absorption maxima of chlorophyll at 670 mμ (1) and BNA.H at 355 mμ (2). Experimental conditions with NAD: 3·2 ml of chlorophyll a solution in pyridine, 3 mg ascorbic acid and 5 mg NAD in 0·8 ml of 5% aquatic solution of ammonia; illumination with red light; measurement in absorption maxima of chlorophyll at 670 mμ (3) and of NAD.H at 340 mμ (4).

Control experiment: chlorophyll a — ascorbic acid in pyridine solution with 10% of water under the same conditions. Measurements at 670 mμ (5) and at 355 mμ (6). O_2— access of air.

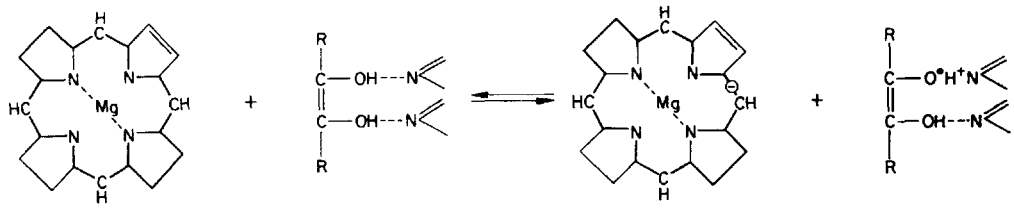
It seems that photochemical steps in both "oxidative" and "reductive" parts of the process consist in electron transfer from donor to acceptor at the expense of the energy of light quanta absorbed by different forms of pigments.

Out of the chloroplast structure, chlorophyll and its analogs are able to photosensitize reactions of hydrogen (electron) transfer in solutions from donor to acceptor which proceed with some "storage" of light energy[7]. Thus, we possess simple models of photochemical electron transfer and can study its mechanisms in simple systems.

We have recently resumed a study of chlorophyll-sensitized reduction of pyridine nucleotides by ascorbic acid revealed in our work with Mrs. G. P. Brin in 1949[8]. The utilization of N-benzyl-nicotinamide (BNA) gave the possibility to perceive the mechanism of this reaction more clearly[9,10].

Photoreduction of $NAD.H_2$ by isolated chloroplasts on the account of endogenous hydrogen donors is replaced for the utilization of ascorbate with the destruction of the intact chloroplast[11]. Chlorophyll strongly sensitizes also the oxidation of $NAD.H_2$[9–11].

In diverse model systems studied in our laboratory[12], ascorbic acid, cystein, hydrogen sulfide, phenylhydrazine, reduced pyridine nucleotides and N-benzylnicotinamide, compounds of ferrous iron (cytochrome *c*), polyphenols etc. included, were mainly applied as electron donors. Safranin T, riboflavin, pyridine nucleotides and N-benzylnicotinamide, quinons, methyl red and oxygen were used as electron acceptors. We used pigments-sensitizers as follows: chlorophyll *a* and *b*, bacteriochlorophyll, protochlrophyll, bacterioviridin, pheophytins, porphyrins. Not all "donor-acceptor" pairs work with various pigments differing in the "range" of their sensitization. With the aim of understanding the mechanism of reactions in the triple system, photoreactions of chlorophyll and its analogues with electron donors and acceptors had to be studied separately.



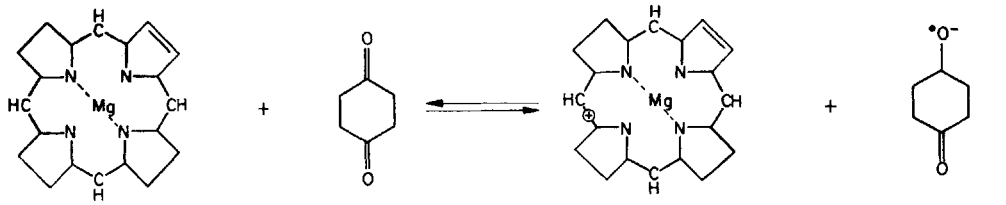


FIG. 2. The scheme of reversible oxidation and reduction of chlorophyll.

2. *Photoreactions of chlorophyll and its analogs with electron donors and acceptors*

Reversible photoreduction is the ability of chlorophyll, its analogs and derivatives to reversibly photochemically interact with the reductants-electron donors [13] (survey). In this reaction intermediate reduced forms appear that differ in their spectral properties and reactivity with respect to the number of electrons and protons accepted and to the conditions of the acid-base equilibrium. The electron accepted in the primary act seems to be delocalized in the system of conjugated double bonds. The localization of hydrogen atom in reduced forms is not yet asserted and is a point of discussion. Upon an introduction of the third component-electron acceptor into the pigment-electron donor (ascorbic acid) system, the reaction of photoreduction is blocked and a photosensitized reduced electron acceptor produced.[14]

This blocking should be attributed to the interaction of pigment photoreduced forms with electron acceptor; such reactions can be realized separately in the "dark act" of the reaction. Upon an interaction of photoreduced forms accumulated upon illumination with the electron acceptor they undergo oxidation leading to the regeneration of chlorophyll. It should be supposed that it is the intermediate photoreduction of pigments which prevails in the mechanism of the reactions proceeding in basic media[13,15]. The value of the potential in "electron donor-chlorophyll" system upon illumination is close to that of the hydrogen electrode (over 0·35 V). The potential of the system seems to be sufficient for the reduction of ferredoxin that is electron acceptor with the highest "negative" value of the redox potential. Our experiments in the model chlorophyll-cytochrome system[16] suggested the possibility of the primary process of electron transfer from the oxidized cytochrome to chlorophyll:

$$\text{Chl} + \text{cyt.Fe}^{++} \rightarrow \cdot\text{Chl}^{-} + \text{cyt.Fe}^{+++}$$

In accordance with these experiments, Kamen[17] points out the possibility of photoreaction in the charge transfer chlorophyll-cytochrome complex with the production of the reduced form of chlorophyll (Chl^{-}).

Reversible photo-oxidation was analysed in the works of several authors with the utilization of sufficiently strong oxidants—e.g., ferric ions by Rabinowitch and Weiss[18], Dain *et al.*[19]. Reaction with oxygen upon illumination and back reaction in the dark (during the interaction with the electron donor) was observed to occur in our experiments[20], most markedly in case of bacteriochlorophyll[21]. In chlorophyll-quinon system in rigid media at the liquid nitrogen temperature Linshitz and Rennert[22] observed a decrease in optical density of chlorophyll with the reversion upon de-freezing. To study reaction of chlorophyll and its analogs with oxidants, we applied alcohol-glycerol viscous media[23]. At —70°C in a viscous transparent medium of this kind we succeeded in observing reversible change of chlorophyll, bacteriochlorophyll and bacterioviridin during their interaction with *p*-quinon.

In the experiments carried out with Mrs. N. N. Drozdova[24] differential light-dark spectra were measured upon the interaction of chlorophyll and its analogs with reductants (ascorbic acid) and oxidants (quinon) using viscous media where intermediate photoproducts were stabilized. It may be seen in Figs. 3 and 4 that reduced and oxidized forms of chlorophyll and bacterioviridin absorb in the green spectral region. This should be explained in both cases by the same destruction of the circularly conjugated system of double bonds

embracing porphyrin. Oxidized products absorb also in the near infrared while photo-reduced ones show spectral changes in this region under special conditions only. Both types of intermediates show most distinct difference in bacteriochlorophyll (Fig. 5) the reduced one with a peak at 640 mμ and oxidized one with the absorption in the region of 650–700 mμ and at 850 mμ.

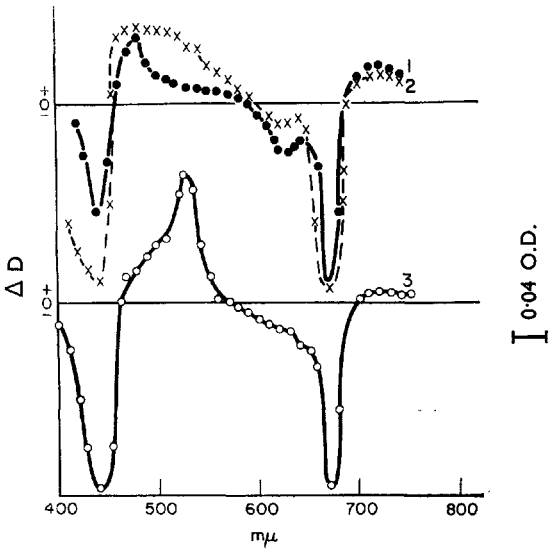


FIG. 3. Differential absorption spectra at photochemical oxidation and reduction of chlorophyll *a*.[24]

1—oxidation by *p*-benzoquinon
2—oxidation by oxygen
3—reduction by ascorbic acid

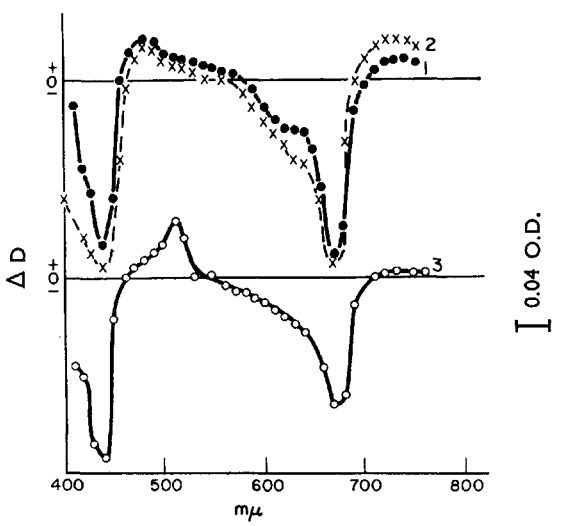


FIG. 4. Differential absorption spectra at photochemical oxidation and reduction of bacterioviridin.[24]

1—oxidation by *p*-benzoquinon
2—by oxygen
3—reduction by ascorbic acid

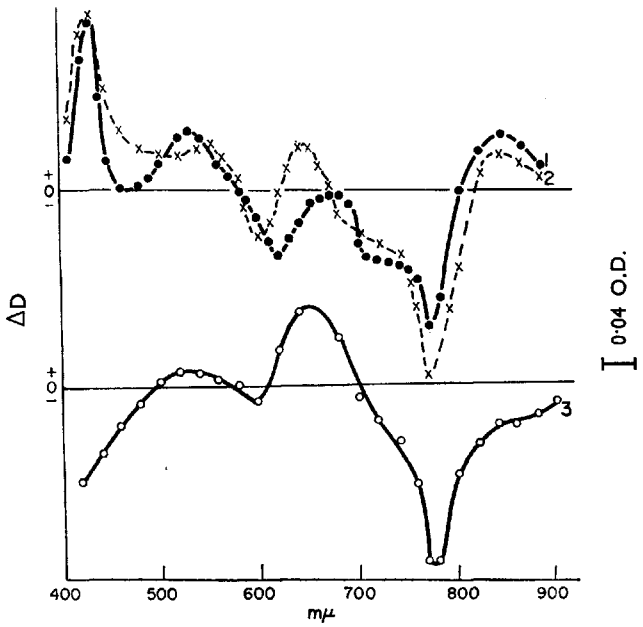


FIG. 5. Differential absorption spectra upon photochemical oxidation and reduction of bacteriochlorophyll.[24]
1—oxidation by *p*-benzoquinon
2—oxygen
3—reduction by sodium sulfide

The nature of electron donors and acceptors in photoreactions of chlorophyll

Photoreduction of chlorophyll is observed during its reaction with dienols (ascorbic acid and others), phenylhydrazine, ferrous compounds. It is of interest that reduced pyridine nucleotides do not photochemically react with chlorophyll upon excitation in the red region but lead to photoreduction of chlorophyll and its analogs when excited with near ultraviolet at the maximum absorption of NAD.H_2 at 340 mμ; the "red" reduced form of chlorophyll is produced thereat, while NAD.H_2 is irreversibly oxidized[10,25]. Illumination of NAD.H_2 solution in pyridine in vacuum with mercury bands at 365 mμ results in the formation of photoactivated products surviving the period of illumination and capable to reduce chlorophyll, safranin, riboflavin etc. in the dark. It is likely that electron transfer in NAD.H_2-pyridine complex leads to a photoactivation of the system[25].

Photoreduced forms of chlorophyll and its analogs react with a wide scope of compounds: pyridine nucleotides and N-benzylnicotinamide, ferric compounds, dyes—safranin T, riboflavin, methyl red, quinons, oxygen and many others. During photoreaction in donor-chlorophyll-acceptor triple system a sensitized reduction of these electron acceptors is observed. As mentioned above, direct photoreaction in chlorophyll solutions with an electron acceptor (quinons, ferric compounds, oxygen) was observed by means of spectrophotometric measurements. Of quinons, no reaction with anthroquinon could be observed, that with naphthequinon being feeble[24].

Electron paramagnetic resonance in pigment systems

With the aid of this method formation of unpaired electrons was shown upon illumination of systems containing chlorophyll and its analogs. Thus, upon illumination of

chlorophyll-ascorbic acid system the formation of the radical of monodehydroascorbic acid was revealed[26]. Tollin and Green observed an EPR signal of semiquinons upon illumination of chlorophyll-quinon system[27]. In the experiments described no signal of the radical form of the pigment could be revealed; the formation of this form upon photoreduction of pigments was shown by the initiation of chain polymerization[28]. When illuminating frozen alcohol solutions of chlorophyll the formation of the triplet state of chlorophyll (in the magnetic field of 1·500 gauss) and that of the radical state (in that of 3·000 gauss) could be observed[29].

Chemoluminescence

Using a photon counter, afterglow was observed upon oxidation of photoreduced chlorophyll and upon photo-oxidation of chlorophyll by air oxygen[30]. Chemoluminescence upon photo-oxidation of bacteriochlorophyll was studied in the work carried out by Goodheer[31].

After the illumination of chlorophyll solution in pyridine with ascorbic acid or with phenylhydrazine a back reaction in the dark (without air) is accompanied by a very weak afterglow. The access of air increases the effect accelerating back reaction. Ammonia,

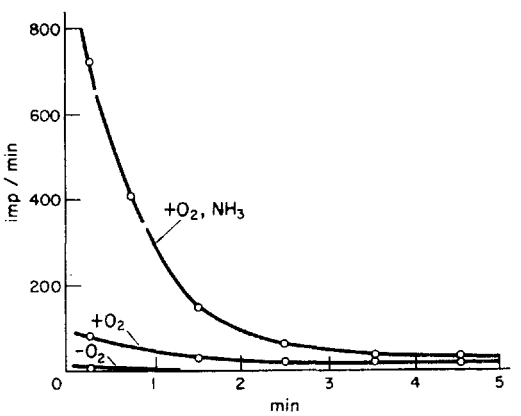


FIG. 6. Chemoluminescence arising upon oxidation of the photo-reduced form of chlorophyll (measurements by means of a photon counter) without O_2—after illumination of chlorophyll-ascorbic acid system without the access of air; $+O_2$—air access in the dark after the reaction of photoreduction; $+O_2$, NH_3—air access and introduction of ammonium solution after photoreduction.[30]

speeding up the conversion of the "red" reduced form of chlorophyll, enhances afterglow still more (Fig. 6). It can be supposed that during the reaction of the reduced form of chlorophyll ($ChlH_2$) with oxygen the formation of the triplet state occurs which transits to the singlet excited state emitting luminescence spectrally identical to fluorescence:

$$ChlH_2 + O_2 \rightarrow ChlH_2O_2 \rightarrow Chl^* + H_2O_2$$

$$\cdot Chl\cdot \rightarrow Chl^* \rightarrow Chl + h\nu$$

The formation of the excited chlorophyll is also possible during back reactions of ion-radical photoproducts via the "reverse way" of photoreduction:

$$\cdot ChlH^- + \cdot AH^+ \rightarrow Chl^* + AH_2.$$

Further experiments will show whether photosynthetic luminescence of Strehler-Arnold can be explained by chemoluminescence arising during photo-oxidation of chlorophyll or of its reduced form.

Photoelectrical phenomena

It was shown in Terenin's works that chlorophyll in solid films possessed photoconductivity with the "hole" migration, i.e. that in the electric field an electron vacancy was moving from one pigment molecule to another[32]. In the solid chlorophyll film coated on the electrode which is dipped into the solution, the experiments of Evstigneev and Terenin[33], and later those of Putzeike[34] showed the Beckerel effect to be observed with the appearance of either a negative or a positive charge of the electrode in relation to the presence of electron donors or acceptors in the solution surrounding the film. This phenomenon was studied in detail in the works of Evstigneev[35] who showed the dependence of the sign and kinetics of the potential upon pH, pigment nature and the presence of different compounds in the solution. The main conclusion drawn from these experiments is that solid pigment films can give up or take electrons upon illumination, they can participate in the elementary act of photoreduction and photo-oxidation. The "semiconductor" model of the chlorophyll action describes the separation of the electron and the hole in quasi crystalline pigment layer under the action of light. However, both the electron and the hole are related to chlorophyll molecule forming, respectively, reduced ($\cdot Chl^-$) or oxidized ($\cdot Chl^+$) forms of the pigment which participate in further reactions.

Photosensitization mechanism

The reversible photochemical interaction of chlorophyll and its analogs with electron donors and acceptors revealed in direct experiments determines the possibility that this kind of reaction may underlie chlorophyll-sensitized oxidoreductive reactions. Experimental arguments were found in our laboratory in favour of the idea that chlorophyll-induced sensitization in basic media was determined by a reversible pigment photoreduction and interaction of the reduced form with the electron acceptor[13,15]. When studying pheophytin-induced photosensitization of the reduction of methyl red (electron donor-ascorbic acid and phenylhydrazine) in dependence upon pH of the solution, Evstigneev demonstrated the reaction to have two peaks in the pH region of 7–8 and 2–3 which were supposed to correspond to the primary reduction and oxidation of the pigment[36].

In both types of reactions the participation of singlet and triplet excited chlorophyll molecules is possible. Oxidants are known to quench chlorophyll fluorescence which serves as an indication of their interaction with the singlet excited state. Reductants (e.g., ascorbate) weakly quench fluorescence but strongly react photochemically with chlorophyll which points out their possible interaction with the triplet state.

3. *Search for photochemical conversions of chlorophyll in the organisms*

Thus, the possibility of the reversible reduction and oxidation of chlorophyll is shown by experiments.

In either a cyclic or open system of electron transfer the question as to what is primarily, the acceptance or giving up of an electron by chlorophyll, looses its essence: the accumulation of the altered form of the pigment will be determined by the metabolic regime and experimental conditions, as in case of the observation of the oxidized or reduced form of cytochrome in mitochondria.

In the working chain of electron transfer its acceptance or giving up alternate quickly which makes it difficult to detect changed forms of chlorophyll. However, at any disturbances in the normal work of the chain of the photochemical electron transfer the possibility arises to reveal transformed forms of pigments. It is just by this way that the search of changed forms of chlorophyll in the organisms proceeds.

Differential spectroscopy of organisms at —196°, blocking "dark" enzymic stages gives the possibility to see the photochemical process; in Chance's experiments[37] the primary oxidation of cytochrome in photosynthetizing bacteria was found. A strong light flash leads to the storage of photoproducts for the use of which enzymic systems turn out to be inadequate; diverse spectra of these photoproducts were studied by Witt[38]. Finally an introduction of the oxidants and reductants blocking different regions of the transfer will give possibility to see the storage of oxidized and reduced forms of pigments. It can be supposed that a system of the reversible oxidation of chlorophyll is working in the oxidative part of photosynthetic electron transfer (oxygen-cytochrome), while the system of the reversible photoreduction of chlorophyll (cytochrome-pyridine nucleotides) is working in the reducing one.

At all photochemical changes of chlorophyll, however, reversible light-dark changes must be observed in the main, "red" absorption maximum of chlorophyll.

Such reversible changes were described in the works of Coleman and Rabinowitch[39], Kok[40]. In our laboratory differential spectrophotometer with the mechanical modulation of the actinic light and a weak monochromatically scanning pulse was constructed. When measuring differential light-dark spectra, reversible changes in the red and green region were observed in agreement with the works of the above mentioned authors. When an interference filter with the transmission maximum is placed before a photomultiplier corresponding to the scanning monochromatic light (e.g. 680 mμ) no reversible changes in optical density can be observed.[41]

When a filter passing fluorescence light but preventing that of scanning light is placed, reversible changes are observed. Thus, changes in the red region of the spectrum are due to a change in chlorophyll fluorescence (excited by a monochromatic beam) under the effect of a strong light pulse[41]. The same conclusions were drawn in the independent investigation of Rubinstein and Rabinowitch[42]. In the light of these facts the data at hand on the differential spectrophotometry in the red region should be revised. As far as the nature of the phenomenon is unclear, the effect should be attributed either to the photodesaggregation

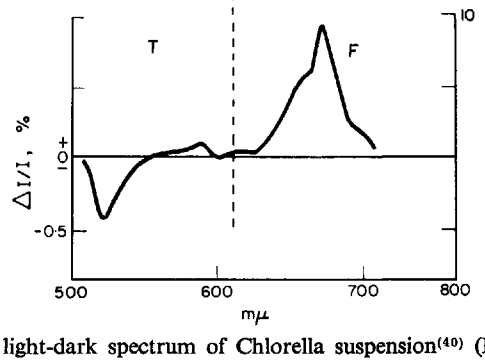


FIG. 7. Differential light-dark spectrum of Chlorella suspension[40] ($D_{680=1\cdot50}$).
On the left—change in the light transmission
On the right—change in fluorescence in relative units

of chlorophyll or to fluorescence changes in chlorophyll-quencher complex (e.g. plastoquinon) leading to the reduction of the quencher (quinon) and thus to the appearance of fluorescence.

In the bulk of works the appearance of unpaired electrons at the action of light upon photo synthetizing organism was taken under study.

Commoner[43] found photosynthetizing tissues to possess the dark ERP signal and illumination to lead to the appearance of a new component devoid of a clearly seen structure. Measurements carried out in Calvin's laboratory[44] at the liquid nitrogen temperature demonstrated that the kinetics of the appearance and decay of the signal in the dark were different in green algae and photosynthetizing bacteria; in these latter switching the light off did not lead to a decay of the light signal. A study of the EPR signal in the process of chlorophyll formation during greening of etiolated leaves[45] showed that at the first step of chlorophyll formation, when the structure of the grana was not developed, a "bacterial" type of the signal was observed which, probably, corresponded to one of the types of photo-reactions; with the accumulation of chlorophyll and formation of the photosynthetizing apparatus a typical of green plants reversible EPR signal appeared upon illumination.

4. *The state of pigments in the organisms; the aggregated forms*

In order to understand the nature of the state of pigments in the organisms, spectral properties of pigments isolated from the organisms are studied in various model systems, such as solutions, colloids, solid films, monolayers. Solutions of chlorophyll and its analogs in polar organic solvents contain mainly "monomeric" forms of pigments. A dilution of the pigment solution (that in alcohol, acetone, pyridine, dioxane) with water, and coagulation, e.g. with magnesium chloride, results in the aggregation of pigments with a shift of the absorption maximum to the long wave region. Varying coagulation degree and pH of the solution colloids-aggregates with a desirable position of absorption maxima can be obtained; in case of chlorophyll and bacterioviridin from 660 to 760 mμ, in that of bacteriochlorophyll from 770 to 900 mμ.

In independently performed works of Livingston[46] and of our laboratory[47] it was found that in dry non-polar organic solvents that did not contain polar admixtures a partial aggregation, probably due to the formation of dimeres, could be observed. In more concentrated pigment solutions and in polar solvents, however, absorption bands can be observed in near infrared region which corresponds to aggregated forms; they are seen most distinctly in case of bacterioviridin usually more easily undergoing aggregation probably due to the fact that in its molecule carboxyl is esterified by a "shorter" alcohol, pharnezol[48], instead of phytol in chloropyll. Thus, in ether or acetone solution of bacterioviridin with a concentration of 10^{-4}M, the maximum is observed at 730 mμ which increases upon cooling.

When the solutions of chlorophyll and its analogs were evaporated in vacuum solid films were formed; their absorption maxima shifted to the infrared region and corresponding to different kinds of packing could be observed. In solid films of bacteriochlorophyll maxima were observed at 800 and 850–890 mμ[49], in bacterioviridin at 740 mμ which corresponded to the absorption of pigments in living bacteria[50]. With the use of electronography crystalline form of chlorophyll with the maxima at 690 and 740 mμ was revealed[51].

Brody[52] detected in frozen chlorophyll solution long wave luminescence corresponding to aggregated forms. Luminescence measurement of solid films of pigments at —196° gave

the possibility to find several maxima corresponding to monomeric forms and various types of aggregation[53]. Their relationship depended upon the procedure of film preparation and upon the degree of the removal of solvent traces. In solid films of pigments the same absorption and luminescence maxima could be observed as in living organisms. Figures 8 and 9 show close resemblance of lumineescence spectra of bacteriochlorophyll[54] and of bacterioviridin in solid films and green bacteria[55].

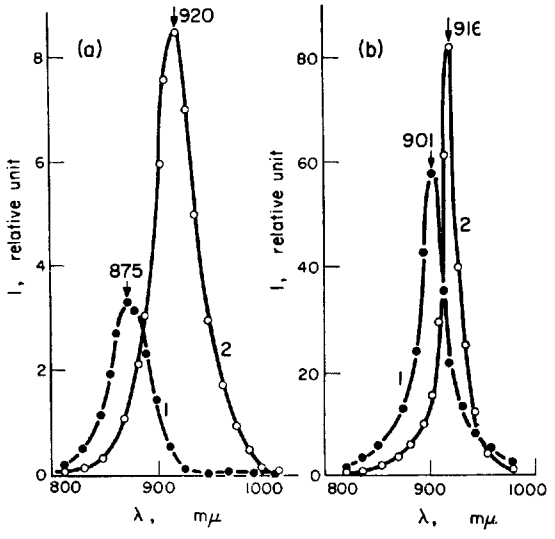


FIG. 8. Fluorescence spectra of bacteriochlorophyll in the solid film (a) and in the culture of Rhodopseudomonas palustris (B) at +20° (1) and at —196° (2).[54]

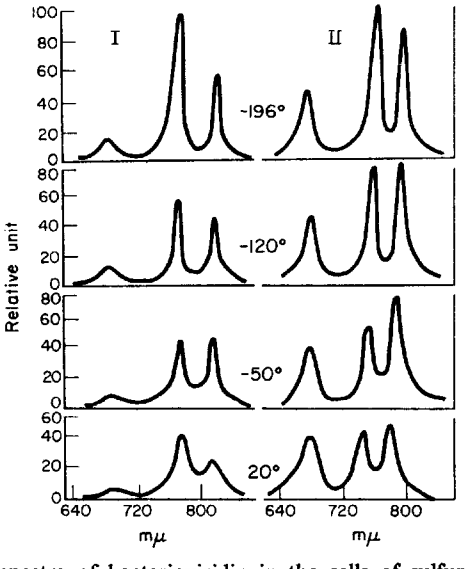


FIG. 9. Fluorescence spectra of bacterioviridin in the cells of sulfur bacteria (I) and in solid films (II) at different temperatures.[55]

Temperature dependence of luminescence is due to the conditions of the intramolecular desactivation of excited pigment molecules. In monomeric forms molecules are located at a distance excluding effective interaction of electronic systems of conjugated porphyrine bonds; so the lowering of temperature affects mainly intramolecular processes of desactivation (weak action). In case of denser packing the vibration and shaking of molecules lead to an intermolecular desactivation at the expense of overlapping of electron clouds of the porphyrine ring when molecules "come into contact" at their vibrations. A drop in temperature, decreasing vibrations, leads to an "isolation" of the molecules and, therefore, to a decrease in the intermolecular desactivation and luminescence enhancement.

Thus, spectral properties of pigments in the organisms are experimentally shown to be considerably determined by the type of pigment-pigment interaction. A comparatively weak interaction between the pigment and proteins or lipids does not lead to considerable spectral effects.

The state of pigments upon greening of stiolated leaves

Freshly formed chlorophyll is in the "monomeric" form with the absorption maximum at 670–672 mμ; a further accumulation of chlorophyll in the process of leaf greening leads to aggregation with a gradual shift of the maximum to 678 mμ.[56] Monomeric forms, unlike aggregated ones, rapidly bleach upon strong illumination (Fig. 10). French[57] revealed spectrally differing chlorophyll forms in the leaves by the method of a "derivative" spectrophotometry.

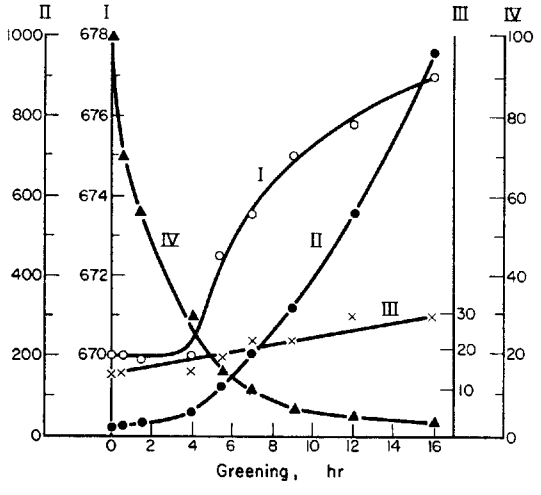


FIG. 10. Change in spectral and photochemical properties of chlorophyll at natural state, in the course of its formation in etiolated leaves.[56]

I—position of the main red absorption maximum in mμ ($\pm$1mμ)
II—amount of the chlorophyll formed in related units
III—amount of the bleached chlorophyll in relative units
IV—Percentage of photochemically destructed chlorophyll after 5 min (by the change in optical density at the maximum)

A different temperature dependence of luminescence is characteristic of monomeric and aggregated forms. Litvin and Rikhireva[58] measured luminescence at —196° during greening of etiolated leaves. It may be clearly seen that initial "monomeric" forms of

chlorophyll little alter luminescence upon cooling while the luminescence of aggregated forms at 740 mμ sharply increases with chlorophyll accumulation in leaves (Fig. 11).

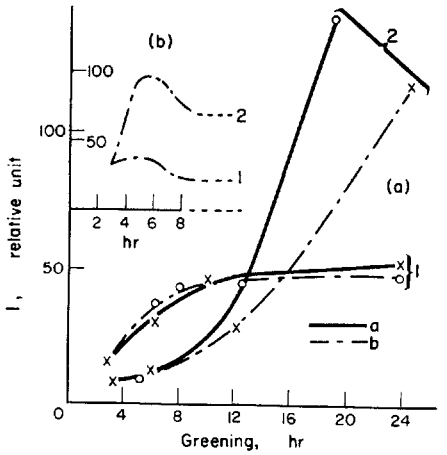


FIG. 11. Change in fluorescence intensity at —196° during greening of etiolated bean leaves (a) and of their homogenates (b). A—12 day = and B—7 day old plants, 1—at 682 mμ, 2—at 730 mμ.

By means of low temperature fixation and luminescence measurement at the liquid nitrogen temperature (at early stages of greening of etiolated leaves) forms of protochlorophyll with the luminescence at 663 and 655 mμ and intermediate forms of chlorophyll with the maxima at 675, 694 and 680 mμ were found[59]. These data are in good agreement with absorption measurement of intermediates in the works of Shibata[60]. An investigation carried out in several laboratories[61,62,63] showed the active form of protochlorophyll to be a protein compound of protochlorophyllid, and chlorophyllid to be primarily formed. A comparison of luminescence spectra measurement of pigments in greening leaves and pigments separation by means of paper chromatography demonstrated that the "active" form of protochlorophyll and the primary "long wave" form of chlorophyll represent non-phytolic forms of pigments[64]. When grinding plant leaves possessing active chlorophyllasa (e.g., sugar beet, Chenopodium) chlorophyllid is accumulated in homogenates and chloroplasts which rapidly bleaches upon strong illumination, along with the "monomeric" form of chlorophyll[65].

Chlorophyll-protein complex. The isolation of chlorophyll-protein complex attracted attention of investigators long ago. In the works of Smith[66] "protochlorophyll-golochrome" was isolated from etiolated leaves which, along with a protochlorophyllid-protein compound probably contained also inactive forms of protochlorophyllid and protochlorophyll. Recently a method of isolating water soluble chlorophyll-protein complex from goosefoot (Chenopodium) leaves was described[67]. It was shown in the work of Mrs. Vorobieva[65] that Chenopodium contained an especially active chlorophyllase, and that the grinding of leaves lead to a rapid accumulation of chlorophyllid. For example, during an overnight storage of goosefoot leaves in homogenate up to 70% of chlorophyll were transformed into non-phytolic form. This suggests that in the work described[62] not a chlorophyll-protein compound, as thought by the authors[65] but a chlorophyllid-protein complex, which probably was an artifact, was isolated.

Thus far the attempts to isolate a chlorophyll-protein-lipid compound of a stable composition and retaining the ability to perform partial reactions of chlorophyll resulted in failure. The decisive condition is a peculiar molecular structure of grana in which spatial arrangement of the components of the photosynthetic chain of the electron transfer provides an organized course of the reactions leading to the production of more stable photosynthetic products.

Summarizing the material presented we would like to stress the following:

A study of the fragments of the chain of the photosynthetic electron transfer points out that photochemical stages represent electron transfer from donor to acceptor, sensitized by different forms of pigments. A reversible photochemical interaction of chlorophyll and its analogs with electron donors and acceptors determines the course of these photochemical stages.

Different, mainly aggregated forms of pigments participate in photosynthesis. The types of the pigment-pigment interaction are determined by physico-chemical properties of the molecules of chlorophyll and its analogs; it was shown that in solid films and concentrated solutions of pigments the same types of packing were found possessing the same spectral characteristics as the pigments in the organisms.

REFERENCES

1. A. A. KRASNOVSKY. In: *The Origin of Life on the Earth.* Academy Press, Moscow, 1957. Pergamon Press, 1959, pp. 606.
2. A. A. KRASNOVSKY, G. P. BRIN, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **147,** 666 (1962).
3. N. GOOD, R. HILL, *Arch. Biochem. Biophys.* **57,** 355 (1955).
4. L. M. VOROBIEVA, A. A. KRASNOVSKY, *Biokhimia* **23,** 760 (1958).
5. L. P. VERNON, M. O. HOBBS, *Arch. Biochem. Biophys.* **72,** 25 (1957).
6. K. TAGAWA, D. J. ARNON, *Nature Lond.* **195,** 537 (1962).
7. A. A. KRASNOVKSY, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **61,** 91 (1948).
8. A. A. KRASNOVSKY, G. P. BRIN, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **67,** 325 (1949).
9. A. A. KRASNOVSKY, G. P. BRIN, N. N. DROZDOVA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **150,** 1157 (1963).
10. A. A. KRASNOVSKY, G. P. BRIN, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **153,** 212 (1963).
11. G. P. BRIN, A. A. KRASNOVSKY, *Biokhimia* **24,** 1085 (1959).
12. A. A. KRASNOVSKY, *J. Chim. Phys.* **55,** 968 (1958); *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11,** 363 (1960).
13. A. A. KRASNOVSKY, A survey, *Uspekhi Khimii* **29,** 736 (1960).
14. A. A. KRASNOVSKY and N. N. DROZDOVA, *Biokhimia* **26,** 859 (1961).
15. V. B. EVSTIGNEEV, *Zhurn. Fiz. Khim.* **32,** 969 (1958).
16. A. A. KRASNOVSKY and K. K. VOINOVSKAYA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **103,** 283 (1955); *Biofizika,* **1,** 120 (1956).
17. M. KAMEN, *Mekhanizm Fotosinteza,* VI Simp. MBK, 293, Academy Press, Moscow, 1962.
18. E. RABINOWITCH and J. WEISS, *Proc. Roy. Soc.* (L), A **162,** 25 (1937).
19. B. J. DAIN and M. S. ASHKINAZI, *Problemy Fotosinteza* **27,** Academy Press, Moscow, 1959.
20. A. A. KRASNOVSKY, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **58,** 617, 835 (1947).
21. A. A. KRASNOVSKY, and K. K. VOINOVSKAYA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **81,** 879 (1951).
22. H. LINSHITZ and J. RENNERT, *Nature Lond.* **169,** 193 (1952).
23. A. A. KRASNOVSKY and N. N. DROZDOVA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **150,** 1378 (1963); **153,** 721 (1963).
24. A. A. KRASNOVSKY and N. N. DROZDOVA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **158,** 730 (1964).
25. A. A. KRASNOVSKY and G. P. BRIN, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **158** (1964).
26. A. A. KRASNOVSKY, *Progress in Photobiology* 561, Elsevier Publ., 1960.
27. G. TOLLIN and G. GREEN, *Biochem. Biophys. Acta* **60,** 524 (1962).
28. A. A. KRASNOVSKY and A. V. UMRIKHINA, *Biofizika* **3,** 547 (1958).
29. G. T. RIKHIREVA, A. V. UMRIKHINA, L. P. KAJUSHIN and A. A. KRASNOVSKY, *Doklady Akad Nauk, S.S.S.R.* **159,** 196 (1964).
30. F. F. LITVIN, G. A. VLADIMIROV and A. A. KRASNOVSKY, *Uspekhi Fizich Nauk* **71,** 149 (1960).
31. J. C. GOEDHEER, G. R. VEGT, *Nature Lond.* **193,** 875 (1962).
32. A. N. TERENIN and E. K. PUTZEIKO, Akimov, *J. Chem. Phys.* **54,** 716 (1957).
33. V. B. EVSTIGNEEV and A. N. TERENIN, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **81,** 223 (1951).

34. E. K. PUTZEIKO, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **150,** 343 (1963).
35. V. B. EVSTIGNEEV, *Biofizika* **8,** 664 (1963).
36. V. B. EVSTIGNEEV and V. A. GAVRILOVA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **151,** 227 (1963).
37. B. CHANCE and N. NISHIMURA, *Mekhanizm Fotosinteza*, VI Simp. MBK, 277, Academy Press, Moscow, 1962.
38. H. T. WITT, *Mekhanizm Fotosinteza*, VI Simp. MBK, 67, Academy Press, Moscow, 1962.
39. J. COLEMAN and E. RABINOWITCH, *J. Phys. Chem.* **63,** 30 (1959).
40. V. KOK, *Mekhanizm Fotosinteza*, VI Simp. MBK, 67, Academy Press, Moscow, 1962.
41. N. V. KARAPETYAN, F. F. LITVIN and A. A. KRASNOVSKY, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **149,** 1428 (1963); *Biofizika* **8,** 191 (1963).
42. D. RUBINSHTEIN and E. RABINOWITCH, *Science* **142,** 681 (1963).
43. B. COMMONER. In: *Light and Life*, 356 (1961).
44. M. CALVIN. In: *Light and Life*, 317 (1961).
45. G. T. RIKHIREVA, L. P. KAYUSHIN and A. A. KRASNOVSKY, *Biofizika* **9,** 390 (1964).
46. R. LIVINGSTON, *J. Amer. Chem. Soc.*, **71,** 1542 (1949).
47. V. B. EVSTIGNEEV, V. A. GAVRILOVA and A.A. KRASNOVSKY. *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **66,** 1133. (1949); **70,** 261 (1950).
48. A. S. HOLT and H. W. MORLEY, *J. Amer. Chem. Soc.* **82,** 500 1960.
49. A. A. KRASNOVSKY, K. K. VOINOVSKAYA and L. M. KOSSOBUTSKAYA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **85,** 389 (1952).
50. A. A. KRASNOVSKY and E. V. PAKSHINA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **127,** 913 (1959).
51. E. V. BELAVTSEVA, L. M. VOROBIEVA and A. A. KRASNOVSKY, *Biofizika*, **4,** 521 (1959).
52. S. S. BRODY, *Science* **128,** 838 (1958).
53. F. F. LITVIN, G. T. RIKHIREVA and A. A. KRASNOVSKY, *Biofizika* **7,** 578 (1962).
54. A. A. KRASNOVSKY, G. A. EROKHIN and HUNG-YUI-TSUN, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **143,** 456 (1962).
55. A. A. KRASNOVSKY, G. E. EROKHIN and B. A. GULYAEV, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **152,** 1231 (1963).
56. A. A. KRASNOVSKY and L. M. KOSSOBUTSKAYA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **85,** 177 (1952); **91,** 343 (1953).
57. C. S. FRENCH and A. B. CHURCH, *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **54,** 162 (1954–1955).
58. F. F. LITVIN, A. A. KRASNOVSKY and G. T. RIKHIRIVA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **135,** 1528 (1960).
59. F. F. LITVIN and A. A. KRASNOVSKY, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **117,** 106 (1957).
60. K. SHIBATA, *J. Biochem. (Tokyo)* **44,** 147 (1957).
61. J. E. LOEFFLER, *Carnegie Inst. Wash. Y.B.* **54,** 159 (1954–55).
62. J. B. WOLF and L. PRICE, *Plant Physiol.* **31,** 30 (1956).
63. T. N. GODNEV, A. A. SHLYCK and J. O. LYAKHNOVICH, *Fiziologia Rastenii* **4,** 393 (1957).
64. A. A. KRASNOVSKY, M. I. BYSTROVA and A. D. SOROKINA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **136,**1227 (1960).
65. L. M. VOROBIEVA, M. I. BYSTROVA and A. A. KRASNOVSKY, *Biokhimia* **28,** 524 (1963).
66. J. H. C. SMITH, *The Photochemical Apparatus, its structure and function.* (In Russian translation), 300, MOSCOW, "IL".
67. E. YAKUSHIJI, K. UCHINO, Y. SUGIMURA, J. SCHIRATORI and F. TAKAMIYA, *Biochim. Biophys. Acta* **75,** 293 (1963).

УДК 577.45

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА И ПРОТОФЕОФИТИНА

М. И. БЫСТРОВА, А. В. УМРИХИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Изучение восстановительных превращений протохлорофилла, его аналогов и производных представляет интерес для выяснения механизма восстановления этих пигментов до хлорофилла в зеленых растениях.

Годнев и Калишевич [1] наблюдали восстановление протохлорофилла в спирто-пиридиновой среде металлическим цинком в присутствии уксусной кислоты (по Тимирязеву) с образованием лейкоформы, регенерирующей в присутствии кислорода воздуха в исходный пигмент. Красновский и Войновская [2] нашли, что протохлорофилл способен к обратимому фотохимическому восстановлению аскорбиновой кислотой в пиридине с образованием восстановленной формы, поглощающей в области 470 *ммк*. Авторы предположили, что восстановление протохлорофилла идет по системе сопряженных по кругу двойных связей молекулы пигмента. В последующей работе [3] при фотовосстановлении протохлорофилла в спирто-пиридиновой среде наряду с формой 470 обнаружен неустойчивый продукт с максимумом поглощения 670 *ммк*; предполагалось, что продукт 670 связан с частичным восстановлением полуизолированной двойной связи 7—8 с образованием гипотетического «хлорин-радикала». Образование небольшого количества устойчивого продукта с поглощением ~670 *ммк* мы наблюдали при фотовосстановлении протохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридине, обработанном металлическим натрием [4]. Евстигнеев и Савкина [5] обнаружили, что восстановление протохлорофилла до формы 470 в системе пиридин — аскорбиновая кислота протекает по меньшей мере в две стадии; ими обнаружено образование разных восстановленных форм пигмента в зависимости от условий кислотности. Одна из этих форм имела максимум поглощения 670 *ммк* (аналогично форме, полученной в работе [3]) и быстро регенерировала в исходный пигмент в реакции с кислородом воздуха. Таким образом, в модельных системах до сих пор не удалось наблюдать образования хлорофилла из протохлорофилла.

В данной работе проводилось систематическое изучение фотовосстановления протохлорофилла и его безмагниевого производного в растворах с целью выяснения механизма реакции и природы восстановленных форм. Кроме того, нас интересовала возможность восстановления «полуизолированной» двойной связи в IV пиррольном кольце молекулы пигмента.

МЕТОДИКА

Протохлорофилл выделяли из внутренних оболочек семян тыквы (сорт Миндальная). Очищенные от наружных оболочек семена намачивали в воде, насыщенной $MgCO_3$, в течение 10—15 мин., затем экстрагировали ацетоном. Протохлорофилл из ацетонового экстракта переводили в серный эфир. Эфирный раствор после упаривания до небольшого объема и высушивания над прокаленным сернокислым натрием использовали для хроматографического разделения на бумаге по ранее описанному методу [6]. Шлык

и Калер [7] предполагают, что наличие нескольких фракций протохлорофилла в процессе хроматографического разделения обусловлено различием в сольватации пигмента или существованием изомеров протохлорофилла. Из образующихся при хроматографировании трех зон протохлорофилла использовали основную, верхнюю, зону с наибольшей хроматографической подвижностью.

Для фотохимических опытов мы пользовались протохлорофиллом, полученным при помощи однократного хроматографического разделения на бумаге. В таком протохлорофилле содержалось некоторое количество протофеофитина, что, однако, не влияло на фотохимические свойства протохлорофилла. Мы обнаружили, что после повторного разделения на бумаге соотношение поглощения при 455 и 430 *ммк* (E_{455}/E_{430}) у протохлорофилла в пиридине увеличивается, после трехкратного разделения достигает величины 1,9, которая не изменяется при последующем хроматографическом разделении. Поэтому можно считать, что отношение $E_{455}/E_{430}=1{,}9$ характерно для раствора протохлорофилла в пиридине. В серном эфире чистый протохлорофилл имеет соотношение величин поглощения при 435 и 420 *ммк*, равное 2.

Протофеофитин получали обработкой раствора протохлорофилла в серном эфире 10%-ной HCl путем встряхивания в делительной воронке и последующего промывания водой для удаления кислоты.

Фотовосстановление проводили в вакуумных трубках Тунберга. Растворы эвакуировали с охлаждением масляным насосом в течение 3—4 мин. при энергичном взбалтывании и освещали фокусированным «белым» светом 300 *вт* киноламлы (освещенность ~2000 люкс) при 20°. Для проведения фотовосстановления при —70° трубки Тунберга с раствором освещали в прозрачном сосуде Дьюара с охлаждающей смесью (твердая углекислота в этиловом спирте). Мы использовали перегнанный чистый пиридин, обычно содержащий до 0,2% воды.

Основным методом изучения превращений пигмента было измерение спектров поглощения в области 400—750 *ммк* на регистрирующем спектрофотометре СФ-10 в ходе реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектры поглощения и состояние протохлорофилла в растворе. Спектры поглощения протохлорофилла в различных растворителях приведены на рис. 1. Положение главных максимумов составляет в серном эфире 440 и 625 *ммк*, в безводном пиридине 455 и 635 *ммк*, в пиридине, содержащем воду (10%), 445 и 631 *ммк*. Таким образом, в пиридине происходит смещение спектра в длинноволновую сторону. Можно предположить, что в пиридине молекулы протохлорофилла взаимодействуют с молеку-

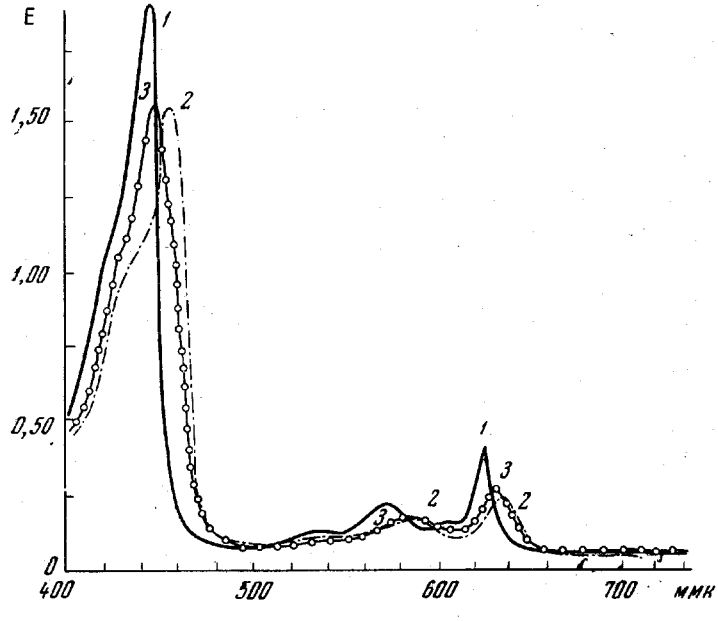


Рис. 1. Спектры поглощения протохлорофилла в разных растворителях

1 — в эфире; *2* — в пиридине; *3* — в пиридине с 10% воды

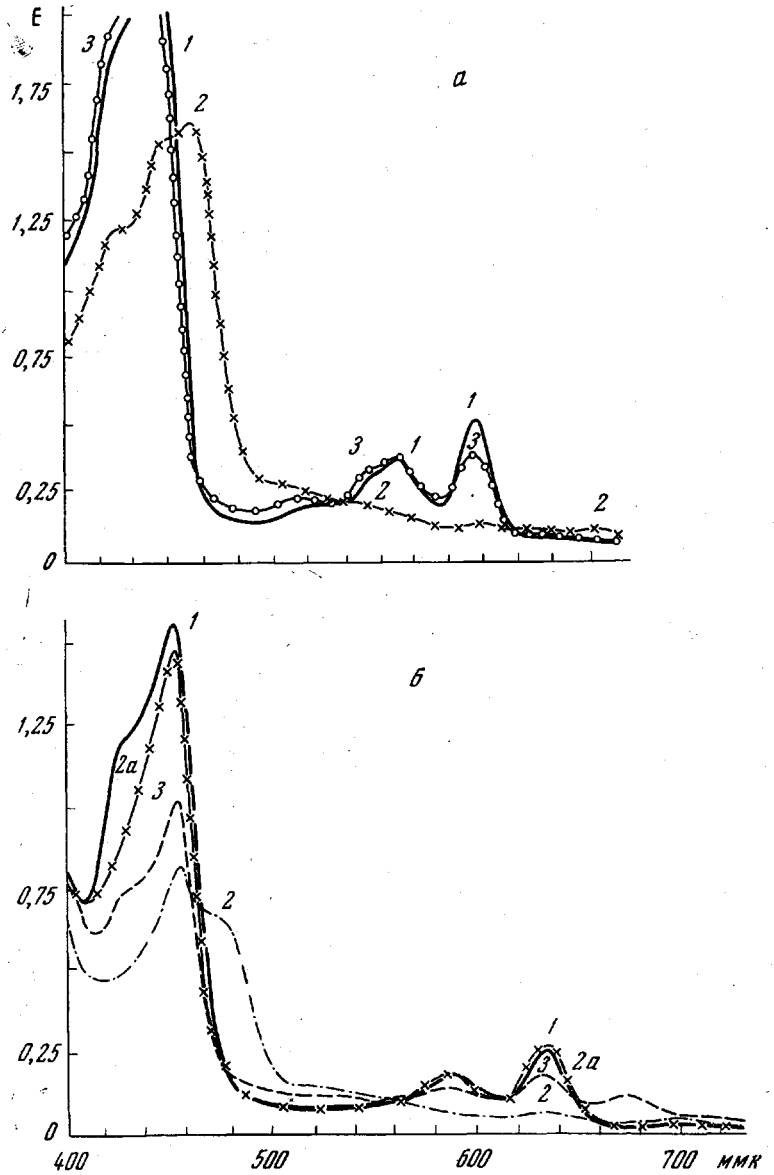


Рис. 2. Фотовосстановление протохлорофилла в пиридине

а — аскорбиновой кислотой (10^{-2} *М*); *б* — бензилникотинамидом (БНА · H_2). Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после освещения; *2, а* — после кратковременного (15 сек.) освещения раствора протохлорофилла с БНА · H_2; *3* — после обратной реакции в присутствии воздуха

лами растворителя (пиридина) с образованием ассоциатов, поглощающих ~460 *ммк*. Вода может разрушать эти ассоциаты, результатом чего является спектральный сдвиг в коротковолновую сторону. Подобное явление не наблюдается в содержащих воду растворах протохлорофилла в спирте. Протофеофитин в пиридине, содержащем воду, не обнаруживает коротковолнового смещения. Этот факт свидетельствует о том, что в случае протохлорофилла в образовании комплексов с пиридином принимает участие атом магния пигмента.

Фотовосстановление протохлорофилла. Протохлорофилл в пиридине в присутствии аскорбиновой кислоты при освещении без воздуха подвергается быстрому восстановлению, которое проявляется в уменьшении

исходных максимумов поглощения пигмента и одновременном образовании продуктов, поглощающих в области ~470 и 510—540 *ммк*. Эти продукты довольно лабильны и в темноте быстро реагируют с кислородом воздуха, приводя к регенерации части исходного пигмента. На рис. 2, *а* представлены спектры поглощения исходного раствора протохлорофилла в пиридине (кривая *1*) с аскорбиновой кислотой (10^{-2} *М*), того же раствора после 3 мин. освещения (кривая *2*) и после стояния в темноте в присутствии воздуха (кривая *3*).

Образованию коротковолновых продуктов фотовосстановления часто сопутствует появление продуктов с максимумами поглощения в области 600—700 *ммк*, которые исчезают при более длительном освещении. Образование этих максимумов зависит от содержания воды и концентрации аскорбиновой кислоты в растворе и, возможно, связано с восстановлением протофеофитина, образующегося в фотореакции, или присутствующего в исходном препарате пигмента. Максимум 470 *ммк* вероятно принадлежит форме пигмента, восстановленного по системе сопряженных двойных связей [2]. Скорость указанного фотопроцесса зависит от количества восстановителя, концентрации пигмента, содержания воды в реакционной системе, температуры. Увеличение содержания восстановителя или уменьшение концентрации пигмента при одном и том же количестве аскорбиновой кислоты приводят к ускорению процесса фотовосстановления. Однако, во всех случаях уровень восстановления одинаков и достигает ~70% от исходной концентрации пигмента. Взаимодействие восстановленной формы с кислородом воздуха вызывает регенерацию исходного пигмента. Ход обратного процесса в течение первых 45 мин. после пуска воздуха существенно не зависит от количества аскорбиновой кислоты, однако, процент регенерированного протохлорофилла снижается с увеличением концентрации восстановителя. Добавление 10% воды ускоряет течение обратной реакции, однако, процент регенерированного протохлорофилла уменьшается за счет побочного образования протофеофитина.

Образование восстановленной формы 470 зависит от температуры. В интервале температур от 80 до 100° форма 470 появляется в первые секунды освещения и затем быстро разрушается. При комнатной температуре (20°) скорость фотовосстановления оптимальна и удобна для измерения. При отрицательных температурах фотовосстановление с образованием формы 470 протекает медленно и при —40° полностью прекращается. Резко выраженная зависимость процесса от температуры свидетельствует о том, что форма 470 является результатом вторичных превращений продуктов первичной фотохимической реакции и, вероятно, аналогична «красной» форме хлорофилла. При температуре —40° форма 470 весьма устойчива, сохраняясь в присутствии кислорода воздуха в течение нескольких часов.

В спиртовом растворе (с аскорбиновой кислотой) образование восстановленной формы протохлорофилла 470 не наблюдается. Форма 470 не образуется в пиридине в присутствии таких восстановителей, как тиомочевина, цистеин, гидрохинон. Реакция идет в случае применения в качестве восстановителей, помимо аскорбиновой кислоты, фенилгидразина и восстановленного бензилникотинамида (БНА·H_2), примененного в нашей лаборатории для изучения фотовосстановления хлорофилла [8]. Фотовосстановление протохлорофилла БНА·H_2 проводили в спирте и пиридине. В спиртовом растворе удается обнаружить восстановленную форму протохлорофилла с максимумом 470 *ммк* после продолжительного освещения (в течение 20 мин.). В пиридине реакция протекает с высокой скоростью, приводя к образованию продуктов, имеющих максимум поглощения ~470 *ммк* и пологий максимум в области 530 *ммк* (рис. 2, *б*). В обратной реакции наряду с исходной формой пигмента образуется небольшое количество продукта с максимумом 675 *ммк*. Форма 675

устойчива в присутствии воздуха, ее можно перевести из пиридина в другой растворитель: наличие воды в реакционной системе препятствует ее образованию. Можно предположить, что поглощение в области 520—530 *ммк* связано с частичным восстановлением формы 470 по «полуизолированной» двойной связи в IV пиррольном кольце молекулы. Взаимодействие продукта, поглощающего в области 520—530 *ммк*, с кислородом воздуха приводит к образованию хлорофиллоподобного соединения с максимумом поглощения 675 *ммк*. Отчетливо форму 530 удалось наблюдать в опытах с амальгамой цинка (см. далее).

Фотовосстановление протофеофитина. Протофеофитин, как и протохлорофилл, восстанавливается в пиридине аскорбиновой кислотой при

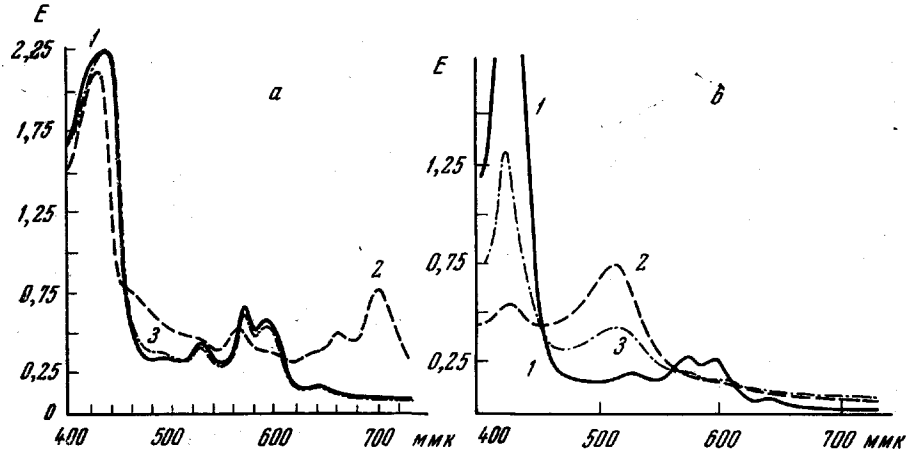


Рис. 3. Фотовосстановление протофеофитина аскорбиновой кислотой
а — в пиридине; *б* — в уксусной кислоте. Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после освещения (1 мин.); *3* — после обратной реакции

освещении в вакууме (рис. 3, *а*). В ходе реакции образуются продукты с отчетливыми максимумами 660 и 700 *ммк* и поглощением около 460—470 и 520 *ммк*. Подобные продукты образуются в присутствии различных количеств аскорбиновой кислоты (10^{-3}—10^{-1} *М*), воды (1—10%) и в пиридине, высушенном над CaO. Указанные продукты быстро реагируют с кислородом воздуха с регенерацией исходного протофеофитина. При освещении свыше одной минуты поглощение в области 660 и 700 *ммк* уменьшается. В избытке аскорбиновой кислоты (свыше 10^{-1} *М*) в красной области удается заметить образование только максимума 660 *ммк* наряду с увеличением поглощения в области 460—470 *ммк* и около 530 *ммк*. В ходе обратной реакции происходит частичная регенерация протофеофитина и образование стабильных продуктов с поглощением в области 500—540 *ммк*.

Фотовосстановление протофеофитина в присутствии БНА·H_2 или фенилгидразина протекает с образованием тех же продуктов, что и в опытах с аскорбиновой кислотой. После продолжительного освещения пиридинового раствора протофеофитина с фенилгидразином (10^{-1} *М*) и последующего выдерживания в темноте в присутствии воздуха в спектре поглощения можно заметить небольшой максимум около 664 *ммк*, который идентичен аналогичному максимуму протохлорофилла, появляющемуся в тех же условиях. Фотовосстановление протофеофитина при температуре —40° в пиридине фенилгидразином приводит к образованию продуктов, поглощающих в зеленой части спектра с максимумами 520 и 560 *ммк*. Это согласуется с данными Евстигнеева и Гавриловой [9], наблюдавших в данных условиях образование неустойчивой «первичной»

восстановленной формы пигмента с максимумами поглощения в области 400—600 *ммк*.

Протофеофитин в уксусной кислоте восстанавливается аскорбиновой кислотой при освещении в анаэробных условиях. Одновременно с падением поглощения в максимумах протофеофитина образуется форма пигмента, поглощающая около 510—515 *ммк* (рис. 3, *б*). Регенерация протофеофитина после пуска воздуха протекает медленно.

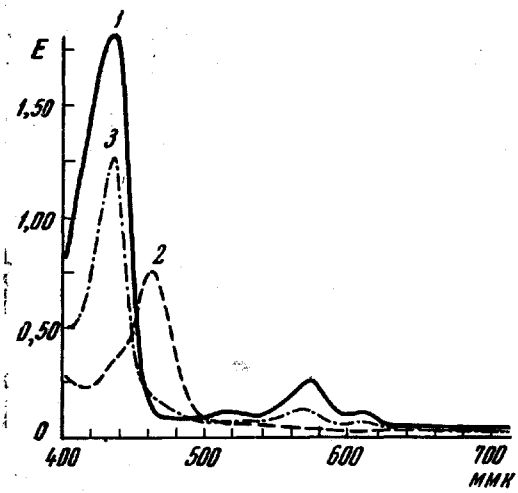


Рис. 4. Фотовосстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиперидине

Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после освещения (15 сек.); *3* — после обратной реакции

Фотовосстановление протохлорофилла и протофеофитина в пиперидине. Ранее было показано [10, 11], что хлорофилл взаимодействует с аминами (в частности, пиперидином) с разрывом циклопентанонового кольца; при этом наблюдаются необратимые изменения спектра. Подобное явление можно было ожидать и для протохлорофилла. Действительно, спектр поглощения протохлорофилла в пиперидине заметно отличается от спектра в других растворителях, например в эфире, спирте, пиридине (рис. 4, кривая *1*). Такой вид спектра сохраняется после переведения пигмента из пиперидина в другой растворитель (серный эфир) *. Очевидно, в пиперидине имеет место разрыв циклопентанонового кольца в молекуле протохлорофилла. Образовавшееся соединение (вероятно, 6-ацидаминпротохлорофилл) восстанавливается аскорбиновой кислотой и БНА · H_2 в пиперидине. Фотореакция протекает в течение нескольких секунд; продукт восстановления имеет четкий максимум 463 *ммк* (рис. 4). Спектральная картина фотопроцесса после добавления спирта и воды к пиперидину не изменяется.

Протофеофитин в пиперидине обладает характерным «порфириновым» спектром поглощения с максимумами ~430, 485, 512, и 550 *ммк* (рис. 5). Подобный спектр сохраняется после переведения пигмента из пиперидина в другой растворитель. Этот факт, как и в случае протохлорофилла, свидетельствует о необратимом химическом взаимодействии протофеофитина с амином, результатом которого является разрыв циклопентанонового кольца в молекуле протофеофитина и приобретение пигментом «порфириноподобной» структуры спектра. Полученное производное протофеофитина восстанавливается под действием света в анаэробных условиях в пиперидине и в смеси пиперидина со спиртом аскорбиновой кислотой (рис. 5, *а*). Результатом реакции, протекающей за несколько секунд освещения, является образование продукта с максимумом поглощения ~465 *ммк*. В обратной реакции регенерирует часть исходного пигмента. Фотовосстановление «протофеофитина» в спиртопиперидиновом растворе при температуре —40° приводит к появлению продуктов с поглощением ~460, 480 *ммк* и большим пологим максимумом ~640 *ммк* (рис. 5, *б*). Было замечено, что непродолжительное (1—2 мин.) выдерживание раствора «протофеофитина» в темноте вслед

* Первоначальные исследования по действию пиперидина на протохлорофилл были проведены в нашей лаборатории К. К. Войновской.

за коротким освещением приводит к возрастанию максимума ~640 *ммк* и одновременному уменьшению поглощения в области 460—480 *ммк*. Это наводит на мысль о том, что форма 640 образуется в темновом акте фотопроцесса из продуктов с коротковолновым поглощением. Возможно, продукт 640 является результатом восстановления молекулы по

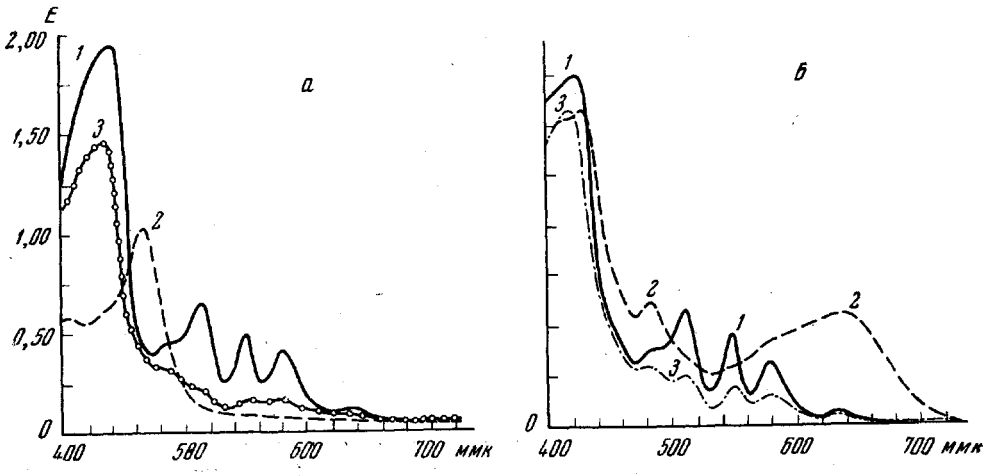


Рис. 5. Фотовосстановление протофеофитина аскорбиновой кислотой в смеси пиперидина и спирта (1 : 1)

а — при комнатной температуре; *б* — при температуре —40°. Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после освещения (1 мин.); *3* — после обратной реакции

«полуизолированной» двойной связи 7—8 с образованием хлориноподобного продукта. Продукт 640 неустойчив, обратная реакция протекает очень быстро.

Восстановление протохлорофилла амальгамой цинка. Амальгама цинка восстанавливает пигменты в темноте. В отличие от восстановления пигментов металлическим цинком (по Тимирязеву) реакция с амальгамой осуществляется и в отсутствие кислоты [12]. При этом можно ожидать образования «электронных» восстановленных форм пигмента.

Амальгаму получали путем растворения 3 *г* гранулированного цинка в 100 *г* ртути нагреванием до 100° с разбавленной серной кислотой. После растворения цинка в ртути кислоту тщательно отмывали водой. Для восстановления протохлорофилла использовали 0,02—0,03 *мл* амальгамы. Реакцию проводили в трубке Тунберга, встряхивая с амальгамой цинка эвакуированный раствор пигмента в пиридине с параллельным измерением поглощения. Восстановление приводит к последовательному появлению форм, поглощающих при 470 и 525 *ммк* (рис. 6). Можно думать, что форма 470, образующаяся в начале реакции, принадлежит протохлорофиллу, восстановленному по системе коньюгированных двойных связей (ср. с фотовосстановлением). При более длительном восстановлении амальгамой эта форма, возможно, подвергается восстановлению по «полуизолированной» двойной связи и присуща соединению, аналогичному «красной» восстановленной форме хлорофилла (форма 525). Обратная реакция приводит к образованию цинкового комплекса протохлорофилла. По-видимому, образующаяся в данных условиях форма 525 и «красная» восстановленная форма хлорофилла отличны по своей структуре и реакционной способности. Регенерация восстановленного протохлорофилла в исходный протохлорофилл происходит довольно медленно, в течение нескольких минут. Добавление кислоты к восстановленному амальгамой протохлорофиллу приводит к мгновенной регенерации пигмента.

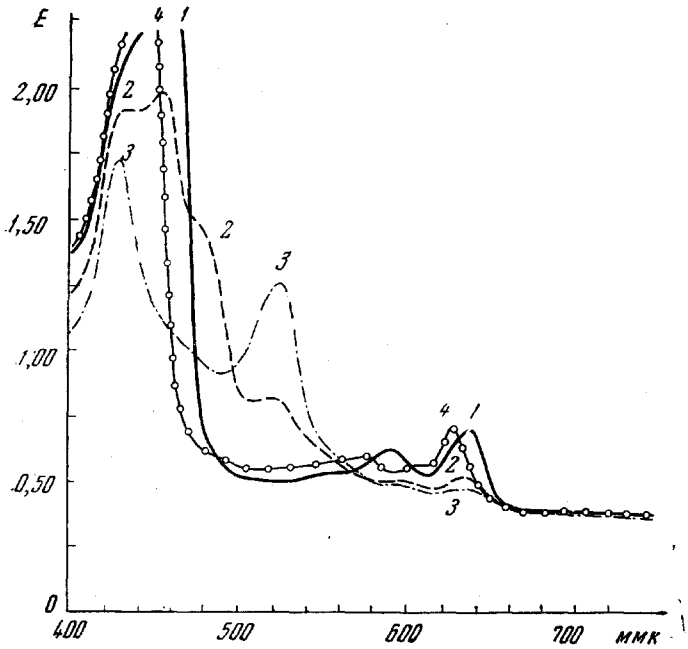


Рис. 6. Восстановление протохлорофилла амальгамой цинка в пиридине

Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2*, *3* — в ходе восстановления; *4* — после обратной реакции

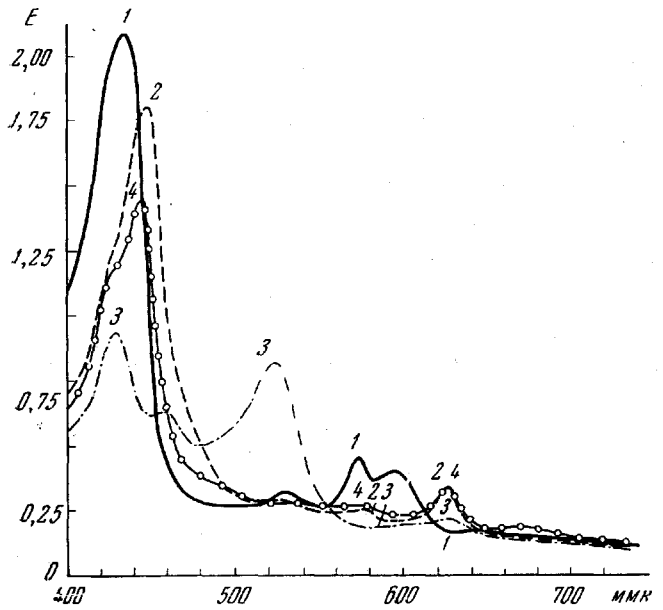


Рис. 7. Восстановление протофеофитина амальгамой цинка в пиридине

Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — образовавшегося цинкпротофеофитината; *3* — после восстановления, *4* — после обратной реакции

При восстановлении протофеофитина амальгамой цинка вначале образуется цинковый комплекс протофеофитина, который затем подвергается восстановлению с образованием формы 525 *ммк*. В обратной реакции после пуска воздуха регенерирует цинкпротофеофитинат (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассматривая полученные результаты, можно видеть, что фотовосстановление протохлорофилла в большинстве вариантов опытов ведет к образованию формы 470. В предыдущих работах [2; 3] эта форма рассматривалась как результат восстановления протохлорофилла по системе сопряженных двойных связей. Присоединение электронов к π-электронной системе ведет к резкому ее нарушению и вследствие этого — к изменению симметрии молекулы и значительным спектральным изменениям.

Возникает вопрос, в каком месте сопряженной системы происходит восстановление. Существует несколько вероятностей: восстановление N—H-связей в центре молекулы; C=C-связей метиновых мостиков; C=C-связей пиррольных колец с разрывом сопряжения по кругу или C=N-связей пиррольных колец. Гуринович [13], подробно обсуждая возможную структуру продуктов фотовосстановления порфиринов, на основании анализа известных работ приходит к выводу о том, что наиболее вероятным местом восстановления является восстановление по C=C-связям пиррольных колец с разрывом сопряжения по кругу. Таких мест в молекуле протохлорофилла два: в I и III пиррольных кольцах.

Восстановление протохлорофилла по «полуизолированной» двойной связи должно приводить к образованию хлорофилла, поскольку известно, что хлорофилл отличается от протофлорофилла наличием гидрированной двойной связи 7—8. При восстановлении протохлорофилла амальгамой цинка происходит последовательное образование форм 470 и 520. Можно предположить, что форма 520 по структуре близка к «красной» восстановленной форме хлорофилла *а*. Возможно, что при фотовосстановлении протохлорофилла бензилникотинамидом образуется аналогичный продукт (с поглощением в области 510—540 *ммк*), который в реакции с кислородом воздуха образует хлорофиллоподобное соединение (с максимумом при 674 *ммк*).

При фотовосстановлении производного протофеофитина в пиперидине (—40°) образуется продукт с максимумом поглощения 640 *ммк* и имеющий, по всей вероятности, хлориноподобную структуру.

Осуществить количественное восстановление протохлорофилла до хлорофилла в модельной системе нам не удалось, очевидно, вследствие того, что состояние протохлорофилла в растворе существенно отличается от естественного состояния предшественника хлорофилла в растении, где пигмент связан с нативным белково-липоидным носителем и образование хлорофилла протекает с высоким квантовым выходом [14]. Наличие естественной связи с белком, по-видимому, приводит к предпочтительному восстановлению связи 7—8.

ВЫВОДЫ

Фотохимическое восстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой, фенилгидразином, БНА·H_2 приводит к образованию формы с максимумом поглощения 470 *ммк* и являющейся результатом восстановления молекулы пигмента по системе сопряженных двойных связей. Продукты фотовосстановления протофеофитина имеют максимумы поглощения 660 и 700 *ммк* и около 460 *ммк*.

При фотовосстановлении протохлорофилла восстановленным бензилникотинамидом наряду с формой 470 образуется соединение, поглощающее в области 510—540 *ммк*, которое в обратной реакции дает хлоро-

филлоподобный продукт с максимумом 674 *ммк*. Восстановление протохлорофилла и протофеофитина амальгамой цинка в темновых условиях приводит к последовательному образованию продуктов с максимумами поглощения 470 и 525 *ммк*.

В растворах протохлорофилла и протофеофитина в пиперидине имеет место необратимое химическое взаимодействие пигмента с амином, результатом которого являются разрыв циклопентанонового кольца и характерные изменения спектров. При фотовосстановлении производного протофеофитина в спиртопиперидиновом растворе (—40°) образуется хлориноподобный продукт с максимумом поглощения 640 *ммк*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Годнев Т. Н. и Калишевич С. В., Тр. Ин-та физиол. растений им. К. А. Тимирязева АН СССР **4**, 160, 1945
2. Красновский А. А. и Войновская К. К., Докл. АН СССР **64**, 663, 1949
3. Красновский А. А. и Войновская К. К., Докл. АН СССР **112**, 911, 1957
4. Красновский А. А. и Быстрова М. И., Биохимия **27**, 958, 1962
5. Евстигнеев В. Б. и Савкина И. Г., Биофизика **4**, 289, 1959
6. Годнев Т. Н. и Акулович Н. К., в сб.: Биохимия и физиол. растений, стр. 42. Изд. АН БССР, Минск, 1958
7. Шлык А. А., Калер В. Л. и Подчуфарова В. А., Бюлл. Ин-та биологии **5**, 141, 1960
8. Красновский А. А. и Брин Г. П., Докл. АН СССР **158**, 225, 1964
9. Евстигнеев В. Б. и Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **118**, 1146, 1958
10. Красновский А. А. и Брин Г. П., Докл. АН СССР **89**, 527, 1953
11. Weigl J. W., Livingston R., J. Amer. Chem. Soc. **74**, 3452, 1952; **76**, 1575, 1954
12. Умрихина А. В. и Красновский А. А., Докл. АН СССР **155**, 904, 1964
13. Гуринович Г. П., Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 83 «Наука», 1965
14. Смит Дж., в кн.: Структура и функция фотосинтетического аппарата, стр. 350, ИЛ, М., 1962

Поступила в редакцию
1.IV 1965

PHOTO-REDUCTION OF PROTOCHLOROPHYLL AND PROTOPHEOPHYTIN

M. I. BYSTROVA, A. V. UMRIKHINA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Photochemical reduction of protochlorophyll with ascorbic acid, phenylhydrazine and reduced benzylnicotinamide results in a compound with an absorbtion maximum at 470 *mμ*, suggesting reduction of the conjugated double bonds system of the pigment molecule.

A similar results seems to be the case also with protopheophytin, which after analogous treatment produces compounds with absorbtion maximum at 660 and 700 *mμ* and at approximately 460 *mμ*.

Photo-reduction of protochlorophyll with reduced benzyl nicotinamide produces the «470» form along with a compound characterized by absorbtion maximum at 510—540 *mμ*, which can be transformed by a reverse reaction into a chlorophyll-like product with maximum at 674 *mμ*.

Reduction of protochlorophyll and protopheophytin with zinc amalgam in the dark leads to sequential formation of products with absorbtion at 470 and 525 *mμ*, respectively.

Protochlorophyll and protopheophytin irreversibly react with piperidine, and treatment with this solvent results in fission of cyclo-pentanone ring followed by characteristic spectral changes. The products formed can be reduced photochemically. Photo-reduction of the protopheophytin derivative in ethanol-piperidine solution at —40° gives rise to a chlorine-like compound with an absorbtion at 640 *mμ*.

УДК 581.132

ВЛИЯНИЕ ДЕЗАГРЕГИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ОБРАЗОВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛИДА И СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА В ХЛОРОПЛАСТАХ И В ГОМОГЕНАТАХ ЛИСТЬЕВ

Л. М. ВОРОБЬЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

При изучении состояния хлорофилла в листьях растений мы провели исследование действия растворителей на спектральные свойства и фотохимическую активность пигмента в суспензиях хлоропластов [1]. В результате работы было обосновано представление о различных последовательных стадиях воздействия растворителей на хлорофилл в естественном состоянии. Вначале происходит постепенное нарушение состояния хлорофилла без перехода пигмента в раствор, по достижении определенной концентрации растворителя хлорофилл переходит в растворенное состояние [1]. Позднее Томас и др. [2; 3] пришли к сходным результатам и обнаружили, что спектральные изменения у хлоропластов аспидистры под влиянием ацетона обратимы до 40% растворителя; указанные авторы предприняли попытку экстрагировать различными концентрациями ацетона разные пигменты и формы хлорофилла *a*.

Обнаружение активации хлорофиллазы при нарушении структуры листа и накопления хлорофиллида в хлоропластах и гомогенатах [4; 5] привело к необходимости проверки заключений, ранее относимых только к хлорофиллу [1]. С этой целью мы систематически исследовали влияние различных дезагрегирующих пигментно-белковый комплекс воздействий на хлорофиллазную активность, спектральные и фотохимические свойства пигментов в гомогенатах и в хлоропластах. В качестве дезагрегирующих воздействий применяли постепенное нагревание, добавки растворителей, детергентов, приготовление препаратов на среде с различной величиной pH. Объектами исследования служили гомогенаты и хлоропласты листьев фасоли, обладающие низкой активностью хлорофиллазы, и сахарной свеклы, отличающиеся высокой активностью фермента.

МЕТОДИКА

Работу проводили с листьями фасоли сорта «сакса» и сахарной свеклы сорта «верхнячка». Фасоль выращивали в оранжерее, сахарную свеклу летом — в вегетационном домике, зимой — в оранжерее.

Методика получения хлоропластов и гомогенатов описана ранее [5]. Хлоропласты готовили при 2°, гомогенаты — при комнатной температуре. Полученные препараты после определения содержания хлорофиллида подвергали предварительной обработке (см. ниже) в течение 1 часа, и определяли количество образовавшегося хлорофиллида, характер кривой поглощения в красной части спектра и понижение поглощения в красном максимуме поглощения в результате освещения. При работе с препаратами листьев сахарной свеклы в большинстве опытов определяли только накопление хлорофиллида за 1 час стояния при комнатной температуре. Методика определения содержания хлорофиллида в гомогенатах и хлоропластах описана ранее [5].

При изучении влияния растворителей к 1 *мл* гомогената или хлоропластов, суспендированных в растворе хлористого натрия, добавляли смесь растворителя и $^1/_{15}$ *М* Na_2HPO_4 (в некоторых случаях фосфат заменяли дистиллированной водой) в таких соотношениях, чтобы получить в общем объеме 10 *мл* концентрацию растворителя от 5 до 80%. Предварительно растворители подвергали очистке: ацетон (Reanal, до 0,2% воды) и пиридин (чистый) перегоняли; диоксан настаивали в течение 10 дней над $FeSO_4$, 5 час. кипятили с металлическим натрием и перегоняли, для работы использовали фракцию, кипящую при 101°. Препараты взбалтывали с растворителем 1 час при комнатной температуре.

При исследовании влияния pH листья (1,5 *г*) растирали в ступке с фосфатным буфером (10 *мл*). Гомогенаты оставляли при комнатной температуре 1 час с момента начала растирания листьев. Для получения растворов с pH>9 к раствору $^1/_{15}$ *М* Na_2HPO_4 добавляли раствор NaOH; pH измеряли на потенциометре ЛП-58. Было найдено, что аскорбат не тормозит накопление хлорофиллида в гомогенатах свеклы, но препятствует образованию при pH>9 темноокрашенных веществ, затрудняющих измерение поглощения хлорофиллида в водном ацетоне. Поэтому при работе с листьями сахарной свеклы перед растиранием к навеске листьев добавляли 10 *мг* аскорбата натрия.

Коллоидные растворы хлорофилла *a*+*b* готвили добавлением 0,05 *мл* концентрированного раствора пигмента в ацетоне к 1,95 *мл* фосфатного буфера различных pH. После стояния в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре к коллоидным растворам добавляли до получения 80%-ной концентрации ацетон и определяли количество бесфитольных форм.

Влияние детергентов изучали, добавляя к гомогенату листьев водные растворы дигитонина, додецилсульфата натрия и дезоксихолата до концентрации 0,2 и 0,5%. Смесь стояла 1 час при комнатной температуре.

Нагревание гомогенатов до определенной температуры производили в течение 1 часа в ультратермостате, после чего охлаждали до комнатной температуры.

Освещение препаратов осуществлялось при 22° киноламповой (750 *вт*) с конденсором через светофильтр КС-11 ($\sim 10^6$ *эрг/см*^{2} · *сек*). Спектры поглощения измеряли в спектрофотометре СФ-5. Точность определения положения максимумов ±1 *ммк*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние pH среды. Предварительно следовало определить, при каких значениях pH происходит прямое отщепление фитола от молекулы хлорофилла. Мы не наблюдали образования бесфитольных форм пигментов при стоянии коллоидных растворов хлорофилла *a*+*b* в течение 1 часа в интервале pH 5—9. При pH 10 образовывались незначительные количества хлорофиллида (0,1—0,15%), при pH 11 образование хлорофиллида достигало 0,8—1,4%. Стояние коллоидного раствора с pH 12 в течение 1 часа приводило к образованию другой бесфитольной формы хлорофилла — хлорофиллина с максимумом поглощения при 640 *ммк*; бóльшая часть присутствующего в коллоидном растворе хлорофилла переходила в эту форму.

Рядом авторов определялся оптимум pH для активности хлорофиллазы. Майер [6] нашел его равным pH 6; Шимицу и Тамаки [7] и Бёгер [8] — около pH 7—7,5, в опытах Клейна и Вишняка [9] активность была постоянной в области pH 6—8, препараты хлорофиллазы из листьев сахарной свеклы в работе Холден [10] обладали наибольшей активностью при pH 7,5—8. Эти различия, по-видимому, определяются видовыми особенностями, а также способами получения препаратов хлорофиллазы и концентрацией ацетона, применяемого для обнаружения активности.

Наши опыты показали увеличение хлорофиллазной активности гомогенатов листьев сахарной свеклы в области pH 4,6—11,0 (рис. 1). При pH 11 в гомогенате свеклы за 1 час образовывалось 45% хлорофиллида. Образование дополнительных количеств хлорофиллида за счет прямого действия щелочного буферного раствора на хлорофилл при pH 11 можно не принимать во внимание, так как оно составляет не более 1,4%. При pH 12 было обнаружено подавление хлорофиллазной активности гомогената листьев сахарной свеклы. Образования значительных количеств хлорофиллина с максимумом поглощения при 640 *ммк*, подобно тому как это имело место в коллоидных растворах хлорофилла *a*+*b*, при pH 12 мы не наблюдали. В гомогенате свеклы в этих услови-

ях образовывались небольшие количества хлорофиллида и хлорофиллина. Следовательно, за 1 час стояния образца при pH 12 не происходит полного освобождения хлорофилла из комплекса, допускающего прямую реакцию со щелочью.

Мы не наблюдали значительного накопления хлорофиллида в гомогенатах листьев фасоли при pH 5—10. Содержание пигмента достигало 0,2—0,5%, немного увеличиваясь по мере возрастания pH. При pH 11 было обнаружено 0,9% хлорофиллида, что, по-видимому, объясняется прямым действием щелочного буфера на хлорофилл.

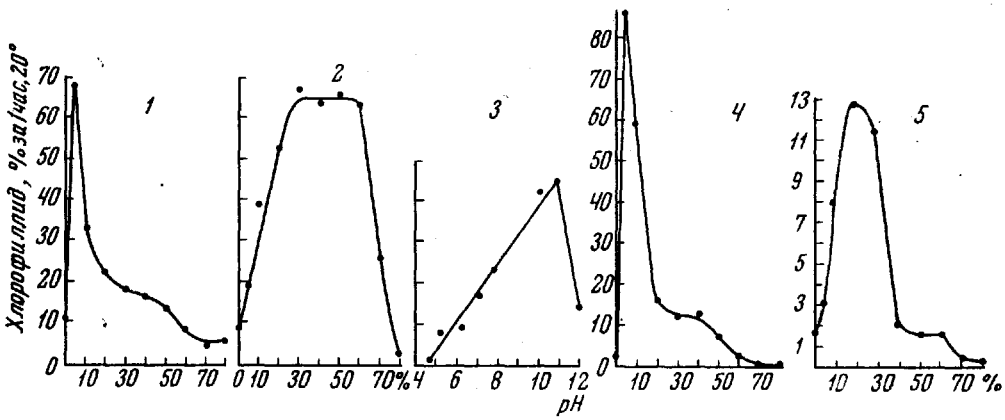


Рис. 1. Зависимость активности хлорофиллазы в гомогенатах и в хлоропластах листьев сахарной свеклы от концентрации растворителей и величины pH среды

1 — пиридин (гомогенат); *2* — ацетон (гомогенат); *3* — pH (гомогенат); *4* — пиридин (хлоропласты); *5* — диоксан (хлоропласты)

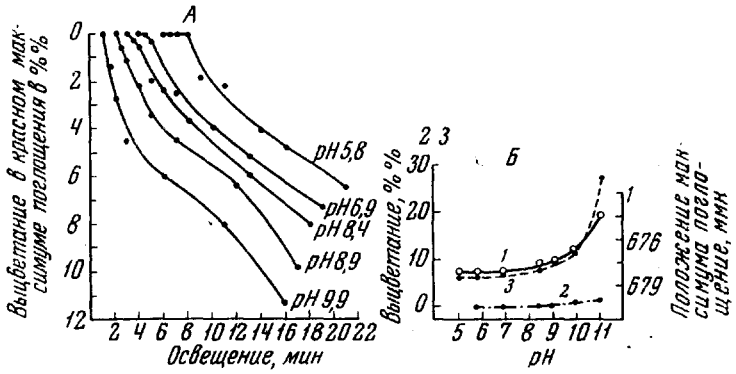


Рис. 2. Спектральные и фотохимические свойства пигментов в гомогенатах листьев фасоли при различных pH среды

А — кинетика выцветания в красном максимуме поглощения; *Б*: *1* — положение красного максимума поглощения; *2* — выцветание за 30 сек. освещения; *3* — выцветание за 15 мин. освещения

Величина pH сред не оказывала большого влияния на положение красного максимума поглощения пигментов в гомогенатах фасоли. Заметный коротковолновый сдвиг максимума до 675 *ммк* вследствие дезагрегации хлорофилла в щелочной среде происходил при pH 11 (рис. 2). Этот сдвиг не может объясняться образованием 1% хлорофиллида.

Выцветание пигмента в красном максимуме поглощения за 15 мин. освещения гомогената фасоли возрастало по мере увеличения щелочности среды. Это возрастание выцветания не может быть объяснено только бо́льшим содержание хлорофиллида, так как количество пигмента,

выцветающего в гомогенате по мере увеличения pH, возрастает, в то время как содержание хлорофиллида остается почти без изменения. Так, при 0,2% хлорофиллида (pH 5—6) за 15 мин. выцветало 6,5% пигмента, при 0,5% хлорофиллида (pH 9) — 10%.

На рис. 2 изображены кривые выцветания пигментов в гомогенатах листьев фасоли при различных pH. При pH 6 пигменты были устойчивы к освещению в течение первых двух минут, по мере перехода к более щелочным pH возрастало количество пигмента, разрушающегося в начале освещения. Выцветание пигментов за первую минуту освещения нельзя объяснить только наличием хлорофиллида, так как, например, при pH 9 в гомогенате обнаружено 0,5% хлорофиллида, а за первую минуту выцветало 1,16% пигментов (рис. 2). Бо́льшую лабильность хлорофилла в щелочной среде можно объяснить частичной дезагрегацией пигмента, происходящей, вероятно, без нарушения связей в пигментно-белковом комплексе.

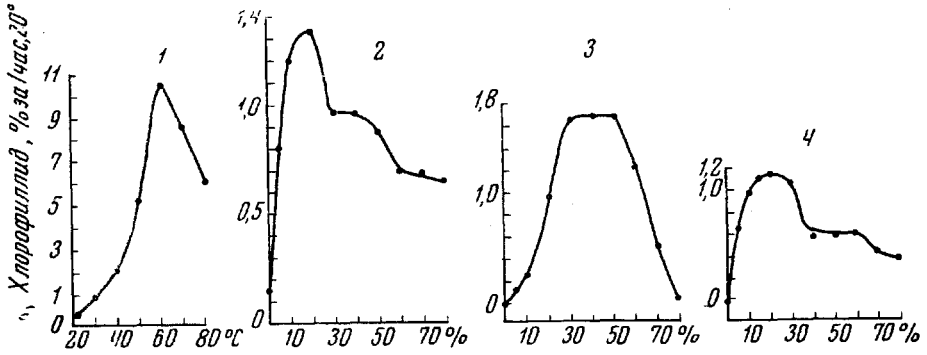


Рис. 3. Зависимость активности хлорофиллазы в гомогенатах и в хлоропластах листьев фасоли от концентрации растворителей и температуры

1 — нагревание (гомогенат); *2* — пиридин (хлоропласты); *3* — ацетон (гомогенат); *4* — пиридин (гомогенат)

Ацетон. Активность хлорофиллазы в большинстве работ определяли в присутствии ацетона. Различные авторы [6—8; 10—13] применяли для этой цели 40—80%-ный ацетон.

На рис. 3 показана хлорофиллазная активность гомогента листьев фасоли при различных концентрациях ацетона. В контроле, без ацетона хлорофиллид не образовывался, но уже при 5% растворителя наблюдалось повышение активности. Максимальная активность хлорофиллазы, равная ~2% хлорофиллида за 1 час, обнаружена при 30—50%-ной концентрации ацетона; 80% ацетона подавляют активность фермента почти полностью.

Сходная картина накопления хлорофиллида в зависимости от содержания ацетона наблюдалась в гомогенатах листьев сахарной свеклы (рис. 1). Максимальная активность (60—70% хлорофиллида за 1 час) наблюдалась при 30—60% ацетона, при 80% активность ниже, чем в контрольном опыте без ацетона.

Ранее было показано, что при добавлении к препаратам зеленых листьев до 50% спирта или ацетона максимум поглощения хлорофилла постепенно перемещается в коротковолновую сторону спектра без перехода пигмента в растворенное состояние, а при концентрации растворителя выше 50% образуется раствор хлорофилла [1]. В данной работе исследовали положение красного максимума поглощения и выцветание пигментов при добавлении ацетона до 50%.

Изменение положения максимума соответствовало ранее опубликованным данным [1]. После обработки 30—40%-ным ацетоном (1 час)

образуются хлопья белка без извлечения пигмента (максимум 670 *ммк*); при 50%-ной концентрации ацетона максимум поглощения смещался до 665 *ммк* и пигмент переходил в раствор. Постепенный сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область при возрастающих концентрациях ацетона не может быть объяснен образованием хлорофиллида, так как в препаратах листьев фасоли в присутствии ацетона не накапливается более 2% хлорофиллида.

Добавление растворителя до концентрации 5% уже оказывает влияние на устойчивость пигментов к деструктивному фотоокислению (выцветанию) (рис. 4). Дальнейшее увеличение концентрации ацетона до 20% мало сказывается на количестве формы пигмента, выцветающей за 7 мин. освещения, и только в том случае, когда наблюдаются значительные нарушения естественного состояния пигмента (40% ацетона), количество выцветающей формы резко возрастает. Выцветание пигментов за первые 30 сек. освещения гомогената при добавлении ацетона до 40% изменялось мало (рис. 4); следовательно, резкое изменение количества пигмента, разрушающегося за 7 мин. освещения, объясняется, вероятно, изменением скорости дезагрегации пигментно-белкового комплекса под действием различных концентраций ацетона при длительном освещении.

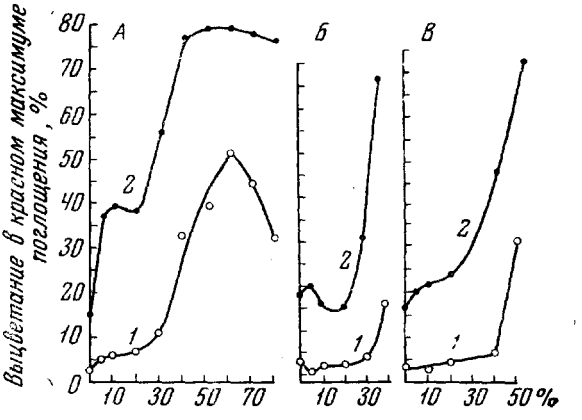


Рис. 4. Выцветание пигментов в гомогенатах и хлоропластах листьев фасоли, содержащих различные концентрации растворителей

А — пиридин (гомогенат); *Б* — пиридин (хлоропласты); *В* — ацетон (гомогенат); *1* — выцветание за 30 сек.; *2* — выцветание за 7 мин.

Пиридин. Ранее мы уже отмечали гораздо более сильное дезагрегирующее действие пиридина на белково-пигментный комплекс хлоропластов, чем действие других растворителей [1]. В соответствии с этим малое количество пиридина, добавленное к гомогенатам и хлоропластам, вызывало значительную активацию хлорофиллазы. В одном из опытов в гомогенате фасоли после приготовления содержалось 0,17% хлорофиллида, т. е. активность хлорофиллазы без пиридина практически отсутствовала. Добавление пиридина до концентрации 5% приводило к накоплению в гомогенате 0,63% хлорофиллида за 1 час. Максимальная активность ($\sim$1,2 хлорофиллида) наблюдалась при 20% пиридина, при концентрациях растворителя выше 60% наблюдалось быстрое снижение активности (рис. 3). Сходная картина возрастания и снижения активности была обнаружена при добавлении пиридина к хлоропластам листьев фасоли (рис. 3). Следует указать на то, что в препаратах листьев фасоли накопление хлорофиллида наблюдалось и при 80% пиридина, тогда как в контрольном образце без пиридина накопление бесфитольного пигмента отсутствовало или происходило более медленно.

Неожиданной была чрезвычайно сильная активность хлорофиллазы при добавлении пиридина к препаратам листьев сахарной свеклы. Максимальная активность наблюдалась при 5% растворителя (60—85% хлорофиллида за 1 час), при дальнейшем увеличении концентрации пиридина происходило быстрое понижение активности. И в этом случае после резкого спада активности наблюдалась область медленного ее понижения, после которого следовало опять более резкое падение. При

70—80% пиридина активность была ниже, чем в контрольном опыте без растворителя (рис. 1).

Пиридин уже при низких концентрациях вызывает значительные изменения нативного пигментного комплекса, образуя, вероятно, координационные связи с хлорофиллом. При 5% пиридина максимум поглощения был расположен ~672—674 *ммк*; при увеличении концентрации пиридина до 50% максимум постепенно перемещался до 670 *ммк* (при этом пигмент не переходил в раствор); по достижении 60%-ной концентрации — до 669 *ммк* (положение максимума поглощения хлорофилла в растворе пиридина). Пиридин вызывает стабилизацию и растворение белка; образование белковых хлопьев наблюдалось при концентрациях растворителя выше 60%.

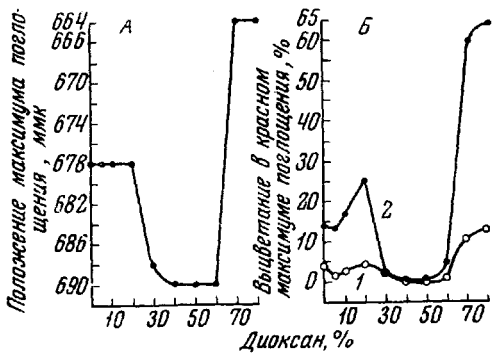


Рис. 5. Спектральные и фотохимические свойства пигментов в хлоропластах листьев фасоли, содержащих различные концентрации диоксана

А — изменение положения красного максимума поглощения; *Б* — выцветание: *1* — за 30 сек.; *2* — за 7 мин. освещения

Изменение выцветания пигментов (за 7 мин. освещения гомогенатов и хлоропластов фасоли) в присутствии возрастающих концентраций пиридина (рис. 4) сходно с картиной, описанной ранее для ацетона: 5% пиридина вызывало возрастание количества выцветающей формы и до 20% растворителя ее количество не увеличивалось, а в опытах с хлоропластами даже несколько уменьшалось, при концентрации пиридина выше 20% вновь наблюдалось возрастание выцветания. Сходную зависимость от концентрации пиридина имеет характер выцветания пигмента за первые 30 сек. освещения. Максимальное количество пигмента разрушалось при 60% пиридина, дальнейшее увеличение концентрации пиридина вызывало уменьшение количества пигмента, разрушающегося в начале освещения.

Диоксан. Хлорофиллазная активность хлоропластов фасоли и сахарной свеклы в присутствии диоксана была сравнительно низкой (рис. 1, *5*). Максимальная активность наблюдалась при 20% диоксана. При этой концентрации растворителя в препаратах сахарной свеклы за 1 час образовывалось 12—15% хлорофиллида, в хлоропластах фасоли — ~0,3%. Дальнейшее увеличение концентрации диоксана вызывало быстрое снижение активности. Как и в опытах с ацетоном и пиридином, в случае добавления диоксана наблюдалась область медленного понижения хлорофиллазной активности.

Как было показано ранее [1], наблюдается несколько стадий действия диоксана на спектральные свойства пигментов в препаратах зеленых листьев. На рис. 5 изображено положение красного максимума поглощения в хлоропластах листьев фасоли в зависимости от концентрации диоксана. Добавление диоксана до 20% не влияло на положение максимума (678 *ммк*), при 30—60% максимум был расположен около 690 *ммк*, при 70% он перемещался до 664 *ммк* (обычное положение максимума поглощения хлорофилла $a+b$ в диоксане). Хлопья белка выпадали при 30—60% диоксана, переход в раствор наблюдался при концентрации растворителя выше 70%. Зависимость выцветания пигментов в гомогенате с добавками диоксана в общих чертах повторяет кривую изменений положения красного максимума поглощения под влиянием этого растворителя. При добавлении диоксана до 20% наблюдалось

постепенное возрастание количества выцветающего пигмента, при 30—60% диоксана пигменты отличались устойчивостью (рис. 5).

Нагревание. При нагревании листьев максимум поглощения хлорофилла смещается в коротковолновую сторону. Годневым [14] было установлено, что смещение максимума начинается при повышении температуры до 47—56°, величина смещения несколько различается у листьев разных видов и зависит от светового режима растения.

Активность хлорофиллазы в препаратах листьев сахарной свеклы тормозится при понижении температуры от 20 до 2°. В препаратах листьев фасоли, полученных при 20 и 2°, найдены близкие коли-

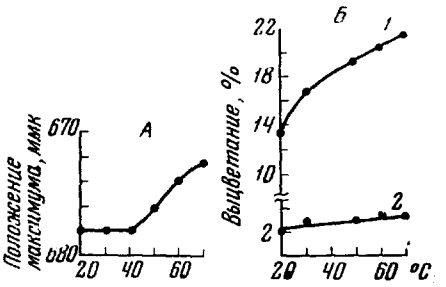


Рис. 6

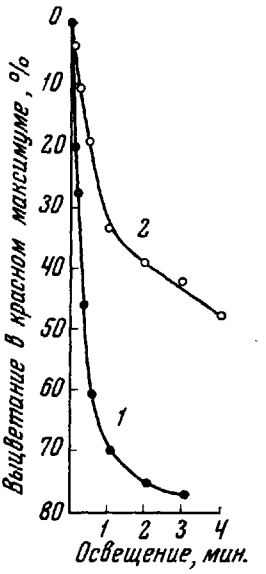


Рис. 7

Рис. 6. Изменение спектральных и фотохимических свойств пигментов при нагревании гомогената листьев фасоли

А — положение красного максимума поглощения; *Б* — выцветание: *1* — за 30 сек.; *2* — за 7 мин. освещения

Рис. 7. Кинетика выцветания хлорофилла *a*+*b* в этиловом спирте и пигментов в гомогенате листьев фасоли в присутствии додецилсульфата натрия

1 — гомогенат, содержащий 0,5% додецилсульфата натрия; *2* — хлорофилл *a*+*b* в спирте

чества хлорофиллида [4; 5]. В данной работе определяли активность хлорофиллазы в гомогенатах листьев фасоли при температуре выше комнатной. По мере возрастания температуры активность хлорофиллазы увеличивалась, особенно резко в интервале 40—60°; нагревание гомогенатов выше 60° понижало активность (рис. 6).

Нагревание гомогенатов вызывало повышение активности хлорофиллазы листьев фасоли более высокое, чем добавление растворителей. Следует подчеркнуть зависимость активности от физиологического состояния растения. В разные дни после 1 часа нагревания гомогената до 60° наблюдались колебания содержания хлорофиллида от 1,35 до 10%.

В наших опытах положение красного максимума поглощения не изменялось в результате нагревания гомогената до 40°, более высокая температура приводила к дезагрегации, характеризующейся сдвигом максимума в коротковолновую область спектра. Выцветание пигментов в нагретых образцах увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 6).

Детергенты. Клейн и Вишняк [9] наблюдали отщепление фитола от изолированных пигментов в водной среде в присутствии препарата хлорофиллазы из проростков ржи и детергента Тритона X-100. Ардао и Веннесланд [11] обнаружили накопление хлорофиллида в хлоропластах шпината, обработанных дигитонином, только в присутствии ацетона и

пришли к выводу, что хлорофиллаза не активируется дигитонином, хлорофил и фермент остаются прочно связанными в структурах.

В наших опытах с гомогенатами листьев фасоли в присутствии гидитонина наблюдалось следующее накопление флорофиллида:

Образец	Хлорофиллид, образующийся за 1 час (20°) в % к сумме пигментов	
	Опыт 1	Опыт 2
Без детергента (0,25% хлорофиллида)	0,0	0,0
Додецилсульфат натрия, %		
0,2	0,08	—
0,5	0,29	0,14
Дигитонин, %		
0,2	0,17	—
0,5	0,17	0,12

Максимум поглощения и количество выцветающей формы пигментов в присутствии дигитонина существенно не отличались от контрольных величин у гомогената без детергента. Додецилсульфат натрия и дезоксихолат вызывали сильную дезагрегацию пигмента и белка, и гомогенаты с детергентом нельзя было отличить от истинных растворов хлорофилла в органических растворителях. Красный максимум поглощения перемещался до 670 *ммк*, выцветание пигментов по скорости падения поглощения в максимуме даже превышало выцветание пигментов при освещении истинных растворов хлорофилла (рис. 7). Несмотря на сильную дезагрегацию хлорофилла, в присутствии этих детергентов не отмечалось большего усиления хлорофиллазной активности, чем в опытах с дигитонином.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на наличие хлорофиллазы в зеленых листьях, количества хлорофиллида, присутствующего в них, весьма низки [4; 5; 15]. Воздействия, приводящие к изменениям белкового компонента хлоропластов и нарушениям упорядоченной структуры пигмента в гранулах, вызывают активацию хлорофиллазы.

Размельчение листа в водных средах уже приводит к образованию хлорофиллида [4; 5]. Щелочная среда, приводящая к частичному растворению белков, в наших опытах благоприятствовала возрастанию активности фермента. Добавление растворителей (ацетон, диоксан, пиридин) к гомогенатам и хлоропластам листьев приводило к активации хлорофиллазы. Величина активности зависела от вида растения, природы и концентрации растворителя. Добавление ацетона и диоксана до концентрации 5% уже оказывало активирующее действие. В случае пиридина в опытах с препаратами листьев сахарной свеклы в присутствии 5% растворителя наблюдалась максимальная активность фермента.

Отмечалось несколько этапов в действии возрастающего количества пиридина и диоксана на хлорофиллазную активность гомогенатов и хлоропластов фасоли и сахарной свеклы — быстрый подъем активности, резкий (особенно у свеклы) спад, область медленного понижения активности и затем вновь быстрое снижение. Ступенчатое снижение хлорофиллазной активности свидетельствует о том, что имеется несколько стадий действия растворителя на пигментно-белковый комплекс, характеризующихся различной активностью хлорофиллазы. Этот вывод соответствует установленным нами ранее стадиям действия растворителей на спектральные свойства хлорофилла в суспензиях хлоропластов [1]. Наибольшая хлорофиллазная активность наблюдается на начальных этапах первой стадии действия растворителя и дезагрегации пигмента, когда, по-видимому, еще не полностью нарушены связи с белковым компонентом; при образовании агрегированных мицелл она несколько пони-

жается, и при переходе хлорофилла в растворенное состояние активность резко падает. В случае ацетона ступенчатость действия проявлялась не столь отчетливо — по достижении максимальной активности и до перехода пигмента в раствор активность была одинаковой.

Наши опыты показали, что количества хлорофиллида в препаратах листьев фасоли, образующихся при добавлении растворителей, слишком малы, чтобы оказывать существенное влияние на спектральные и фотохимические свойства пигментов, изучаемые описанными методами. Следовательно, изменения свойств пигмента при добавлении растворителей к препаратам листьев фасоли следует в основном объяснять изменением свойств хлорофилла.

Высокая хлорофиллазная активность препаратов из листьев свеклы еще более возрастает при действии дезагрегирующих агентов; по изменениям свойств пигмента в этом случае нельзя делать вывод об изменении состояния хлорофилла. Так, мы ранее обнаружили, что положение максимума поглощения и количество выцветающей формы в гомогенатах листьев сахарной свеклы в значительной степени зависят от величины pH среды. На основании результатов данной работы это можно объяснить накоплением в гомогенатах свеклы хлорофиллида, идущего при щелочных pH с большей скоростью, и изменением связей образующегося хлорофиллида с белковым носителем. Ранее мы наблюдали обогащение надосадочной жидкости хлорофиллидом при центрифугировании гомогенатов [4; 5], что, по-видимому, объясняется изменением связей молекул пигмента в белковом комплексе. В работе Шлыка и др. [12] было показано, что при экстракции пигментов из листьев сахарной свеклы 60%-ным ацетоном хлорофиллид легче хлорофилла переходит в водный ацетон.

Полученные в работе данные об изменении спектральных свойств пигментов при добавлении растворителей к гомогенатам и хлоропластам листьев фасоли соответствуют данным, полученным ранее с хлоропластами листьев огурцов, и согласуются с представлениями о нескольких стадиях извлечения пигментов из белковой стромы [1]. На первой стадии при постепенном увеличении концентрации растворителя происходит изменение положения максимума поглощения естественного состояния без перехода хлорофилла в раствор, о чем свидетельствуют низкая флуоресценция и отличия в положении максимума поглощения от истинного раствора. В конце этой стадии наблюдается образование белковых хлопьев, отрыв пигмента от белка и переход во вторичное агрегированное состояние, возможно сопровождающийся вторичной адсорбцией пигмента на белковых структурах. При этом проявляются специфические свойства каждого растворителя и максимум поглощения близок к максимуму поглощения частиц хлорофилла в водных коллоидных растворах данного растворителя. Особенно отчетливо это проявляется при действии диоксана и метанола.

При добавлении к препаратам листьев диоксана до концентрации 30—60% максимум расположен ~690 *ммк*, что соответствует максимуму поглощения пигмента в суспензии частиц, образующихся в коллоидных растворах хлорофилла *а* из диоксана. Было показано, что эти частицы обладают упорядоченной кристаллической структурой [16].

При действии на нативный комплекс хлорофилла метанола наблюдается образование второй известной упорядоченной упаковки молекул хлорофилла *а* с максимумом поглощения при 740 *ммк*. Подобная структура наблюдалась ранее Джакобсом, Ваттером и Холтом [17] и нами [16] при испарении концентрированных растворов хлорофилла *а* из смеси серного и петролейного эфиров в присутствии воды, а позже в работах Агиона [18—20] и Говинджи [21] при добавлении определенных количеств метанола, этанола и ацетона к хлоропластам ряда растений и суспензиям одноклеточных водорослей. Агион [19; 20] приписывает образо-

вание максимума 740 *ммк* вторичной кристаллизации хлорофилла на структурах хлоропластов.

Мы повторили опыты Агиона и обнаружили образование максимума поглощения при 740 *ммк* после добавления к суспензии хлоропластов метанола до концентрации 65% и при нагревании кусочков листьев табака с метанолом. Нагревание кусочков листьев в метаноле сопровождалось переходом большей части пигментов в растворенное состояние; при охлаждении ввиду плохой растворимости хлорофилла в метаноле наблюдалось выпадение пигмента в осадок в виде частичек, обладающих в водной суспензии максимумом поглощения при 740 *ммк*. Содержание хлорофиллида в осадке не превышало 0,6%, и, следовательно, в данном случае структура с максимумом 740 *ммк* образована молекулами хлорофилла.

При нагревании твердого хлорофилла $a+b$ с водным 85%-ным метанолом образовывался весьма концентрированный раствор, после охлаждения которого выпадал осадок частиц, обладающих в водной среде максимумом поглощения в области 705 *ммк*; после длительного стояния во льду наблюдалось образование максимума при 740 *ммк*. Максимумы 690, 705 и 740 *ммк* характеризуют разные типы упаковки молекул пигмента. При вторичной кристаллизации хлорофилла из концентрированных растворов, образующихся при действии растворителей на хлоропласты и гомогенаты листьев, могут образовываться упаковки молекул пигмента, сходные с существующими в гранулах, но при этом утрачиваются или изменяются связи с белковым компонентом.

Следующая стадия действия растворителей характеризуется переходом хлорофилла в растворенное состояние при достижении определенной концентрации растворителя.

Результаты опытов по изменению выцветания пигментов в гомогенатах и хлоропластах листьев фасоли также хорошо согласуются с представлениями о разных стадиях действия растворителей. На первой стадии, ведущей к образованию коллоидного состояния хлорофилла, в опытах с ацетоном и пиридином ускорялась дезагрегация пигмента и наблюдалось увеличение количеств выцветающей формы после 7 мин. освещения гомогенатов листьев фасоли. Однако количество быстровыцветающей формы пигмента, разрушающейся за первые 30 сек. освещения, возрастало на первой стадии мало. При действии пиридина и диоксана на хлоропласты фасоли после некоторого возрастания выцветания наблюдалось даже уменьшение количества выцветающей формы. Можно думать, что при низких концентрациях растворителя происходит «растворение» части молекул пигмента, которое облегчает их разрушение при освещении. При дальнейшем возрастании концентрации растворителя и образовании коллоидных частиц, по-видимому, содержащих в своей структуре молекулы данного растворителя, фотохимические свойства пигмента таковы же, как в коллоидных растворах из данного растворителя. Так, форма 690 *ммк*, образующаяся при действии диоксана, была устойчивой и не разрушалась при освещении.

На первой стадии действия растворителей происходит постепенное изменение структуры пигментно-белкового комплекса, сопровождающееся нарушением координации фотореакций, участвующих в фотосинтезе. Ранее было показано, что фотохимическая активность (реакция Хилла) хлоропластов огурцов не подавляется низкими концентрациями некоторых растворителей [1]. Так, ацетон и спирт до 10% не подавляли фотохимическую активность, при 20% наблюдалось торможение реакции на 10—20%, полное ее подавление происходило при концентрациях растворителей около 30%. В случае диоксана скорость реакции понижалась на 30% при 10%-ной концентрации диоксана и полностью при 20%. Наиболее сильным действием обладал пиридин, который при концентрации 2% полностью подавлял фотохимическую активность. Сравнение этих

величин с данными опытов по изучению спектральных и фотохимических изменений при добавлении растворителей показывает, что полное подавление реакции Хилла происходит непосредственно перед образованием коллоидного состояния пигмента, что близко соответствует максимуму активности хлорофиллазы, т. е. нарушению естественной организации пигментной системы до перехода пигмента в раствор.

ВЫВОДЫ

Добавление растворителей (ацетон, диоксан, пиридин) к гомогенатам и хлоропластам листьев фасоли и сахарной свеклы вызывает активацию хлорофиллазы. Количество образующегося хлорофиллида зависит от вида растения, природы и концентрации растворителя. Дезагрегирующие воздействия (нагревание, детергенты, щелочные среды) также приводят к увеличению хлорофиллазной активности в гомогенатах.

При возрастании количества растворителя в водной среде наблюдаются следующие стадии нарушения естественного состояния хлорофилла: постепенная дезагрегация и нарушение связи с белком, приводящие к вторичному образованию агрегированных форм пигмента с упаковкой молекул, соответствующей коллоидным мицеллам, образующимся при разбавлении водой концентрированных растворов пигмента в данном растворителе; наиболее отчетливо этот эффект наблюдается в случае диоксана. Вторичная агрегация не сопровождается переходом пигмента в раствор, которое наступает лишь при концентрациях растворителя выше 50%.

На начальной стадии действия растворителей наблюдается активация хлорофиллазы, вторичная агрегация ведет к некоторому снижению активности, переход пигмента в раствор сопровождается дальнейшим снижением количеств образующегося хлорофиллида.

В хлоропластах и гомогенатах листьев фасоли содержание хлорофиллида в присутствии растворителей не превышало 2%; следовательно, изменения спектральных и фотохимических свойств пигмента следует приписать изменению состояния хлорофилла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А., Биохимия **18**, 340, 1953
2. Thomas J. B., Flight W. F. G., Biochim. et biophys. acta **79**, 500, 1964
3. Thomas J. B., Van der Wal U. P., Biochim. et biophys. acta **79**, 490, 1964
4. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А., Биохимия **28**, 524, 1963
5. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Физиол. растений 1966 (в печати)
6. Mayer H., Planta **11**, 294, 1930
7. Shimizu S., Tamaki E., Bot. Mag (Tokyo) **75**, 462, 1962
8. Böger P., Phytochemistry **4**, 435, 1965
9. Klein A. O., Vishniac W., J. Biol. Chem. **236**, 2544, 1961
10. Holden M., Biochem. J. **78**, 359, 1961
11. Ardao C., Vennesland B., Plant Physiol. **35**, 368, 1960
12. Шлык А. А., Николаева Г. Н., Власенок Л. И., Годнев Т. Н., Докл. АН БССР **5**, 364, 1961
13. Судьина Е. Г., Укр. ботан. ж. **18**, 3, 1961
14. Годнев Т. Н., Акулович Н. К., Докл. АН СССР **120**, 1307, 1958
15. Власенок Л. И., Шлык А. А., Биохимия **28**, 57, 1963
16. Белавцева Е. М., Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика **4**, 521, 1959
17. Jacobs E. E., Vatter A. E., Holt A. S., J. Chem. Phys. **21**, 2246, 1953
18. Lippincott J., Aghion J., Porcile E., Bertsch W. F., Arch. Biochem. and Biophys. **98**, 17, 1962
19. Aghion J., Biochim. et biophys. acta **66**, 212, 1963
20. Aghion J., Physiol. Veg. **2**, 35, 1964
21. Govindjee, Naturwissenschaften **50**, 720, 1963

Поступила в редакцию
24.VIII 1965

THE EFFECT OF DISAGGREGATING AGENTS UPON THE FORMATION OF CHLOROPHYLLIDE AND THE PROPERTIES OF CHLOROPHYLL IN CHLOROPLASTS AND HOMOGENATES OF GREEN LEAVES

L. M. VOROBIEVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Addition of solvents (acetone, dioxane, pyridine) to homogenates and chloroplasts of bean and sugar-beet leaves results in activation of chlorophyllase. The amount of chlorophyllide formed depends upon the plant species, and on the nature and the concentration of solvents. Disaggregating agents (heating, detergents, alkaline media) lead to an increase of the chlorophyllase activity of homogenates.

The following steps of the disturbance of the natural state of chlorophyll are observed, when concentration of solvent in aqueous solution is increased: gradual disaggregation and cleavage of pigment — protein bonds leading to secondary formation of aggregated pigment forms. This phenomenon is most pronounced with dioxane. Secondary aggregation does not result in dissolution of pigment, the latter occurs only at concentration of sovent higher than 50%.

At the first step, treatment with solvents leads to activation of chlorophyllase, secondary aggregation leads to a decrease of the activity, and the dissolution of pigment results in a further decrease of the amount of chlorophyllide formed. The amount of chlorophyllide in the cloroplasts and homogenates of bean leaves treated with solvents was less than 2%, and the change of spectral and photochemical properties of the pigments are due to the change of the chlorophyll state.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 13, вып. 6 1966 г.

УДК 581.132 : 581.174

ХЛОРОФИЛЛИД В ХЛОРОПЛАСТАХ И ГОМОГЕНАТАХ ЛИСТЬЕВ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Энзиматическое расщепление хлорофилла на хлорофиллид и фитол обнаружили Вильштеттер и Штоль [1]; с тех пор хлорофиллаза исследовалась в ряде работ, но до сих пор не установлено ее строение.

Майер [2] исследовал препараты разных растений (60 видов) и нашел, что хлорофиллазная активность зависит от вида растения. Кроссинг [3], Ардао и Веннесланд [4] нашли, что хлорофиллаза локализуется в хлоропластах. Наибольшая активность фермента наблюдается на первых этапах зеленения этиолированных листьев, и увеличение активности при освещении этиолированных растений идет параллельно процессу накопления хлорофилла [5, 6]. Хлорофиллаза отщепляет фитол, помимо хлорофилла *а* и *в*, от феофитина *а* и *в* [2, 7], бактериохлорофилла и бактериовиридина [7]. Шлык и Николаева нашли, что при растирании листьев сахарной свеклы с 60%-ным ацетоном на холоду (—2°) около 30% хлорофилла переходит в хлорофиллид, при этом хлорофиллаза наиболее легко гидролизует ту часть хлорофилла, которая легче экстрагируется, скорее разрушается при освещении и представлена более «молодыми» молекулами пигмента [8].

В большинстве работ хлорофиллазную активность препаратов наблюдали в среде, содержащей 40—80% органического растворителя — ацетона или спирта [1—10]. Частично очищенные водорастворимые препараты хлорофиллазы после экстракции фермента раствором лиммонокислого натрия [6] и водным *н*-бутанолом [10] были активными в присутствии ацетона. Извлечение хлорофиллазы дезоксихолатом позволило Клейну и Вишняку [7] получить водорастворимый препарат, активный в водной среде в присутствии детергента Тритона Х-100. В нашей лаборатории было обнаружено, что хлорофиллаза некоторых растений (сахарной свеклы, лебеды) активируется при растирании листьев в водной среде и при комнатной температуре в водных гомогенатах накапливаются значительные количества хлорофиллида [11].

В разнообразных исследованиях ведется работа с изолированными хлоропластами и гомогенатами листьев, при этом в большинстве работ не учитывается возможность образования хлорофиллида в этих препаратах. Следовало выяснить, как влияет процедура получения и хранения хлоропластов и гомогенатов на соотношение хлорофилла и хлорофиллида. Хлорофиллид всегда присутствует в зеленых листьях [12], поэтому для суждения о том, насколько возрастает количество хлорофиллида при нарушении структуры листа, мы определяли содержание хлорофиллида в листьях различных растений и исследовали его накопление в хлоропластах и гомогенатах.

МЕТОДИКА

В работе использовали растения с низкой (фасоль) и с высокой (сахарная свекла, лебеда, тополь) активностью хлорофиллазы. Бо́льшая часть работы проводилась с листьями фасоли сорта Сакса, сахарной свеклы сорта Верхнячка, шпината сорта Северный, лебеды Chenopodium album и тополя. Фасоль росла 1—2 недели после прорастания семян. «Молодые» растения сахарной свеклы выращивали в оранжерее 2—4 недели после прорастания семян, «старые» — 2—4 месяца в оранжерее или в полевых условиях. «Молодые» растения шпината росли в оранжерее около недели после прорастания семян, «старые»— более месяца в полевых условиях (стадия начала цветения). Для опытов использовали молодые листья тополя (около двух недель после разворачивания).

чивания листьев из почек). Для получения «этиолированных» листьев тополя ветки с набухшими почками ставили в темноту при 26°.

Хлоропласты выделяли из листьев в затемненной комнате при 2° в условиях, близких к описанным Арноном [13]. Для этого навеску листьев (15 *г*) быстро растирали в ступке с 20 *мл* раствора хлористого натрия 0,5 *М* в случае свеклы и 0,35 *М* для других растений. Кашицу отжимали через полотно и центрифугировали 2 мин. (~200 *g*). Осадок удаляли, надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин. (1000 *g*). Осадок суспендировали в 20 *мл* раствора хлористого натрия, центрифугировали 15 мин. при ~1000 *g*. Полученные хлоропласты суспендировали в растворе хлористого натрия. Микроскопический контроль образцов, полученных описанным способом, показал, что препараты в главной массе состоят из хлоропластов.

Гомогенаты листьев готовили при 2° и при комнатной температуре. Листья (8—10 *г*) растирали в ступке с 1/15 *М* Na_2HPO_4 (30 *мл*), отжимали через полотно и центрифугировали 15 мин. при 2000 *g*. Для работы использовали надосадочную жидкость.

Для опытов по влиянию скоростного центрифугирования на соотношение пигментных форм использовали гомогенаты листьев, приготовленные при комнатной температуре и простоявшие в этих условиях 2 часа для накопления хлорофиллида. Гомогенат охлаждали до 0° и часть его центрифугировали при 20 000 *g* (2°), Гомогенат, стоявший это же время при 2°, служил контролем.

Ранее было показано, что растирание листьев сахарной свеклы с ацетоном даже при —2° [8] приводит к образованию хлорофиллида и для получения данных о действительном соотношении пигментов листья необходимо фиксировать жидким азотом с последующим извлечением ацетоном, охлажденным до —76°.

Листья (0,2—0,3 *г*) 15 мин. растирали в ступке с 80%-ным или безводным ацетоном (10 *мл*) в присутствии $CaCo_3$ и фильтровали через стеклянный фильтр. Ацетон применяли безводный фирмы «Reanal». В том случае, когда извлечение вели безводным ацетоном, к полученному экстракту доливали 20% (по объему) воды. К раствору добавляли 0,02 *М* NH_4OH (1 *мл*) на 10 *мл* водного ацетона [12].

В согласии с предыдущими работами [11, 12] наименьшее количество хлорофиллида получено при фиксации жидким азотом (табл. 1).

Таблица 1

Содержание хлорофиллида в листьях в зависимости от условий экстракции безводным ацетоном

Способ фиксации листьев	Температура при экстракции, °С	% хлорофиллида
Сахарная свекла		
Кипячение 1 мин.	20	0,50
Без фиксации	20	3,70
Без фиксации	2	0,30
Жидкий азот	—76	0,25
Лебеда (Chenopodium album)		
Кипячение 1 мин.	20	0,66
Без фиксации	2	0,36
Жидкий азот	—76	0,32
Тополь		
Кипячение 1 мин.	20	0,72
Без фиксации *	2	19,00 *
Без фиксации	2	4,00
Жидкий азот	—76	0,50
Зеленые бактерии (Chlorobium ethylicum)		
Без фиксации	—76	1,00
Фасоль		
Без фиксации	20	0,02

* В опыте использовали 80%-ный ацетон.

Для извлечения пигментов из хлоропластов и гомогенатов к 2 *мл* препарата добавляли 8 *мл* ацетона. Образующийся осадок удаляли центрифугированием при 3 000 *g* в течение 5—10 мин. при 2°. В отдельных опытах было показано, что применение ацетона, охлажденного до —76°, не уменьшает количеств хлорофиллида, обнару-

живаемых в гомогенатах. К водно-ацеоновому раствору пигментов добавляли 0,02 *М* NH_4OH (1 *мл* на 10 *мл* раствора).

Количество хлорофиллида в листьях и их препаратах определяли по методу Веег и Маккини [14], в основу которого положена способность хлорофилла переходить из водного ацетона в легкий петролейный эфир, в то время как хлорофиллид остается в водно-ацетоновом слое. Для удаления хлорофилла и разделения пигментов растворы в 80%-ном ацетоне помещали в делительную воронку, добавляли 0,1—0,2 *мл* насыщенного раствора хлористого натрия и 5—8 раз взбалтывали с легким петролейным эфиром (т. кип. до 60°). После каждого взбалтывания к смеси доливали ацетон так, чтобы объем водного ацетона оставался примерно одинаковым. Измеряли спектр поглощения растворов в водном ацетоне до и после обработки петролейным эфиром на спектрофотометре СФ-5 в области 650—700 *ммк*. Мерой количества пигментов принимали разность оптической плотности ΔD в красном максимуме поглощения и при 700 *ммк*. По ΔD пигментов в ацетоновом растворе до и после обработки петролейным эфиром (с учетом изменения объема) судили о количестве хлорофиллида. Содержание хлорофиллида выражали в процентах к сумме хлорофилла и хлорофиллида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Содержание хлорофиллида в зеленых листьях при фиксации жидким азотом невелико — 0,02% — в листьях фасоли, 0,3—0,5% в листьях свеклы, лебеды, тополя (табл. 1). Эти результаты соответствуют данным, полученным ранее [11, 12].

Количество хлорофиллида в листьях, помимо вида растения, зависит от стадии развития. На первых этапах зеленения этиолированных листьев фасоли [11] и тополя (табл. 2) были обнаружены значительные количества хлорофиллида (большое количество хлорофилла в этиолированных листьях тополя объясняется тем, что в нераспустившихся почках уже был и хлорофилл и хлорофиллид). При зеленении этиолированных проростков фасоли наблюдается быстрое падение содержания хлорофиллида [11], в листьях тополя после 3-х суток зеленения обнаружено до 6% хлорофиллида. Трудно полагать, что большие количества хлорофиллида, обнаруживаемые в листьях тополя в первые сутки зеленения, определяются неполным подавлением активности хлорофиллазы в применяемых жестких условиях фиксации.

Таблица 2

Содержание хлорофиллида в листьях тополя в зависимости от возраста

Объект	Способ фиксации листьев	Температура при экстракции	Растворитель	% хлорофиллида
Этиолир» листья	Жидкий азот	—76	Безводный ацетон	18,0
1 часов зеленения	Жидкий азот	—76	То же	35,0
3 суток зеленения	Без фиксации	2	80%-ный ацетон	39,0
3 » »	Жидкий азот	—76	Безводный ацетон	6,0
9 » »	Жидкий азот	—76	То же	0,5

Бесфитольные формы пигментов, по-видимому, присутствуют не только в листьях высших растений, но во всех фотосинтезирующих организмах. В хлорелле было обнаружено наличие хлорофиллида [15]. Нам не удалось экстрагировать пигменты из хлореллы полностью, извлеченная часть пигментов содержала около 2% хлорофиллида. Около 1% бесфитольного пигмента обнаружено в зеленых фотосинтезирующих бактериях Chlorobium ethylicum.

При растирании листьев растений, содержащих активную хлорофиллазу, при комнатной температуре обнаруживаются большие количества хлорофиллида. По мере стояния гомогенатов при комнатной температуре наблюдается дальнейшее увеличение содержания этого пигмента. Мы наблюдали ранее это явление в гомогенатах листьев сахарной свеклы и лебеды [11], в данной работе образование и накопление хлорофиллида обнаружено также в препаратах листьев тополя и шпината (табл. 3, рис. 2).

Таблица 3

Хлорофиллид в хлоропластах и гомогенатах листьев

Объект	Вариант	Возраст растений	% хлорофиллида в препарате, получен. при 2°	Стояние при 20° (часы)	% хлорофиллида после стояния
Фасоль хлоропласты *	1	Молодые	0,16	1	0,31
	2	То же	0,20	1	0,20
Гомогенат	1	» »	0,17	1	0,16
	2	» »	0,20	1	0,34
	3	» »	0,50	1	0,50
Сахарная свекла хлоропласты *	1	Старые	1,00	1	1,50
	2	То же	1,40	1	3,63
	3	» »	1,50	1	5,00
	4	Молодые	4,50	1	9,40
Гомогенат	1	Старые	5,10	1	13,50
	2	То же	5,37	1	15,20
	3	Молодые	14,50	1	29,00
	4	»	11,10	1	34,30
Шпинат Хлоропласты *	1	Старые	0,27	4	1,00
	2	Молодые	0,20	7	2,80
Гомогенат	1	Старые	0,56	4	2,10
	2	Молодые	2,90	4	21,00

* Среда для опытов с хлоропластами: фасоль — 1 *мл* 0,35 *М* NaCl, 9 *мл* 1/15 *М* NaHPO; сахарная свекла — 1 *мл* 0,5 *М* NaCl, 9 *мл* 1/15 *М* Na_2HPO_4; шпинат — 0,35 *М* NaCl.

Низкая температура тормозит активность фермента, однако следует подчеркнуть, что в гомогенатах и хлоропластах, полученных при 2°, содержится хлорофиллида больше, чем в листьях (табл. 3). Количество хлорофиллида в препартах было бóльшим по сравнению с листьями у всех исследованных растений, в том числе и у фасоли, бедной хлорофиллазой. По-видимому, в хлоропластах содержится форма хлорофилла, особенно легко подвергающаяся хлорофиллазному гидролизу и переходящая в хлорофиллид при нарушении структуры листа даже при низкой температуре. Эти данные соответствуют заключению, полученному в работе Шлыка и Николаевой [8]. Можно предполагать, что в листьях фасоли только эта часть пигмента доступна действию хлорофиллазы, так как в хлоропластах и гомогенатах (полученных при комнатной температуре и при 2°) обнаруживаются близкие количества хлорофиллида и не наблюдается накопления хлорофиллида при нагревании образцов (полученных при 2°) до комнатной температуры.

Наши опыты показали, что хранение препаратов растений, богатых хлорофиллазой, во льду тормозит действие фермента, тогда как при нагревании их до комнатной температуры происходит накопление хлорофиллида (табл. 3, рис. 1, 2).

Величина хлорофиллазной активности препаратов зависела от степени нарушения клеточной структуры. Хлоропласты содержали меньше хлорофиллида, и скорость его накопления была ниже, чем в гомогенатах (рис. 1, 2). Полного превращения всего хлорофилла в хлорофиллид в гомогенатах и хлоропластах не происходило. В хлоропластах сахарной свеклы накапливалось до 18% хлорофиллида, в гомогенатах сахарной свеклы, лебеды и тополя — 50—80%.

Хлорофиллазная активность гомогенатов и хлоропластов зависела от возраста растения. У молодых растений скорость накопления хлорофиллида была более высокой, чем у старых. Это наблюдалось в опытах с препаратами сахарной свеклы и особенно заметно было при работе со шпинатом (табл. 3). Очевидно, в листьях старых растений наруше-

ния белкового комплекса, в результате которых становится возможным контакт хлорофиллазы и хлорофилла, затруднены и происходят медленнее. В листе хлорофиллаза, по-видимому, пространственно удалена от главной массы хлорофилла, так как для ее активации необходимо добавление растворителей или набухание в водной среде.

Мы наблюдали, что скоростное центрифугирование гомогенатов листьев сахарной свеклы приводит к обогащению надосадочной жидкости хлорофиллидом ([11], табл. 4). Частичное фракционирование пиг-

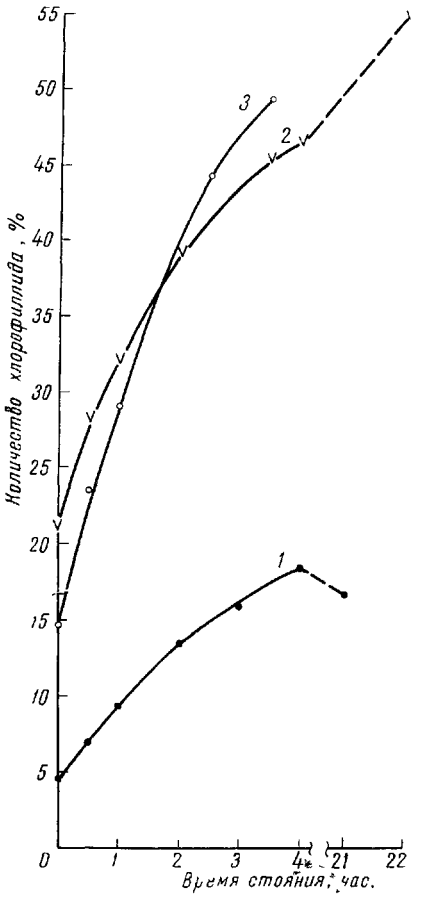


Рис. 1. Накопление хлорофиллида в хлоропластах и гомогенатах молодых листьев сахарной свеклы при 20°

1 — хлоропласты, выделенные при 2°; *2* — гомогенат, полученный при 20°; *3* — гомогенат, полученный при 2°

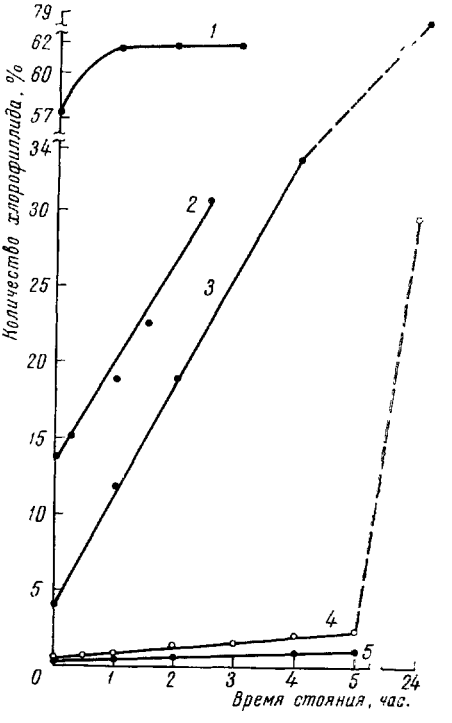


Рис. 2. Накопление хлорофиллида в гомогенатах и хлоропластах при 20°

1 — гомогенат листьев тополя, полученный при 20°, *2* — гомогенат листьев тополя, полученный при 2°; *3* — гомогенат листьев лебеды, полученный при 2°; *4* — гомогенат «старых» листьев шпината, полученный при 20°, *5* — хлоропласты «старых» листьев шпината, выделенные при 2°

ментов происходит уже в процессе приготовления хлоропластов и гомогенатов и при центрифугировании при невысоких скоростях. При получении гомогенатов происходит обогащение гомогената (надосадочной жидкости) хлорофиллидом. При выделении хлоропластов бóльшая часть образующегося хлорофиллида остается в надосадочной жидкости (табл. 4).

Некоторое обогащение хлорофиллидом надосадочной жидкости наблюдалось при скоростном центрифугировании гомогенатов листьев фасоли (табл. 4), однако и после часа центрифугирования при 20 000 *g* содержание хлорофиллида в гомогенате фасоли оставалось низким.

Обогащение надосадочной жидкости хлорофиллидом, по-видимому, связано с изменением связей пигмента в белковом комплексе в результате удаления фитола. Об этом же свидетельствует перемещение мак-

Таблица 4

Обогащение надосадочной жидкости хлорофиллидом при центрифугировании

Образец	% хлорофиллида	Образец	% хлорофиллида
Гомогенат листьев фасоли без центрифугирования.	0,51	Гомогенат листьев сахарной свеклы без центрифугирования	26,00
После 30 мин. центрифугирования при 20 000 *g*	0,83	После 30 мин. центрифугирования при 20 000 *g*	46,00
Гомогенат листьев фасоли без центрифугирования	0,70	Первый осадок хлоропластов листьев сахарной свеклы	1,60
После 60 мин. центрифугирования при 20 000 *g*	1,50	Надосадочная жидкость после первого осаждения хлоропластов	5,00

симума поглощения на 2—6 *ммк* в коротковолновую сторону у пигмента, не оседающего при скоростном центрифугировании, наблюдавшееся нами ранее [16]. В гомогенатах листьев сахарной свеклы максимум сдвигался от 678—676 *ммк* до 674—672 *ммк*, в гомогенатах листьев фасоли — от 680 до 678 *ммк*. В гомогенатах листьев свеклы бóльшая часть коротковолновой формы пигмента в надосадочной жидкости после скоростного центрифугирования представляет собой соединение хлорофиллида. Гомогенаты листьев фасоли содержат слишком мало хлорофиллида, и его присутствие не может оказывать заметного влияния на положение максимума поглощения; следует полагать поэтому, что при скоростном центрифугировании гомогенатов листьев фасоли мы имеем дело с фракционированием различных форм хлорофилла.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе получены данные, свидетельствующие о том, что при получении хлоропластов и гомогенатов вышеописанными методами на холоду (2°) нельзя полностью исключить образование хлорофиллида. У фасоли, в листьях которой хлорофиллаза малоактивна, образование хлорофиллида в большинстве опытов не превышало 0,5% от суммы пигментов. В препаратах листьев растений, обладающих активной хлорофиллазой (сахарная свекла, тополь, лебеда, шпинат) присутствуют значительные количества хлорофиллида, при повышении температуры до комнатной накопление хлорофиллида достигало 20—80%.

Тот факт, что нарушение структуры листьев приводит к активации хлорофиллазы, ставит особые требования для проведения работ с хлоропластами и гомогенатами. Необходимо контролировать хлорофиллазную активность при получении препаратов и во время опытов и по возможности сводить ее к минимуму — избегать даже кратковременного повышения температуры и работать с ненарушенными хлоропластами. Следует подчеркнуть, что работа с препаратами листьев, содержащих активную хлорофиллазу, исключает проведение длительных опытов при комнатной температуре вследствие перехода части хлорофилла в хлорофиллид.

Особенно много ошибок может возникнуть при препаративном получении разного рода хлорофилл-белковых комплексов, процедура приготовления которых предусматривает фракционное центрифугирование, приводящее в случае растений, обладающих активной хлорофиллазой,

к значительному обогащению надосадочной жидкости хлорофиллидом. В определенных условиях с помощью центрифугирования можно получить препарат, практически полностью лишенный хлорофилла.

Так Якушиджи и др. [17] описали получение из листьев Chenopodium водорастворимого хлорофилл-белкового комплекса, обладающего максимумом поглощения при 667 *ммк* и чувствительного к освещению. Для получения комплекса листья растирали с раствором Na_2HPO_4 и полученный материал подвергали длительной обработке, включающей фракционное центрифугирование, многократное осаждение сульфатом аммония, длительный диализ. Указанные операции авторы производили в условиях, благоприятствующих накоплению хлорофиллида. Авторы не знали о найденной нами высокой хлорофиллазной активности препаратов из листьев лебеды [11]. Вероятно, в описанной работе выделен не естественный хлорофилл-белковый комплекс, а соединение хлорофиллида, нативность связи которого с белком может подвергаться сомнению.

Недавно появилось сообщение Кана [18] о получении водорастворимого хлорофилл-белкового комплекса из листьев шпината с использованием в качестве среды для обработки хлоропластов детергента Тритона X-100, примененного ранее [7] для обнаружения хлорофиллазной активности изолированных пигментов в водной среде в присутствии препарата хлорофиллазы. Длительная обработка в присутствии детергента и указание автора на то, что для опытов использовали надосадочную жидкость после скоростного центрифугирования (190 000 *g*), содержащую бо́льшую часть пигмента, позволяет предполагать, что хлорофилл-белковый комплекс, описанный в работе [18], в действительности может быть соединением хлорофиллида.

Сомнения в нативности пигментных форм вызывают также препараты, полученные Аллен с сотр. из Chlorella pyrenoidosa [19, 20] и Броди и Левиным из озвученных хлоропластов и других объектов [21]. Пигментный комплекс Аллен с максимумом поглощения 672 *ммк* выделяется из надосадочной жидкости суспензии клеток хлореллы, обработанных ультразвуком, после часа центрифугирования при 144 000 *g* и составляет 1—1,5% общего количества хлорофилла клеток. На приведенной в работе [19] хроматограмме пигментов на бумаге хорошо видно раздвоение пятен хлорофилла *a* и *b* в препарате после обработки ультразвуком. Можно думать, что это происходит за счет образования из части хлорофилла хлорофиллида. На хроматограмме комплекса с максимумом поглощения 672 *ммк* наблюдаются единичные пятна, которые можно приписать хлорофиллиду после удаления хлорофилла в результате «очистки» комплекса.

ВЫВОДЫ

1. В гомогенатах и хлоропластах листьев, полученных при 2°, наблюдается увеличение содержания хлорофиллида, по сравнению с исходными листьями, за счет действия хлорофиллазы. В гомогенатах и хлоропластах сахарной свеклы, лебеды, тополя и шпината, полученных при 2°, при комнатной температуре происходит накопление хлорофиллида, достигающее 20—80% от общего количества пигментов. В гомогенатах и хлоропластах листьев фасоли обнаруживаются близкие количества хлорофиллида (0,2—0,5%), стояние при комнатной температуре не приводит к дальнейшему накоплению пигмента.

2. Хлорофиллазная активность препаратов листьев зависит от вида и возраста растения и степени нарушения структуры листа. В препаратах листьев «молодых» растений активность выше, чем в препаратах «старых» растений. Нарушение структуры хлоропластов благоприятствует образованию хлорофиллида.

3. Центрифугирование гомогенатов и хлоропластов приводит к обогащению надосадочной жидкости хлорофиллидом, величина которого

зависит от вида растения, скорости и длительности центрифугирования.

4. При исследовании фотобиологических свойств хлоропластов и гомогенатов и в особенности при фракционировании пигментно-белковых комплексов из листьев следует учитывать и контролировать наличие хлорофиллида и его образование в течение эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Willstätter R., Stoll A., Untersuchungen über Chlorophyll, Springer — Verlag, 1913.
2. Mayer H. Planta, **11**, 294, 1930.
3. Krossing G., Biochem. Z, **305**, 359, 1940.
4. Ardao C., Vennesland B. Plant. Physiol., **35**, 368, 1960.
5. Судьина Е. Г. Проблемы фотосинтеза, Изд-во АН СССР, 1959.
6. Holden M. Biochem. J., **78**, 359, 1961.
7. Klein A. O., Vishnias W. J. Biol. Chem., **236**, 2544, 1961.
8. Шлык А. А., Николаева Г. Н. Докл. АН СССР, **143**, 460, 1962.
9. Шлык А. А., Николаева Г. Н., Власенок Л. И., Годнев Т. Н. Докл. АН БССР, **5**, 364, 1961.
10. Shimizu S., Tamaki E. Bot. Mag. (Tokyo), **75**, 462, 1962.
11. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А. Биохимия, **28**, 524, 1963.
12. Власенок Л. И., Шлык А. А. Биохимия, **28**, 57, 1963.
13. Arnon D. I, Allen M. B., Whatley F. R. Biochem. et biophys. acta, **20**, 449, 1956.
14. Weast C. A., Mackinney G. J. Biol. Chem., **133**, 551, 1940.
15. Michel-Wolwertz M. R., Sironval S. Biochem. et biophys. acta, **94**, 330, 1965.
16. Красновский А. А., Воробьева Л. М., Пакшина Е. В. Физиол. растений, **4**, 124, 1957.
17. Yakushiji E., Uchino K., Sugimura Y., Shiratori I., Takamija F. Biochem. et biophys. acta, **75**, 293, 1963.
18. Kahn J. S. Biochem. et biophys. acta, **79**, 234, 1964.
19. Allen M. B., Murchio J. C., Jaffrey S. W., Bendix S. A. Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. The Tokyo Univ. Press., 1963.
20. Allen M. B., Murchio J. C. Photosynthesis Mechanisms in Green Plants, NAS, 1963.
21. Brody S. S., Brody M., Levine J. H. Biochem. et biophys. acta, **94**, 310, 1965.

Поступила в редакцию
9.VIII.1965

CHLOROPHYLLIDE IN LEAF HOMOGENATES AND CHLOROPLASTS

L. M. VOROBYOVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The chlorophyllide content was measured in bean, sugar beet, goose-foot, poplar and spinach leaves, chloroplasts and leaf homogenates. The amount of chlorophyllide in leaf homogenates and chloroplasts obtained at 2° was found to be higher than that in the initial leaves due to the effect of chlorophyllase. In sugar beet, goose-foot, poplar and spinach leaf homogenates and chloroplasts obtained at 2° chlorophyllide was found to accumulate at room temperature and to comprise from 20 to 80% of the total amount of pigments. No such accumulation was observed in bean leaf homogenates and chloroplasts, the amount at room temperature remaining the same as that at 2° (0.2—0.5%). The chlorphyllase activty of the leaf preparations depended on the species and age of the plants and on the degree of destruction of the leaf structure. The activity of «young» plant leaf preparations was higher than that of «old» leaf preparations. Destruction of the chloroplast promoted the formation of chlorophyllide. The supernatant produced by centrifuging the homogenates and chloroplasts was enriched with chlorophyllide; the degree of enrichment depended on the plant species and on the rate and duration of centrifugation. In photobiochemical studies of chloroplasts and homogenates, especially those involving fractionation of the pigment-protien complexes of leaves, the presence of chlorophyl lide and its formation during the experiment should be controlled and taken into account.

Том XXIV | Труды Московского общества испытателей природы | 1966
Vol. XXIV | Transactions of the Moscow Society of Naturalists

УЧАСТИЕ РАЗНЫХ ФОРМ БАКТЕРИОВИРИДИНА И БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В ФОТОСИНТЕЗЕ БАКТЕРИЙ И МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ МЕЖДУ ФОРМАМИ ЭТИХ ПИГМЕНТОВ

Ю. Е. Ерохин и А. А. Красновский

Изучение свойств и состояния пигментов в клетках фотосинтезирующих организмов, базирующееся на использовании современных чувствительных, главным образом спектральных методов, показало, что основные пигменты находятся в нескольких разных формах. В настоящее время исследования направлены на выяснение природы этих форм, особенностей состояния в них молекул пигментов, а также на изучение участия и роли отдельных форм пигментов в процессах фотосинтеза. С 1952 г. в нашей лаборатории проводится систематическое изучение спектральных свойств хлорофиллов в живых фотосинтезирующих организмах, а также в модельных системах с различными типами упаковок молекул пигментов (Красновский и др., 1952, 1959, 1962; Ерохин и Красновский, 1963). Эти исследования позволили высказать и обосновать ряд положений относительно особенностей нативного состояния пигментов фотосинтезирующих бактерий и природы отдельных их форм.

Данная работа была проведена с целью выяснения, какие формы пигментов бактерий принимают непосредственное участие в фотосинтезе. Одним из подходов к решению этой задачи могло быть изучение спектров действия фотосинтеза бактерий. Работ по спектрам действия бактериального фотосинтеза очень мало (French, 1937; Larsen, 1953; Takamutsu a. Morita, 1958). Кроме того, отсутствие детальных измерений в области, где поглощают разные формы бактериальных хлорофиллов, не позволяло составить достаточно четких представлений об участии и роли отдельных форм в фотосинтезе бактерий. Поэтому в данной работе особое внимание уделялось получению данных по спектрам действия в красной и инфракрасной областях спектра, т. е. областях поглощения основных форм хлорофиллов бактерий.

Однако представления об участии разных форм пигментов в фотосинтезе и интерпретация результатов по спектрам действия требуют учета возможности миграции энергии между отдельными формами и разными пигментами бактерий. Это обусловило необходимость изучить передачу энергии возбуждения между разными формами и пигментами непосредственно в клетках бактерий. Расчеты Дейзенса (Duysens, 1952) указывали, что в клетках пурпурных бактерий эффективность миграции энергии между разными формами бактериохлорофилла

(БХЛ-800; БХЛ-850; БХЛ-890) достигает 100%, тогда как от каротиноидов на бактериохлорофилл передается не более 35—40% поглощенной ими энергии. Вопрос о миграции энергии в пигментной системе зеленых бактерий только начал изучаться, так как вообще к изучению пигментной системы этих организмов приступили сравнительно недавно. Сибесма и Олсон (Sybesma a. Olson, 1963) установили, что эффективность передачи энергии между формами пигментов у зеленых бактерий довольно низка. По мнению авторов, конечным акцептором энергии у этих организмов является форма, поглощающая в длинноволновой области спектра. Выделив пигмент, обусловливающий поглощение в этой области, они установили, что по спектральным свойствам он сходен с бактериохлорофиллом пурпурных бактерий. Это обстоятельство заставляет с осторожностью относиться к той роли, которая приписывается данной форме.

МЕТОДИКА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Работа проводилась с чистыми культурами пурпурных и зеленых бактерий *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium*, *Chlorobium thiosulfatophilum* и *Chloropseudomonas ethylicum*, выращенных и любезно предоставленных нам Е. Н. Кондратьевой (кафедра микробиологии МГУ).

Спектры люминесценции и спектры возбуждения люминесценции разных форм пигментов бактерий измеряли на записывающем спектрофлуорометре, описанном ранее (Ерохин и Красновский, 1963). В случае измерений спектров возбуждения люминесценции для выделения монохроматических участков спектра возбуждающего света использовали дополнительный монохроматор с автоматическим поворотом призм от мотора. Энергию возбуждающего света в различных участках спектра измеряли с помощью термостолбика; при построении спектров учитывалось число квантов в каждом отдельном участке спектра. Довольно хорошее совпадение спектров возбуждения люминесценции и спектров поглощения для чистых пигментов подтвердило правильность проведенных расчетов и поправок, а также допустимость выбранных условий измерений.

Об участии разных форм пигментов бактерий в фотосинтезе судили по спектрам действия роста бактерий в тех участках спектра, где поглощают эти формы. Как известно, фотосинтезирующие бактерии при интенсивном развитии почти не накапливают запасных веществ и вся утилизованная ими энергия света идет в конечном счете на рост клеток, накопление биомассы культуры. Для пурпурных бактерий была прямо показана пропорциональность между потреблением CO_2 и накоплением биомассы (Шапошников и др., 1961). На основании этих фактов критерием оценки интенсивности фотосинтеза был выбран прирост клеток в различных участках спектра.

Бактерии равномерно засевали на твердые среды с оптически прозрачным агаром в специальные плоскопараллельные кюветы из органического стекла. Эти кюветы помещали в кассеты вместо фотопластинок, закрепляли на камере спектрографа и экспонировали на сплошном спектре от лампы накаливания (рис. 1). Очевидно, скорость развития и прирост клеток бактерий в разных участках спектра в этом случае будут функцией поглощения фотоактивных пигментов, их активности в процессах фотосинтеза и распределения энергии в спектре, от-

брасываемом на кювету с бактериями. Как и в случае измерений спектров возбуждения люминесценции, была проведена оценка энергии в отдельных монохроматических участках спектра. При построении кривых спектров действия роста разные участки спектра были уравнены по числу падающих квантов, что давало возможность, зная поглощение разных форм пигментов, судить об активности каждой из них в отдельности. После 48—72 *час* экспозиции на спектрографе в кюветах обычно наблюдался прирост клеток бактерий в виде довольно четких полос в тех участках спектра, где поглощают их основные пигменты. Прирост клеток в различных участках спектра оценивался по пропусканию при фотометрировании таких кювет с бактериями на регистрирующем микрофотометре.

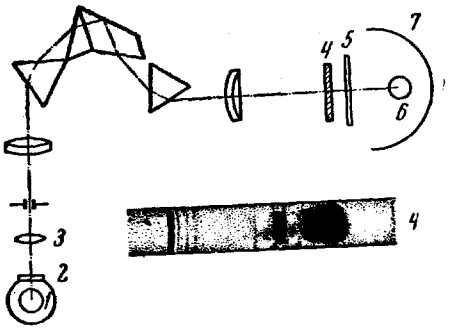


Рис. 1. Схема установки для выращивания фотосинтезирующих бактерий в монохроматических областях спектра:
1 — лампа накаливания; *2* — корректирующие светофильтры; *3* — линза; *4* — кювета с бактериями; *5* — светофильтр для дополнительной подсветки; *6* — лампа подсветки; *7* — рефлектор

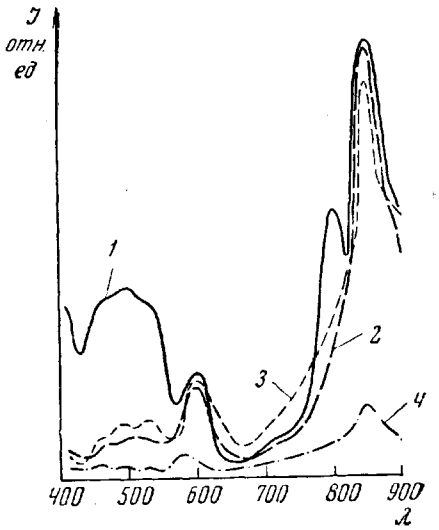


Рис. 2. Спектры поглощения и возбуждения люминесценции бактериохлорофилла в клетках некоторых пурпурных бактерий:
1 — спектр поглощения *Chromatium* sp.; *2—4* — спектры возбуждения *Rhodospirillum rubrum (2), Chromatium* sp. *(3)* и *Rhodopseudomonas palustris (4)*

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спектрах люминесценции пурпурных бактерий наблюдается только одна полоса с максимумом при 900—920 *ммк* (Duysens, 1952; Brody a. Linschitz, 1961; Красновский и др., 1962; Ерохин и Красновский, 1963), которая обычно относится к наиболее длинноволновой форме бактериохлорофилла (БХЛ-890). Дейзенс (1952) показал, что интенсивность этой люминесценции приблизительно пропорциональна общему поглощению всех трех форм бактериохлорофилла в клетках бактерий. На основании этого факта и было высказано предположение о том, что в пигментной системе пурпурных бактерий имеет место высокоэффективная передача энергии между отдельными формами бактериохлорофилла. Наши измерения показали, что вид спектров люминесценции пурпурных бактерий не изменяется при возбуждении разными участками спектра. Это подтверждает предположение о существовании только одного типа излучателей, т. е. одной флуоресцирующей формы, и, следовательно, допускает возможность эффективной миграции энергии с других форм и пигментов. На рис. 2 представлены спектры поглощения и спектры возбуждения люминесценции разных видов пурпурных бак-

терий. Измерениями спектров возбуждения было установлено, что действительно люминесценция при 900—920 *ммк* эффективно возбуждается как БХЛ-890, так БХЛ-850 и БХЛ-800.

Небольшие полосы около 460, 490—500 и 550—560 *ммк* в спектрах возбуждения люминесценции пурпурных бактерий, вероятно, принадлежат каротиноидам, передача энергии с которых осуществляется с довольно низкой эффективностью (25—30%), что согласуется с данными Дейзенса (1952).

У зеленых бактерий, по нашим измерениям, наблюдаются три полосы люминесценции (Красновский и др., 1959, 1962; Ерохин и Красновский, 1963). Вид спектров люминесценции и соотношение интенсивностей в этих трех максимумах люминесценции существенно изменялись при возбуждении разными участками спектра (рис. 3). Это ука-

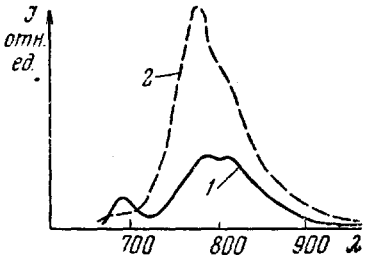


Рис. 3. Спектры люминесценции *Chlorobium thiosulfatophilum:*
1 — при возбуждении монохроматическим светом, равным 430 *ммк;*
2 — то же, равным 460 *ммк*

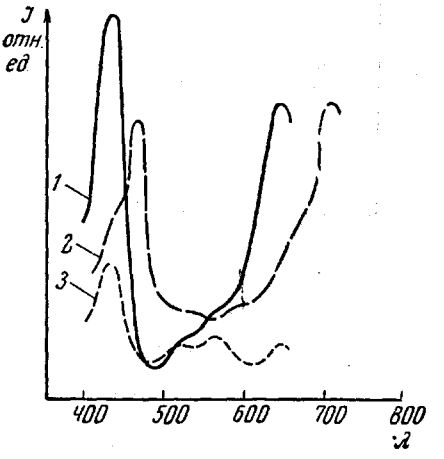


Рис. 4. Спектры возбуждения люминесценции разных форм бактериовиридина у зеленых бактерий *Chlorobium thiosulfatophilum:*
1 — при 680 *ммк; 2* — при 780 *ммк;*
3 — при 680 *ммк* после добавления к суспензии бактерий этанола

зывает на существование нескольких независимых излучающих типов молекул пигментов. Существование трех полос люминесценции, которые можно приписать трем формам бактериовиридина, а также отмеченные выше изменения в виде спектров люминесценции зеленых бактерий при разном возбуждении — все это говорило против возможности эффективной передачи энергии между разными формами бактериовиридина в клетках.

Измерения спектров возбуждения люминесценции отдельных форм бактериовиридина в бактериях показали, что наибольшие различия обнаруживаются между возбуждением коротковолновой люминесценции 680 *ммк* и возбуждением длинноволновых полос при 780 и 805—820 *ммк* (рис. 4). Следовательно, передача энергии между этими формами мало вероятна. Спектры возбуждения двух длинноволновых полос различались незначительно (рис. 5), возможно, это связано с частичной миграцией энергии от первой формы ко второй. По оценке Сибесма и Олсона (1963), эффективность передачи энергии с формы, поглощающей при 750 *ммк*, на форму, поглощающую около 800 *ммк*, составляет приблизительно 33%.

Таким образом, измерения спектров возбуждения люминесценции зеленых бактерий показали, что между длинноволновыми (агрегированными) формами их пигментов наблюдается миграция энергии,

тогда как более коротковолновые формы (менее агрегированные или, возможно, мономерные) энергетически не сопряжены с ними.

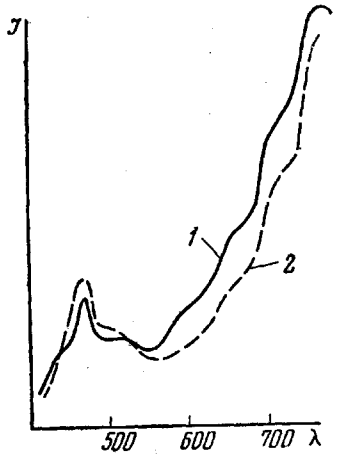


Рис. 5. Спектры возбуждения люминесценции разных форм бактериовиридина у зеленых бактерий *Chloropseudomonas ethylicum:*
1 — при 808 *ммк;* *2* — при 780 *ммк*

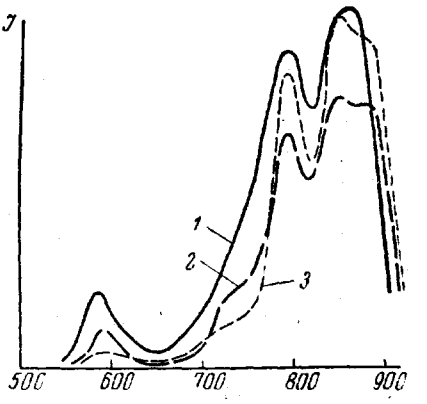


Рис. 6. Спектры действия роста пурпурных бактерий *1 — Rhodospirillum rubrum; 2 — Chromafium; 3 — Rhodopseudomonas palustris*

Результаты по спектрам действия фотосинтеза (на основании данных по приросту клеток в разных участках спектра), представленные на рис. 6 и 7, показывают, что у пурпурных бактерий в процесс фотосинтеза вовлекаются все три формы бактериохлорофилла. Раньше всего заметный прирост клеток наблюдается в инфракрасной области спектра, где обнаруживаются три четкие полосы, соответствующие наиболее интенсивным полосам поглощения бактериохлорофилла в клетках. Затем проявляется полоса роста около 590—600 *ммк*; мало заметная в начале развития; которая, очевидно, обусловлена общим поглощением всех трех форм бактериохлорофилла. Заметного роста в области поглощения каротиноидов при обычных экспозициях не отмечалось. Слабый прирост без каких-либо характерных максимумов можно было наблюдать в синей области спектра только при очень длительных экспозициях. Это подтверждает предположение о том, что каротиноиды не участвуют непосредственно в запасании энергии света при фотосинтезе бактерий.

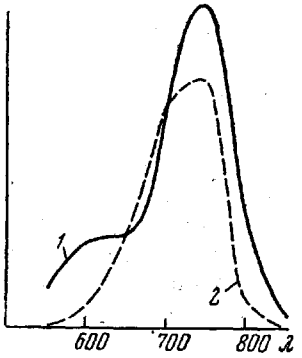


Рис. 7. Спектры действия роста зеленых бактерий:
1 — Chloropseudomonas ethylicum; 2 — Chlorobium thiosulfatophilum

У зеленых бактерий начало роста и наилучшее развитие было отмечено в области около 740—750 *ммк*, которая соответствует наиболее сильно поглощающей форме бактериовиридина. Заметный рост наблюдался и в области поглощения более коротковолновой формы при 660—680 *ммк*. В области поглощения наиболее длинноволновой формы 800 *ммк* прирост клеток был очень слабый и становился заметным только при длительных экспозициях.

Вопрос о роли и участии различных форм бактериальных пигментов в процессе фотосинтеза начинает только изучаться. Несомненно, что использование фотосинтезирующих бактерий представляется в этом отношении весьма перспективным. Действительно, пигменты этих организмов находятся в нескольких спектрально четко разграниченных формах, что очень удобно как для установления природы отдельных форм, так и для выяснения их роли и участия в фотосинтезе. Возможность учитывать интенсивность фотосинтеза по приросту биомассы облегчает измерение спектров действия этого процесса, определение которого по другим параметрам (в частности, по потреблению CO_2) связано с рядом трудностей. Первые результаты по исследованию спектров действия фотосинтеза бактерий, конечно, еще не дают ответа на вопрос о роли в этом процессе каждой отдельной формы их пигментов. Однако они показали, что в процессе фотосинтеза у пурпурных бактерий вовлекаются все три формы бактериохлорофилла, что согласуется с прежними наблюдениями (Vermehler, Wassink a. Roman, 1937).

У зеленых бактерий найдено, что не все формы их хлорофилла одинаково активны. Мало активной оказалась форма, поглощающая при 800 *ммк*. Не исключена возможность, что эта форма активно работает в кооперации с другой формой, поглощающей около 750 *ммк*. По мнению Сибесма и Олсона (1963), именно форма пигмента с поглощением около 800 *ммк* является конечным акцептором энергии возбуждения и осуществляет фотохимические реакции, определяющие фотосинтез зеленых бактерий. Но в наших опытах свет, поглощенный непосредственно этой формой, оказался мало активным в фотосинтезе данных организмов. Наиболее активно используется свет, поглощаемый формой 750 *ммк*, что согласуется с данными Ларсена (Larsen, 1953) по спектрам действия фотосинтеза зеленых бактерий, полученными при определении потребления CO_2.

Данные по спектрам возбуждения люминесценции зеленых бактерий, характеризующие энергетическое взаимодействие форм и миграцию энергии между ними, и спектрам действия фотосинтеза допускают возможность осуществления коротковолновыми формами бактериальных пигментов независимых фотохимических реакций. Такое разобщение может определять разный уровень восстановленности первичных промежуточных продуктов и тем самым определять уже на этом этапе разнокачественность конечных продуктов фотосинтеза. Использование дальнейших исследованиях по спектрам действия фотосинтеза метода меченых атомов позволит, возможно, не только точнее количественно оценить активность разных форм, но и проверить предположение об образовании разных продуктов при вовлечении в первичные процессы разных форм бактериальных пигментов.

Выводы

1. Измерены спектры возбуждения люминесценции бактериохлорофилла и бактериовиридина в клетках бактерий. Миграция энергии отмечена между длинноволновыми формами. В случае зеленых бактерий энергия, поглощенная коротковолновыми формами, не передавалась на длинноволновые формы.

2. Спектры действия роста бактерий показали, что у пурпурных бактерий в процессе фотосинтеза вовлекаются все три формы бактериохлорофилла, тогда как у зеленых бактерий одна форма бактериовиридина с наиболее длинноволновым максимумом поглощения давала в области своего поглощения очень слабый прирост клеток, что может быть связано с ее малой активностью.

PARTICIPATION OF DIFFERENT FORMS OF BACTERIOVIRIDIN AND BACTERIOCHLOROPHYLL IN THE PHOTOSYNTHESIS OF BACTERIA AND THE MIGRATION OF ENERGY BETWEEN THE FORMS OF THESE PIGMENTS

Yu. E. Erokhin and A. A. Krasnovsky

Summary

Excition spectra luminescense of bacteriochlorophyll and bacterioviridin in bacterial cells were measured. A migration of energy was observed between long-wave forms. In the case of green bacteria energy absorbed by shortwave forms was not transmitted to long-wave forms.

Action spectra of bacterial growth show that in purple bacteria all the tree forms of bacteriochlorophyll are involved in the process of photosynthesis, whereas in green bacteria one form of bacterioviridin with the longest wave-length maximum of absorption showed a very weak cell growth in the region of its absorption.

ЛИТЕРАТУРА

Ерохин Ю. Е. и Красновский А. А. 1963. Изучение состояния и превращений пигментов в пурпурных и зеленых фотосинтезирующих бактериях. «Биофизика», 8, 446.

Красновский А. А., Войновская К. К. и Кособуцкая Л. М. 1952. Природа естественного состояния хлорофилла в связи со спектральными свойствами его коллоидных растворов и твердых пленок. «Докл. АН СССР», **85**, 389.

Красновский А. А., Ерохин Ю. Е. и Хун Юй-цюнь. 1932. Флуоресценция агрегированных форм бактериохлорофилла, бактериовиридина и хлорофилла в связи с состоянием пигментов в фотосинтезирующих организмах. «Докл. АН СССР», **143**, 456.

Красновский А. А. и Пакшина Е. В. 1959. Фотохимические и спектральные свойства бактериовиридина зеленых бактерий. «Докл. АН СССР», **127**, 913.

Шапошников В. Н., Осницкая Л. К. и Чудина В. И. 1961. Развитие пурпурной бактерии *Chromatium vinosum* при разных интенсивностях света. «Микробиология», **30**, 825.

Brody M. a. Linschitz. 1961. Fluorescence of photosynthetic organismus at room and liquid nitrogen temperatures. «Science», **133**, 705.

Duysens L. N. M. 1952. Transfer of exitation energy in photosynthesis. Doctoral Thesis, Utrecht.

French C. S. 1937. The quantum yield of hydrogen and carbon dioxide assimilation in purple bacteria. «J. Gen. Physiol.», **20**, 711.

Larsen H. 1953. On the microbiology and biochemistry of the photosynthetic green sulfur bacteria. «Kgl. Norske vid. selskabs skr.», **26**, 1.

Sybesma C. a. Olson J. M. 1963. Transfer of chlorophyll oxitation energy (green photosynthetic bacteria. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», **49**, 248.

Takamutsu K. a. Morita S. 1958. Action spectra of photosynthesis and photochemical assimilation of pyruvic acid in *Rhodopseudomonas palustris*. «J. Biochem.», **45**, 541.

Vermehler D., Wassink E. C. a. Roman G. H. 1937. On the fluorescence of photosynthetizing cells. «Enzymologia», **4**, 254.

Том XXIV
Vol. XXIV
Труды Московского общества испытателей природы
Transactions of the Moscow Society of Naturalists
1966

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПИГМЕНТОВ В КЛЕТКАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Н. В. Карапетян и А. А. Красновский

Одним из путей, ведущих к познанию природы световых реакций фотосинтеза, является изучение превращений пигментов фотосинтезирующих организмов под действием света. Фотохимические процессы в нормально функционирующих организмах протекают очень быстро, образующиеся лабильные фотопродукты обладают очень коротким временем жизни, вследствие чего выделить эти промежуточные соединения с тем, чтобы в последующем изучить их свойства, невозможно. Наиболее приемлемы для таких исследований спектральные методы, позволяющие проводить количественные исследования процессов непосредственно в живых организмах. Однако обычные спектральные методы непригодны для регистрации короткоживущих фотопродуктов, образующихся в небольшом количестве. Необходима аппаратура, которая обладает большей чувствительностью и дает возможность быстро и точно регистрировать соединения, возникающие в ходе фотосинтетических реакций. Высокая точность измерения достигается использованием метода дифференциальной спектрофотометрии, который позволяет обнаруживать изменения поглощения до 0,01—0,001%.

При исследовании первичных процессов фотосинтеза наибольший интерес представляет исследование дифференциальных спектров, которые обусловлены действием освещения и в основном отражают превращения соединений и пигментов, участвующих в фотосинтезе. Исследование дифференциальных спектров в зависимости от различных условий (интенсивность освещения, состав среды, pH, действие ядов и других факторов) позволяет идентифицировать соединения, ответственные за измеренные спектры. Идентификации максимумов в дифференциальных спектрах способствуют исследования на организмах различных систематических групп, отличающихся как пигментным составом, так и степенью организации. Регистрация дифференциальных спектров «свет — темнота» через различные периоды освещения помогает выяснить временную последовательность, в которой промежуточные соединения (пигменты, ферменты) вовлекаются в реакции фотосинтеза. На основании этих измерений могут быть получены данные о первичных процессах фотосинтеза, о последовательности участия пигментов в фотосинтетических реакциях, о скоростях этих реакций и концентра-

циях реагирующих соединений. За последние годы в этой области достигнуты значительные успехи, и на результатах, полученных методом дифференциальной спектрофотометрии, основаны предлагаемые ныне схемы первичных реакций фотосинтеза. В отношении фотосинтезирующих бактерий известно следующее.

Пурпурные бактерии. В спектре поглощения пурпурных бактерий в близкой инфракрасной области обнаруживаются три максимума при 800, 850 и 890 *ммк*, которые обусловлены одним и тем же пигментом — бактериохлорофиллом. Положение максимумов и их соотношение зависят от вида и штамма бактерий и условий их выращивания. Указанные максимумы отражают наличие в бактериях различных, видимо, трех форм бактериохлорофилла, обозначаемых как Б-800, Б-850 и Б-890. Работами А. А. Красновского с сотрудниками (Красновский, Войновская и Кособуцкая, 1952; Красновский, Кособуцкая и Войновская, 1953; Красновский, Ерохин и Хун Юй-цюнь, 1962; Красновский, Ерохин и Гуляев, 1963) показано, что взаимодействие между близко расположенными молекулами бактериохлорофилла в твердых пленках и коллоидных мицеллах ведет к спектральным сдвигам, наблюдаемым у бактериохлорофилла в клетках бактерий; кроме того, наблюдаются одинаковые эффекты растворителей, нагревания и освещения на спектры поглощения и спектры флуоресценции бактериохлорофилла в твердых пленках и бактериях. На основании указанных работ авторы приходят к выводу, что различные формы бактериохлорофилла обусловлены скорее всего различной степенью агрегации молекул пигмента.

Для выяснения механизма участия бактериохлорофилла в фотохимических реакциях фотосинтеза исследовались спектральные изменения при освещении бактерий. В дифференциальных спектрах пурпурных бактерий, вызванных освещением, в инфракрасной области было обнаружено увеличение поглощения при 750—795 *ммк* с максимумом 785—790 *ммк* и уменьшение поглощения в области 800—900 *ммк*. Положение отрицательных максимумов зависело от вида бактерий: для *Chromatium* — 810, 840 и 890 *ммк* (Duysens, 1952; Duysens a. oth., 1956; Kok, 1959; Olson a. Kok, 1959; Clayton, 1962a); для *Rhodospirillum rubrum* — 810 и 870 *ммк* (Duysens, 1952; Kok, 1959; Clayton, 1962б; Kuntz a. oth., 1964); для *Rh. spheroides* — 810, 835 и 880 *ммк* (Clayton, 1962a; 1963; Kuntz a. oth., 1964). Поскольку положение отрицательных максимумов в дифференциальных спектрах соответствовало положению максимумов в спектре поглощения бактериохлорофилла in vivo, было сделано заключение, что при освещении пурпурных бактерий происходят обратимые превращения бактериохлорофилла. Так как подобные же изменения в поглощении обнаруживались в присутствии окислителей, наблюдаемые изменения объясняли фотоокислением бактериохлорофилла (Duysens, 1959).

Изменения в поглощении бактериохлорофилла были обнаружены и в видимой части спектра (Duysens, 1957; Olson a. Kok, 1959; Clayton, 1962a). Помимо уменьшения поглощения в максимумах бактериохлорофилла в видимой и инфракрасной областях, наблюдалось также появление новых максимумов (Duysens, 1957; Olson a. Kok, 1959; Clayton, 1962в).

Для выявления сенсибилизированных бактериохлорофиллом превращений других пигментов (ферментов), связанных с их участием в первичных реакциях фотосинтеза, бактерии освещали инфракрасным светом, поглощаемым только бактериохлорофиллом, а измерения проводились в области 250—600 *ммк*, где, помимо бактериохлорофилла, поглощают и другие компоненты клетки.

При таком освещении пурпурных бактерий наблюдалось появление максимума при 340 *ммк*, приписываемое фотовосстановленному пиридиннуклеотиду (Olson a. oth., 1959; Clayton, 1962б). Эта же реакция была подробно изучена с использованием более чувствительного флуоресцентного метода по изменению в ходе освещения интенсивности голубой флуоресценции восстановленного пиридиннуклеотида с максимумом в области 460 *ммк* (Duysens a. Sweep, 1959; Olson, 1959).

На основании сопоставления спектров поглощения цитохромов и дифференциальных спектров бактерий в области 400—600 *ммк* ряд максимумов был отнесен за счет превращения цитохромов (Duysens, 1954, 1957). Обнаружено, что в клетках бактерий в фотосинтетические реакции вовлекаются по крайней мере три цитохрома (Olson a. Chance, 1960). Фотоокисление одного из цитохромов происходит даже при температуре —196° (Chance a. Nishimura, 1960), причем обратная реакция является температурно зависимой. Превращения же других цитохромов на свету наблюдаются при температурах не ниже —40° (Vredenberg a. Duysens, 1964).

При освещении бактерий инфракрасным светом в дифференциальном спектре в области 450—520 *ммк* обнаруживаются также три максимума, относимые за счет превращения (возможно, окисления) каротиноидов (Chance, 1959; Smith a. Ramirez, 1959; Clayton, 1962а). Указанные изменения не наблюдаются в бескаротиноидных штаммах бактерий.

Показано также (Чанс и Нишимура, 1962; Clayton, 1962б, 1963), что освещение бактерий вызывает фотохимическое восстановление кофермента *Q*, обнаруживаемое по уменьшению поглощения при 272 *ммк;* изменение поглощения быстро обратимо после выключения света.

Возникает вопрос: отражают ли спектральные изменения бактериохлорофилла, возникающие под действием освещения, малые превращения молекул пигмента, находящихся в одинаковом состоянии, или же эти изменения обусловлены значительными превращениями малой части бактериохлорофилла в особом состоянии? Еще в 1953 г. А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая и К. К. Войновская высказали предположение, что световым превращениям подвергается небольшая часть активных молекул бактериохлорофилла. В настоящее время также принимается (Vredenberg a. Duysens, 1963; Clayton, 1962в), что наблюдаемые в инфракрасной области изменения поглощения бактериохлорофилла обусловлены превращениями лишь малой части этого пигмента (2—4%), обозначаемой как П-890 (или П-870 — в зависимости от бактерий) по аналогии с П-700 в зеленых растениях (Kok a. Hoch, 1961). Предполагается, что молекула П-890 находится в связи с цитохромом и каким-то акцептором, возможно, с коферментом *Q*. При освещении П-890 восстанавливает хинон и воспринимает электрон от цитохрома, вызывая его окисление.

Зеленые бактерии. Исследование дифференциальных спектров зеленых фотосинтезирующих бактерий представляет особый интерес, так как они содержат аналог хлорофилла — бактериовиридин. Однако в отличие от пурпурных бактерий, пигментная система зеленых бактерий изучена недостаточно. Найдено, что бактериовиридин in vivo обладает тремя максимумами поглощения в красной и близкой инфракрасной области при 680, 750 и 810 *ммк*. Имеются указания на существование у этих организмов двух типов хлорофилловых пигментов (Stanier a. Smith, 1960; Olson a. Romano, 1962). Установлено сходство спектров поглощения бактериовиридина в пленках и в клетках зеленых бактерий (Красновский и Пашкина, 1959). Измерения низкотемпературных спектров люминесценции показали, что основная часть пигментов в клетках

зеленых бактерий находится в агрегированных формах, различающихся плотностью и типом упаковки пигментов (Красновский, Ерохин и Федорович, 1960; Ерохин и Красновский, 1963; Красновский, Ерохин и Гуляев, 1963).

При исследовании дифференциальных спектров «свет — темнота» зеленых бактерий в средней области обнаружены изменения поглощения при 423 и 553 *ммк*, обусловленные окислением их цитохрома *с* (Olson a. Sybesma, 1963). В то же время не отмечено изменений в основных максимумах поглощения бактериовиридина при 680, 745 и 810 *ммк*, но найдено уменьшение поглощения при 840 *ммк* (Sybesma a. Vredenberg, 1963). Предполагается, что изменение при 840 *ммк* связано с превращением бактериовиридина в особом состоянии, благодаря которому П-840 является конечным акцептором световой энергии и служит реакционным центром фотосинтетической единицы у зеленых бактерий, по аналогии с П-700 у растений или П-890 у пурпурных бактерий. Изменения при 840 *ммк* происходят и при —170°, тогда как изменения в синей области спектра, вызванные фотоокислением цитохрома *с*, зависят от температуры и наблюдаются лишь при температурах выше —40° (Sybesma a. Vredenberg, 1964). Таким образом, как и у зеленых растений, у зеленых бактерий не найдено изменений в основных максимумах поглощения при 745 и 465—470 *ммк*.

На основании исследования дифференциальных спектров поглощения фотосинтезирующих организмов принимается, что небольшая часть хлорофилловых пигментов, находящихся в особом состоянии, претерпевает обратимые окислительно-восстановительные превращения. Нами было показано, что в дифференциальных спектрах «свет — темнота» зеленых растений изменения в красной области обусловлены не изменениями поглощения, а изменениями флоуресценции, возбуждаемой измеряющим лучом. Представлялось интересным исследовать в сравнительном аспекте световые превращения бактериальных пигментов для выяснения возможного влияния флуоресценции на дифференциальные спектры пурпурных и зеленых бактерий. Кроме того, исследование дифференциальных спектров бактерий в красной и инфракрасной областях позволило бы обнаружить превращения хлорофилловых пигментов, определить природу их превращений и связь с первичными процессами фотосинтеза.

МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовались пурпурные бактерии *Chromatium, Rhodospirillum rubrum* и *Rhodopseudomonas palustris* и зеленые бактерии *Chloropseudomonas ethylicum*, выделенные на кафедре микробиологии МГУ (Шапошников, Кондратьева, Красильникова и Раменская, 1959); условия выращивания всех бактерий описаны Е. Н. Кондратьевой (1963). 3—5-дневные культуры пурпурных бактерий и 1—2-дневные культуры зеленых бактерий концентрировали центрифугированием, суспендировали в культуральной (или другой) среде до необходимой оптической плотности и помещали в кювету толщиной 5 *мм*. Исследовались также дифференциальные спектры хроматофоров, выделенных из *Chromatium*.

Измерения проводились на установке для измерения дифференциальных спектров поглощения «свет — темнота», описанной ранее (Карапетян, 1963; Карапетян, Литвин и Красновский, 1963а). Разделение измеряющего и действующего лучей достигалось использованием

фосфороскопа, помещенного на выходе монохроматора, что позволяло проводить измерения в любой области независимо от спектрального состава действующего света, так как рассеянный действующий свет и флуоресценция, возбуждаемая действующим светом, не достигали фотоумножителя. Источником действующего света служила киноламна 750 *вт*; максимальная интенсивность модулированного действующего света с длиной волны больше 700 *ммк* превышала 10^6 *эрг/см²·сек*. Дифференциальные спектры измерялись по точкам через каждые 5 *ммк*. При каждой длине волны измеряющего света величина фототока I, обусловленная пропущенным через объект светом, приводилась к постоянной величине. Этот фототок компенсировался, и измерялось изменение фототока ΔI при освещении объекта действующим светом. Поскольку I=const, зависимость ΔI от длины волны измеряющего света представляет собой дифференциальный спектр поглощения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пурпурные бактерии. В соответствии с литературными данными при освещении бактерий инфракрасным светом были найдены изменения в сине-зеленой области спектра (400—550 *ммк*), приписываемые превращениям цитохромов и каротиноидов (рис. 1). Полученный дифференциальный спектр обусловлен истинными изменениями поглощения, поскольку перед фотоумножителем был помешен светофильтр СЗС-22, пропускающий свет с длиной волны менее 600 *ммк* и отсекающий более длинноволновую часть.

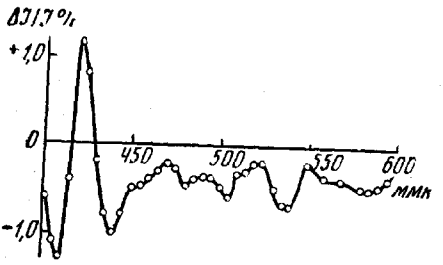


Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения суспензии клеток *Rhodopseudomonas palustris*, вызванный освещением красным светом λ>600 *ммк*

Дифференциальные спектры «свет — темнота» пурпурных бактерий в инфракрасной области спектра также обнаруживают сходство с соответствующими спектрами, сообщенными другими авторами: наблюдается уменьшение поглощения в области 800—900 *ммк* с 2—3 максимумами, положение которых зависит от вида бактерий, и увеличение поглощения в области 750—795 *ммк* с максимумом при 785—790 *ммк* (рис. 2—4). Кинетика изменений при 790 и 860 (или 850) *ммк* у *Chromatium* и *Rh. palustris* представлена на рис. 2, *Б* и 3, *Б*.

Изменения при 790 *ммк* воспроизводились и при помещении после объекта (перед фотоумножителем) интерференционного светофильтра с максимумом пропускания, соответствующим длине волны измеряющего света [1]. Это указывает на то, что изменения фототока при 790 *ммк* обусловлены истинным изменением поглощения. Однако при измерении без помещения этого светофильтра после объекта величина изменения была примерно на 30% ниже, чем в случае измерения со светофильтром. С помощью стеклянного светофильтра ИКС-3, помещенного после объекта, было показано, что измеряющий свет возбуждает флуоресценцию бактерий, интенсивность которой усиливается под действием све-

[1] В опытах с помещением интерференционных светофильтров после объекта интенсивность измеряющего света, падающего на объект, усиливалась, чтобы интенсивность света, прошедшего через объект (I), была такой же, как при измерениях без интерференционного светофильтра.

товых импульсов. Интенсивность флуоресценции при освещении бактерий усиливается вначале быстро, затем медленнее и достигает максимального стационарного уровня; после выключения света происходит быстрое, а затем более медленное падение интенсивности флуоресценции до исходного уровня (рис. 2, *Б* и 3, *Б*).

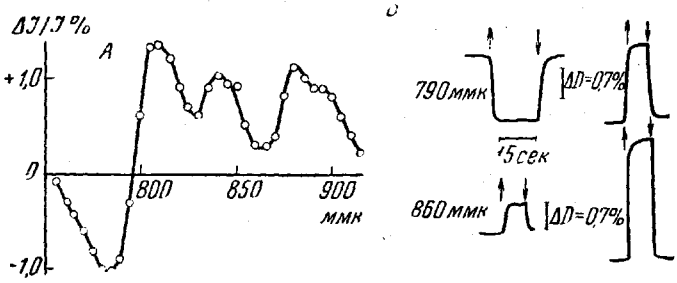


Рис. 2. Chromatium: *А* — дифференциальный спектр поглощения суспензии клеток, вызванный освещением инфракрасным светом; *Б* — кинетика изменений поглощения при 790 и 860 *ммк* (слева) и изменений флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом 790 или 860 *ммк* (справа) (при измерении изменений флуоресценции интенсивность измеряющего света, возбуждающего флуоресценцию, значительно усилена по сравнению с той, при которой проводилось измерение изменений поглощения)

Следовательно, при измерении дифференциальных спектров пурпурных бактерий наряду с изменениями поглощения при 790 *ммк* одновременно происходит и изменение флуоресценции, обусловливающее изменение величины фототока в противоположном направлении по отношению к изменениям поглощения при 790 *ммк*. Поэтому суммарная

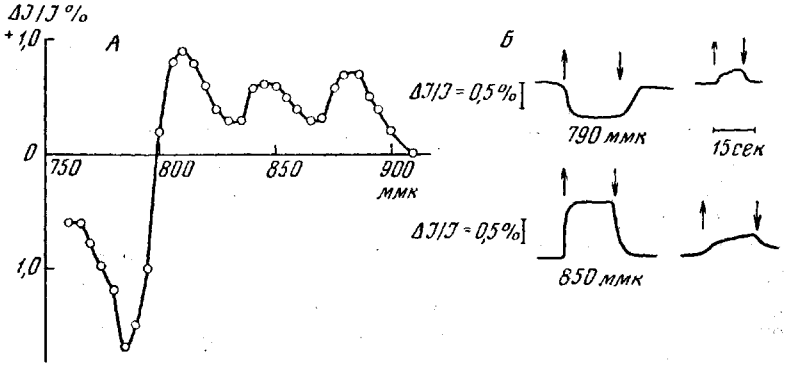


Рис. 3. *Rhodopseudomonas palustris: А* — дифференциальный спектр поглощения «свет — темнота» суспензии клеток; *Б* — кинетика изменений поглощения при 790 и 850 *ммк* (слева) и изменений флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом 790 или 850 *ммк* (справа); интенсивность возбуждающего флуоресценцию измеряющего света усилена

величина этих эффектов меньше при измерении $\Delta I/I$ без интерференционного светофильтра, когда флуоресценция бактерий достигает фотоумножителя. При помещении же после объекта интерференционного светофильтра флуоресценция отсекается и изменения сигнала целиком обусловлены изменением поглощения.

При измеряющем свете 860 *ммк* освещение бактерий вызывает усиление сигнала, соответствующее уменьшению поглощения (рис. 2*Б*).

Однако если после объекта помещался интерференционный светофильтр с максимумом пропускания при 860 *ммк*, т. е. измерялось только изменение поглощения, величина изменения сигнала была меньше, но характеризовалась такой же кинетической кривой, как и в опыте без использования светофильтра. Изменения флуоресценции у плотной суспензии клеток *Chromatium* составляли до 50% общей величины изменения сигнала. Если перед фотоумножителем помещался светофильтр ИКС-3, то при освещении бактерий наблюдается увеличение сигнала, вызванное лишь усилением флуоресценции объекта (рис. 5,*Б*). При данной длине волны измеряющего света уменьшение поглощения и усиление флуоресценции вызывают изменение фототока в одном и том же направлении, в связи с чем наложение этих двух эффектов приводит к увеличению значения ΔI. Найдено, что относительные изменения флуоресценции у пурпурных бактерий могут достигать 100%. Величина изменений флуоресценции, как и интенсивность возбуждаемой измеряющим лучом флуоресценции, чрезвычайно сильно зависит от физиологического состояния исследуемого объекта, условий роста, возраста и ряда других причин. Следует отметить, что выход флуоресценции у пурпурных бактерий, в особенности у зеленых (см. дальше), значительно ниже, чем у растений.

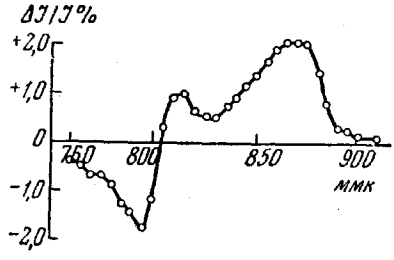


Рис. 4. *Rhodospirillum rubrum:* дифференциальный спектр поглощения суспензии клеток, вызванный освещением инфракрасным светом

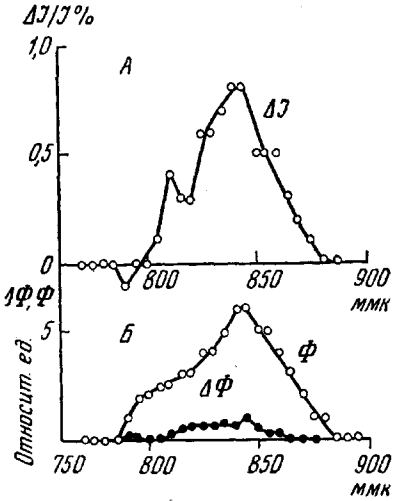


Рис. 5. *Chromatium: А* — дифференциальный спектр плотной суспензии клеток (ΔI); *Б* — спектральные кривые интенсивности флуоресценции Ф в зависимости от длины волны измеряющего света и изменений этой флуоресценции $\Delta\Phi$ в результате освещения (кривые Ф и $\Delta\Phi$ измерены со светофильтром ИКС-3, помещенным после объекта)

Изменения флуоресценции наиболее выражены у пурпурных бактерий *Chromatium*. Особенно четко наблюдаются изменения флуоресценции у бактериальных суспензий с высокой оптической плотностью (рис. 5, *А*) или при более интенсивном измеряющем луче. Однако в том случае, когда оптическая плотность суспензий клеток *Chromatium* при 860 *ммк* меньше 0,6, изменения флуоресценции не наблюдаются вообще или же они настолько малы, что не сказываются на величине изменений сигнала, целиком обусловленного изменением поглощения. Изменения флуоресценции, как и интенсивность флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом, значительно меньше у *R. rubrum* и *Rh. palustris* и, таким образом, не могут мешать при измерении дифференциальных спектров поглощения. Меньшим выходом флуоресценции об-

ладают также хроматофоры, выделенные из *Chromatium*; практически под измеряющим лучом они не флуоресцируют.

Как изменения поглощения, так и изменения флуоресценции наблюдались только у организмов, обладающих нативным фотосинтетическим аппаратом. Всякое повреждение нативности структуры вызывало исчезновение обоих эффектов.

Зеленые бактерии. Спектральные изменения у зеленых бактерий (рис. 6) обнаруживались лишь при использовании бактериальных суспензий с высокой оптической плотностью; кинетика этих изменений представлена на рис. 6,*Б*. При измерении в области 680—760 *ммк* освещение бактерий вызывало увеличение фототока фотоумножителя; максимум в спектральной кривой располагался при 740 *ммк* (рис. 6,*А*). Наблюдаемые изменения, казалось бы, свидетельствуют о выцветании бактериовиридина. Однако никаких изменений не наблюдалось, если после объекта помещались интерференционные светофильтры с максимумами пропускания при 700, 725 или 750 *ммк* при соответствующей длине волны монохроматического измеряющего света. Следовательно, наблюдаемые изменения не обусловлены изменениями поглощения. В то же время изменения, хотя и меньшие по величине, наблюдались, если после объекта был помещен светофильтр ИКС-1, пропускающий свет с длиной волны больше 760 *ммк* (рис. 6,*А*). Таким образом, и в этом случае измеряющий свет возбуждает флуоресценцию объекта, интенсивность которой меняется под действием световых импульсов (Карапетян и Красновский, 1965).

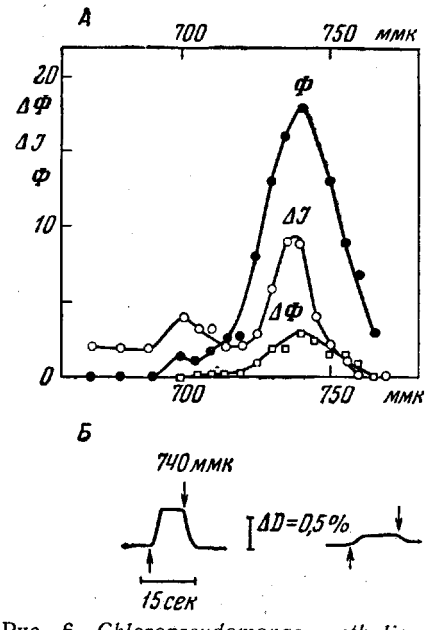


Рис. 6. *Chloropseudomonas ethylicum*: *А* — дифференциальные спектры плотной суспензии клеток зеленых бактерий, вызванные освещением: ΔI — измерено без светофильтра; $\Delta\Phi$ — измерено со светофильтром ИКС-1, выделяющим флуоресценцию бактерий. Кривая Ф характеризует интенсивность флуоресценции в зависимости от длины волны измеряющего света, возбуждающего флуоресценцию (измерено без дополнительного освещения, после объекта помещен ИКС-1); *Б* — кинетика изменений флуоресценции (возбуждаемой измеряющим лучом 740 *ммк*), измеренная без светофильтра и со светофильтром ИКС-1 (справа)

Поскольку изменений поглощения не зарегистрировано, то спектральная кривая ΔI (рис. 6,*А*) обусловлена только изменениями флуоресценции. Эта кривая по виду и положению максимумов сходна со спектральными кривыми зависимости интенсивности флуоресценции Ф от длины волны возбуждающего (измеряющего) света и спектральной кривой $\Delta\Phi$ изменений этой флуоресценции при освещении. Флуоресценция зеленых бактерий усиливается лишь на 10—20% от исходной величины.

Нам не удалось обнаружить у зеленых бактерий изменений поглощения в области 840 *ммк*, превышающих 0,1% (чувствительность установки). Изменения не наблюдались как при комнатной температуре, так и при 0°. Исходя из того, что изменения поглощения обычно наблюдаются в той спектральной области, где поглощает пигмент, претерпе-

вающий превращения, мы пытались обнаружить максимум 840 *ммк* в обычном спектре поглощения, измеряемом при температуре —196°. В низкотемпературном спектре четко обнаруживались три основных максимума при 670, 755—760 и 810—820 *ммк*, несколько сдвинутые в длинноволновую область по сравнению с их положением в спектре, измеренном при комнатной температуре, но не найдено никакого поглощения при 840 *ммк* (рис. 7).

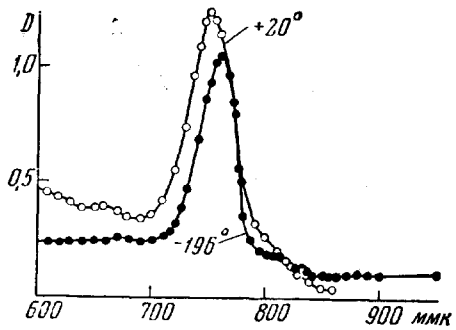


Рис. 7. *Chloropseudomonas ethylicum:* спектры поглощения зеленых бактерий при 20 и —196°

ОБСУЖДЕНИЕ

Все предлагаемые ныне схемы первичных реакций фотосинтеза включают в себя как составную часть превращения хлорофилловых пигментов. Предполагается, что, воспринимая электрон на свету и отдавая его дальше по цепи первичных реакций, ведущих в конечном счете к восстановлению ТПН (или ДПН) и образованию АТФ, сама молекула хлорофилла in vivo претерпевает окислительно-восстановительные превращения. Возникает вопрос: происходят ли в ходе световых превращений химические изменения молекулы хлорофилла, и промежуточное соединение в этом случае обладает достаточно долгим временем жизни, позволяющим его спектральное обнаружение по уменьшению поглощения в красном и синем максимумах хлорофилла, или же эти изменения настолько быстротечны, что не могут быть зарегистрированы? Обнаружение новых максимумов поглощения, характерных для образовавшегося соединения, довольно трудно, особенно в области 400—550 *ммк*, так как в этой области, кроме хлорофилла, поглощают другие пигменты. Поэтому особый интерес представляет исследование дифференциальных спектров в красной области, где поглощение целиком обусловлено хлорофилловыми пигментами.

В дифференциальных спектрах пурпурных бактерий были обнаружены максимумы, свидетельствующие о фотохимических превращениях бактериохлорофилла при освещении бактерий. Для зеленых растений и водорослей долгое время не удавалось обнаружить подобного эффекта в красной области. Кок (1957) нашел уменьшение поглощения с главным максимумом при 700—710 *ммк* и небольшие изменения при 650 и 680 *ммк*. Колман и Рабинович (Coleman a. Rabinowitch, 1959) обнаружили для хлореллы основное уменьшение поглощения при 680 *ммк* и сравнительно небольшие изменения при 625, 650 и 710 *ммк*. Однако нами было показано, что вызванные освещением изменения в красной области спектра у зеленых растений и водорослей обусловлены не изме-

нением поглощения, а изменениями флуоресценции объекта, возбуждаемой измеряющим лучом (Карапетян, Литвин и Красновский, 1963а, б; Карапетян, 1963); к подобному же выводу пришли Рубинштейн и Рабинович (Rubinstein a. Rabinowitsh, 1963).

Как можно видеть из результатов, представленных выше, и при регистрации дифференциальных спектров поглощения фотосинтезирующих бактерий измеряющий свет вызывает флуоресценцию бактерий, интенсивность которой изменяется при освещении. Изменения флуоресценции наблюдаются только при использовании бактериальных суспензий с высокой оптической плотностью. У зеленых бактерий наблюдаемые изменения обусловлены только изменениями флуоресценции, тогда как у пурпурных бактерий обнаруживаются как изменения поглощения, так и изменения флуоресценции. Дифференциальный спектр поглощения пурпурных бактерий можно измерить лишь при использовании суспензии бактерий с малой оптической плотностью.

Таким образом, изменения фототока при измерении дифференциальных спектров «свет — темнота» пурпурных бактерий частично, а зеленых бактерий — целиком обусловлены именно изменениями флуоресценции, а не другими эффектами. Наблюдаемые изменения не могут быть вызваны попаданием на фотоумножитель рассеянно действующего света или флуоресценции, возбуждаемой действующим лучом, так как в конструкции установки использован принцип фосфороскопа. Под действием освещения могут происходить изменения внутренней структуры клеток бактерий, ведущие к изменению условий светорассеяния монохроматического измеряющего света; Белл (1954) указал на возможность таких изменений в листьях растений. Однако если бы подобные явления имели место в бактериях, то мы должны были наблюдать эффект при помещении интерференционных светофильтров после объекта (в случае зеленых бактерий). Поскольку никаких изменений при этом не было обнаружено, то наблюдаемые эффекты нельзя объяснить изменениями светорассеяния. Измеряемые изменения не обусловлены также оседанием или фототаксисом бактерий, так как, во-первых, знак изменений при освещении пурпурных бактерий различен в разных участках спектра; во-вторых, при исключении оседания или фототаксиса бактерий суспендированием их в среде с 3%-ной желатиной или 40%-ным глицерином дифференциальные спектры подобны спектрам бактерий, которые находились в культуральной среде или водопроводной воде.

Изменения флуоресценции, вызванные освещением, наблюдаются у фотосинтезирующих организмов различных систематических групп, т. е. это явление универсально. То обстоятельство, что изменения флуоресценции обнаруживаются при наличии нативной структуры фотосинтетического аппарата, свидетельствует о связи изменений флуоресценции с первичными процессами фотосинтеза.

Обратимые изменения в красном максимуме поглощения хлорофилловых пигментов обнаружены лишь у пурпурных бактерий и, видимо, свидетельствуют о фотохимических превращениях бактериохлорофилла при фотосинтезе. У зеленых бактерий, как и у зеленых растений (Карапетян, Литвин и Красновский, 1963б), подобных изменений поглощения в красной области не обнаружено. Не зарегистрировано также изменений поглощения у зеленых бактерий при 840 *ммк*. Возможно, эти изменения поглощения настолько малы и быстры, что для их обнаружения необходима более чувствительная аппаратура с лучшим временным разрешением. Именно в связи с тем, что превращения хлорофилловых пигментов занимают ключевое положение во всех гипотезах пер-

вичных реакций фотосинтеза, достоверное доказательство наличия спектральных превращений этих пигментов представляет особую важность.

Параллельное исследование изменений поглощения и изменений флуоресценции, сопоставление их с фотосинтетической активностью клеток, изучение этих явлений на организмах, обладающих различным пигментным составом, позволят ближе подойти к выяснению световых превращений хлорофилловых пигментов, а тем самым и к выяснению механизма фотосинтетических процессов.

В заключение приносим глубокую благодарность академику В. Н. Шапошникову и доктору биологических наук Е. Н. Кондратьевой, любезно предоставившим нам культуры фотосинтезирующих бактерий.

Выводы

1. При измерении дифференциальных спектров поглощения «свет — темнота» пурпурных бактерий помимо изменений поглощения обнаруживаются также изменения флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом. Изменения флуоресценции наиболее выражены у *Chromatium* и могут достигать 30—50% от величины изменения сигнала. Наложение изменений поглощения и изменений флуоресценции в разных участках спектра оказывает различное влияние на характер измеряемого дифференциального спектра. Истинный дифференциальный спектр поглощения пурпурных бактерий, вызванный освещением, может быть измерен при использовании суспензий с малой оптической плотностью.

2. Спектральные изменения в красной области при освещении зеленых бактерий обусловлены только изменениями флуоресценции, возбуждаемой измеряющим лучом, и обнаруживаются лишь при использовании плотных бактериальных суспензий. Не удалось обнаружить обратимых изменений поглощения бактериовиридина в клетках в красной области спектра. Возможно, эти изменения настолько малы и быстры, что не могут быть зарегистрированы используемой аппаратурой.

3. Обнаружение изменений флуоресценции, возбуждаемой слабым (измеряющим) светом, под действием интенсивного (действующего) света у фотосинтезирующих организмов различных систематических групп: зеленых растений, водорослей, пурпурных и зеленых бактерий — свидетельствует об универсальности этого явления. Изменения флуоресценции связаны с изменением состояния фотосинтетического аппарата под действием света и наряду с изменениями поглощения могут отражать превращения хлорофилловых пигментов на свету, связанные с их участием в первичных реакциях фотосинтеза.

INVESTIGATION OF LIGHT-INDUCED TRANSFORMATIONS OF PIGMENTS IN THE CELLS OF PHOTOSYNTHETIZING BACTERIA BY MEANS OF DIFFERENTIAL SPEKTROPHOTOMETRY

N. V. Karapetian and A. A. Krasnovsky

Summary

1. When measuring absorption difference spectra (light—dark) of purple bacteria along with absorption changes are also observed changes of fluorescence, excited by the measuring beam. Fluorescence changes are

most marked in Chromatium and may reach 30—50% of signal change value. The overlapping of absorption and fluorescence changes in various spectral regions influences in different ways the character of the measured difference spectrum. Light-induced changes of the absorption of purple bacteria can be measured using cell suspensions of low optical density.

2. Spectral changes in the red region in illuminated green bacteria are caused only by fluorescence changes excited by the measuring beam and occur only in dense bacterial suspensions. We were unable to find any reversible absorption changes of bacterioviridin in the cells in the red region of spectrum. These changes may be so small and rapid, that they cannot be registered by the instruments used.

3. The changes in fluorescence excited by weak (measuring) light under the action of intence (actinic) light in different photosynthesizing organisms (green plants, algae, purple and green bacteria) are proof of the universality of this phenomenon. Fluorescence changes are related to changes in the state of the photosynthetic apparatus induced by light. It seems that they are indicative of light — induced transformations of chlorophyll pigments, connected with their participation in the primary photosynthetic reactions.

ЛИТЕРАТУРА

Белл Л. Н. 1954. О механизме действия углекислого газа на поглощение лучистой энергии листьями растений. «Докл. АН СССР», **95**, 669.

Ерохин Ю. Е. и Красновский А. А. 1963. Изучение состояния и превращений пигментов в пурпурных и зеленых фотосинтезирующих бактериях. «Биофизика», 8, 446.

Карапетян Н. В. 1963. Исследование световых превращений хлорофилла в фотосинтезирующих организмах методом дифференциальной спектрофотометрии. Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. М., Ин-т биохимии АН СССР.

Карапетян Н. В. и Красновский А. А. 1965. Изменения флуоресценции при измерении дифференциальных спектров зеленых фотосинтезирующих бактерий. «Биофизика», **10**, 242.

Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А. 1963а. Исследование световых превращений хлорофилла методом дифференциальной спектрофотометрии. «Биофизика», 8, 191.

Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф. и Красновский А. А. 1963б. Изменения люминесценции при исследовании дифференциальных спектров фотосинтезирующих организмов. «Докл. АН СССР», **149**, 1428.

Кондратьева Е. Н. 1963. Фотосинтезирующие бактерии. М., Изд-во АН СССР.

Красновский А. А., Войновская К. К. и Кособуцкая Л. М. 1952. Природа естественного состояния хлорофилла в связи со спектральными свойствами его коллоидных растворов и твердых пленок. «Докл. АН СССР», **85**, 389.

Красновский А. А., Ерохин Ю. Е. и Гуляев Б. А. 1963. Температурная зависимость люминесценции бактериовиридина и его состояния в фотосинтезирующих бактериях. «Докл. АН СССР», **152**, 1231.

Красновский А. А., Ерохин Ю. Е. и Хун Юй-цюнь. 1962. Флуоресценция зеленых фотосинтезирующих бактерий и состояние в них бактериовиридина. «Докл. АН СССР», **134**, 1232.

Красновский А. А., Ерохин Ю. Е. и Хун Юй-цюнь. 1962. Флуоресценция агрегированных форм бактериохлорофилла, бактериовиридина и хлорофилла в связи с состоянием пигментов в фотосинтезирующих организмах. «Докл. АН СССР», **143**, 456.

Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. и Войковская К. К. 1953. Активные и неактивные формы протохлорофилла, хлорофилла и бактериохлорофилла в фотосинтезирующих организмах. «Докл. АН СССР», **92**, 1201.

Красновский А. А. и Пашкина Е. В. 1959. Фотохимические и спектральные свойства бактериовиридина зеленых серных бактерий. «Докл. АН СССР», **127**, 913.

Шапошников В. Н., Кондратьева Е. Н., Красильникова Е. Н. и

Раменская А. А. 1959. Зеленые бактерии, использующие органические соединения. «Докл. АН СССР», **129**, 1424.
Чанс Б., Нишимура М. (Chance, Nishimura) 1962. Системы переноса электрона в фотосинтезирующих бактериях, активируемые светом и кислородом. «Тр. V Междунар. биохим. конгресса. (Москва, 10—16/VIII 1961). Механизм фотосинтеза». Симпозиум VI. М., Изд-во АН СССР. 277.
Chance B. 1959. Oxygen-linked absorbancy changes in photosynthetic cells. In: «The photochemical apparatus, its structure and function. Brookhaven, Sympos. Biol.», No. 11, N. Y., 74.
Chance B. a. Nishimura M. 1960. On the mechanism of chlorophyll-cytochrome interaction. The temperature insensitivity of light — induced cytochrome oxidation in *Chromatium*. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», **46**, 19.
Clayton R. K. 1962a. Recent development in photosynthesis. «Bacteriol. Revs», **26**, 1, 151.
Clayton R. K. 1962б. Evidence for the photochemical reduction on coenzyme Q in chromatophores of photosynthetic bacteria. «Biochem. a. Biophys. Res. Communs.», **9**, 49.
Clayton R. K. 1962в. Primary reactions in bacterial photosynthesis. I. Nature of light-induced absorbancy changes in chromatophores; evidence for *a* special bacteriochlorophyll component. «Photochem. Photobiol.», **1**, 201.
Clayton R. K. 1962г. Primary reactions in bacterial photosynthesis. III. Reactions of carotenoids and cytochromes in illuminated bacterial chromatophores. «Photochem. Photobiol.», **1**, 313.
Clayton R. K. 1963. Photosynthesis: primary physical and chemical processes. «Ann. Rev. Plant. Physiol.», **14**, 159.
Coleman J. W. a. Rabinowitch E. I. 1959. Evidence of photoreduction of chlorophyll in vivo. «J. Phys. Chem.», **63**, 30.
Duysens L. N. M. 1952. Transfer of excitation energy in photosynthesis. «Thesis, Univ. Utrecht», Holland.
Duysens L. N. M. 1954. Reversible photo-oxidation of a cytochrome pigment in photosyntesizing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. «Nature», **173**, 692.
Duysens L. N. M. 1957. Investigations in the photosynthetic mechanism of purple bacteria by means of sensitive absorption spectrophotometry. In: «Research in Photosynthesis», N. Y., 164.
Duysens I. N. M. 1959. The path of light energy in photosynthesis. In: «The photochemical apparatus. Its structure and function». Brookhaven Sympos. Biol., N. Y., 10.
Duysens L. N. M., Huiskamp W. J., Vos J. J. a. van der Hart J. M. 1956. Reversible changes in bacteriochlorophyll in purple bacteria upon illumination. «Biochim. et Biophys. Acta», **19**, 188.
Duysens L. N. M. a. Sweep G. 1957. Fluorescence spectrophotometry of pyridine nucleotide in photosynthesizing cells. «Biochim. et Biophys. Acta», **25**, No. 1, 13.
Kok B. 1957. Light induced absorption changes in photosynthetic organisms. «Acta bot. Neerl.», **6**, 316.
Kok B. 1959. Light induced absorption changes in photosynthetic organisms. II. A split-beam difference spectrophotometer. «Plant Physiol.», **34**, 184.
Kok B. a. Hoch G. 1961. Spectral changes in photosynthesis in «Light and Life». The J. Hopkins Press, Baltimore, 397.
Kuntz I. D. Jr., Loach P. A. a. Calvin M. 1964. Absorption changes in bacterial chromatophores. «Biophys. J.», **4**, 227.
Olson J. M. 1959. Fluorometric identification of pyridine nucleotide changes in photosynthetic bacteria and algae. In: «The photochemical apparatus. Its structure and function». Brookhaven Sympos. Biol., No. 11, N. Y., 317.
Olson J. M. a. Chance B. 1960. Oxidation — reduction reactions in the photosynthetic bacterium *Chromatium*. I. Absorption spectrum changes in whole cells. «Arch. Biochem. a. Biophys.», **88**, 26.
Olson J. M., Duysens L. N. M. a. Kronenberg G. H. M. 1959. Spectrofluorometry of pyridine nucleotide reactions in *Chromatium*. «Biochem. et Biophys. Acta», **36**, 125.
Olson J. M. a. Kok B. 1959. Is oxidized bacteriochlorophyll an intermediate in bacterial photosynthesis? «Biochim. et Biophys. Acta», **32**, 278.
Olson J. M. a. Romano C. A. 1962. A new chlorophyll from green bacteria. «Biochim. et Biophys. Acta», **59**, 726.
Olson J. M. a. Sybesma C. 1963. Energy transfer and cytochrome oxidation in green bacteria. In: «Bacterial photosynthesis» (H. Gest-ed.), The Antioch Press, Yellow Springs Ohio, 413.
Rubinstein D., Rabinowitsh E. 1963. Fluorescence and absorption changes in *Chlorella* exposed to strong light: the red band. «Science», **142**, 681.
Smith L. a. Ramirez, J. 1959. Absorption spectrum changes in photosynthetic bacteria following illumination or oxygenation. «Arch. Biochem. Biophys.», **79**, 233.

Stanier R. I. a. Smith J. H. S. 1960. The chlorophylls of green bacteria. «Biochim. et Biophys. Acta», **41**, 478.
Sybesma C. a. Vredenberg F. J. 1963. Evidence for a reaction center P 840 in the green photosynthetic bacterium *Chloropseudomonas ethylicum*. «Biochim. et Biophys. Acta», **75**, 439.
Sybesma C. o. Vredenberg W. J. 1964. Kinetics of light-induced cytochrome oxidation and P-840 bleaching in green photosynthetic bacteria under various conditions. «Biochim. et Biophys. Acta», **88**, 205.
Vredenberg W. J. a. Duysens L. N. M. 1963. Transfer of energy from bacteriochlorophyll to a reaction centre during bacterial photosynthesis. «Nature», **197**, 355.
Vredenberg W. J. a. Duysens L. N. M. 1964. Light-induced oxidation of cytochromes in photosynthetic bacteria between 20 and—170°. «Biochim. et Biophys. Acta», **79**, 456.

Доклады Академии наук СССР
1966. Том 171, № 5

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Н. В. КАРАПЕТЯН, И. Н. КРАХМАЛЕВА,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ИНАКТИВАЦИИ НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ПУРПУРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

При освещении пурпурных фотосинтезирующих бактерий наблюдаются обратимые изменения поглощения в близкой и.-к. области спектра, где расположены главные максимумы поглощения бактериохлорофилла в естественном состоянии связи; при этом обратимо изменяется лишь малая часть (около 2%) бактериохлорофилла ([1]). Предполагается, что эти обратимые изменения поглощения связаны с фотосинтетическими реакциями и могут определяться обратимым фотоокислением бактериохлорофилла ([2, 3]). Возможность обратимого фотохимического окисления бактериохлорофилла кислородом и хинонами в растворах была показана в нашей лаборатории ([4, 5]), причем дифференциальный спектр поглощения в процессе этой реакции не соответствует дифференциальному спектру, наблюдаемому при освещении бактерий, хотя при рассмотрении этих различий следует учесть, что состояние пигмента в клетках отличается от растворов бактериохлорофилла. Изменение поглощения бактериохлорофилла в бактериях может быть связано не только с обратимым фотоокислением и фотовосстановлением, но и с изменением состояния пигмента.

Для получения данных о природе световых изменений поглощения бактериохлорофилла и их связи с фотосинтезом исследовали действие температурной инактивации на дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» пурпурных бактерий, на фотосинтетическую активность бактерий (по скорости включения C^{14}-ацетата) и вид спектров поглощения и флуоресценции бактерий, характеризующих состояние бактериохлорофилла в клетках. Суспензии бактерий в культуральной среде нагревали в водяной бане в течение 45 сек. от 40 до 90° с интервалом в 10°, а также подвергали замораживанию до —196° и оттаиванию. Большую часть опытов проводили с бактериями Rhodopseudomonas sp., в отдельных опытах использовали бактерии Chromatium и хроматофоры, выделенные из обоих видов бактерий. Дифференциальные спектры измеряли на установке, описанной нами ранее ([6]), с интервалом 5 мμ; время освещения импульсным светом 5 сек., «темновой» интервал 1 мин. Суспензии бактерий и хроматофоров освещали и.-к. (через светофильтр ИКС-1) светом лампы накаливания 750 вт, интенсивность и.-к. света находилась в линейной части кривой зависимости изменений поглощения от интенсивности действующего света. На той же установке измеряли интенсивность флуоресценции объекта и индуцированные светом изменения флуоресценции, помещая за объектом светофильтр ИКС-3, выделяющий флуоресценцию бактерий. В этих опытах интенсивность измеряющего света 800 мμ (возбуждающего флуоресценцию) усиливали в 100 раз по сравнению с интенсивностью монохроматического света при измерении дифференциальных спектров. Спектры поглощения записывали на модернизированном спектрофотометре СФ-10 с областью измерения до 920 мμ; спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуорометре, собранном в нашей лаборатории Ю. Е. Ерохиным.

Температурная инактивация фотосинтеза. Опыты, проведенные Е. Н. Кондратьевой и А. Н. Нестеровым, показали, что кратковременное нагревание бактерий Rhodopseudomonas sp. до 50° не сказывается на скорости фотосинтетического усвоения C^{14}- ацетата, при 55° скорость включения резко уменьшается, а при нагревании до 60° и выше происходит полное подавление фотосинтетической активности.

Влияние нагревания на спектры поглощения и флуоресценции бактерий. Нагревание до 60° практически не влияет на спектры поглощения и флуоресценции, хотя клетки при этом теряют способность к фотосинтезу. При 70° происходит некоторое изменение в состоянии бактериохлорофилла, проявляющееся в небольшом падении поглощения при 890 мμ и усилении флуоресценции при 910 мμ. Нагревание же до 80° и выше приводит к значительным изменениям: наблюдается уменьшение поглощения при 890 мμ (без изменений в максимумах при 800 и 865 мμ) и одновременное изменение интенсивности флуоресценции, сопровождающееся коротковолновым сдвигом и расширением полосы флуоресценции, в соответствии с более ранними наблюдениями лаборатории [7].

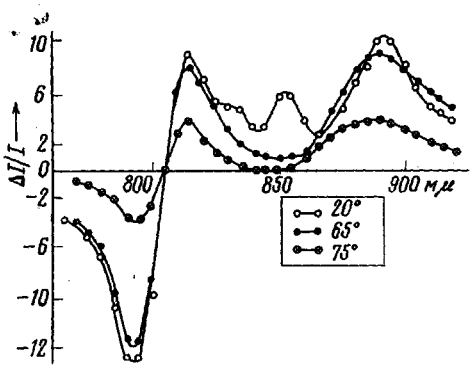


Рис. 1

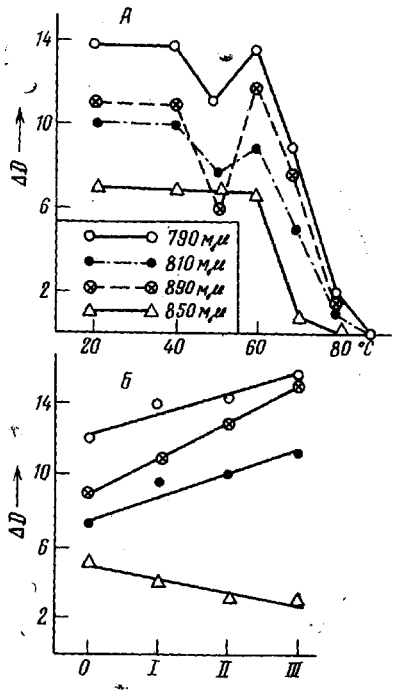


Рис. 2

Рис. 1. Действие предварительного нагревания на дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» пурпурных бактерий Rhodopseudomonas sp.

Рис. 2. Зависимость индуцированных светом изменений поглощения при 790; 810; 850 и 890 мμ у Rhodopseudomonas sp. от предварительного нагревания бактерий (*А*) и от повторного замораживания до —196° и оттаивания бактерий (*Б*). При нагревании до каждой указанной температуры использовалась новая суспензия бактерий.

Измерение дифференциальных спектров поглощения. Нагревание до 60°, подавляющее фотосинтетическую активность бактерий, влияет на вид спектра (рис. 1). В отличие от включения C^{14}-ацетата, изменения поглощения пропадают лишь после нагревания до 80—90°. Многочисленными повторными измерениями показано, что изменения при 850 и при 790; 810 и 890 мμ имеют различный характер (рис. 2*А*). В то время как изменения при 850 мμ уменьшаются постепенно с повышением температуры и исчезают при 70°, кривые изменений поглощения при остальных максимумах имеют более сложный характер: падение величины изменений при 50°, увеличение до максимального значения при 60°, вновь падение при 70° и исчезновение при 80°. Сложный характер зависимости изменений поглощения при 790; 810 и 890 мμ на-

блюдается также в опытах с Chromatium и хроматофорами, выделенными из обоих видов бактерий. В опытах с хроматофорами, при тех же температурных воздействиях максимальная величина изменений поглощения наблюдалась при нагревании до 50, а не до 60°, как в опытах с целыми клетками.

Итак, при температурной инактивации изменения поглощения при 850 и при 790; 810 и 890 мμ показывают различную зависимость. Можно было бы ожидать, что подобное различие будет наблюдаться и при других воздействиях на клетки. При трехкратном повторении цикла замора-

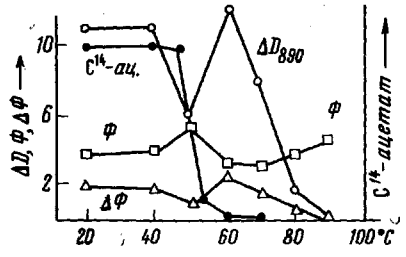


Рис. 3

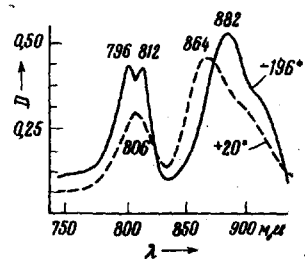


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость скорости светового включения C^{14}-ацетата, интенсивности флуоресценции (Φ) и индуцированных светом изменений поглощения (ΔD) и изменений флуоресценции ($\Delta\Phi$) от нагревания бактерий Rhodopseudomonas sp.

Рис. 4. Спектры поглощения бактерий Chromatium при комнатной температуре и при —196°

живание — оттаивание величина изменений при 850 мμ падала, тогда как изменения при 790; 810 и 890 мμ усиливались (рис. 2*Б*). Следует отметить, что изменения при 850 мμ малы у бактерий, выращенных при интенсивном освещении, и у хроматофоров, хранившихся в течение 48 час. при 0°. По-видимому, изменения при 850 мμ более тесно связаны с структурной целостностью бактериальной клетки, хотя это и не указывает на их связь с процессами фотосинтеза.

В предыдущих работах ([6], [8], [9]) указывалось, что изменения флуоресценции, обусловленные интенсивным освещением, связаны с первичными процессами фотосинтеза и отражают изменения в состоянии фотосинтетического аппарата. Измерения, проведенные с фотосинтетическими бактериями, показали, что зависимость интенсивности флуоресценции и величины световых изменений этой флуоресценции от температуры нагревания также имеет сложный характер, причем кривая изменений флуоресценции подобна кривой изменений поглощения при 890 мμ, тогда как кривая флуоресценции является зеркальным изображением указанных выше кривых (рис. 3). Сходная зависимость изменений поглощения и изменений флуоресценции свидетельствует о тесной связи процессов, ответственных за эти изменения.

Таким образом, фотосинтетическая активность бактерий наиболее чувствительна к нагреванию и исчезает при 60°, т. е. при более низкой температуре, чем наблюдаемые изменения поглощения и флуоресценции, указывающие на состояние бактериохлорофилла в клетках. Существенно, что наибольшие изменения поглощения бактериохлорофилла in vivo наблюдаются после нагревания до 60°, т. е. в условиях полного подавления фотосинтетической активности и отсутствии заметных изменений состояния пигмента, что соответствует литературным данным ([10]). Можно предположить, что температурная инактивация какой-нибудь из ферментативных реакций фотосинтеза ведет к накоплению фотохимически измененных молекул пигмента из-за блокирования цепи переноса электронов.

Нагревание до более высокой температуры ведет к постепенному разрушению пигмент-белкового комплекса и активного центра фотореакций.

Сходная температурная зависимость изменений поглощения при 790; 810 и 890 мμ позволяет предположить, что эти изменения или обусловлены превращениями одной и той же формы бактериохлорофилла П-890, или, скорее, отражают превращения разных форм пигмента, например, в результате фотодезагрегации ([11]), при которой уменьшение содержания более агрегированных молекул (падение поглощения при 890 мμ) сопровождается увеличением содержания менее агрегированных или мономерных форм (появление максимума при 790 мμ). Негативный максимум при 810 мμ в дифференциальном спектре является, по-видимому, дополнительным к максимуму при 890 мμ. Обнаружение сложной структуры максимума при 800 мμ в низкотемпературном спектре Chromatium (рис. 4), в котором проявляются пики при 796 и 812 мμ, обусловленные, очевидно, разным типом упаковки, позволяет предположить, что появление максимумов в дифференциальном спектре поглощения «свет — темнота» пурпурных бактерий может быть связано с перестройкой состояния пигментной системы, вызывающей перераспределение интенсивностей максимумов при 796 и 812 мμ под действием света.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения поглощения при 850 мμ не связаны с изменениями при 890 мμ, т. е. с превращениями активного центра П-890. Можно предположить, что эти изменения обусловлены световыми превращениями активной части формы Б-850. Поскольку спектральные различия разных форм бактериохлорофилла в клетках бактерий связаны с различными типами агрегации пигментов на белково-липоидных структурах хроматофоров, на очереди выяснение участия разных форм бактериохлорофилла в реакциях фотосинтеза, которое может не ограничиваться «светосбором» — миграцией энергии возбуждения к «длинноволновому» активному центру.

Приносим благодарность Е. Н. Кондратьевой, любезно предоставившей нам культуры бактерий.

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

Поступило
29 VIII 1966

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] L. N. M. Duysens, Thesis, Utrecht, 1952. [2] L. N. M. Duysens, W. J. Huiskamp et al., Biochim. et biophys. acta, 19, 188 (1956). [3] R. K. Clayton, Photochem. Photobiol., 1, 201 (1962). [4] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [5] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [6] Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Биофизика, 8, 191 (1963); ДАН, 144, 1428 (1963). [7] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952). [8] Н. В. Карапетян, Бюлл. МОИП, отд. биол., 69, 157 (1964). [9] Н. В. Карапетян, А. А. Красновский, Биофизика, 10, 242 (1965); Тр. МОИП, 24, 94 (1966). [10] W. Arnold, R. K. Clayton, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 46, 769 (1960). [11] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, 92, 201 (1953).

ФОТОПРОЦЕССЫ В ПИГМЕНТАХ ТИПА ХЛОРОФИЛЛА

А. А. Красновский

ФОТОХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

При фотосинтезе растений энергия квантов света, поглощенных пигментной системой, преобразуется в потенциальную химическую энергию продуктов фотосинтеза — органических соединений и молекулярного кислорода. В цепи реакций, следующих за поглощением кванта света молекулой хлорофилла, образуются все более устойчивые и долгоживущие соединения, «запасающие» энергию кванта. Так, длительность жизни синглетных возбужденных состояний составляет приблизительно 10^{-8} сек., триплетных — 10^{-3} сек., первичных фотопродуктов — 10^{-2}—10^{-3} сек., промежуточных соединений, участвующих в биохимических циклах — вероятно 10^{-1} сек. и долгоживущих продуктов, выходящих из углеродного цикла, — 10^{2}—10^{4} сек.

Последовательность элементарных стадий цепи реакций фотосинтеза можно представить следующим образом: при поглощении кванта света хлорофиллом его молекула приходит в возбужденное состояние; происходит миграция энергии возбуждения между компонентами пигментной системы; происходит элементарный фотохимический процесс; фотопродукты включаются в цепь реакций фотосинтетического переноса электрона; образуются долгоживущие соединения, «запасающие» энергию света, — аденозинтрифосфат, и восстановленные пиридиннуклеотиды, входящие в углеродный цикл с конечным образованием сахаров и других продуктов фотосинтеза.

Один из путей, ведущих к выяснению природы начальных фотофизических и фотохимических реакций фотосинтеза, заключается в исследовании пигментов растений в изолированных системах, вне структуры фотосинтезирующих органов. А. Н. Теренин писал в 1947 г. [55] «. . . вопрос о физической или химической природе первичного акта является для проблемы фотосинтеза общим с фотохимией красителей. В нем нет специфических особенностей, присущих только биохимической системе». В настоя-

щей статье излагаются некоторые аспекты исследований фотохимических свойств хлорофилла и его аналогов, проведенных в лаборатории автора.

Химические свойства возбужденных состояний

Общепринятая ныне схема энергетических уровней органических молекул применима для хлорофилла и его аналогов (рис. 1). Молекула хлорофилла в темноте находится на нижнем синглетном состоянии S; заселенность колебательных уровней на схеме не изображается. В свете современных исследований отдельные полосы в спектре поглощения молекулы хлорофилла принадлежат различным электронным переходам; на схеме изображены д(перехода, соответствующие красному ($S \rightarrow S^*$) и синему ($S \rightarrow S_1^*$) максимумам поглощения молекулы хлорофилла. Хорошо изучены безызлучательные переходы с более высоких возбужденных уровней на нижний уровень S с испусканием кванта света флуоресценции ($S^* \rightarrow S$), безызлучательный переход с образованием триплетного состояния ($S^* \rightarrow T$) и поглощение кванта света долгоживущим состоянием T с образованием возбужденного состояния T^*, несущего энергию двух квантов света.

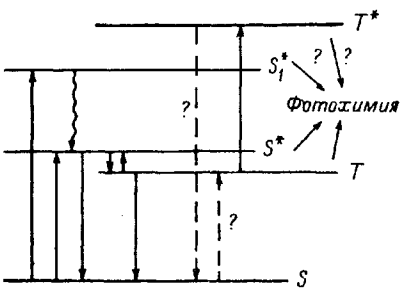


Рис. 1. Схема электронных уровней хлорофилла.

— — изученные переходы; — — — — неизученные процессы.

Об образовании метастабильного триплетного состояния хлорофилла свидетельствует фосфоресценция хлорофилла *в* в замороженных до —196° системах [60, 71] и наблюдение переходов $T \rightarrow T^*$, измеренных с помощью импульсной спектроскопии при комнатной температуре [89, 68, 63].

Недавно удалось измерить полосу электронного резонан(триплетных состояний хлорофилла *в* в спирте при —196°; наряду с этим наблюдалось образование радикальных форм [51] (рис. 2).

Прямой маловероятный переход $S \rightarrow T$ должен проявляться в виде полосы поглощения в близкой инфракрасной области в концентрированных растворах хлорофилла. Нам удалось наблюдать такие полосы поглощения в области 720—850 ммк [27], но больше вероятности в том, что они принадлежат агрегированным формам пигмента.

Таким образом, спектроскопические наблюдения показывают образование всех типов возбужденных соединений, изображенных на схеме: S^*, S_1^*, T и T^*. Наиболее важно получить сведения

о химических свойствах возбужденных состояний, коренным образом отличающихся от свойств молекулы в нижнем невозбужденном состоянии S. По сути, все типы возбужденных состояний — это новые неустойчивые активные молекулярные конфигурации, несущие большую часть энергии кванта света. Они способны претерпевать химическое превращение либо отдавать свою энергию (электрон) подходящему акцептору, т. е. участвовать в процессах миграции энергии [57]. А. Н. Теренин [54, 98] в 1943 г. показал, что роль триплетных состояний в фотохимии определяется их большой длительностью жизни и химической ненасыщенностью (свойствами бирадикала) из-за наличия неспаренного электрона.

В молекуле пигмента при включении в цепь сопряжения гетероатома с неподеленной электронной парой (азот, кислород) возможны наряду с $\pi \rightarrow \pi^*$-переходами в сопряженной системе связей также $n \rightarrow \pi^*$-переходы, в результате которых электронная вакансия («дырка») может быть локализована на атоме азота или кислорода. Наличие адденда, связывающего неподеленную электронную пару (наиболее отчетливо — протона в кислых средах), приводит к снижению вероятности $n \rightarrow \pi^*$-перехода [81]. До сих пор неясно, какие полосы поглощения в спектре хлорофилла можно приписать $n \rightarrow \pi$-переходу. Предположение Каша и Бекера [71] о том, что этим переходам отвечают полосы, появляющиеся в неполярных растворителях, нельзя считать обоснованным; известно, что неполярные среды благоприятствуют агрегации и предполагаемые $n \rightarrow \pi$-переходы в действительности являются полосами поглощения агрегированных форм (димеров).

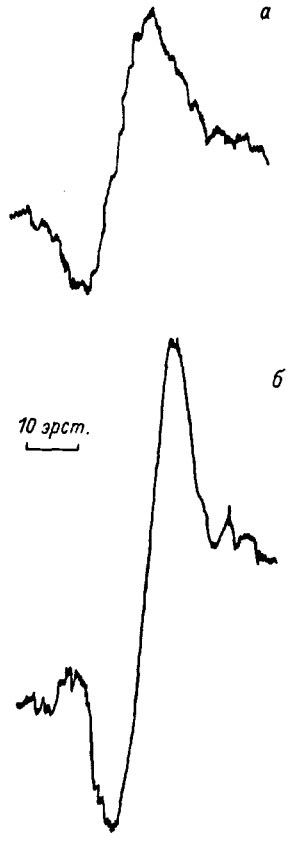


Рис. 2. Спектры ЭПР при освещении растворов хлорофилла в спирте при —196°.

а — триплетное состояние (поле 1600 эрст.); *б* — радикальное состояние (поле 3300 эрст.).

Наличие полосы поглощения может быть связано с обратимым переносом электрона с участием координационно связанного адденда. Так, полосы поглощения сольватированных ионов давно рассматривались школой Дж. Франка [79] как спектры переноса электрона. Таким же образом интерпретируются спектры светочувствительных комплексов неорганических ионов с органическими молекулами [8].

Б. Я. Даин [9] рассматривает спектр железного комплекса хлорофилла как внутримолекулярный спектр переноса заряда. Однако до сих пор достоверно не установлена возможность интерпретации отдельных полос в спектре магниевого комплекса хлорофилла, относящихся к комплексам с переносом заряда [58]. Известные полосы поглощения в спектрах хлорофилла следует приписать электронным переходам с колебательными подуровнями [94]. Для суждения о химических свойствах возбужденных синглетных и триплетных молекул исследуется влияние посторонних молекул на среднюю длительность жизни. Тушение флуоресценции и фосфоресценции акцепторами и донорами электрона может рассматриваться как электронный обмен и является первой стадией химического процесса [56, 103]; далее следует образование более устойчивых фотопродуктов.

Тушение флуоресценции

Влияние посторонних молекул на флуоресценцию хлорофилла и его аналогов изучено в ряде работ [82, 77, 20, 90, 10, 11, 15].

В нашей лаборатории недавно изучалась связь между структурой аналогов хлорофилла, их фотохимическими свойствами и тушением флуоресценции. Представляло интерес выяснить влияние каротина на эффект тушения флуоресценции пигментов посторонними молекулами в связи с блокирующим действием полиеновых соединений на фотохимические реакции хлорофилла [41, 73, 42].

Результаты опытов по тушению флуоресценции пигментов в ацетоне кислородом приведены в табл. 1. Величина тушения выражена отношением интенсивности начальной флуоресценции Φ_0 к флуоресценции на воздухе $\Phi_в$ и при насыщении раствора кислородом $\Phi_к$ (ошибка измерения ± 0.05).

Таблица 1

Пигмент	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$
Бактериовиридин	1.08	1.30
Бактериохлорофилл	1.09	1.37
Хлорофилл *а*	1.08	1.30
Хлорофилл *в*	1.09	1.30
Протохлорофилл	1.06	1.20
Феофитин *а*	1.07	1.40

Из данных табл. 1 видно, что в ряду аналогов хлорофилла не наблюдается существенной разницы в тушении флуоресценции кислородом.

В табл. 2 приведены значения концентраций *p*-бензохинона, соответствующих «половинному» тушению флуоресценции исследованных пигментов. Тушение феофитина *а*, хлорофилла *в* и протохлорофилла требует несколько большей концентрации тушителя, чем для хлорофилла *а* и бактериовиридина. Результаты свидетельствуют о том, что возбужденные молекулы более окисленных пигментов слабее взаимодействуют с молекулами-окислителя — хинона. Тушение в пиридине всегда несколько слабее и требует более высокой концентрации тушителя.

Тушение флуоресценции трудно приписать изменению концентрации хлорофилла в результате необратимой фотохимической реакции с тушителем, так как за время опыта оптическая плотность в максимуме поглощения пигментов заметно не изменяется.

Таблица 2

Пигмент	$C_{1/2}$, М/л
Бактериовиридин	0.092
Хлорофилл *а*	0.125
Бактериохлорофилл	0.128
Протохлорофилл	0.198
Хлорофилл *в*	0.182
Феофитин *а*	0.210

Нами изучалась способность разных хинонов тушить флуоресценцию хлорофилла *а*. Использовались *p*-бензохинон, как наиболее сильный окислитель ($E_0=+0.7$ в), 2,3-диметокси-5-метилбензохинон, 2-метил-1,4-нафтохинон ($E_0=+0.42$ в) и антрахинон ($E_0=-0.2$ в). При действии этих соединений на тушение флуоресценции наблюдается та же закономерность, что и при фотореакции хлорофилла с изученными соединениями [12]. Так, реакция обратимого фотоокисления хлорофилла *а* идет наиболее глубоко с *p*-бензохиноном и практически не идет с антрахиноном.

Влияние каротина на эффект тушения флуоресценции. Исследования сводились к измерению интенсивности флуоресценции в присутствии тушителя и разных количеств каротина. Ранее мы нашли, что каротин не тушит флуоресценцию хлорофилла в пиридине при возбуждении в «красной» полосе поглощения [42]. Тушителями флуоресценции служили в опытах с хлорофиллом *p*-бензохинон и кислород, а в опытах с феофитином — фенилгидразин (табл. 3). Результаты этих опытов показали, что в присутствии каротина уменьшается эффект туше-

Таблица 3

Концентрация каротина	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$
Без каротина	1.06	1.21
$1.5 \cdot 10^{-4}$	1.00	1.12
$5 \cdot 10^{-4}$	1.00	1.05

ния флуоресценции хлорофилла всеми перечисленными соединениями.

Известно, что каротин тормозит фотохимические реакции хлорофилла и его аналогов, поэтому представляло интерес выяснить, как влияют другие соединения, тормозящие фотовосстановление хлорофилла, на эффект тушения флуоресценции. В одном из таких опытов был использован феназин — соединение, эффективно блокирующее фотовосстановление хлорофилла. Однако это соединение не влияет на величину тушения флуоресценции хлорофилла *p*-бензохиноном.

Известно защитное действие каротина при реакциях фотоокисления, обратимого фотовосстановления [42, 73] и фотофеофитинизации [49, 46] хлорофилла в растворах. Элементарный механизм действия каротина в этих реакциях до сих пор не установлен с полной определенностью. Ливингстон и Фуджимори, используя технику импульсной спектроскопии, показали возможность тушения каротином триплетного возбужденного состояния хлорофилла [80]. Наши опыты показали, что каротин не тушит флуоресценцию хлорофилла, возбуждаемую красным светом [43, 44], т. е. не реагирует с синглетным возбужденным состоянием хлорофилла.

Механизм найденного блокирующего действия каротина неясен; эффект наблюдается с тушителями разной химической природы — кислородом, хиноном, фенилгидразином, и поэтому трудно объяснить образованием комплексов каротина с тушителем. В опытах Литвина и Гуляева установлено образование комплексов хлорофилла с каротином в пленках и монослоях [48]. Поэтому требует исследования образование комплексов каротина с хлорофиллом в растворе и дезактивации (каротином) триплетных состояний пигмента, возможно, образующихся в акте тушения флуоресценции.

Резюмируя полученные данные, можно прийти к следующим выводам: кислород практически одинаково тушит флуоресценцию всех исследованных пигментов; парадоксально более сильное тушение феофитина, что не соответствует скорости фотоокисления изученных пигментов кислородом. Здесь возможен «физический»

механизм тушения, связанный с парамагнитными свойствами молекулы кислорода, в согласии с работами А. Н. Теренина [98]. Хинон несколько сильнее тушит наиболее восстановленные пигменты и менее сильно — более окисленные, однако здесь нет корреляции с фотохимическим окислением этих пигментов хиноном.

В наших опытах, например, феофитин не реагировал с хиноном, тогда как тушение флуоресценции феофитина хиноном значительно и мало отличается от тушения хлорофилла. Тушение флуоресценции хлорофилла различными хинонами соответствует глубине обратимого фотоокисления хлорофилла этими соединениями, что согласуется с распространенной концепцией, заключающейся в том, что акт тушения флуоресценции пигментов рассматривается как результат обмена электроном между возбужденной молекулой пигмента и молекулой тушителя [56, 103, 104]. Согласно этим представлениям, в комплексе возбужденный пигмент—тушитель происходит обратимый перенос электрона. В благоприятных условиях возможен распад комплекса, ведущий к образованию первичных фотопродуктов, диффундирующих в толщу растворителя. При этом требует выяснения, не связано ли тушение флуоресценции хлорофилла окислителями с промежуточным переходом пигмента в метастабильное триплетное состояние.

Тушение метастабильных (триплетных), возбужденных состояний

О судьбе триплетных состояний можно судить с помощью измерения тушения фосфоресценции [62].

Фосфоресценция и сигнал ЭПР триплетного хлорофилла наблюдаются в замороженных твердых системах, когда посторонняя молекула не может подойти к триплетной молекуле пигмента, жестко «распятой» на молекулах матрицы — растворителя. При этом возникновение сигнала ЭПР не зависит от наличия кислорода в системе [51]; либо триплетные молекулы не столь реакционно способны, как это предполагалось ранее, либо кислород не может подойти к молекуле при замораживании среды. Изучение тушения триплетных молекул при комнатной температуре возможно путем применения импульсной спектроскопии [63].

В лаборатории Ливингстона [87] было установлено, что длительность жизни триплетов резко уменьшается в присутствии окислителей — кислорода, динитробензола, хинона, а также каротина и ретинена. Восстановители — фенилгидразин, аллилтиомочевина и аскорбиновая кислота относительно мало влияли на длительность жизни триплетов. В опытах Чибисова и Карякина триплетные состояния также более активно реагируют с окислителями и менее активно — с восстановителями [22, 66—68].

Таким образом, оба известных типа возбужденных состояний хлорофилла эффективно тушатся окислителями и весьма малоэффективно — восстановителями. Пожалуй, единственно известное различие в свойствах обоих типов возбужденных состояний связано с действием каротина, который не тушит флуоресценцию хлорофилла, но эффективно дезактивирует триплетное состояние. Тушение реализуется в комплексе возбужденный пигмент—тушитель, предшествуя «истинному» фотохимическому процессу, когда партнеры, получившие и отдавшие электрон, расходятся в виде самостоятельно диффундирующих молекулярных образований.

Посмотрим теперь, как реализуется фотохимический процесс при реакции возбужденных пигментов с донорами и акцепторами электрона, ведущими к образованию более долгоживущих фото продуктов.

Порре и Рабинович [92] нашли, что хлорофилл в метаноле в вакууме способен к обратимому выцветанию под действием сильного света. Сходные явления наблюдались в опытах Ливингстона [88]. Эффекты обратимого выцветания, по-видимому, могут быть связаны с обратимым окислением или восстановлением хлорофилла.

Обратимое фотохимическое восстановление

Способность хлорофилла, его аналогов и производных к реакции обратимого фотовосстановления — обратимому фотохимическому взаимодействию с восстановителями — донорами электрона была обнаружена нами в 1948 г. [24, 29]. При фотореакции образуются восстановленные формы пигментов, различающиеся по своим спектральным свойствам и реакционной способности в зависимости от числа воспринимаемых электронов и протонов и условий кислотно-основного равновесия в среде. После выключения света реакция идет обратно с различной скоростью в зависимости от природы среды, свойств донора электрона и наличия в системе акцептора электрона. Воспринимаемый в первичном акте электрон, по-видимому, делокализован в системе сопряженных двойных связей молекулы пигмента; локализация атомов водорода в восстановленных формах не установлена с полной определенностью и является предметом дискуссии [7, 53, 83, 96].

При фотовосстановлении в пиридине образуются достаточно устойчивые окрашенные фотовосстановленные формы: у хлорофилла и бактериовиридина красного цвета, у бактериохлорофилла — зеленого. Фотовосстановление в спирте обычно ведет к обратимому падению «красного» максимума поглощения без образования окрашенных восстановленных форм.

Фотовосстановление наблюдается также и в кислых средах: например, порфирины восстанавливаются аскорбиновой кислотой в водном растворе серной кислоты с образованием «красной» фотовосстановленной формы. При освещении порфиринов в кислом

замороженном спирте наблюдается синглетный сигнал ЭПР [52], который следует приписать ион-радикалу — восстановленной спиртом молекуле пигмента. Течение реакции зависит от свойств среды. Так, мы наблюдали, что в диоксане восстановление хлорофилла и других пигментов аскорбиновой кислотой происходит и в отсутствие света. Применение метилвиологена в качестве редокс-индикатора позволило показать различия восстановительного потенциала аскорбиновой кислоты в пиридине в зависимости от количества воды в этом растворителе [36].

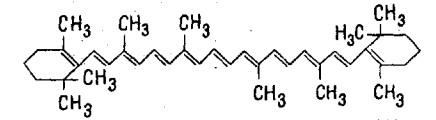
В качестве доноров электрона при фотовосстановлении пигментов используются аскорбиновая кислота и другие диэнолы, фенилгидразин, соединения двухвалентного железа. Любопытно, что восстановленные пиридиннуклеотиды (НАД·H_2) и их аналог — N-бензилникотинамид (БНА·Н) не приводят к фотовосстановлению хлорофилла при освещении красным светом, т. е. в области поглощения хлорофилла, но приводят к фотовосстановлению хлорофилла при возбуждении близким ультрафиолетом в области поглощения НАД·H_2 при 340 ммк [33—35]. При этом образуются «красная» восстановленная форма хлорофилла, а НАД·H_2 окисляется необратимо. Освещение пиридинового раствора НАД·H_2 в вакууме линиями ртути 365 ммк ведет к образованию фотопродуктов, не разрушающихся при освещении и способных в темноте к восстановлению хлорофилла, сафранина и других соединений [35].

О механизме фотовосстановления. Следуя схеме Михаэлиса, мы предположили, что при реакции образуются ионные и неионные формы семихинонов и валентно насыщенные лейко-формы [24].

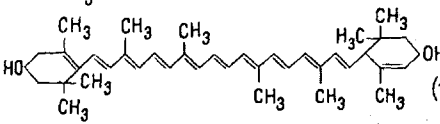
Евстигнеев и Гаврилова [16], изучая механизм фотовосстановления, нашли, что двухступенчатый механизм реакции особенно удобно наблюдать в случае феофитина; проводя фотовосстановление при —40°, удается наблюдать спектроскопически образование «первичной» формы пигмента, долгоживущей в этих условиях и переходящей при нагревании в более устойчивую «красную» форму. В серии опытов было показано, что эта «первичная» форма определяет появление фотопотенциала и фотопроводимости в растворах хлорофилла и его аналогов [13, 14]. В измерениях Чибисова [66] с помощью импульсной спектроскопии было показано, что в системе феофитин—аскорбиновая кислота при —40° образуется «первичная» форма с поглощением при 460—470 ммк с длительностью жизни в несколько миллисекунд. Это указывает на то, что более долгоживущая «первичная» форма феофитина, изученная Евстигнеевым, образуется из первичного ион-радикала.

Для прямых определений свободных радикалов, образующихся при реакции, применялись методы инициирования цепной полимеризации и измерения ЭПР. Так, система хлорофилл—

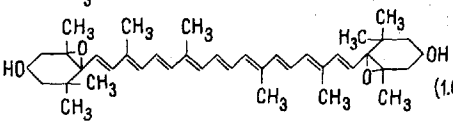
Группа 1



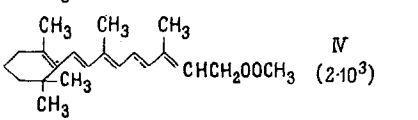
I ($2 \cdot 10^5$)



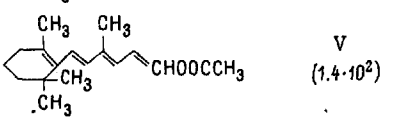
II ($1.8 \cdot 10^5$)



III ($1.6 \cdot 10^5$)



IV ($2 \cdot 10^3$)



V ($1.4 \cdot 10^2$)



VI (1.0)

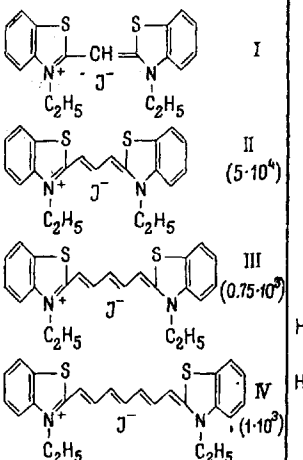


VII ($1.9 \cdot 10^2$)



VIII (1.0)

Группа 2



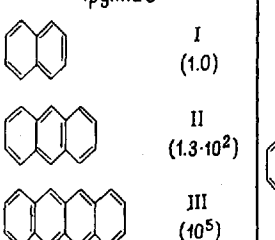
I

II ($5 \cdot 10^4$)

III ($0.75 \cdot 10^5$)

IV ($1 \cdot 10^3$)

Группа 3

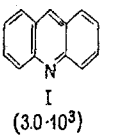


I (1.0)

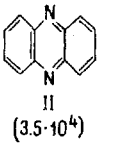
II ($1.3 \cdot 10^2$)

III (10^5)

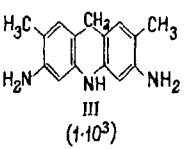
Группа 4



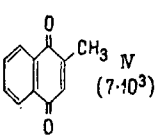
I ($3.0 \cdot 10^3$)



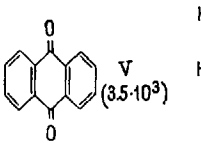
II ($3.5 \cdot 10^4$)



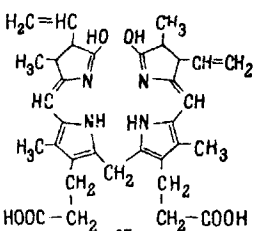
III ($1 \cdot 10^3$)



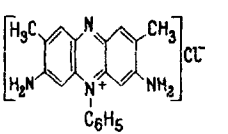
IV ($7 \cdot 10^3$)



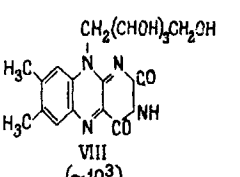
V ($3.5 \cdot 10^3$)



VI ($3.5 \cdot 10^3$)



VII ($3 \cdot 10^3$)



VIII ($\sim 10^3$)

донор электрона энергично фотосенсибилизирует полимеризацию метилметакрилата, и поэтому реакция сопровождается образованием свободных радикалов; освещение системы в резонаторе ЭПР-спектрометра приводило к появлению сигнала [40].

Линшитц и Вейссман [85] нашли, что «красная» восстановленная форма не дает сигнала ЭПР и поэтому не является свободным радикалом.

С помощью метода ЭПР удалось найти сигнал монодегидроаскорбиновой кислоты, образующейся при реакции [4]. Освещая замороженные системы, содержащие пигмент и растворитель, удалось измерить синглетный сигнал, по-видимому, обязанный переходу электрона от молекулы матрицы-растворителя к возбужденной молекуле пигмента [52].

С фотовосстановленными формами хлорофилла и его аналогов реагирует широкий круг соединений — пиридиннуклеотиды и N-бензилникотинамид, соединения окисного железа, различные красители (сафранин *Т*, рибофлавин, метиловый красный и др.) хиноны, кислород.

При фотореакции в тройной системе донор электрона—пигмент—акцептор наблюдается сенсибилизированное восстановление молекул-акцепторов и блокирование реакции фотовосстановления.

Обнаруженное резкое торможение фотовосстановления хлорофилла каротином [12, 45] не укладывалось в описанную схему, поскольку нам не удалось обнаружить продуктов фотосенсибилизированного восстановления каротина. Эти опыты привели к систематическому изучению влияния полиенов и циклических соединений с различной структурой на фотовосстановление хлорофилла. Мы изучали влияние соединений следующих классов: каротиноидов и их аналогов с различной длиной сопряженных двойных связей; молекул полиметиновых красителей, в которых полиеновая цепь сочетается с гетероциклом; полициклических углеводородов (нафталина, антрацена, тетрацена); гетероциклических соединений, содержащих в цепи сопряжения атомы азота и кислорода (эти соединения лежат в основе структуры обратимо восстанавливающихся красителей).

Влияние полиенов [42]. Исследовалось действие каротиноидов и некоторых полиенов, имеющих разное число

Рис. 3. Структура различных соединений, исследованных в качестве акцепторов электрона.

Эффективность тормозящего действия исследованных соединений (цифры в скобках) охарактеризована условным отношением $\frac{k}{k_1 c}$, где k — скорость фотовосстановления в контрольном опыте, выраженная отношением $\frac{\Delta D}{\Delta t}$ на прямолинейном участке кривой (обычно первые 3—6 мин.); k_1 — скорость фотовосстановления в присутствии исследуемых веществ; c — концентрация М/л исследуемого вещества (ингибитора). Чем больше абсолютная величина $\frac{k}{k_1 c}$, тем больше эффективность тормозящего действия. Единица означает отсутствие тормозящего действия.

сопряженных двойных связей. Для этого были использованы следующие вещества (в скобках номера формул в таблице, группа 1): каротин (I) — 11 сопряженных двойных связей, лютеин (II) — 10, виолаксантин (III) — 9, витамин А ацетат (IV) — 5, метиловый эфир-1,1,3-триметилциклогексанил-3-метил-1,35-гептатриен кислота (V) — 4, аллооцимен (VI) — 3, β-ионон (VII)— 2 и кротоновая кислота (VIII) — 1 (рис. 3).

Уменьшение числа сопряженных двойных связей в молекуле вещества ведет к ослаблению эффекта действия. Так, каротин, лютеин и виолаксантин, имеющие соответственно 11, 10 и 9 сопряженных двойных связей, существенно тормозят фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой в концентрации 10^{-5} М/л, соединения с более короткой полиеновой цепочкой обладают меньшим тормозящим эффектом, их действие появляется только в концентрации 10^{-3} М/л, а аллооцимен, имеющий три сопряженные двойные связи в молекуле, не оказывает заметного действия даже в концентрации 10^{-1} М/л.

Некоторый тормозящий эффект в опыте с β-иононом, имеющим две сопряженные двойные связи, по-видимому, объясняется наличием в молекуле кетогруппы. Аналогичная зависимость защитного действия каротиноидов с различным числом сопряженных двойных связей на фотоокисление хлорофилла наблюдалась в работах Клесса и Накаяма [72, 73].

Процесс фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой можно проследить также путем измерения потенциала инертного металлического электрода, опущенного в реагирующий раствор. Были поставлены опыты по выяснению влияния каротина и тетрацена на фотопотенциал системы хлорофилл—аскорбиновая кислота с использованием методики, принятой в нашей лаборатории [15]. Каротин и тетрацен полностью тормозят появление фотопотенциала, что соответствует их действию на фотовосстановление.

Полиметиновые красители. Эти соединения характеризуются наличием в молекуле сочетания гетероцикл с полиеновой цепью. Изучались производные диэтилтиоцианин-йодида, отличающиеся друг от друга длиной полиеновой цепи (рис. 3, группа *2*).

Соединение II тормозит фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой в концентрации 10^{-4} М/л, тогда как соединение I в той же концентрации несколько ускоряет этот процесс.

Соединения III и IV, имеющие более длинную полиеновую цепочку, обладают большим тормозящим эффектом. Их действие проявляется уже в концентрации $2.5 \cdot 10^{-5}$ М/л. Следовательно, и в случае полиметиновых красителей эффект тормозящего действия возрастает с увеличением числа сопряженных двойных связей в молекуле красителя.

Во всех опытах наблюдалось сенсибилизированное хлорофиллом фотовосстановление перечисленных соединений, о чем свидетельствовало резкое падение оптической плотности в максимумах поглощения исследованных веществ и наличие индукционного периода в кривых, отражающих процесс фотовосстановления хлорофилла. Накопление фотовосстановленной «красной» формы хлорофилла происходило только после того, как произошло полное восстановление молекул красителя, являющихся в данном случае акцепторами электрона.

Полициклические углеводороды. Испытывались нафталин I, антрацен II и тетрацен III (рис. 3, группы *3*). Тетрацен существенно замедляет фотовосстановление хлорофилла концентрации 10^{-5} М/л; антрацен обладает гораздо меньшим тормозящим эффектом. Его действие при тех же условиях проявляется только при концентрации 10^{-2} М/л. В присутствии нафталина в концентрации 10^{-2} М/л фотовосстановление протекает с такой же скоростью, что и в контрольном опыте без акцептора. Таким образом, и в этом случае наличие большого числа сопряженных двойных связей в молекуле углеводорода ведет к увеличению тормозящего эффекта.

Полученные нами результаты о действии ароматических углеводородов на фотовосстановление соответствуют данным Шварца [97], исследовавшего относительную реакционность ароматических соединений по отношению к метильному радикалу. В опытах Шварца было показано чрезвычайно активное действие тетрацена, гораздо меньшая активность антрацена и совсем малая — нафталина, что соответствует действию этих соединений на фотовосстановление хлорофилла. Это сопоставление указывает на то, что тетрацен может играть роль соединения, реагирующего с ион-радикалом фотовосстановленного хлорофилла.

Гетероциклические соединения. Из этой группы соединений нами были изучены (рис. 3, группа *4*): акридин I, феназин II, акридиновый желтый III, менадион IV, антрахинон V, билирубин VI, сафранин VII и рибофлавин VIII. Эти соединения характеризуются наличием в молекуле сопряженных двойных связей и атомов азота и кислорода, находящихся в цепи сопряжения. Все перечисленные соединения в той или иной степени тормозят фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой. Обычно соединения, имеющие в своей молекуле большее число гетероатомов, обладают более сильным тормозящим действием, например феназин сильнее тормозит фотовосстановление хлорофилла, чем акридин.

Возможны следующие механизмы блокирования реакции перечисленными соединениями:

1) дезактивация синглетных и триплетных соединений хлорофилла; однако среди изученных соединений лишь полиены дез-

активируют триплеты и большая часть изученных соединений не тушит флуоресценцию хлорофилла;

2) реакция обратимого фотоокисления возбужденного хлорофилла молекулами-акцепторами, конкурирующая с фотовосстановлением; однако большая часть изученных соединений не тушит флуоресценцию хлорофилла (см. выше).

3) реакция с фотовосстановленными формами хлорофилла.

Можно предположить, что каротин и тетрацен обратимо воспринимают электрон фотовосстановленного хлорофилла, не будучи в состоянии долго «удержать» лишний электрон в молекуле с образованием более устойчивых валентнонасыщенных соединений, тогда как в случае циклических соединений, обладающих в цепи сопряжения гетероатомами (азота, кислорода, серы) восприятие электрона системой сопряженных связей приводило к образованию более стабильных продуктов восстановления (в конечном счете, валентнонасыщенных) путем последующего связывания протона вакантной электронной парой гетероатома с последующей дисмутацией образуемых семихинонов. Примером, иллюстрирующим такой механизм, служит поведение полиметиновых красителей, у которых полиеновая цепочка соединена с гетероциклом. В отличие от каротиноидов здесь наблюдается сенсибилизированное восстановление красителя; воспринимаемый от хлорофилла электрон стабилизируется в молекуле красителя за счет связывания протона атомами азота гетероцикла. Благодаря особенностям структуры молекулы-акцептора и наличию в цепи сопряжения атомов азота и кислорода, способных к восприятию протона и последующей дисмутации, происходит захват фотохимически мобилизованного электрона.

Итак, надежно действующая электронная «ловушка» представляет собой сочетание полиеновой цепочки с гетероциклом. Эти опыты позволяют понять особенность структуры соединений, определяющую их эффективное действие в качестве «ловушек» фотохимически мобилизованного электрона. Такими соединениями служат пиридин- и флавиннуклеотиды, производные феназина, производные нафтахинона (витамин К), а также соединения, в которых сочетаются полиеновая цепь с производными хинона (коэнзим Q). Все они не только воспринимают электрон, но могут образовывать более устойчивые и долгоживущие восстановленные соединения, которые служат «резервуаром» восстановительной силы и используются при ферментативных стадиях фотосинтеза. Соединения, обладающие лишь цепью сопряженных связей и эффективно воспринимающие электрон, не могут удержать его достаточно долго, что определяет их как промежуточных переносчиков электрона. К таким соединениям можно отнести каротиноиды и ненасыщенные липоиды в структурах митохондрий и гранул хлоропластов.

Фотофеофитинизация

Реакция феофитинизации представляет собой замещение центрального атома магния в молекуле пигмента на два атома водорода, обычно наблюдающееся в кислых средах

$$\text{хлорофилл} + 2H^+ \longrightarrow \text{феофитин} + Mg^{2+}.$$

Скорость образования феофитинов из соответствующих магниевых комплексов — аналогов хлорофилла — соответствует убывающему ряду: бактериовиридин—хлорофилл *а*—протохлорофилл—бактериохлорофилл—хлорофилл *в* [46, 49].

Различия в степени восстановления полуизолированной двойой связи в молекуле пигмента не оказывают влияния на реакцию;

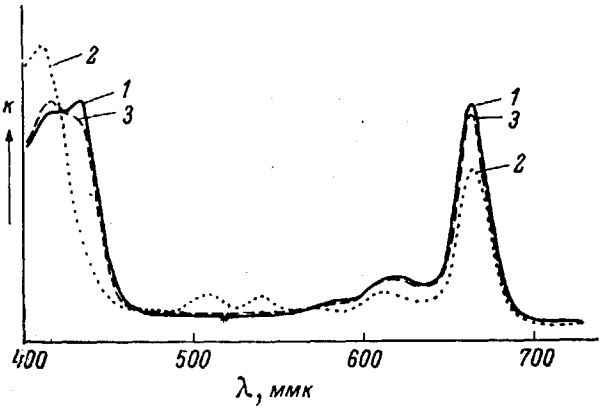


Рис. 4. Фотофеофитинизация хлорофилла *а* в абсолютном спирте в присутствии аскорбиновой кислоты.

1 — исходный спирт; *2* — после 17 мин. освещения светом 10^5 эрг/см² сек.; *3* — контрольный опыт 30 мин. темноты.

упрочнение связи магния следует приписать наличию электроотрицательных заместителей (альдегидная группа у хлорофилла *в*).

Рабинович в своей монографии [94] указал на неопубликованные наблюдения об ускоряющем действии света на феофитинизацию хлорофилла. Мы наблюдали образование феофитина, сопутствующее реакции обратимого фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой [24]. Чем больше воды и аскорбиновой кислоты в пиридине, тем больше феофитина накапливается после реакции.

Евстигнеев и Гаврилова [15] показали, что хлорофилл, фотовосстановленный фенилгидразином в толуоловом растворе при медленной обратной реакции, подвергается феофитинизации. Банистер детально исследовал образование феофитина при фотовосстановлении хлорофилла [70].

В нашей лаборатории было показано [46 ,49], что феофитин образуется при освещении таких систем, где не удается спектро-

скопически наблюдать образование продуктов фотовосстановления, например в системе хлорофилл—пиридин—соляная кислота, пиридин—щавелевая кислота, спирт—щавелевая кислота (рис. 4) и т. д. В табл. 4 приведено время полупревращения пигментов в феофитины. (Растворитель — пиридин+10% воды без воздуха. Щавелевая кислота $2 \cdot 10^{-2}$ М/л. Красный свет 10^5 эрг/см^2 сек; +20° С).

Реакция фотофеофитинизации, также как и фотовосстановление, блокируется акцепторами электрона — метиловым красным, рибофлавином, сафранином, а также β-каротином и тетраценом.

Таблица 4

Пигменты	Время «полупревращения», мин.	
	темнота	свет
Бактериовиридин *	60	14
Хлорофилл *а*	180	12
Протохлорофилл	600	10
Хлорофилл *в*	1400	9

Примечание. * В опыте с бактериовиридином 0.4 10^{-2} М/л. щавелевой кислоты.

В основе действия этих соединений, вероятно, лежит обратимая реакция с промежуточной восстановленной формой пигмента или конкуренция за возбужденную молекулу пигмента путем обратимого переноса электрона в комплексе. Можно предполагать, что в основе изученной реакции лежит обратимое фотовосстановление хлорофилла молекулами растворителя (пиридина, спирта), играющими роль донора электрона с более быстрой феофитинизацией промежуточных фотовосстановленных форм пигмента.

Обратимое фотохимическое окисление

Рабинович и Вейс [95] установили, что реакция хлорофилла с окисными соединениями железа представляет собой обратимое окисление. Изучение этой реакции в лаборатории Даина [1, 5] показало, что в одних условиях происходит замещение магния на железо, а в других — идет фотовосстановление хлорофилла ионами двухвалентного железа, образующимися при фотохимической реакции [5].

Давно известно, что при интенсивном освещении растворов хлорофилла на воздухе происходит деструктивное фотоокисление. Мы нашли, что наряду с продуктами необратимого окисления образуются промежуточные лабильные продукты, из которых частично регенерируется пигмент при добавлении восстановителей. Эти процессы наиболее отчетливо проходят в спиртовых растворах [24а]. Явление обратимости наиболее ярко выражено

в опытах с бактериохлорофиллом [38]. Эти данные были подтверждены в исследованиях Годхера [76].

Евстигнеев и Теренин нашли, что знак потенциала твердых пленок хлорофилла и его аналогов связан с окислительно-восстановительными свойствами среды, окружающей пленку [21]. При измерении фотопотенциалов пленок пигментов, нанесенных на металлический электрод и опущенных в раствор электролита, содержащего окислитель или восстановитель, при освещении было обнаружено обратимое изменение потенциала, что свидетельствует о способности пигментов обратимо отдавать или воспринимать электрон [16].

Качан и Даин [23], освещая хлорофилл ультрафиолетовым этом в «жестких» средах при температуре —190°, нашли изменения поглощения хлорофилла, которое они объяснили элементарным фотоокислением. Линшитц и Реннерт [84] установили, что при освещении хлорофилла красным светом при температуре жидкого азота —190° в смеси эфир—изопентан—спирт происходит выцветание, которое усиливается в присутствии хинона и объясняется фотоокислением. Процесс обратим при размораживании раствора. Толлин и Грин [99] наблюдали при освещении системы хлорофилл—хинон в той же «жесткой» среде появление сигнала ЭПР со спектром семихинона, что служит указанием на одновременно идущее одноэлектронное фотоокисление хлорофилла. Эти результаты можно также интерпретировать как сенсибилизированное хлорофиллом восстановление хинона с использованием компонентов растворителя в качестве донора электрона. Мы нашли, что в вязкой спирто-глицериновой среде при —70° наблюдается обратимое фотоокисление хлорофилла *а* и его аналогов *р*-бензохиноном [43, 44]. Тушение флуоресценции хлорофилла окислителями может рассматриваться как обратимое одноэлектронное окисление возбужденной молекулы хлорофилла молекулами окислителя в комплексе.

Нами была выбрана среда, благоприятствующая фотоокислению, — смесь спирта с глицерином [6]. Эта система при —70° неподвижна и образует высоковязкую систему. В этих средах хлорофилл и его аналоги образуют растворы. Мы нашли также, что хлорофилл растворяется в ортофосфорной кислоте, образуя феофитин с сохранением характерной красной флуоресценции.

Реакция с кислородом. Мы исследовали фотохимическое окисление хлорофилла *а* и *в*, бактериохлорофилла, бактериовиридина, протохлорофилла и феофитина кислородом воздуха в спирто-глицериновых растворах. Явный эффект обратимости наблюдается только после добавления в опытную смесь некоторого количества аскорбиновой кислоты или при введении аскорбиновой кислоты в среду до начала освещения.

Понижение температуры до —70° приводит к ускорению реакции в опытах с хлорофиллом *а* и незначительному замедлению

в опытах с бактериохлорофиллом и бактериовиридином. Возможно, что хлорофилл *а* при низких температурах склонен вступать в темновое взаимодействие с кислородом с образованием лабильного молекулярного комплекса, внутри которого и осуществляется перенос электрона при поглощении кванта света.

Наблюдения хемилюминесценции после освещения растворов хлорофилла, содержащих кислород, приводит к выводу о существовании лабильных фотоокисленных форм хлорофилла [47].

Опыты Теренина и Холмогорова [65] показали, что освещение твердого хлорофилла в присутствии кислорода и воды ведет к появлению сигнала ЭПР, что может быть связано с переносом электрона в комплексе с образованием «окисленного» хлорофилла. Сходные результаты получены в работе Умрихиной и др. [6].

Реакция с хинонами [43, 45, 12]. Проводились наблюдения за обратимым выцветанием исследуемых пигментов в присутствии *р*-бензохинона в спирто-глицериновой среде при температуре +20° и —70°. При комнатной температуре мы не смогли увидеть изменений в максимуме поглощения пигмента (во всех случаях измерение производилось через 10—15 сек. после освещения), проводя же опыты при —70°, нам удалось обнаружить обратимые эффекты. Обратимое изменение оптической плотности ΔD в «красном» максимуме поглощения при окислении пигментов *р*-бензохиноном (ΔD ± 0.01) минус — падение интенсивности за 2 мин. света C, плюс — возрастание за 2 мин. темноты T (табл. 5).

Таблица 5

Пигменты	При световой реакции ($C - T$)	При темновой обратной реакции ($T - C$)	Регенерация пигмента, %
Бактериохлорофилл	—170	+140	82
Бактериовиридин	—140	+110	82
Хлорофилл *а*	—120	+110	90
Хлорофилл *в*	— 50	+ 30	60
Протохлорофилл	— 30	+ 20	33
Феофитин *а*	0	0	0

По скорости взаимодействия с *р*-бензохиноном пигменты располагаются в следующем порядке: бактериохлорофилл, бактериовиридин, хлорофилл *а*, хлорофилл *в*. С феофитином *а* реакция не наблюдалась. Эти результаты согласуются с данными, полученными в опытах по изучению скорости фотохимического окисления этих пигментов молекулярным кислородом.

Мы проверяли возможность взаимодействия разных хинонов с хлорофиллом *а*. Опыты ставились по той же методике при температуре —70°. Обратимая фотореакция наблюдалась с *р*-бензохиноном и 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном. С 2,3-метил-1,4-

нафтохиноном реакция шла слабо, с антрахиноном и коэнзимом Q_3 реакцию наблюдать не удалось.

По-видимому, в данных условиях реакция наблюдается с окислителями, обладающими E_0^1 от +0.2 до +0.8 в.

При действии красного света происходит обратимое фотохимическое взаимодействие пигмента с хиноном и образование [illegible]ихинона, предположительно, гласно реакции

$$X^* + Хин \rightleftarrows X^+ + Хин^-.$$

Действие красного и белого света. Существенно отметить, что обратимый эффект в этой реакции наблюдается только при действии красного света. В белом свете лампы накаливания мы не могли наблюдать обратимых эффектов. Это явление может быть объяснено тем, что продукт окисления хлорофилла *p*-бензохиноном имеет максимум поглощения около 480 ммк, и действие белого света вызывает быстрые необратимые превращения этого продукта.

Дифференциальные спектры окисленных восстановленных форм. В связи с развитием техники дифференциальной спектроскопии в литературе оживленно обсуждается вопрос

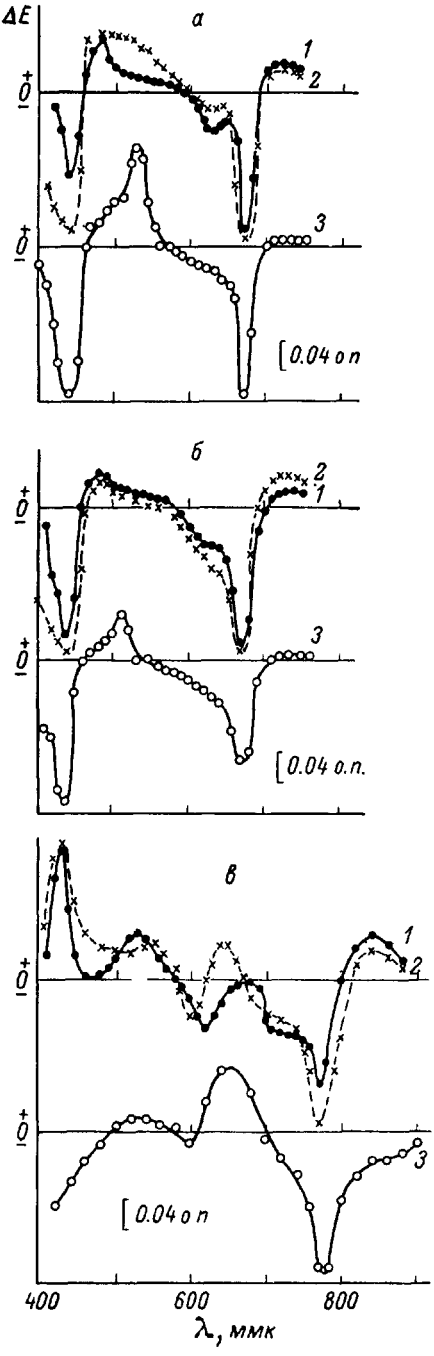


Рис. 5. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении хлорофилл *а* (*а*), бактериовиридина (*б*) и бактериохлорофилла (*в*).

1 — окисление *p*-бензохиноном; *2* — окисление кислородом; *3* — восстановление аскорбиновой кислотой (при восстановлении бактериохлорофилла применялся сернистый натрий).

о наличии в живых фотосинтезирующих организмах фотохимически измененных форм хлорофилла и его аналогов. В таких поисках может помочь знание дифференциальных спектров поглощения продуктов фотохимического взаимодействия пигментов с окислителями и восстановителями. Эти измерения проведены в вязкой спирто-глицериновой среде при реакции пигментов с хиноном и кислородом и в пиридин-глицериновой среде при реакции с аскорбиновой кислотой (рис. 5).

Рассмотрим вид спектров промежуточных форм хлорофилла *а*. Для обоих реакций (окисления и восстановления) характерно падение «красного» и «синего» максимумов и появления поглощения в средней области видимого спектра при окислении с максимумом при 480 ммк, при восстановлении — при 525 ммк. При окислении наблюдается появление полосы поглощения около 740 ммк; при восстановлении поглощение в близкой инфракрасной области наблюдается лишь при более длительном освещении и в особых условиях. Спектры бактериовиридина подобны хлорофиллу *а*: максимум окисленного продукта лежит при 480 ммк, а восстановленного — при 510 ммк. В случае бактериохлорофилла более отчетливо выражены различия окисленных и восстановленных форм. Окисленные формы характеризуются максимумами при 430, 530 и 840 ммк, при окислении кислородом наблюдается, кроме того, увеличение поглощения при 650 ммк; для восстановленных форм характерно увеличение поглощения в красной области с максимумом при 650 ммк. Во всех случаях обращает внимание сходство дифференциальных спектров поглощения при обратимом окислении пигментов хиноном и при преимущественно необратимом окислении кислородом.

Были измерены спектры относительно устойчивых продуктов, и нет уверенности в том, что они соответствуют спектрам продуктов «одноэлектронного» окисления — восстановления. Большое сходство спектров окисленных и восстановленных форм указывает на то, что в обоих случаях происходит нарушение системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента.

Фотосенсибилизация

Давно известно фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в растворах. Еще в 20-х годах нашего столетия в лаборатории Эмиля Баура был изучен ряд случаев сенсибилизации окислительно-восстановительных реакций хлорофиллом. В качестве доноров электрона применяли фенилгидразин и органические амины, а в качестве акцепторов электрона — разнообразные красители, преимущественно азосоединения.

Гаффрон [74, 75] около 40 лет тому назад нашел, что сенсибилизированное хлорофиллом фотоокисление аллилтиомочевины кислородом идет с квантовым выходом, равным единице. Варбург [102] применил сенсибилизированную хлорофиллом реакцию окисления

тиомочевины в качестве химического актинометра из-за постоянства квантового выхода в различных условиях.

В нашей лаборатории изучались разнообразные окислительно-восстановительные реакции, сенсибилизированные хлорофиллом и аналогами, идущие в органических растворителях и в воде. Ниже приводится краткая сводка экспериментального материала.

Пигменты-сенсибилизаторы. В нашей лаборатории было установлено, что фотосенсибилизирующим действием обладают фталоцианины, хлорофиллы *а* и *в*, бактериохлорофилл, бактериовиридин, феофитины, протохлорофилл, порфин, разнообразные порфирины и другие аналоги и производные хлорофилла, содержащие в центре молекулы атомы магния, водорода или цинка.

Доноры электрона. Аскорбиновая кислота оказалась универсальным донором электрона, действующим в широком диапазоне условий. Наряду с ней применялись другие диэнолы, фенилгидразин, цистеин, сернистый натрий и другие соединения. Своеобразную группу представляют соединения, используемые в качестве доноров электрона — восстановленные пиридиннуклеотиды и N-бензилникотинамид [33—35]. В ряде реакций мы использовали соединения двухвалентного железа, в том числе цитохром С [28, 39].

Акцепторы электрона. В качестве акцепторов электрона в нашей лаборатории применялся широкий круг разнообразных соединений, пожалуй, менее специфичных, чем соединения-доноры. Использовались кислород, метиловый красный и другие азокрасители, сафранин, различные хиноны, рибофлавин, ди- и трифосфопиридиннуклеотиды, N-бензилникотинамид, метилвиологен. В качестве акцепторов электрона могут использоваться системы в широчайшем пределе редокс-потенциалов: от кислородного электрода до водородного электрода (метилвиологен). Применение метилвиологена особенно интересно, так как это соединение обладает восстановительным потенциалом, равным потенциалу ферредоксина, наиболее восстановленного компонента цепи фотосинтетического переноса электрона. В наших опытах с Г. П. Брин наблюдалось фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена в спирте и пиридине [36] (рис. 6).

Природа среды. Молекулы среды — растворителя, взаимодействуя с молекулами, участвующими в реакции, приводят к изменению их электронодонорных и электроноакцепторных свойств. Так, основные среды (пиридин) приводят к усилению электронодонорных свойств аскорбиновой кислоты, облегчая тем самым реакции фотосенсибилизированного восстановления. Применение водных кислых сред позволило использовать соединения двухвалентного железа (наряду с аскорбиновой кислотой) в качестве донора электрона при сенсибилизированном восстановлении метилового красного [см. обзор 29].

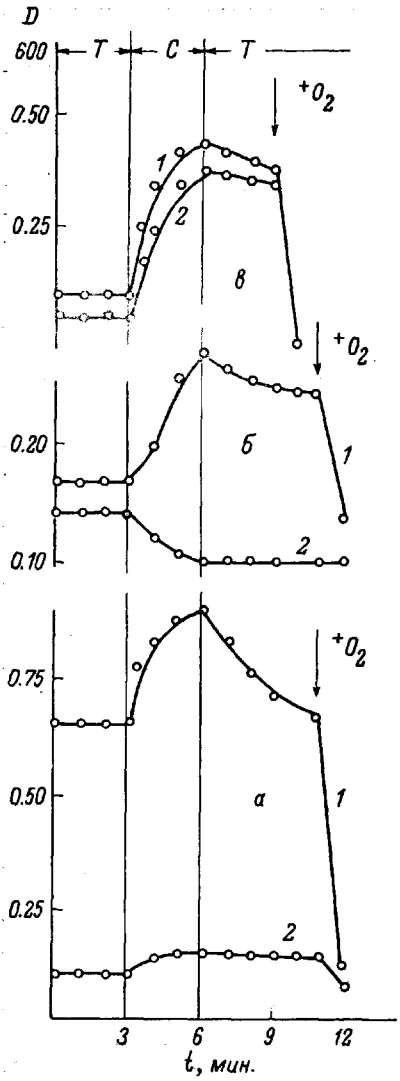


Рис. 6. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена.

а — система хлорофилл *а* (10^{-5} М/л) — аскорбиновая кислота ($5 \cdot 10^{-3}$ М/л) — метилвиологен ($2 \cdot 10^{-4}$ М/л) в пиридине (10% воды) : 1 — при 20° С; *2* — без аскорбиновой кислоты; *б* — система хлорофилл *а* — аскорбиновая кислота — метилвиологен в спирте (20% воды): *1* — при —60° С; *2* — без аскорбиновой кислоты; *в* — система хлорофилл *а* — фенилгидразин—метилвиологен в спирте: *1* — при 20 °С; *2* — при —60° С.

Хлорофилл и его аналоги не растворимы в воде. Поэтому в водной среде фотосенсибилизация пигментами изучалась в гетерогенных системах — коллоидных растворах, взвесях кристаллов пигмента, адсорбатах. Двадцать лет тому назад в совместной работе автора с Г. П. Брин [30] было установлено фотосенсибилизирующее действие кристаллических фталоцианинов на окисление водных растворов аскорбиновой кислоты. Те же авто показали большую активность водных коллоидных растворов хлорофилла, полученных с помощью детергентов [31]. Это явление было детально изучено для коллоидных растворов, полученных с разными детергентами, при различных pH с использованием разных доноров электрона [2]. По-видимому, хлорофилл в мицелле детергента находится в «мономерной» форме, чем и объясняется его высокая активность.

Было найдено, что хлорофилл, адсорбированный на белках цитохрома С или находящийся в водном коллоидном растворе [25, 39], в водной среде обладает фотосенсибилизирующим действием в реакциях окисления и восстановления цитохрома. В работе Ворог евой [6] показана возможность фотосенсибилизированного восстановления метилового красного аскорбиновой кислотой в водных коллоидных растворах хлорофилла и гомогенатах листьев. Евстигнеев и Гаврилова [17] изучали фотосенсибилизированное восстановление метилового красного коагулированными коллоидами хлорофилла и в последующих работах — активность хлорофилла при этой реакции в адсорбированном состоя-

нии на неорганических и органических адсорбентах и в коацерватах [18]. Недавно в серии работ Вернон с сотрудниками [69, 100, 101] исследовали фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в водных растворах, содержащих ферментные препараты. Им удалось показать возможность фотосенсибилизированного восстановления пиридиннуклеотидов в водных растворах по типу реакций, изученных нами ранее в растворах пиридина [3, 32].

Из всех этих работ можно сделать вывод, что хлорофилл в различных формах в гомогенных и гетерогенных условиях обладает фотосенсибилизирующим действием в окислительно-восстановительных реакциях.

В работах нашей лаборатории не измерялся квантовый выход реакций; об эффективности процесса обычно судили по скорости реакции при данной оптической плотности раствора пигмента-сенсибилизатора и сравнимых значениях концентрации акцептора и донора электрона.

Реакции в органических растворителях, где пигменты находятся в «мономерных» формах, обычно более эффективны, чем реакции, в которых участвуют агрегированные (коллоидные) формы пигмента.

Близкое взаимодействие между молекулами пигментов в агрегированных формах (в кристаллах, твердых пленках, коллоидных частицах) приводит к тесному взаимодействию π-электронных облаков и возможному искажению геометрии молекул при их упаковке в агрегированной структуре. Междумолекулярное взаимодействие влечет к ослаблению или полному тушению флуоресценции пигментов при комнатной температуре и обычно к сдвигу максимумов поглощения в длинноволновую область спектра. Спектры поглощения и люминесценции агрегированных форм хлорофилла и его аналогов детально изучены в работах сотрудников нашей лаборатории. Однако эти исследования выходят из рамок данной статьи.

Влияние вязкости среды [44]. Были исследованы фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода в вязких средах различной природы. Для этой цели мы использовали систему аскорбиновая кислота—хлорофилл—акцептор электрона. Изучали сенсибилизированное восстановление акцепторов электрона (преимущественно метилового красного) в разных средах при температуре от +20 до —70°. В системе спирт—глицерин сенсибилизированное восстановление метилового красного становится все менее эффективным с увеличением вязкости по мере понижения температуры. Реакция при —10° идет медленнее, чем при +20°, а при —40° в этой системе уже не удается наблюдать сенсибилизированной реакции. Существенно, что в этиловом спирте даже при —70° наблюдается быстрая сенсибилизация. Таким образом, эффект связан не с понижением температуры, а с увеличением вязкости системы при понижении

температуры. Сенсибилизированное фотовосстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в системе пиридин—глицерин дает ту же картину. В фосфорной кислоте и в смеси фосфорной кислоты с глицерином наблюдается эффективно идущая сенсибилизация при комнатной температуре, а при —20° (в переохлажденной вязкой системе) процесс полностью останавливается. Сенсибилизированное восстановление сафранина и рибофлавина показывает те же закономерности.

Таким образом, фотосенсибилизация в растворах требует диффузии активных продуктов и, может быть, поэтому представлена в виде чередования элементарных стадий, требующих соударений между промежуточными соединениями с вероятным образованием долгоживущих предреакционных комплексов.

О механизме элементарных стадий. Известны схемы, рассматривающие перенос энергии от возбужденной молекулы пигмента к молекулам веществ, превращающихся при сенсибилизированной реакции. Наряду с этим распространены представления, согласно которым реакция идет в результате обратимых фотохимических превращений возбужденных молекул пигментов-сенсибилизаторов [напр., 78, 93, 94].

Рассмотрим возможные механизмы реакций.

Перенос энергии от возбужденной молекулы пигмента к молекулам-акцепторам, подвергающимся фотохимическим превращениям. Вероятность переноса энергии от возбужденной синглетной и триплетной молекулы связана с длительностью жизни возбужденного состояния, которая на несколько порядков выше у триплетной молекулы. Переносу энергии благоприятствует длительный контакт между возбужденной молекулой-донором энергии (S^*, T) и молекулой-акцептором энергии A, определяющийся образованием комплексов типа SA, или S^*A или TA. В случае хлорофилла и других пигментов в растворе известны случаи передачи энергии по механизму Вавилова—Перрена [57]; необходимое условие — молекула-акцептор должна иметь электронный уровень, расположенный ниже S^*. При сенсибилизированных хлорофиллом реакциях это условие не соблюдается, так как донор электро (например, аскорбат) и широкий ряд изученных акцепторов обладают полосами поглощения в более коротковолновой области, чем электронный уровень хлорофилла, соответствующий красной полосе поглощения. Перенос энергии с коротковолнового электронного уровня хлорофилла S_1^* (синяя полоса поглощения) до сих пор не наблюдали в виду малой длительности жизни этого возбужденного состояния и эффективной внутримолекулярной деградации энергии до уровня S^* и S. Недавно Марти и Рабинович [91] описали тушение флуоресценции хлорофилла каротином при возбуждении в синем максимуме хлорофилла. Вероятно, в условиях образования долгоживущих комплексов SA можно надеяться наблюдать подобные переходы. Однако в изученных нами случаях

реакция возбуждается в «красном» максимуме хлорофилла, и описанная возможность переноса энергии исключена.

Условием переноса энергии на триплетном уровне по механизму Теренина—Ермолаева [61] также является более низкое расположение T-уровня молекулы-акцептора энергии. У партнеров сенсибилизированных реакций, которые могут быть акцепторами энергии, недостаточно изучены низшие триплетные уровни. У большинства этих соединений не удалось найти фосфоресценцию, лежащую в более длинноволновой области, чем фосфоресценция хлорофилла (около 850 ммк).

Тушение триплетного состояния в опытах с применением импульсной спектроскопии может быть результатом восприятия энергии молекулой-тушителем или химического взаимодействия триплетной молекулы с тушителем. При этом возможна миграция энергии между «однотипными» молекулами на триплетном уровне [59]. Эффективное тушение триплетного состояния молекулами-окислителями (хинонами, нитросоединениями) следует приписать химической реакции, так как триплетные уровни этих молекул расположены выше, чем у хлорофилла.

Итак, мы пока не располагаем достоверными экспериментальными данными, указывающими на роль процессов переноса энергии при сенсибилизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакциях.

Элементарные реакции переноса электрона при фотосенсибилизации. Результатом взаимодействия возбужденной молекулы-сенсибилизатора с донором или акцептором электрона может быть элементарное фотовосстановление или фотоокисление. Какие из этих процессов реализуются в сенсибилизированные реакции?

Фотовосстановление хлорофилла и аналогов в пиридине происходит с образованием долгоживущих промежуточных продуктов, превращение которых можно наблюдать обычными спектральными методами. Это облегчает изучение механизма реакции в таких средах. Автором статьи было показано [26—29] следующее:

1) сенсибилизированная реакция переноса водорода от донора акцептору наблюдается с теми донорами, которые способны к фотовосстановлению хлорофилла (аскорбиновая кислота, фенилгидразин, цистеин и др.) и не наблюдается с донорами, с которыми не удалось наблюдать фотовосстановление (пировиноградная, яблочная, щавелевая кислоты и др.);

2) введение в систему акцептора электрона (сафранин, рибофлавин, метиловый красный) блокирует фотовосстановление, наблюдаемое путем спектроскопических измерений, измерения фотопотенциала и фотопроводимости;

3) в темновом акте реакции удается наблюдать обратимое взаимодействие фотовосстановленных форм хлорофилла и феофитина с акцепторами электрона.

Описанные наблюдения указывают на то, что сенсибилизация

в основных средах определяется обратимым фотовосстановлением пигмента-сенсибилизатора в изученных типах реакций.

Более трудно установить механизм реакции в тех средах, где не удается наблюдать образование долгоживущих промежуточных продуктов с выраженным спектром поглощения. Мы указывали на вероятность механизмов, связанных с фотовосстановлением пигмента в основных средах и с фотоокислением — в спиртовых средах [37]. Анализируя кинетику сенсибилизированного хлорофиллом восстановления метилового красного в спиртовом растворе, Ливингстон с сотрудниками [86] предположили, что в основе элементарного механизма реакции лежит перенос электрона в комплексе: метиловый красный—хлорофилл с последующей реакцией образованного комплекса с переносом заряда и донора водорода — фенилгидразином. Согласно этой схеме, метиловый красный воспринимает электрон возбужденной молекулы хлорофилла. В работе Ливингстона и Ке Чунь-линь [90] показано, что метиловый красный энергично тушит флуоресценцию хлорофилла наряду с сильными окислителями хиноном, нитросоединениями и др. Эти наблюдения указывают на возможность окислительного механизма сенсибилизации в данной системе. В других работах Ливингстон рассматривает восстановительный механизм, согласно которому первична фотореакция хлорофилла с фенилгидразином.

Изучение фотогальванического эффекта в твердых пленках фталоцианина магния и хлорофилла позволило Евстигнееву и Теренину [21] установить, что знак фотопотенциала зависит от состава среды, окружающей электрод. Систематическое изучение фотопотенциала на границе твердая пленка пигмента—раствор позволило Евстигнееву [14] выяснить условия, благоприятствующие восприятию и отдаче электрона при освещении пленки.

Так, например, в этих опытах было показано, что кислород и метиловый красный наиболее отчетливо в кислых средах способствуют появлению положительного фотопотенциала пленки пигментов, т. е. играют роль акцепторов электрона; в отличие от этого аскорбат и фенилгидразин способствуют появлению отрицательного фотопотенциала пленки. В опытах Пуцейко [50] было показано, что в этих условиях появляется максимум спектра действия фото-э.д.с. в зеленой области спектра, соответствующий поглощению фотовосстановленного хлорофилла.

При изучении фотосенсибилизированного феофитином восстановления метилового красного Евстигнеев с сотрудниками [19] нашли повышение эффективности сенсибилизации в нейтральной и кислой среде, предположительно соответствующие элементарному фотовосстановлению или фотоокислению пигмента.

В опытах Чибисова и Карякина [66—68] с применением импульсной спектроскопии удалось наблюдать первичную реакцию триплетной формы хлорофилла и образующихся первичных ион-радикалов пигмента с донорами и акцепторами электрона. Так,

изучена реакция первичного ион-радикала хлорофилла с полиметиновым красителем, играющим роль конечного акцептора электрона [67].

Совокупность известного экспериментального материала указывает на возможность механизмов сенсибилизации, связанных с первичным фотовосстановлением или фотоокислением пигментов и вероятным промежуточным образованием комплекса возбужденной молекулы пигмента с донором или акцептором электрона. Эти возможности показаны на рис. 7. Оба механизма не исключают друг друга и могут работать одновременно с различной эффективностью (см. наст. сб., статью В. Б. Евстигнеева).

Исследования фотохимии хлорофилла, его аналогов и производных позволяют получить сведения, нужные для понимания

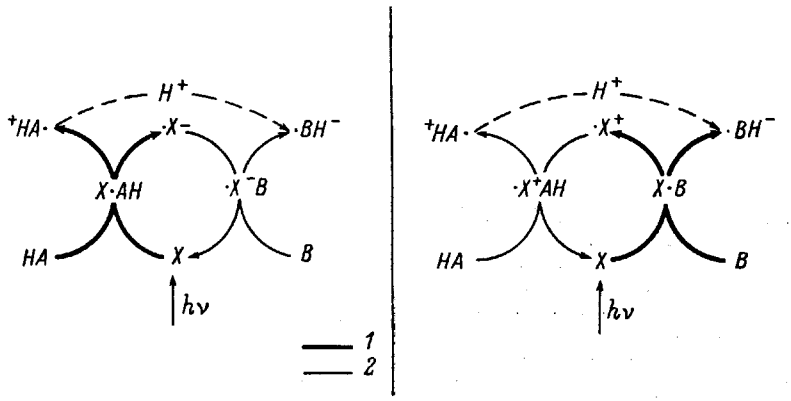


Рис. 7. Схема механизма фотосенсибилизации.

1 — световая стадия; 2 — темновая стадия. *X* — хлорофилл; *AH* — донор электрона; *B* — акцептор электрона.

природы элементарных процессов фотосинтеза. Главным представляется тот вывод, что возбужденный светом хлорофилл и его аналоги участвуют в процессах переноса электрона от молекул-доноров к акцепторам путем обратимого восприятия или отдачи электрона. Можно предполагать, что таков путь включения разных форм хлорофилла в каждую из фотохимических стадий фотосинтетической цепи переноса электрона. Дальнейшие исследования должны показать природу элементарных фотопревращений отдельных форм хлорофилла и его аналогов непосредственно в живых фотосинтезирующих организмах.

В работающей цепи фотосинтетического переноса электрона акты восприятия или отдачи электрона хлорофиллом следуют быстро, что затрудняет обнаружение измененных форм пигмента. Продукты фотохимического превращения хлорофилла могут накапливаться в измеримых количествах лишь при нарушении нормальной системы переноса электрона.

При рассмотрении природы первичного превращения хлорофилла следует указать на аналогию с работой цитохромов в цепи переноса электрона в митохондриях. В работающей циклической или открытой системе теряет значение вопрос о том, что первично — окисление или восстановление цитохрома. При спектроскопическом наблюдении накопление восстановленного или окисленного цитохрома зависит от метаболического режима — наличия субстратов-доноров электрона, степени аэрации. Равным образом наблюдение за накоплением измененных форм хлорофилла будет зависеть от условий эксперимента. Работа цепи фотосинтетического переноса электрона не зависит от порядка чередования элементарных процессов.

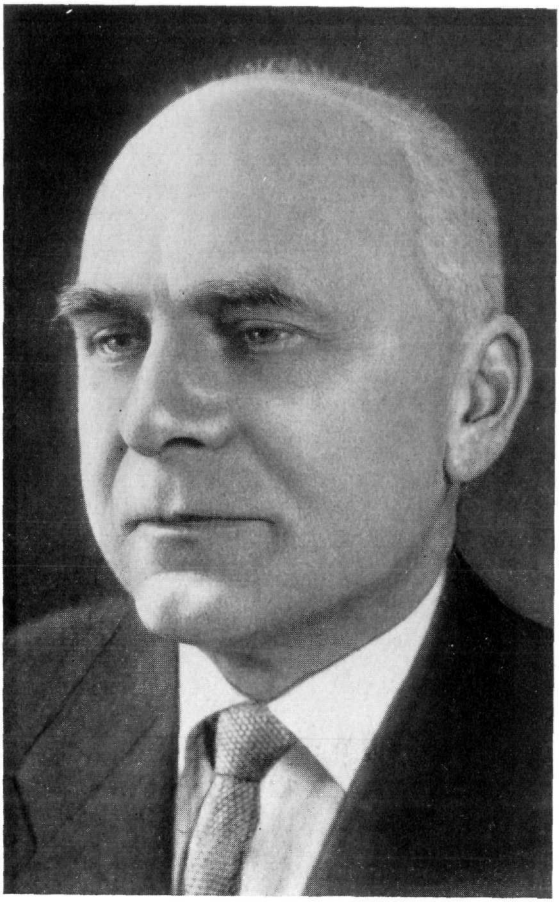
Согласно современным представлениям, в цепи переноса электрона при фотосинтезе существуют ветви, работающие в окислительной и восстановительной областях, которым соответствуют два типа фотореакций. В той и другой ветви переноса электрона можно искать оба типа элементарных реакций хлорофилла — обратимое восстановление и обратимое окисление.

Литература

1. Ашкинази М. С., Г. С. Гликман, Б. Я. Даин, ДАН СССР, 1950, **73**, 743.
2. Брин Г. П., А. А. Красновский, Биохимия, 1957, **22**, 776.
3. Брин Г. П., А. А. Красновский, Биохимия, 1959, **24**, 1085.
4. Бубнов Н. Н., А. А. Красновский, А. В. Умрихина, В. Ф. Цепалов, В. Я. Шляпинтох, Биофизика, 1960, **5**, 121.
5. Буцко С. С., Б. Я. Даин, Укр. хим. ж., 1961, **27**, 314.
6. Воробьева Л. М., А. А. Красновский, Биохимия, 1956, **21**, 126; 1958, **23**, 760.
7. Гуринович Г. П., сб. «Биохимия, биофизика фотосинтеза», изд. «Наука», М., 1965, стр. 83.
8. Даин Б. Я., Усп. химии, 1946, **15**, 539.
9. Даин Б. Я., М. С. Ашкинази, сб. «Проблемы фотосинтеза», Изд. АН СССР, М., 1959, стр. 57.
10. Дилунг И. И., И. Н. Чернюк, ДАН СССР, 1961, **140**, 162.
11. Дилунг И. И., И. Н. Чернюк, ЖФХ, 1963, **37**, 1100.
12. Дроздова Н. Н., А. А. Красновский, Биохимия, 1965, **30**, 605.
13. Евстигнеев В. Б., ЖФХ, 1958, **32**, 969.
14. Евстигнеев В. Б., Биофизика, 1963, **8**, 664.
15. Евстигнеев В. Б., В. А. Гаврилова, ДАН СССР, 1953, **91**, 899.
16. Евстигнеев В. Б., В. А. Гаврилова, ДАН СССР, 1954, **95**, 841.
17. Евстигнеев В. Б., В. А. Гаврилова, Биофизика, 1959, **4**, 641.
18. Евстигнеев В. Б., В. А. Гаврилова, Биофизика, 1960, **5**, 599.
19. Евстигнеев В. Б., В. А. Гаврилова, И. Г. Савкина, ДАН СССР, 1963, **151**, 227.
20. Евстигнеев В. Б., А. А. Красновский, ДАН СССР, 1948, **60**, 623.
21. Евстигнеев В. Б., А. Н. Теренин, ДАН СССР, 1951, **81**, 223.

22. Карякин А. В., А. К. Чибисов, см. наст. сб., стр. 296.
23. Качан А. А., Б. Я. Даин, ДАН СССР, 1951, **80**, 619.
24. Красновский А. А., ДАН СССР, 1948, **60**, 421.
24а. Красновский А. А., ДАН СССР, 1947, **83**, 617, 835.
25. Красновский А. А., ДАН СССР, 1955, **103**, 283.
26. Красновский А. А. Вопросы химической кинетики. Изд. АН СССР, М., 1955, стр. 92.
27. Красновский А. А., ЖФХ, 1956, **30**, 968.
28. Красновский А. А., сб. «Проблемы фотосинтеза», Изд. АН СССР, М., 1959, стр. 30.
29. Красновский А. А., Усп. химии, 1960, **29**, 736.
30. Красновский А. А., Г. П. Брин, ДАН СССР, 1946, **53**, 447.
31. Красновский А. А., Г. П. Брин, ДАН СССР, 1948, **63**, 163.
32. Красновский А. А., Г. П. Брин, ДАН СССР, 1949, **67**, 325.
33. Красновский А. А., Г. П. Брин, ДАН СССР, 1963, **153**, 212.
34. Красновский А. А., Г. П. Брин, сб. «Проблемы эволюционной и технической биохимии», Изд. АН СССР, М., 1964.
35. Красновский А. А., Г. П. Брин, ДАН СССР, 1964, **158**, 225.
36. Красновский А. А., Г. П. Брин, ДАН СССР, 1965, **163**, 761.
37. Красновский А. А., Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН СССР, 1949, **59**, 393.
38. Красновский А. А., К. К. Войновская, ДАН СССР, 1951, **81**, 879.
39. Красновский А. А., К. К. Войновская, Биофизика, 1956, **I**, 120.
40. Красновский А. А., А. В. Умрихина, Биофизика, 1958, **3**, 547.
41. Красновский А. А., Н. Н. Дроздова, Е. В. Пакшина, Биохимия, 1960, **25**, 288.
42. Красновский А. А., Н. Н. Дроздова, Биохимия, 1961, **26**, 859.
43. Красновский А. А., Н. Н. Дроздова, ДАН СССР, 1963, **150**, 1378.
44. Красновский А. А., Н. Н. Дроздова, ДАН СССР, 1963, **153**, 721.
45. Красновский А. А., Н. Н. Дроздова, ДАН СССР, 1964, **158**, 730.
46. Красновский А. А., Е. В. Пакшина, ДАН СССР, 1963, **148**, 935.
47. Литвин Ф. Ф., Ю. А. Владимиров, А. А. Красновский, УФН, 1960, **71**, 149.
48. Литвин Ф. Ф., Б. А. Гуляев, ДАН СССР, 1965, **162**, 1184.
49. Пакшина Е. В., А. А. Красновский, Биохимия, 1964, **29**, 1132.
50. Пуцейко Е. К., ДАН СССР, 1963, **150**, 343.
51. Рихирева Г. Т., З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. В. Умрихина, А. А. Красновский, ДАН СССР, 1964, **159**, 196.
52. Рихирева Г. Т., А. В. Умрихина, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский, ДАН СССР, 1965, **163**, 491.
53. Сидоров А. Н., А. Н. Теренин, ДАН СССР, 1962, **145**, 1093.
54. Теренин А. Н., ЖФХ, 1944, **18**, 1.
55. Теренин А. Н., Изв. АН СССР, сер. биол., 1947, **3**, 369.
56. Теренин А. Н. Фотохимия красителей. Изд. АН СССР, М.—Л., 1947.
57. Теренин А. Н., УФН, 1951, **43**, 347.
58. Теренин А. Н., Усп. химии, 1955, **24**, 121.
59. Теренин А. Н., Радиотехника и электроника, 1956, **I**, 1127.
60. Теренин А. Н., сб. «Проблемы фотосинтеза», Изд. АН СССР, М., 1959, стр. 9.

61. Теренин А. Н., В. Л. Ермолаев, ДАН СССР, 1952, **85**, 547.
62. Теренин А. Н., В. Л. Ермолаев, Изв. АН СССР, 1962, **26**, 21.
63. Теренин А. Н., А. В. Карякин, Е. Б. Любомудров, П. С. Сущинский, О. Д. Дмитриевский, Опт. и спектр., 1956, I, 456.
64. Умрихина А. В., И. Н. Голубев, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский, Биофизика, 1964, **9**, 423.
65. Холмогоров В. Е., А. Н. Теренин, ДАН СССР, 1961, **137**, 199.
66. Чибисов А. К. Исследование фотореакций пигментов методом импульсного фотолиза и кинетической спектроскопии. Канд. дисс., ГОХИ, М., 1964.
67. Чибисов А. К., ДАН СССР, 1965, **160**, 1417.
68. Чибисов А. К., А. В. Карякин, М. Е. Зубрилин ДАН СССР, 1965, **161**, 483.
69. Ash O. K., W. S. Zeugg, L. P. Vernon, Acta chem. scand. 1961, **15**, 1629.
70. Bannister T. T., Plant. Physiol., 1959, **34**, 249.
71. Becker R. S., M. Kasha, J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 3669.
72. Claes H., T. Nakayama, Z. Naturforsch, b, 1959, **14**, 746.
73. Claes H., Z. Naturforsch, b, 1961, **16**, 445.
74. Gaffron H., Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1927, **60**, 755, 2229.
75. Gaffron H., Plant. Physiol. Ed. F. C. Steward, V, I B Acad. Press., 1960.
76. Goedheer J. C., Biochim. et biophys. acta, 1958, **27**, 478.
77. Frank J., H. Levi, Z. phys. chem., 1934, **27**, 409.
78. Franck J., F. Livingston, J. Chem. Phys., 1941, **9**, 184.
79. Franck J., G. Scheibe, J. Phys. Chem. A., 1928, **139**, 22.
80. Fujimori E., R. Livingston, Nature, 1957, **180**, 1936.
81. Kasha M., «Life and Light», J. Hopkins press, Boltimore, 1961, p. 31.
82. Kautsky H., A. Hirsch, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1931, **64**, 2677.
83. Krasnovsky A. A., Ann. Rev. Plant. Physiol., 1960, **11**, 363.
84. Linschitz H., Rennert J., Nature, 1952, **169**, 193.
85. Linschitz H., S. L. Weissman, Arch. Biochem. and Biophys., 1957, **67**, 491.
86. Livingston R., R. Pariser, J. Amer. Chem., Soc., 1948, **70**, 1510.
87. Livingston R., «The photochemistry of Chlorophyll», Encyclopedia of plant physiology, 1960, **5**, 830.
88. Livingston R., J. Phys. Chem., 1941, **45**, 1312.
89. Livingston R., Quart. Rev., Biol., 1960, **14**, 173.
90. Livingston R., Ke Chun-lin, J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 909.
91. Murty N. K., E. Rabinowitch, J. Chem. Phys., 1964, **41**, 602.
92. Porret D., E. Rabinowitch, Nature, 1937, **140**, 321.
93. Rabinowitch E., J. Phys. Chem., 1962, **66**, 2537.
94. Rabinowitch E. Photosynthesis, v. I—III, N.-Y, L., 1946—1956.
95. Rabinowitch E., J. Weiss, Proc. Roy. Soc., 1937, **162**, 251.
96. Seely G., Photochemistry and Photobiology, 1964, **3**, 195.
97. Scwarc M., J. Polymer Sci., 1955, **16**, 367.
98. Terenin A. N., Acta Phys. Chim., URSS, 1943, **18**, 210.
99. Tollin G., G. Green, Biochim. et biophys. acta, 1962, **60**, 524.
100. Vernon L. P., Acta Chem. Scand., 1961, **15**, 1651.
101. Vernon L. P., Acta Chem. Scand., 1961, **15**, 1639.
102. Warburg O., V. Schocken, Arch. Biochem. and Biophys., 1949, **21**, 363.
103. Weiss J. Trans. Farad. Soc., 1938, **34**, 451.
104. Weiss J. Trans. Farad. Soc., 1939, **35**, 48.



ГЛУБОКОУВАЖАЕМЫЙ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ!

Редколлегия и редакция Журнала физической химии приветствуют Вас, выдающегося физико-химика нашего времени, в день Вашего юбилея и шлют Вам лучшие пожелания здоровья и счастья.

В этот торжественный день Ваши коллеги, последователи и ученики, у которых Вы воспитали дух научного исследования, обращаются к Вам со словами благодарности за несравненные чувства, которые возбуждает ощущение новых путей в науке, открытых Вами.

Редколлегия Журнала физической химии признательна Вам за постоянную деятельную помощь и гордится Вашим участием в ее работе.

Мы желаем Вам, дорогой Александр Николаевич, многих, многих лет радостного творческого труда.

РЕДКОЛЛЕГИЯ И РЕДАКЦИЯ

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ
Т. XL 1966 № 5

АКАДЕМИК А. Н. ТЕРЕНИН

(К 70-летию со дня рождения)

6 мая 1966 года исполнилось 70 лет академику Александру Николаевичу Теренину, выдающемуся исследователю в области молекулярной фотохимии и спектроскопии. С именем А. Н. Теренина тесно связана вся история советской фотохимии.

Круг главных научных интересов А. Н. Теренина в течение более 45 лет активной научной работы связан с проблемой взаимодействия кванта света и молекулы. Начиная с ранних работ, А. Н. Теренин использует поглощение кванта света не только как средство анализа энергетических уровней атомов и молекул, но и как средство активного воздействия на молекулу, приводящего в конечном счете к разнообразным фотохимическим превращениям. Отсюда — тесная связь спектроскопии и фотохимии, характерная для научной школы А. Н. Теренина.

Формирование научной индивидуальности А. Н. Теренина происходило в эпоху бурного развития знаний в области электронной структуры атомов и молекул.

Нильс Бор выдвинул свои квантовые постулаты о строении атома в 1913 г.; последующее десятилетие было годами энергичной разработки строения электронных оболочек атомов и молекул с позиций теории Бора, работы которого были изданы на русском языке отдельной книгой в переводе С. И. Вавилова в 1923 г.

А. Н. Теренин учился в казенном реальном училище г. Калуги в предреволюционные годы; он вспоминает, что это училище было передовым учебным заведением того времени, с хорошо поставленным преподаванием естественных наук, физики и химии,— (включающем изучение качественного и количественного анализа). Еще в училище А. Н. Теренин, работая в физическом кружке, приспособил фотокамеру к спектроскопу и снимал спектры газов в электрическом разряде; преподаватель физики искал превращения гелия в водород в разряде и, что самое удивительное, нашел это превращение! Потом выяснилось, что водородный спектр появлялся в результате действия разряда на пары воды, выделяющиеся из стекла. Это была превосходная школа опыта и анализа научных заблуждений еще на заре научной карьеры!

Изумительное зрелище тонкой структуры разноцветных спектральных линий в окуляре спектроскопа и в наш век чарует неискушенного наблюдателя, а какова сила впечатления в юные годы, особенно, когда теория Бора объяснила принципы интимных электронных процессов, лежащих в основе этих видимых глазом эффектов! Я думаю, что уже школьные годы определили острый интерес А. Н. Теренина к проблеме взаимодействия кванта света с атомом и молекулой.

Этот интерес был закреплен в Центральной научно-технической лаборатории Военного ведомства, передового Института того времени, где А. Н. Теренин провел годы 1917—1918 военной службы. Первая научная работа А. Н. Теренина была там посвящена расшифровке состава германского люминофора, которым покрывали мушку винтовки. Эта задача была успешно решена с помощью эмиссионного спектрального анализа и послужила основой первой научной публикации А. Н. Теренина, посвященной фотометрированию светящихся составов. Не здесь ли истоки интересов А. Н. Теренина к люминисценции полупроводников и электронным процессам, в них происходящим?

После демобилизации А. Н. Теренин поступает на физическое отделение Петроградского университета и уже на втором курсе начинает исследовательскую работу под руководством Д. С. Рождественского.

В первой научной работе, выполненной в университете («Нормальная орбита электрона в атоме ртути»), проявляются особенности научного дарования А. Н. Теренина: умение простыми и изящными экспериментальными средстами добиваться исчерпывающего решения вопроса. Когда возникла необходимость вести спектральные измерения в области длин волн ~ 1 μ, что требовало сенсибилизации фотопластинки, А. Н. Теренин разработал метод сенсибилизации эффекта Гершеля красителями, блестяще решив поставленную научную задачу.

По окончании университета в 1922 г. А. Н. Теренин работает на кафедре оптики физического факультета университета и выбирает для самостоятельной работы исследование спектральных уровней атомов металлов высоко избирательным методом фотонного возбуждения (1922—1925 гг.).

Исследования люминесценции паров солей под действием искрового ультрафиолета (1925—1932 гг.) привели А. Н. Теренина к открытию оптической диссоциации молекул с образованием возбужденных атомов и радикалов, идентифицированных по спектру собственного испускания. Этот цикл исследований изложен в монографии «Фотохимия паров солей». Далее А. Н. Теренин применил метод люминесцентного фотораспада к изучению фотохимии более сложных органических молекул в газовой фазе и в адсорбированном состоянии.

В 1932 г. А. Н. Теренин избирается членом-корреспондентом АН СССР и организует в Ленинградском университете лабораторию оптики поверхностных явлений, преобразованную впоследствии в лабораторию фотокатализа. Тогда интересы А. Н. Теренина были сосредоточены на спектроскопии и фотохимии адсорбированных молекул, что важно для теории гетерогенного катализа; он все глубже входит в круг решения химических проблем: изучает методами инфракрасной спектроскопии адсорбированные молекулы, тушение люминесценции твердых тел адсорбированными молекулами, «вылет» адсорбированных молекул «в объем» после возбуждения квантом света. Одновременно создается новое направление по изучению фотоионизации и распада газовых молекул методом масс-спектрометрии. Это — годы интенсивной работы и все возрастающего потока научных публикаций.

В 1939 г. А. Н. Теренин избирается действительным членом Академии наук СССР по Отделению химических наук. В предвоенные годы научные интересы А. Н. Теренина распространяются на область изучения обмена колебательной энергии между возбужденными и невозбужденными молекулами; проводятся первые работы по изучению инфракрасных спектров молекул при высоких давлениях.

В годы Великой Отечественной войны под руководством А. Н. Теренина разрабатываются физические методы просветления оптических деталей и конструкции более совершенных оптических приборов.

Исследования фосфоресценции и фотохимии органических молекул, в том числе органических красителей, приводят его к сформулированной в 1943 г. гипотезе о бирадикальном (триплетном) состоянии метастабильных молекул, обладающих повышенной химической реакционной способностью.

Представления о фотохимической активности триплетных и синглетных возбужденных состояний органических молекул и последовательная трактовка первичного фотоакта в конденсированной фазе, связанного с миграцией возбуждения и переносом электрона, позволили А. Н. Теренину объединить и систематизировать большой экспериментальный материал по фотохимии органических соединений в книге «Фотохимия красителей и родственных органических соединений», вышедшей в 1947 году и до последнего времени остающейся единственной монографией этого рода.

Дальнейшее исследование метастабильных молекул приводит к открытию А. Н. Терениным и В. Л. Ермолаевым переноса энергии между молекулами на триплетном уровне. Изучение этого фундаментального явления привело к большому и ежегодно растущему числу работ; этот тип элементарного процесса приобретает все большее признание в фотохимии органических молекул.

В своей речи «Свет и химия» на общем собрании АН СССР в 1943 г. А. Н. Теренин сформулировал дальнейшие задачи развития фотохимии, обратив внимание на необходимость развития работ в области биологии, биохимии и фотосинтеза.

После войны все больше растут интересы А. Н. Теренина к биофизике и биохимии, к применению спектральных и фотохимических методов для решения механизма биологических процессов.

В 1945 г. А. Н. Терениным организована в Москве в Институте биохимии им. А. Н. Баха лаборатория фотобиохимии, задачей которой являлось изучение первичных фотохимических процессов фотосинтеза (преимущественно вопросы фотохимии хлорофилла и его аналогов).

Проблема первичных фотореакций в органических соединениях в конденсированных средах тесно связана с фотоэлектрическими процессами в этих соединениях. Еще с довоенных лет А. Н. Теренин уделяет большое внимание развитию фотоэлектроники органических красителей, изучению фотопроводимости пленок органических соединений, внешнего фотоэффекта и эффекта Беккереля на фазовых границах твердая пленка — раствор. В лаборатории А. Н. Теренина установлено наличие электронной и дырочной проводимости ряда органических соединений, в том числе у хлорофилла и его аналогов. Обнаружено и изучено явление оптической сенсибилизации фотоэффекта неорганических полупроводников при их окрашивании красителями. Эти работы ныне продолжены в сторону изучения фотоэлектрических свойств органических полупроводников.

А. Н. Теренин уделяет большое внимание изучению краткоживущих фотопродуктов в конденсированной фазе с использованием методов скоростной импульсной спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса.

Работы А. Н. Теренина являются примером того, что фундаментальные теоретические исследования всегда будут использованы в технике. Так, отвлеченные исследования сенсибилизации фотопроводимости окиси цинка красителями привели к использованию этого явления в электрофотографии. Число таких примеров можно было бы умножить.

Напряженную исследовательскую работу А. Н. Теренин все годы совмещает с большой педагогической деятельностью. С 1932 г. он профессор ЛГУ и автор курса «Введение в спектроскопию», а ныне руководит кафедрой фотонной биомолекулярной физики в ЛГУ. Им воспитана плеяда ученых, успешно работающих в области спектроскопии, фотохимии и физической химии.

Особое внимание А. Н. Теренин уделяет введению в науку талантливой молодежи, в его лаборатории всегда работают школьники и студенты; А. Н. Теренин, несмотря на свои многообразные обязанности, лично руководит молодыми людьми, входя во все детали эксперимента.

Выдающиеся заслуги А. Н. Теренина в области развития фотохимии и фотофизики получали неоднократное признание в нашей стране и за ее пределами. В 1945 г. ему была присуждена Государственная премия первой степени по химии. В 1954 г. за работы по люминесценции А. Н. Теренину была присуждена золотая медаль имени С. И. Вавилова по физике. За работы в области молекулярной спектроскопии А. Н. Теренину в 1959 г. была присуждена Болонским университетом золотая медаль им. Чиамичиана. За работы по межмолекулярному переносу энергии на Международном конгрессе по фотобиологии в Лондоне в 1964 г. А. Н. Теренину была вручена золотая медаль им. Финзена.

А. Н. Теренин — председатель Научного совета АН СССР по проблемам фотосинтеза, координирующего научную деятельность в этом направлении в Советском Союзе. А. Н. Теренин состоит почетным членом французского Общества физической химии и английского химического общества. Он представляет СССР в комиссии по строению и спектроскопии молекул Международного объединения общей и прикладной химии (ЮПАК).

Советское правительство высоко оценило разносторонние научные заслуги А. Н. Теренина, наградив его четырьмя орденами Ленина, орденом Трудового Красного Знамени, орденом Красной Звезды и медалями.

Свое 70-летие академик А. Н. Теренин встречает в расцвете творческих сил и строит планы дальнейшего наступления на область взаимодействия света с веществом, используя последние достижения экспериментальной физики и химии.

А. А. Красновский

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

Доклады Академии наук СССР
1966. Том 168, № 5

УДК 541.1 + 541.8 + 541.4

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ СОЕДИНЕНИЙ ОКИСНОГО ЖЕЛЕЗА; СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОКИСЛАМИ ВОЛЬФРАМА, ТИТАНА И ЦИНКА

Изучение фотохимического окисления воды представляет интерес в связи с моделированием отдельных реакций фотосинтеза растений. Действие ультрафиолетового света в области собственного поглощения гидратированных ионов — окислителей приводит к выделению кислорода; так, Вейсс и Порре ([1]) обнаружили выделение кислорода при освещении растворов перхлората церия, Даин и Качан ([2]) — при освещении перхлората железа; эта реакция шла с малым квантовым выходом и обладала максимумом спектральной чувствительности при 240 мμ. Недавно Бальзани и Карасити ([3–5]) нашли, что освещение растворов комплексных солей октацианидов вольфрама и молибдена линиями ртути 365 и 404 мμ ведет к выделению кислорода с высоким квантовым выходом.

Давно известно выделение кислорода при разложении перманганата калия в водном растворе под действием ультрафиолета ([6]). Качан и Шерстобоева ([7]) обнаружили, что введение кварца увеличивает выход этой реакции в согласии с наблюдениями Даина и Качана ([8]) над действием поверхности на фотохимическое выделение кислорода.

Задача заключалась в исследовании возможности сенсибилизации реакций этого типа к более длинноволновой области спектра. Ранее мы нашли ([9, 11]), что введение фотокатализаторов — окиси цинка, двуокиси титана и вольфрамовой кислоты сдвигает спектральную чувствительность реакций, сопровождающихся выделением кислорода, в область собственного поглощения изученных фотокатализаторов, т. е. в близкую ультрафиолетовую и сине-фиолетовую область спектра *.

В системе, содержащей феррицианид калия или железоаммиачные квасцы, мы обнаружили сенсибилизированное выделение кислорода в присутствии окислов цинка, титана и вольфрама. Реакции этого типа могут рассматриваться как неорганические модели реакции Хилла ([10]). Мы нашли, что окись цинка и двуокись титана эффективно фотосенсибилизируют разложение перманганата калия ([9]).

Длинноволновая граница поглощения в случае белых окислов цинка и титана лежит в области 380—400 мμ и в случае желтой вольфрамовой кислоты — до 450 — 500 мμ. Сенсибилизированное выделение кислорода измерялось в стеклянных сосудах, т. е. в условиях, когда прямое фотохимическое выделение кислорода практически отсутствует. Действующим светом в опытах с окислами цинка и титана были линии ртути 365 мμ, в опытах с окислами вольфрама — линии 365, 404 и 436 мμ.

В настоящей работе измерены квантовые выходы выделения кислорода и стехиометрия описанных реакций.

Методика. Выделение кислорода измеряли микроманометрическим методом Варбурга в стеклянных сосудах при 20° С. Освещение осуществлялось со стороны дна манометрических сосудов ртутно-кварцевой лампой ПРК-4 в кварцевой муфте, погруженной в водную ванну термостата ([10]).

* В дальнейшем изложении термины «фотокатализатор» и «сенсибилизатор» мы употребляем как синонимы.

Наибольшая интенсивность света лампы в области 250—500 мμ на уровне дна сосуда составляла $6 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. Интенсивность света варьировали с помощью калиброванных проволочных сеток. Опыты проводили в атмосфере воздуха и азота. В последнем случае сосуды с реакционной смесью продували азотом, очищенным от следов кислорода в колонках со щелочным гидросульфитом. Квантовый выход реакции определяли с помощью железооксалатного актинометра ([11, 12]), обладающего постоянной величиной квантового выхода в области 250—500 мμ. Раствор для актинометрии помещали в те же манометрические сосуды, в которых наблюдали выделение кислорода. Более подробное описание установки и реактивов дано в предыдущей работе ([10]).

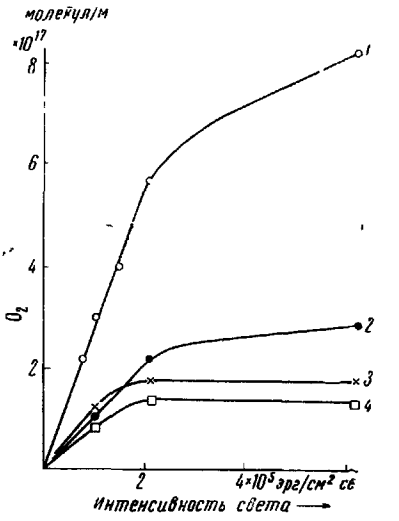


Рис. 1. Зависимость выделения кислорода от интенсивности света. Стеклянный сосуд. 10 мл воды. Лампа ПРК-4. 0,2 г фотокатализатора. *1*, *2* — железоаммиачные квасцы (*1* — 0,05 г + WO_3, *2* — 0,025 г + TiO_2); *3*, *4* — феррицианид (*3* — 0,015 г + ZnO, *4* — 0,015 г + WO_3)

Условия реакций. Соотношение количества фотокатализатора и соединений железа изучалось при наибольшей интенсивности света. Опыта вели в 20 мл сосудах с объемом реакционной смеси 10 мл. При 0,2 г сенсибилизатора оптимальные результаты были получены с 0,015 г феррицианида калия, с 0,025 г квасцов с TiO_2, 0,050 г с WO_3. Увеличение количества фотокатализатора до 0,5 г приводило к увеличению скорости реакции.

На рис. 1 показана зависимость скорости реакции от интенсивности света. Интенсивность света изменяли, заключая манометрические сосуды в металлические сетки с различной плотностью. Опыты проводили в течение 25 мин. Скорость реакции измеряли на прямолинейном участке кривой. Изученные реакции с железными солями достигают насыщения при $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. В случае разложения перманганата калия светового насыщения реакции наблюдать не удалось.

Квантовый выход. В табл. 1 приведены результаты измерений квантового выхода.

Таблица 1

Квантовый выход выделения кислорода в системах фотокатализатор — соединения окисного железа ($2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек)

Соединение железа	Фотокатализатор	Квантовый выход, $\gamma \cdot 100$	
		воздух	азот
Феррицианид	окись цинка	0,60	1,00
	двуокись титана	—	0,30
	вольфрамовая к-та	0,42	0,74
Железоаммиачные квасцы	двуокись титана	0,73	1,60
	вольфрамовая к-та	1,90	3,10

Измерения показали, что величина квантового выхода изученных реакций имеет порядок 10^{-2}; в азоте квантовый выход реакций выше, чем в присутствии воздуха. Наибольший квантовый выход выделения кислорода получен в системе, содержащей вольфрамовую кислоту и железоаммиачные квасцы.

Таким образом, хотя эффективность сенсибилизированных реакций мала, но значительно превышает эффективность прямых фотореакций, идущих в данных системах в более коротком ультрафиолете, в кварцевых сосудах. Наши измерения показали, что величина квантового выхода выделения кислорода в растворе железоаммиачных квасцов в кварцевом сосуде (без фотокатализатора) не превышает 10^{-4}, а в случае феррицианида калия реакция практически не идет.

Ниже показаны измерения квантового выхода фотокаталитического разложения перманганата калия (0,005 г $KMnO_4$, 0,03 г фотокатализатора, 10 мл воды, свет $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек).

Фотокатализатор	Квантовый выход, $\gamma \cdot 100$
Без фотокатализатора	0,06
Двуокись титана	0,20
Окись цинка	1,10

Таким образом, квантовый выход этой реакции также имеет порядок 10^{-2}.

Стехиометрия измерялась для наиболее эффективной реакции, сенсибилизированной вольфрамовой кислотой (рис. 2). Следовало ожидать, что реакция идет согласно уравнению:

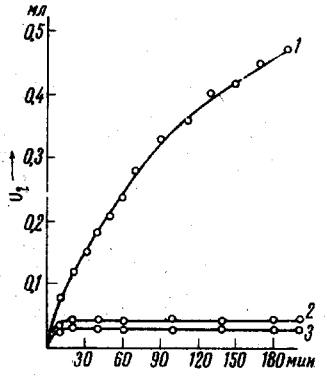


Рис. 2. Сенсибилизированное вольфрамовой кислотой выделение кислорода. 10 мл воды, 0,2 г вольфрамовой кислоты, 0,05 г железоаммиачных квасцов. Свет $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. *1* — все компоненты, *2* — без вольфрамовой кислоты, *3* — без железоаммиачных квасцов

$$Fe_2(SO_4)_3 + H_2O \rightarrow 2FeSO_4 + {}^1/_2O_2 + H_2SO_4. \quad (1)$$

Задача сводилась к количественному определению выделенного кислорода, образовавшегося закисного железа и серной кислоты. Объем выделившегося кислорода измеряли при помощи прибора Варбурга. Для определения закисного железа реакционные смеси, стоявшие в темноте и после светового опыта, отфильтровывали от взвешенных частиц вольфрамовой кислоты, подкисляли 0,1 *N* серной кислотой и титровали раствором перманганата калия. Разность титрования между световым опытом и контрольным опытом, стоявшим в темноте, показывает количество образовавшегося закисного железа. Для определения кислоты проводилось потенциометрическое титрование в двух вариантах: 1) раствор после светового опыта титровали 0,01 *N* NaOH, доводя pH до величины, соответствующей pH в «темновом» опыте, и 2) контрольную смесь, стоявшую в темноте, титровали 0,01 *N* серной кислотой с доведением pH до величины «светового» опыта. Результаты прямого и обратного титрования совпадали. Для того чтобы уменьшить ошибку определения, проводили длительный опыт (рис. 2) с накоплением 0,47 мл кислорода ($2{,}1 \cdot 10^{-5}$ *M*). Количество образованного в опыте $FeSO_4$ и H_2SO_4 в пределах ошибки измерения ($\pm 5\%$) соответствует уравнению (1).

Можно представить следующие возможные механизмы изученной реакции.

1. При поглощении кванта света электроны полупроводника переходят в зону проводимости, что может приводить к образованию электронодонорных и электроноакцепторных центров на фазовой границе полупроводник/раствор. Ион гидроксила воды может отдавать электрон в «дырку», ион окисного железа или комплексный ион $Fe(CN)_6^{3+}$ — воспринимать электрон от электронодонорного центра. Возможность образования OH радикалов в этих условиях была показана в опытах Корсуновского ([13]) по фотосенсибилизированному гидроксилированию бензола в присутствии TiO_2 и ZnO.

2. Первичным фотопроцессом может быть разложение WO_3 с выделением кислорода и образованием низшего окисла вольфрама (например W_2O_5), реагирующего с окисным железом:

$$2WO_3 \xrightarrow{h\nu} W_2O_5 + O_2,$$
$$W_2O_5 + Fe_2(SO_4)_3 + H_2O \rightarrow 2WO_3 + 2FeSO_4 + H_2SO_4.$$

Суммарная реакция соответствует уравнению (1).

Действительно, при освещении желтой вольфрамовой кислоты ультрафиолетом в атмосфере азота или в присутствии воздуха наблюдается посинение осадка, вероятно связанное с образованием W_2O_5. Однако измерить выделяющийся при этом кислород методом Варбурга не удается. Если после 60 мин. освещения ультрафиолетом суспензии 0,2 г вольфрамовой кислоты в 10 мл воды добавить раствор 0,05 г квасцов, то, измеряя окраску с о-фенантролином, обнаруживается Fe^{2+} в количестве 10^{-5} *M* (по сравнению с контрольным опытом без освещения).

Следует полагать, что при освещении вольфрамовой кислоты образуется низший окисел, способный восстанавливать в темноте окисное железо; при этом наблюдается возвращение первоначальной желтой окраски осадка. Аналогичные опыты были поставлены с двуокисью титана. В этом случае обнаружены лишь следы закисного железа при реакции $Fe_2(SO_4)_3$ с освещенной суспензией. Описанные результаты указывают на большую вероятность второго механизма в случае реакций, сенсибилизированных вольфрамовой кислотой.

Окончательное установление механизма описанных типов фотохимических реакций требует дальнейших исследований.

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

Поступило
20 XII 1965

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] D. Porret, J. Weiss, Nature, **139**, 1019 (1937). [2] Б. Я. Даин, А. А. Качан, ДАН, **61**, 471 (1948). [3] V. Balzani, A. Bertolyzza, V. Carassiti, Bull. Soc. chim. Belg., **71**, 821 (1962). [4] V. Balzani, V. Carassiti, Ann. Chim., **51**, 533 (1961). [5] V. Balzani, V. Carassiti, Ann. Chim., **52**, 432 (1962). [6] J. H. Mathews, L. H. Dewey, J. Phys. Chem., **17**, 211 (1913). [7] А. А. Качан, М. А. Шерстобоева, ЖНХ, **3**, 1089 (1958). [8] Б. Я. Даин, А. А. Качан, ДАН, **67**, 85 (1949). [9] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **139**, 142 (1961). [10] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **147**, 656 (1962). [11] C. Parker, Proc. Roy. Soc., **235**, 518 (1956). [12] C. Hatchard, C. Parker, Proc. Roy. Soc., **220**, 104 (1953). [13] Г. А. Корсуновский, Проблемы фотосинтеза, Изд. АН СССР, 1959, стр. 87; ЖФХ, **34**, 510 (1960).

Доклады Академии наук СССР
1966. Том 167, № 3

УДК 581.132

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. И. БЫСТРОВА, Е. В. ПАКШИНА

ВЛИЯНИЕ АТОМА МАГНИЯ В МОЛЕКУЛЕ ПИГМЕНТА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ АНАЛОГОВ ХЛОРОФИЛЛА

В 1952 г. в нашей лаборатории были обнаружены своеобразные спектральные свойства агрегированных форм бактериохлорофилла (1). Результаты этого цикла работ можно резюмировать следующим образом. Взаимодействие между близкорасположенными молекулами бактериохлорофилла в твердых пленках и коллоидных мицеллах ведет к появлению двух главных максимумов поглощения в близкой инфракрасной области спектра: при 790—800 и 850—890 мμ, соответствующих поглощению бактериохлорофилла в клетках бактерий. Исследование низкотемпературной флуоресценции позволило обнаружить сходство спектров бактериохлорофилла в твердых пленках и в клетках фотосинтезирующих бактерий (2).

В отличие от бактериохлорофилла агрегированные формы безмагниевого пигмента не изменяют положения максимума при нагревании; обработка кислотой клеток пурпурных бактерий ведет к изменению спектра поглощения, соответствующему агрегированной форме бактериофеофитина. Результаты работы позволили предположить, что формы «800» и «890» бактериохлорофилла образованы с участием атома магния, тогда как форма «850» образована с участием других группировок молекулы пигмента (1).

Зеленые фотосинтезирующие бактерии содержат аналог хлорофилла — бактериовиридин или хлоробиум-хлорофилл. Этот пигмент, содержащий вместо фитола более короткую углеводородную цепь — фарнезол (3), легче, чем хлорофилл, образует агрегированные формы (4).

В нашей лаборатории установлено, что в твердых пленках бактериовиридина наблюдаются типы упаковки с максимумами поглощения при 680 и 710 — 750 мμ, соответствующие поглощению пигмента в клетках зеленых бактерий (4). Соответственно низкотемпературные спектры флуоресценции зеленых бактерий и твердых пленок бактериовиридина подобны (5–7). В присутствии глицерина пигмент в клетках зеленых бактерий образует «мономерную» форму с максимумом при 670 мμ. Эта форма быстро разрушается при освещении в отличие от светоустойчивых агрегированных форм пигмента (4).

В настоящей работе сопоставлены спектры агрегированных форм бактериовиридина и его безмагниевого производного в твердых пленках и клетках бактерий в сравнении с агрегированными формами других пигментов.

Бактериовиридин выделяли из культуры зеленых бактерий Chloropseudomonas ethylicum с конечной хроматографией на сахарозе, по методу, принятому в нашей лаборатории. Феофитин получали из бактериовиридина обработкой эфирного раствора 0,1 *N* водным раствором соляной кислоты с последующей промывкой водой и хроматографией пигмента на бумаге.

Твердые пленки пигментов получали испарением эфирных растворов в вакууме на стенке стеклянной трубки Тунберга. Откачивание осуществлялось масляным форвакуумным насосом. Вид спектра пленок зависит от полноты удаления следов растворителя. Однако даже в присутствии следов растворителя, без откачивания пленки в глубоком вакууме, отчетливо проявляются спектральные эффекты пигмент-пигментного взаимодействия.

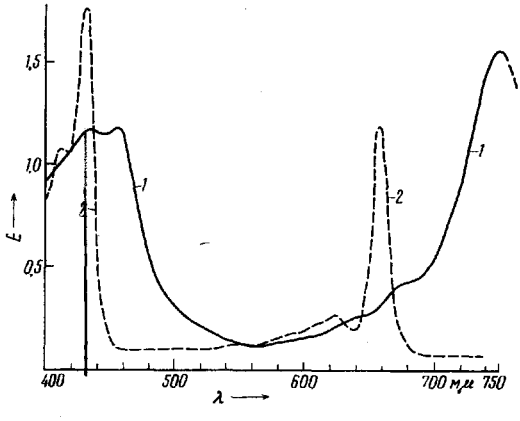


Рис. 1. Спектры поглощения твердой пленки (*1*) и эфирного раствора (*2*) бактериовиридина

На рис. 1 показан спектр поглощения твердой пленки и эфирного раствора бактериовиридина. Отчетливо виден далекий сдвиг в длинноволновую сторону пигмента в твердой пленке (максимум 740 мμ) по сравнению с эфирным раствором (максимум 660 мμ) *.

На рис. 2 показаны спектры раствора бактериовиридин-феофитина и твердой пленки этого пигмента, полученной при испарении эфирного раствора; видно, что положения максимумов поглощения пигмента в растворе и в твердой пленке близки, в отличие от магниевого комплекса. В другом опыте получена пленка бактериовиридина, обладающая максимумом поглощения при 750 мμ. Пленка залита водным 0,01 *N* раствором соляной кислоты. При этом максимум 750 мμ постепенно перемещается к 670 мμ. Таким образом, в твердых пленках феофитина не удается наблюдать больших спектральных сдвигов, наблюдаемых у магниевых комплексов.

Зеленые бактерии. Максимум поглощения бактерий так же, как и твердых пленок, расположен при 740—750 мμ. Суспензию бактерий помещали в 0,01 *N* соляную кислоту. Постепенно происходил переход максимума 750 мμ в 670 мμ с сохранением постоянства изобестической точки (рис. 3). Таким образом, в клетках бактерий феофитин, образованный из агрегированного бактериовиридина, не обладает длинноволновым сдвигом максимума поглощения. Освещение таких «феофитинизированных» клеток ведет к более медленному выцветанию пигмента, в отличие от клеток, выдержанных в глицерине. Итак, в отличие от бактериофеофитина, безмагниевое производное бактериовиридина не дает упаковок, обладающих длинноволновым сдвигом. Коротковолновый максимум при 680 мμ, наблюдающийся в спектрах поглощения зеленых бактерий и в «спектрах действия» бактериального фотосинтеза, может принадлежать феофитину или особой упаковке молекул бактериовиридина с максимумом 670 — 680 мμ. В старых культурах этот максимум соответствует феофитину, а в молодых культурах — особой форме бактериовиридина.

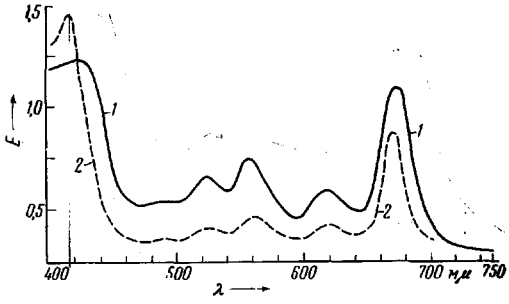


Рис. 2. Спектры поглощения твердой пленки (*1*) и эфирного раствора (*2*) феофитина бактериовиридина

* Нагревание пленки до 90° ведет к длинноволновому сдвигу до 750 мμ.

Следует сопоставить наблюдаемые эффекты со спектрами поглощения твердых пленок хлорофиллов a и b и соответствующих феофитинов, полученных при испарении в вакууме эфирных растворов этих пигментов.

Максимум поглощения твердых пленок пигментов, мμ (±2 мμ)

	Хлорофилл a	Хлорофилл b	Феофитин a	Феофитин b
При t= +20°	680	660	700	680
При t= +80°	678	655	680	680

Хлорофиллы a и b в твердых пленках дают упаковки, близкие к хлорофиллу в организмах. В пленках хлорофилла a иногда удается наблюдать упаковку с максимумом 700 мμ, переходящую при нагревании в 680 мμ. Феофитин a, в отличие от пигмента зеленых бактерий, обнаруживает длинноволновый сдвиг поглощения. Однако упаковка, соответствующая этому сдвигу, термолабильна и при нагревании переходит в более коротковолновую форму; в отличие от этого, пленка феофитина b термостабильна. Различия в свойствах агрегированных форм безмагниевого бактериовиридина и феофитина хлорофилла a связаны с разным строением молекул. Можно допустить, что плоские порфириновые циклы молекул феофитина a при образовании агрегированных структур ближе подходят друг к другу, приводя к большему взаимодействию сопряженных связей, и, следовательно, большему длинноволновому сдвигу. Однако это слабое взаимодействие, нарушаемое при нагревании. Можно думать, что близкому контакту между молекулами феофитина бактериовиридина препятствует метилирование метиновых группировок и, возможно, иная геометрия остатка фарнезола, обладающего, как известно, более разветвленной цепью по сравнению с фитолом. Этим может определяться различие в спектральных свойствах пленок феофитина a и бактериовиридина. Термостабильность пленок феофитина b можно приписать участию карбонильной группы, взаимодействующей с пиррольным кольцом соседней молекулы.

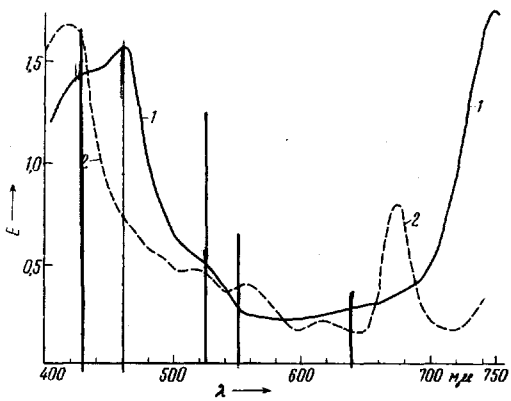


Рис. 3. Спектры поглощения зеленых бактерий Rhodopseudomonas ethylicum (*1*) и той же культуры после обработки 0,01 *N* HCl в течение 1 часа (*2*)

Следует выяснить природу «точек сцепления» между молекулами пигментов при образовании агрегированных структур. Уже указывалось на возможность связи между молекулами пигмента через «мостик» из молекулы растворителя (воды), координационно связывающей молекулы пигмента через атомы магния, перпендикулярно плоскости порфиринового кольца ([1]). При этом возможно различное количество молекул в агрегате и разные типы взаимной ориентации молекул.

Катц, Стрейн с соавторами ([8]), основываясь на изучении инфракрасных спектров и спектров я.м.р. хлорофилла в неполярных растворителях, обосновывают структуру димеров, в которых происходит наложение молекул пигмента друг на друга, так, что атом магния взаимодействует с карбонильной группой заместителя в пиррольном кольце.

В связи с этим следует указать на опыты нашей лаборатории по исследованию активации флуоресценции хлорофилла и феофитина в неполярных растворителях; эффект активации не наблюдался в случае безмагниевых пигментов ([9]).

Возможен другой путь оценки взаимодействия между молекулами пигментов в агрегированных структурах. Как известно, твердые пленки хлорофилла обладают весьма слабой флуоресценцией при комнатной температуре, тогда как при глубоком охлаждении растет длинноволновая флуоресценция агрегированных форм ([2], [10]).

Можно думать, что интенсивность флуоресценции пленок пигментов при комнатной температуре также может быть качественным признаком междумолекулярного взаимодействия: чем слабее взаимодействие, тем сильнее флуоресценция. Это явление отчетливо видно при изучении температурной зависимости спектров люминесценции бактериовиридина ([6]). В случае мономерных форм пигментов, где слабо выражено взаимодействие между молекулами, понижение температуры мало влияет на интенсивность свечения, тогда как у агрегированных форм понижение температуры ведет к резкому усилению люминесценции. Феофитины в твердых пленках обладают флуоресценцией при комнатной температуре. Это явление описано, например, при сравнительном исследовании протофеофитина и протохлорофилла ([11]).

Итак, можно предполагать, что агрегированные формы бактериовиридина с поглощением в области 740—750 мμ характеризуются междумолекулярным взаимодействием с участием центрального атома магния. Наряду с этим можно предполагать, что форма «680» бактериовиридина построена с участием иного типа междумолекулярной связи. Вопрос о молекулярной структуре агрегированных форм пигментов нуждается в углубленном изучении.

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

Поступило
30 IX 1965

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1953); 92, 1201 (1953). [2] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун Юй-цынь, ДАН, 143, 456 (1962). [3] A. S. Holt, H. W. Morley, J. Am. Chem. Soc., 82, 500 (1960). [4] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, 127, 913 (1959). [5] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, И. Б. Федорович, ДАН, 134, 1232 (1960). [6] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Б. И. Гуляев, ДАН, 152, 1231 (1963). [7] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, 8, 446 (1963). [8] J. J. Katz, G. L. Closs et al., J. Am. Chem. Soc., 85, 3801 (1963). [9] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, 70, 261 (1950). [10] Ф. Ф. Литвин, Б. И. Гуляев, ДАН, 158, 460 (1964). [11] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Биофизика, 10, 433 (1965).

Доклады Академии наук СССР
1966. Том 166, № 1

УДК 541.143

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ; ДЕЙСТВИЕ КАРОТИНА НА ЭФФЕКТ ТУШЕНИЯ

Тушение флуоресценции хлорофилла и его аналогов посторонними молекулами изучалось в ряде работ ([1–5, 18]). Цель настоящего исследования заключалась в установлении связи между структурой аналогов хлорофилла, их фотохимическими свойствами тушением флуоресценции. Представляло интерес выяснить влияние каротина на эффект тушения флуоресценции пигментов посторонними молекулами в связи с блокирующим действием полиеновых соединений на фотохимические реакции хлорофилла ([6–8]).

В работе были использованы хлорофиллы a и b, бактериовиридин, бактериохлорофилл, протохлорофилл и феофитин a, выделенные из фотосинтезирующих организмов по методам, принятым в нашей лаборатории с конечной хроматографической очисткой на сахарозе. Тушителями флуоресценции служили преимущественно кислород и различные хиноны, фотохимическое взаимодействие которых с хлорофиллом и его аналогами изучалось в наших предыдущих работах ([9–11]). В качестве растворителей использовали перегнанный ацетон (х.ч. Reanal) и пиридин (чистый, содержащий до 0,2% воды): люминесценцию возбуждали желтыми (578 мμ) и зелеными (546 мμ) линиями ртути (лампа СВДШ-120, светофильтры ЖС-18 и СЗС-21). Интегральную интенсивность люминесценции измеряли фотоэлектрическим блоком спектрофотометра СФ-4. В случае хлорофилла a, хлорофилла b, бактериовиридина и феофитина a перед фотоэлементом помещали светофильтр КС-15, в случае протохлорофилла — КС-14. Для измерения люминесценции пиридинового раствора бактериохлорофилла применяли светофильтр КС-19 и ацетонового раствора — интерференционный светофильтр с максимумом пропускания 775 мμ. «Скрещенность» светофильтров на пути возбуждающего и измеряемого света была достаточно полной. Измерения флуоресценции проводили в трубках Тунберга при 20°; тушитель вводили сливанием из бокового отвода трубки после измерения флуоресценции в вакууме. Во всех опытах после измерения тушения измеряли оптическую плотность в максимуме поглощения пигмента, чтобы можно было судить о возможном химическом взаимодействии между молекулами пигмента и тушителя. Для измерений применяли растворы пигментов с оптической плотностью 0,5—0,6 в красном максимуме поглощения, что соответствует концентрации около $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*.

Тушение флуоресценции кислородом. В трубку Тунберга вводили требуемое количество эфирного раствора пигмента, снятого с хроматограммы, эфир удаляли испарением в вакууме. Приливали 6 мл растворителя, в котором вели измерения, эвакуировали при сильном взбалтывании (с охлаждением до —50° в случае ацетона) с испарением растворителя до определенного объема (5 мл). Измеряли начальную интенсивность флуоресценции в вакууме Φ_0 пускали воздух, измеряли величину флуоресценции в присутствии воздуха $\Phi_в$ насыщали раствор кислородом и опять производили измерение флуоресценции $\Phi_к$.

Из табл. 1 видно, что в пиридиновом растворе тушение флуоресценции всех пигментов меньше, чем в ацетоне, что может быть связано с

меньшей растворимостью кислорода в пиридине ([12]). Повышенное тушение флуоресценции феофитина по сравнению с хлорофиллом в ацетоне находится в согласии с данными Ливингстона ([13]), который наблюдал более сильное тушение флуоресценции мезо- и протопорфиринов. Возможно, что отсутствие магния в молекуле пигмента облегчает подход молекулы кислорода к системе сопряженных двойных связей. Откачивание кислорода приводило к практически полному возвращению начальной интенсивности флуоресценции пигментов в вакууме.

Таблица 1

Тушение флуоресценции растворов пигментов кислородом (средние значения из 4—5 опытов)

Пигмент	Ацетон		Пиридин	
	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$
Хлорофилл a	1,07	1,30	1,07	1,23
Хлорофилл b	1,08	1,35	1,06	1,21
Феофитин a	1,11	1,58	1,02	1,18
Протохлорофилл	1,09	1,42	1,03	1,19
Бактериохлорофилл	1,07	1,33	1,03	1,15
Бактериовиридин	1,12	1,67	1,06	1,21

Таблица 2

Концентрация «половинного» тушения флуоресценции пигментов *n*-бензохиноном в ацетоне и в пиридине (в молях на литр) $\times 10$.

Пигмент	Ацетон	Пиридин
Бактериовиридин	0,080	0,138
Хлорофилл a	0,090	0,120
Хлорофилл b	0,120	0,200
Феофитин a	0,138	0,210
Протохлорофилл	0,182	—
Бактериохлорофилл	0,145	0,260

Тушение флуоресценции *n*-бензохиноном. Исследовали действие *n*-бензохинона (свежевозогнанный) в ацетоне и в пиридине. Опыт проводили в трубке Тунберга с боковым отводом. Измеряли начальную флуоресценцию в вакууме (Φ_0) затем приливали из отвода раствор хинона в вакууме и опять производили измерение $\Phi_х$. Концентрацию хинона доводили до $2 \cdot 10^{-2}$ *M*. В опытах с хлорофиллом a и бактериохлорофиллом параллельно измеряли тушение флуоресценции хиноном в присутствии воздуха. В пределах ошибки измерения зависимость тушения от концентрации хинона была одинаковой в обеих сериях опытов, поэтому в дальнейшем измерение тушения *n*-бензохиноном проводили без откачивания воздуха *.

В табл. 2 приведены значения концентрации *n*-бензохинона, соответствующие «половинному» тушению флуоресценции исследованных пигментов. Тушение феофитина a, протохлорофилла и бактериохлорофилла требует несколько большей концентрации тушителя, чем для хлорофилла a и бактериовиридина. Тушение в пиридине всех пигментов несколько слабее, чем в ацетоне, и требует соответственно более высокой концентрации тушителя.

Тушение флуоресценции в этих растворителях трудно приписать изменению концентрации пигментов в результате необратимой фотохимической реакции с тушителем, так как за время опыта практически не изменяется оптическая плотность (D) в максимуме поглощения.

На рис. 1 показана зависимость тушения флуоресценции пигментов от концентрации *n*-бензохинона. Наиболее сильно тушится люминесценция хлорофилла и бактериовиридина и менее сильно — феофитина и бактериохлорофилла. Изучение фотохимического взаимодействия пигментов с *n*-бензохиноном в наших предыдущих работах показало, что наиболее глубоко реакция шла с бактериальными пигментами и практически отсутствовала с феофитином ([9–11]). Эти данные не коррелируют с измеренной величиной тушения флуоресценции хиноном: тушение нереагирующего феофитина мало отличается от тушения активно реагирующего с хиноном бактериохлорофилла.

На рис. 2 приведены результаты опытов по сравнению способности разных хинонов тушить флуоресценцию хлорофилла a. Использованы

* Метилвиологен в спирте тушит флуоресценцию хлорофилла a с эффективностью, близкой к хинону, но не тушит флуоресценции феофитина.

n-бензохинон, как наиболее сильный окислитель (+0,7 в) 2,3-диметокси-5-метилбензохинон, 2-метил-1,2-нафтохинон (+0,42 в) и антрахинон (—0,20 в). В скобках даны величины редокс-потенциала E_0. Тушение флуоресценции этими соединениями качественно соответствует фотореакции хлорофилла ([9–11]); так, реакция обратимого фотоокисления

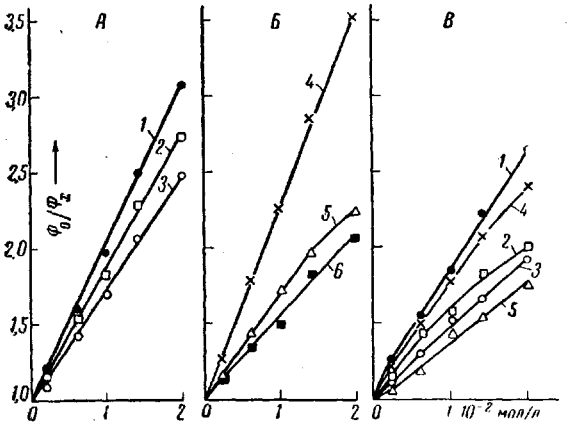


Рис. 1

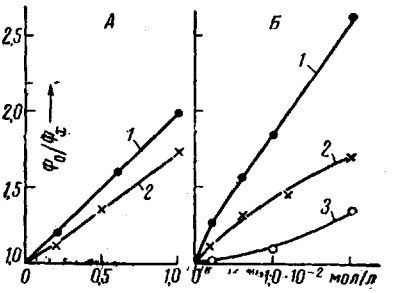


Рис. 2

Рис. 1. Тушение флуоресценции пигментов *n*-бензохиноном в ацетоне (*А, Б*) и в пиридине (*В*). Цифры в скобках показывают изменение оптической плотности, выраженное отношением *D* после опыта к начальной (первая цифра — для ацетона, вторая — для пиридина). *1* — хлорофилл а (1,0; 1,0); *2* — хлорофилл b (0,98; 0,92); *3* — феофитин а (1,0; 1,0); *4* — бактериовиридин (0,89; 0,97); *5* — бактериохлорофилл (0,97; 0,93); *6* — протохлорофилл (0,96)

Рис. 2. Тушение флуоресценции хлорофилла а разными хинонами в ацетоне (*А*) и в пиридине (*Б*). Для *А*: *1* — *n*-бензохинон, *2* — 2,3-диметокси-5-метилбензохинон; для *Б*: *1* — *n*-бензохинон, *2* — 2-метил-1,4-нафтохинон, *3* — антрахинон

хлорофилла а идет наиболее глубоко с *n*-бензохиноном и практически не идет с антрахиноном. Опыты с 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном проводили в ацетоне, так как при добавлении к раствору пигмента в пиридине небольшого количества этого хинона происходит сильное падение интенсивности красной флуоресценции, сопровождающееся изменением *D* хлорофилла.

Тушение флуоресценции фенилгидразином. Измеряли действие фенилгидразина на хлорофилл а и феофитин а в ацетоновом растворе. Фенилгидразин добавляли из головки трубки Тунберга после удаления из раствора растворенного воздуха. Концентрацию фенилгидразина в опыте доводили до $7{,}2 \cdot 10^{-1}$ мол/л. Мы подтвердили данные Дилунта и Чернюк ([5]) о том, что фенилгидразин тушит флуоресценцию феофитина сильнее, чем хлорофилла.

Влияние каротина на эффект тушения флуоресценции. Исследования сводились к измерению интенсивности флуоресценции в присутствии тушителя и разных количеств каротина. Тушителями флуоресценции служили в опытах с хлорофиллом а *n*-бензохинон и кислород, а в опытах с феофитином — фенилгидразин. Чтобы исключить экранирующее действие «хвоста» поглощения каротина в области возбуждения, начальную флуоресценцию измеряли в опыте с каротином, после чего вводили тушитель. Результаты этих опытов показали, что в присутствии каротина уменьшается эффект тушения флуоресценции хлорофилла хиноном (рис. 3), кислородом (табл. 3) и феофитина а — фенилгидразином. Так, концентрация «половинного» тушения феофитина фенилгидразином в ацетоне составляет 0,45 мол/л, а в присутствии $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ каротина 0,63 мол/л.

Известно защитное действие каротина при реакциях фотоокисления и фотовосстановления ([5–8]) и фотофеофитинизации ([14]) хлорофилла в растворах. Элементарный механизм действия каротина в этих реакциях до сих пор не установлен с полной определенностью. Ливингстон и Фужимори ([15]), используя технику импульсной спектроскопии, показали воз-

можность тушения каротином триплетного возбужденного состояния хлорофилла. Мы нашли, что каротин не тушит флуоресценции хлорофилла, возбуждаемой красным светом ([8]), т. е. не реагирует с синглетно возбужденным хлорофиллом; недавно Марти и Рабинович ([16]) наблюдали тушение флуоресценции хлорофилла каротином при возбуждении хлорофилла в «синем» максимуме поглощения.

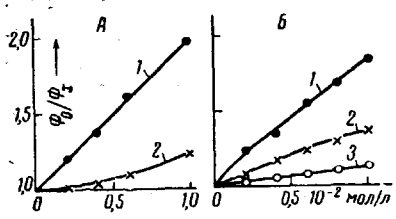


Рис. 3. Влияние каротина на тушение флуоресценции хлорофилла а *n*-бензохиноном в ацетоне (*А*) и в пиридине (*Б*). Для *А*: *1* — контроль (хлорофилл а без каротина), *2* — каротин, $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ *М*; для *Б*: *1* — контроль, *2* — каротин $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ *М*, *3* — каротин $5{,}0 \cdot 10^{-4}$ *М*

Механизм найденного блокирующего действия каротина неясен; эффект наблюдается с тушителями разной химической природы — кислородом, хиноном, фенилгидразином — и поэтому трудно объяснить образованием комплексов каротина с тушителем. В опытах Литвина и Гуляева ([17]) установлено образование комплексов хлорофилла с каротином в монослоях. Требует исследования образование комплексов каротина с хлорофиллом в растворе и дезактивация каротином триплетного состояния пигментов, возможно образующегося в акте тушения флуоресценции.

Итак величина тушения флуоресценции пигментов — аналогов хлорофилла кислородом и хиноном не соответствует скорости и глубине фотохимической реакции этих пигментов с изученными окислителями. Так, например, флуоресценция крайне трудно фотоокисляющегося феофитина сильнее тушится кислородом, чем флуоресценция быстроокисляющегося бактериохлорофилла.

Таблица 3

Влияние каротина на тушение флуоресценции хлорофилла кислородом

Концентрация каротина, мол/л	Пиридин		Ацетон	
	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$
Без каротина	1,07	1,23	1,10	1,30
$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	1,00	1,12	1,06	1,22
$5{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,00	1,05	—	—

Следует искать корреляцию между эффектом тушения и первичным быстрообратимым фотохимическим процессом, но не сравнительно медленно идущими, более глубокими фотохимическими изменениями пигмента. Возможно, что измеряемый эффект включает различные типы тушения «физическое» и «химическое». Так, обратимое тушение флуоресценции пигментов кислородом может быть, согласно Теренину ([12]), связано с парамагнитными свойствами кислорода. Требует экспериментального выяснения, нет ли связи между тушением флуоресценции хлорофилла окислителями и промежуточным переходом пигмента в триплетное состояние.

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

Поступило
23 VIII 1965

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] H. Kautsky, A. Hirsch, Ber., 64, 2677 (1931). [2] J. Frank, H. Levi, Zs. phys. Chem., 27, 409 (1934). [3] В. Б. Евстигнеев, А. А. Красновский, ДАН, 60, № 4, 623 (1948). [4] R. Livingston, Ke Chum-lin, J. Am. Chem. Soc., 72, 909 (1950). [5] И. И. Дилунг, И. Н. Чернюк, ДАН, 140, 162 (1961); ЖФХ, 37, 1100 (1963). [6] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. В. Пакшина, Биохимия, 25, 288 (1960). [7] H. Claes, Zs. Naturforsch., 16b, 445 (1961). [8] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Биофизика, 4, 5 (1959); Биохимия, 26, 860 (1961). [9] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 153, 721 (1963). [10] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 158, 730 (1964). [11] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [12] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1946. [13] R. Livingston, L. Thompson, M. Ramarao, J. Am. Chem. Soc., 74, 1074 (1952). [14] Е. В. Пакшина, А. А. Красновский, Биохимия, 29, 1132 (1964). [15] E. Fujimori, R. Livingston, Nature, 180, 1936 (1957). [16] N. R. Murty, E. Rabinowitch, J. Chem. Phys., 41, 602 (1964). [17] Ф. Ф. Литвин, Б. А. Гуляев, В. А. Синещеков, ДАН, 162, № 5 (1965). [18] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 52, 1073 (1952).

Доклады Академии наук СССР
1966. Том 167, № 4

УДК 541.143

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ МЕТИЛВИОЛОГЕНОМ

В работах Арнона ([1]) показано, что ферредоксин может быть одним из конечных акцепторов в цепи фотосинтетического переноса электрона; высказано предположение, что ферредоксин, фотовосстанавливаясь, может воспринимать электрон возбужденной молекулы хлорофилла.

Ферредоксин обладает среди биохимических систем наиболее «отрицательной» величиной окислительно-восстановительного потенциала; в качестве модели может быть использован метилвиологен, обладающий способностью к «одноэлектронному» окислению — восстановлению и величиной потенциала, близкой к водородному электроду ($E_0' = -0{,}446$ в). Следовало изучить фотохимическое взаимодействие хлорофилла с метилвиологеном.

В нашей лаборатории было установлено ([2]), что хлорофилл способен фотосенсибилизировать восстановление метиовиологена с использованием аскорбиновой кислоты или молекул растворителя (пиридина) в качестве донора электрона. Блокируя реакцию фотовосстановления хлорофилла, метилвиологен может реагировать с восстановленной формой этого пигмента. Наконец, наблюдения обратимого фотопотенциала в системе хлорофилл — метилвиологен ([2]) и тушения флуоресценции хлорофилла виологеном ([3]) могут служить указанием на возможность обратимого фотовосстановления виологена, сопряженного с окислением хлорофилла. Метилвиологен ускоряет фотоокисление хлорофилла кислородом ([4]), что свидетельствует о возможности фотохимического взаимодействия хлорофилла с виологеном.

Эффект тушения флуоресценции пигментов связывается с обратимым «одноэлектронным» фотохимическим взаимодействием возбужденной молекулы пигмента с тушителями ([5–7]). В настоящей работе изучено тушение флуоресценции хлорофилла и его аналогов метилвиологеном в условиях, использованных нами при изучении тушения этих пигментов хинонами и кислородом; в предыдущей работе ([3]) мы кратко указали на тушение флуоресценции хлорофилла метилвиологеном и отсутствие эффекта в случае феофитина.

Измерения вели при комнатной температуре в трубке Тунберга, без воздуха, согласно описанной ранее методике ([3]). Использовали преимущественно растворы пигментов в этиловом спирте (ректификат). Флуоресценцию возбуждали зелеными и желтыми линиями ртути (578; 546 мμ). Измерение — фотометрическим блоком спектрофотометра СФ-4 через красный светофильтр КС-15, а в случае бактериохлорофилла — через интерференционный светофильтр с максимумом пропускания 775 мμ. До и после измерения регистрировали оптическую плотность в максимумах поглощения. На рис. 1—3 показано отношение начальной флуоресценции Φ_0 к величине Φ после введения тушителя.

Опыты показали, что метилвиологен тушит флуоресценцию хлорофилла а с эффективностью, близкой к хинону, несмотря на большую разницу в величине редокс-потенциала этих тушителей. Плохая растворимость метилвиологена в пиридине не позволила использовать весь ряд концентраций; незначительный эффект тушения флуоресценции хлорофилла а наблю-

дался лишь при концентрации метилвиологена $4 \cdot 10^{-3}$ *M*. Это явление можно поставить в связь с тем, что в пиридине хуже проявляется способность к фотоокислению по сравнению со спиртом. Флуоресценция феофитина практически не тушится метилвиологеном, что соответствует большей устойчивости феофитина к фотоокислению. Подобным образом флуоресценция хлорофилла b тушится гораздо слабее, чем у хлорофилла a (рис. 1). Однако легко окисляющийся бактериохлорофилл тушится метилвиологеном менее эффективно, чем хлорофилл a, что можно связать с более низкой величиной возбужденного уровня бактериохлорофилла; максимум поглощения этого пигмента в растворе более чем на 100 мμ сдвинут в длинноволновую область по сравнению с хлорофиллом a. Своеобразно оказалось поведение бактериовиридина. Введение начального количества метилвиологена вело не к тушению, а к возгоранию флуоресценции; увеличение концентрации тушителя вело к «обычному» тушению, однако эффективность этого процесса была также более низкой, чем у хлорофилла a (рис. 2), хотя бактериовиридин гораздо легче окисляется кислородом, чем хлорофилл a.

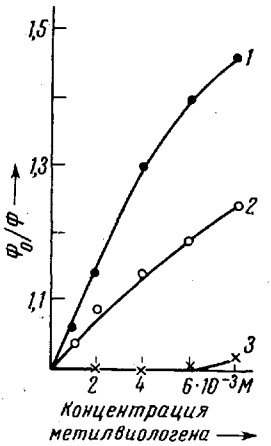


Рис. 1. Тушение флуоресценции хлорофилла a (*1*), хлорофилла b (*2*) и феофетина a (*3*) метилвиологеном в этиловом спирте

Это явление объясняется следующим образом: бактериовиридин (более склонный к агрегации, чем хлорофилл ([8])) находится в спиртовом растворе частично в агрегированной форме. Введение метилвиологена вначале ведет к дезагрегации и, следовательно, усилению флуоресценции; далее происходит тушение флуоресценции «мономерной» формы пигмента.

Желательно изучить возможность подобных элементарных процессов в интактных хлоропластах. Недавно в работах Арнона ([9]) было установлено тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах кофакторами фотофосфорилирования — менадионом и феназином, а также ферредоксином. Нужно отметить, что первые два соединения слабо тушат флуоресценцию растворенного хлорофилла ([3]).

Мы измерили тушение люминесценции хлоропластов и их осколков метилвиологеном. Препараты хлоропластов выделяли из проростков гороха по методу ([10]). Осадок центрифугированных «целых» хлоропластов* суспендировали в сахарозно-фосфатном растворе (0,5 *M* сахароза, *M*/75 фосфатный буфер pH 7,3); фрагменты хлоропластов — в фосфатном буфере при 2°, метилвиологен растворяли соответственно в сахарозно-фосфатном и фосфатном буфере. После введения виологена в суспензию растворенный воздух откачивали из трубки Тунберга. Измерения вели при комнатной температуре.

На рис. 3 показана зависимость флуоресценции хлорофилла в пластидах от концентрации метилвиологена в растворе. Тушение метилвиологеном в хлоропластах гораздо эффективнее, чем в растворах, и сопровождается насыщением.

Рис. 3 демонстрирует также флуоресценцию в контрольных опытах, где производилась та же процедура добавления 0,1 мл фосфорного буфера (имитирующего раствор виологена) и откачивания воздуха. Эта процедура также ведет к некоторому уменьшению флуоресценции хлорофилла. Измерения тушения флуоресценции хлоропластов воздухом и кислородом показали, что величина тушения кислородом близка к величине тушения хлорофилла в растворе. Откачивание кислорода в большинстве опытов приводило к почти полному возвращению начальной интенсивности флуоресценции в вакууме.

* Приносим благодарность И. И. Филиппович и Э. Н. Светайло, любезно предоставивших нам свежевыделенные препараты хлоропластов.

Однако в интерпретации опытов с хлоропластами следует проявить осторожность. Тушение флуоресценции хлоропластов и их осколков сопровождается значительным падением оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла — в приведенном опыте от 1,2 до 0,85 при конечной концентрации тушителя. Требует исследования вопрос, не является

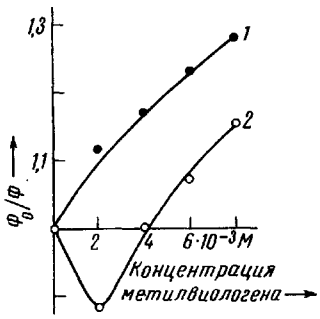


Рис. 2

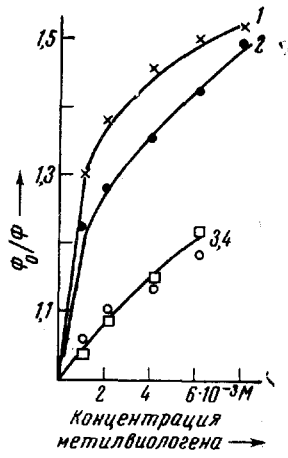


Рис. 3

Рис. 2. Тушение флуоресценции бактериохлорофилла (*1*) и бактериовиридина (*2*) метилвиологеном в этиловом спирте

Рис. 3. Тушение флуоресценции хлоропластов (*2*) и их фрагментов (*1*) метилвиологеном. *3* — контрольный опыт с хлоропластами, *4* — с фрагментами при той же процедуре опыта, но без введения метилвиологена

ли тушение в хлоропластах процессом, сопутствующим коллоидным изменениям структур под влиянием тушителя.

Таким образом, описанные эксперименты указывают на возможность «одноэлектронного» взаимодействия хлорофилла в возбужденном синглетном состоянии с метилвиологеном.

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

Поступило
16 XII 1965

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] D. I. Arnon, VI Intern. Congr. Biochem., N. Y., 1964, Abstr., p. 744. [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **163**, 761 (1965). [3] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **166**, 223 (1966). [4] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Биофизика, **11**, № 3 (1966). [5] J. Weiss, Trans. Farad. Soc., **32**, 1331 (1936). [6] А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947. [7] Б. Я. Даин, И. И. Дилунг, Сборн. Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 53. [8] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **127**, 913 (1959). [9] D. I. Arnon, H. Tsujimoto, B. D. McSwain, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **54**, 927 (1965). [10] Н. М. Сисакян, И. И. Филиппович, Э. Н. Светайло, ДАН, **147**, 488 (1962).

Доклады Академии наук СССР
1966. Том 169, № 3

УДК 577.1+576.343

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, И. М. САПОЖНИКОВА

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ С ТИОМОЧЕВИНОЙ И КИСЛОРОДОМ

Система хлорофилл — тиомочевина — кислород давно привлекает внимание исследователей; Гаффрон (1) около 40 лет тому назад нашел, что сенсибилизированное окисление аллилтиомочевины кислородом идет с квантовым выходом, близким к единице. Ускоренное фотоокисление хлорофилла в присутствии производных тиомочевины наблюдал Вебер (2). Варбург с сотрудниками (3) широко использовал и реакцию сенсибилизированного окисления тиомочевины в пиридиновом растворе в качестве химического актинометра; в случае применения в качестве сенсибилизатора протопорфирина было замечено появление поглощения при 675 мμ после реакции. Изучая фотосенсибилизированное окисление аллилтиомочевины хлорофиллом а, Ливингстон и Оуэнс (9) заметили образование фотопродукта с максимумом поглощения при 698 мμ. В данной работе изучается реакция аналогов хлорофилла с тиомочевиной и кислородом.

Первые опыты мы проводили с раствором хлорофилла а в этиловом спирте, содержащем от 3 до 10% воды, в присутствии 10^{-3} *M* тиомочевины «особой чистоты» и кислорода воздуха. Освещая раствор лампой накаливания через зеленый светофильтр ЗС-1, мы наблюдали падение поглощения при 665 мμ и появление нового максимума при 700 мμ.

При освещении раствора хлорофилла а белым или красным светом этого явления не наблюдалось из-за быстрого фотоокисления продукта, обладающего поглощением в длинноволновой области спектра.

В присутствии кислорода без тиомочевины наблюдалось обычное деструктивное фотоокисление хлорофилла. С тиомочевиной (проводя опыт в вакууме) путем спектрофотометрических и потенциометрических измерений не удается наблюдать фотовосстановления хлорофилла ни в спирте, ни в пиридине.

Ниже приводятся результаты исследования реакции различных пигментов в этиловом спирте. Хлорофилл а образует наряду с продуктами деструкции продукт с максимумом поглощения при 700 мμ (рис. 1), устойчивый в темноте и разрушающийся при дальнейшем освещении красным светом (10^4 эрг/см^2·сек).

Реакция с хлорофиллом b идет глубже, при этом образуется продукт с максимумом поглощения при 678 мμ (см. рис. 1) и флуоресценции ~685 мμ. Постоянство изобестической точки указывает на количественный характер перехода. Продукт устойчив в темноте и медленно окисляется при действии красного света; в отличие от хлорофилла а, реакцию хлорофилла b с тиомочевиной удается наблюдать и при освещении красным светом. В процессе реакции наряду с образованием фотопродукта происходит деструктивное фотоокисление хлорофилла с образованием соединений, слабо поглощающих в длинноволновой области спектра. Степень перехода хлорофилла b в продукт 678 можно выразить соотношением оптической плотности (D) раствора хлорофилла b в его максимуме поглощения при 655 мμ к D фотопродукта при 678 мμ. Ниже показано это отношение в за-

висимости от количества тиомочевины (ТМ) в растворе в условиях достижения максимальной концентрации фотопродукта (ТМ в мг в 5 мл раствора, зеленый свет):

ТМ, мг	D_{669}/D_{678}	ТМ, мг	D_{669}/D_{678}
0	9,9	20	1,45
1	7,40	40	1,42
5	2,10	60	1,34
10	1,50	80	1,31

Опыты показали, что при увеличении количества тиомочевины растет выход фотопродукта 678; это следует объяснить ускорением реакции с тиомочевиной промежуточного продукта фотоокисления хлорофилла кислородом. При введении более 50 мг тиомочевины в 5 мл раствора полное растворение наблюдается в процессе фотореакции, что, вероятно, связано с фотосенсибилизированным окислением этого соединения.

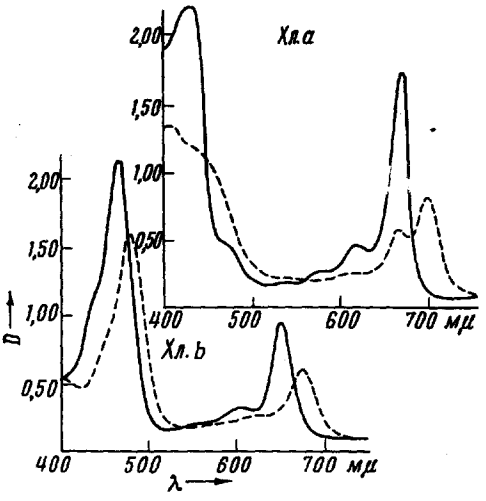


Рис. 1. Фотореакция хлорофилла a и b с тиомочевиной на воздухе при 20°. Зеленый свет (лампа накаливания, светофильтр ЗС-1, 10^3 эрг/см²·сек), 5 мл раствора хлорофилла в этиловом спирте, 10% воды, 50 мг тиомочевины. Измерение на регистрирующем спектрофотометре СФ-10. Сплошная кривая — спектр поглощения до освещения, пунктирная кривая — после 10 мин освещения

Протохлорофилл при освещении с тиомочевиной образует соединение с размытым максимумом поглощения около 640 мμ. В случае бактериовиридина и бактериохлорофилла не удается наблюдать образования устойчивых фотопродуктов. При фотоокислении бактериовиридина без тиомочевины в спирте образуется фотопродукт с максимумом при 760 мμ, в эфире — при 760 и 860 мμ. Реакции с феофитинами a и b идут гораздо медленнее, чем с магниевыми комплексами; однако и здесь образуются длинноволновые продукты с максимумами поглощения, близкими к продуктам, полученным из соответствующих хлорофиллов.

Введение тиомочевины ускоряет реакцию в зеленом и красном свете, идущую гораздо медленнее лишь в присутствии кислорода воздуха * (см. также рис. 2):

Пигмент	Без ТМ	С ТМ	Пигмент	Без ТМ	С ТМ
Хлорофилл a	0,04	0,60	Протохлорофилл	0,00	0,04
Хлорофилл b	0,01	0,40	Бактериовиридин	0,25	0,50
Феофитин a	0,00	0,05	Бактериохлорофилл**	1,50	1,50
Феофитин b	0,00	0,01			

Различие в действии зеленого и красного света следует связать с преимущественным поглощением света промежуточными фотопродуктами в длинноволновой области спектра. Скорость фотоокисления продуктов реакции с тиомочевиной у различных соединений приблизительно соответствует скорости фотоокисления исходных пигментов. Обращает на себя внимание тот факт, что лишь у бактериохлорофилла введение тиомочевины практически не влияет на скорость фотоокисления.

* Падение оптической плотности пигмента ΔD в 1 мин., в красном максимуме поглощения на начальном участке кривой за первые 2 мин. освещения; раствор пигментов в спирте 10^{-5} *M*, тиомочевина (ТМ) 10^{-3} *M*, красный свет 10^4 эрг/см²·сек, светофильтр КС-13, 20°.

** Опыт с бактериохлорофиллом при освещении 10^3 эрг/см²·сек за 30 сек. фотореакции.

Влияние среды изучали преимущественно для реакции хлорофилла b. Реакция идет быстро в этиловом и метиловом спиртах, содержащих до 20% воды. Охлаждение до —70° ведет к торможению реакции. Введение глицерина в спирт также приводит к торможению. В эфире и ацетоне наблюдается более медленное образование фотопродукта. В пиридине реакция практически не идет: введение пиридина в спирт ингибирует ее.

Действие тиосоединений. Мы применяли в спиртовых растворах аллилтиомочевину, тиомолочную, тиогликолевую кислоты и цистеин. Лишь с тиомолочной кислотой наблюдалась медленно идущая реакция. Введение сероводорода в раствор блокировало окисление, не приводя к фотореакции.

Действие ингибиторов. Соединения, тормозящие фотоокисление хлорофилла кислородом, блокируют фотореакцию с тиомочевиной. Гидрохинон (10^{-3} *M*) и аскорбиновая кислота 0,006 *M* полностью останавливают процесс.

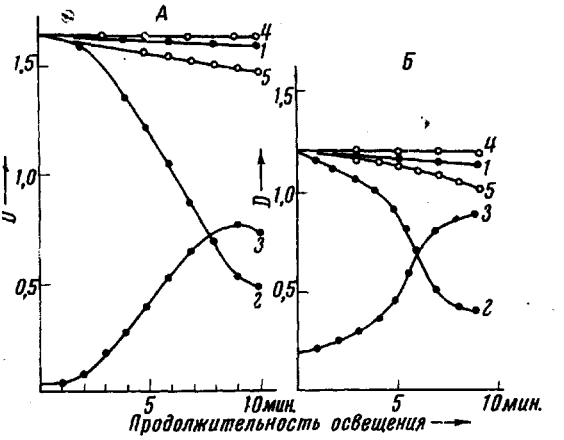


Рис. 2. Скорость фотоокисления хлорофилла a и феофитина a (*А*) и хлорофилла b и феофитина b (*Б*) с тиомочевиной (ТМ) в этиловом спирте. Зеленый свет, 50 мг ТМ в 5 мл этилового спирта, 10% воды, 10^{-5} мол. пигмента. *D* — в красном максимуме. *1* — хлорофилл без ТМ (падение *D* при 665 мμ), *2* — хлорофилл с ТМ, *3* — хлорофилл с ТМ (рост *D* фотопродукта при 700 мμ для *А* и 678 мμ для *Б*), *4* — феофитин a без ТМ, *5* — феофитин a с ТМ

Свойства фотопродукта изучали для производных хлорофилла a и b. Это устойчивые соединения, обладающие флуоресценцией; при действии кислоты превращаются в соответствующие феофитины, обладающие характерными спектрами поглощения. В присутствии пиридина и аскорбиновой кислоты фотопродукты подвергаются обратимому фотовосстановлению, как и все производные хлорофилла.

При освещении красным светом фотопродукты деструктивно окисляются: полученный из хлорофилла b (фотопродукт 678) медленнее, чем из хлорофилла a (фотопродукт 700). Нагревание раствора до 70° не ведет к изменению спектра поглощения фотопродукта.

Механизм реакции. Мы не смогли установить возможность фотохимической реакции хлорофилла с тиомочевиной без кислорода. Таким образом, в механизме исследуемой реакции следует исключить первичное фотовосстановление пигмента. Фотореакция наблюдается в средах, благоприятствующих окислению (спирте, но не пиридине), и ингибиторы фотоокисления тормозят реакцию. Поэтому следует полагать, что первичной является фотореакция хлорофилла с кислородом и вторичной — реакция фотохимически образованного «мольоксида» хлорофилла с тиомочевиной или продуктами ее фотосенсибилизированного окисления, таким продуктом может быть сульфиновая кислота, которая образуется при сенсибилизированном окислении тиомочевины ([4]). Возможно, что при фотосенсибилизированном окислении тиомочевины сенсибилизаторами являются не только исходные пигменты, но и их устойчивые фотопродукты.

Ускорение фотоокисления следует связать с быстрой реакцией первичных продуктов фотоокисления с тиомочевиной. Однако тиомочевина не ускоряет фотоокисления бактериохлорофилла. Как известно, в молекуле этого пигмента, в отличие от хлорофиллов, «полуизолированные» двойные

связи восстановлены. В работе И. Ф. Гуринович, Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко и С. М. Таугер ([5]) убедительно показано, что при фотоокислении порфиринов кислород присоединяется по месту полуизолированной двойной связи. Способность к наблюдаемой реакции можно связать, таким образом, с наличием полуизолированных двойных связей в молекуле пигмента (хлорофиллы, протохлорофилл). Можно предположить, что и в изучаемой реакции «первичная» перекись образуется при реакции возбужденной (триплетной) молекулы пигмента с «раскрытием» полуизолированной двойной связи и последующей реакцией (присоединением) тиомочевины или сульфиновой кислоты.

Следует указать на то, что в отличие от изучаемой реакции обратимое фотоокисление пигментов кислородом ([6–8]) наблюдается наиболее отчетливо в случае бактериохлорофилла ([7, 8]), в этом случае обратимая реакция с кислородом не требует наличия полуизолированной двойной связи и идет по месту какой-нибудь из группировок в системе сопряженных по кругу двойных связей молекулы пигмента.

В присутствии тиомочевины удается наблюдать образование фотопродуктов окисления бактериохлорофилла, из которых при действии аскорбиновой кислоты регенерирует пигмент. Тиомочевина обладает тем же свойством, приводя в темноте к частичной регенерации фотоокисленного бактериохлорофилла.

Изложенный материал можно резюмировать следующим образом. В растворах хлорофилла и его аналогов, содержащих тиомочевину и кислород, образуются устойчивые фотопродукты, обладающие поглощением в более длинноволновой области, чем исходные пигменты; эти соединения, вероятно, образуются в результате реакции с тиомочевиной первичных продуктов фотоокисления пигментов.

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

Поступило
25 IV 1966

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] G. Gaffron, Ber., 60, 755 (1927). [2] K. Weber, Ber., 69, 1026 (1936). [3] O. Warburg, V. Schocken, Arch. Biochem., 21, 363 (1949). [4] C. O. Schenck, H. Wirth, Naturwiss., 40, 141 (1953). [5] И. Ф. Гуринович, Г. П. Гуринович и др., ДАН, 164, 201 (1965). [6] А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947). [7] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [8] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [9] R. Livingston, K. E. Owens, J. Am. Chem. Soc., 78, 3301 (1956).

Том XI, вып. 5 1966

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ВИДИМОГО СВЕТА НА СИСТЕМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ХЛОРОФИЛЛ

Г. Т. РИХИРЕВА, А. В. УМРИХИНА, Л. П. КАЮШИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биологической физики АН СССР, Москва
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследования механизма фотохимических реакций в системах, содержащих хлорофилл, позволили установить, что в ходе этих реакций образуются свободнорадикальные продукты. Однако в литературе до сих пор отсутствуют однозначные данные о спектрах электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) свободнорадикальных состояний молекул самих пигментов. Доказательства образования свободных радикалов пигмента при реакции обратимого фотовосстановления хлорофилла были получены А. А. Красновским и А. В. Умрихиной в опытах по инициированию цепной полимеризации метилметакрилата [1, 2]. Эти авторы указали на появление сигнала ЭПР при освещении реагирующей системы (растворов пигмента с восстановителем) в резонаторе ЭПР — спектрометра [2]. Детальное исследование [3, 4] позволило установить, что при фотореакции хлорофилла и его аналогов с аскорбиновой кислотой образуются радикалы окисленной формы восстановителя (монодегидроаскорбиновой кислоты). Измерения ЭПР в этой системе позволили ряду авторов [3—6] сделать заключение о нерадикальной природе устойчивой, образующейся при фотовосстановлении «красной» формы хлорофилла. Толлин [7], проведя детальные исследования ЭПР растворов хлорофилла с хинонами, указывает, что в этих системах при освещении регистрируются спектры семихинонных форм окислителей. По мнению автора, применение низких температур позволяет проследить более ранние стадии фотохимического взаимодействия пигмента с акцептором электрона, т. е. перенос электрона в комплексе пигмента с акцептором.

В литературе имеются данные, что фотоиндуцированный синглетный сигнал ЭПР наблюдается в очень концентрированных ($\geqslant 10^{-3}$ *M*) растворах хроматографически чистого хлорофилла в органических растворителях [6, 8].

Исследования фотоиндуцированного парамагнетизма в твердых препаратах фотосинтетических пигментов, которые были проведены А. Н. Терениным и В. Е. Холмогоровым, показали, что фотоиндуцированные сигналы ЭПР появляются в кристаллических препаратах пигмента в присутствии акцепторов электрона (кислорода, хинонов) при обязательном условии сорбции воды на кристаллах; для переноса электрона в таких системах помимо оптического возбуждения молекул пигмента необходима их термическая активация (энергия $\sim$0,1 *эв*) [9, 10].

В предыдущей работе [11] мы использовали метод ЭПР для изучения образования триплетного возбужденного состояния хлорофилла, а также его свободнорадикальных форм в условиях освещения спиртовых растворов пигмента при 77° К. Сигнал ЭПР триплетного состояния был

зарегистрирован в растворе хлорофилла при освещении красным светом. При освещении «полным» светом ртутной лампы происходило образование свободнорадикальных форм пигмента и спирта, вероятно, в результате фотохимического взаимодействия между хлорофиллом и растворителем, в котором спирт, по-видимому, осуществлял роль донора электрона (водорода). Значительно больший интерес представляет образование свободнорадикальных форм пигментов при освещении видимым светом.

В наших опытах было показано, что синглетный сигнал ЭПР возникает при освещении видимым светом замороженных (77° К) спиртовых растворов хлорофилла *b* [11], а также порфина и ряда порфиринов [12]. Синглетный сигнал ЭПР, возникающий в этаноловых растворах порфина (в присутствии 5% HCl) был приписан ион-радикалу пигмента, образующемуся в результате фотопереноса электрона в комплексе пигмент — растворитель.

В данной работе была поставлена задача изучения условий образования свободнорадикальных состояний в растворах хлорофилла методом ЭПР. Используемая аппаратура, методика приготовления образцов, удаления воздуха из растворов и условия измерения спектров были описаны ранее [11, 12].

Изучали образование парамагнитных продуктов под действием видимого света ($\lambda > 400$ *ммк*; фильтр ЖС-4) в следующих системах: 10^{-3} *М* растворы хлорофилла *a* и *b* в пиридине и этаноле; растворы хлорофилла *a*, *a*+*b* и феофитина *a*+*b*, содержащие восстановители (аскорбиновую кислоту, фенилгидразин) в пиридине, пиперидине и этаноле.

Помимо освещения образцов непосредственно в резонаторе при 77° К была использована методика освещения растворов при комнатной температуре с последующей фиксацией образующихся продуктов жидким азотом, при температуре которого производили регистрацию спектров. Полученные результаты описаны в следующих двух разделах.

Фотоиндуцированное образование парамагнитных центров при 77° К

В неосвещенных 10^{-3} *М* растворах хлорофилла в пиридине и этаноле были обнаружены очень слабые «темновые» сигналы ЭПР, примерно одинаковой интенсивности в эвакуированных и неэвакуированных ампулах. При освещении растворов хлорофилла *a* в пиридине возникал синглетный сигнал ЭПР ($\Delta H = 11{,}7 \pm 0{,}5$ *э*). В этаноле при такой же концентрации пигмента фотоиндуцированный сигнал ($\Delta H = 10{,}0 \pm 1{,}0$ *э*) возникал лишь в том случае, если в раствор добавляли 10—20% воды (исходный растворитель содержал ~5% воды); *g*-фактор сигналов был близок к *g*-фактору свободного электрона. Образующиеся парамагнитные центры стабилизировались при низкой температуре: сигналы по форме и величине сохранялись практически без изменения несколько часов после выключения света. Максимальная амплитуда сигналов достигалась за 5—10 мин. освещения. Количество парамагнитных частиц в образцах после освещения достигало величины $2{,}3—2{,}7 \cdot 10^{14}$. При объеме исследуемых растворов 0,10—0,15 *мл* это составляло ~0,3—0,5% от общего количества молекул пигмента в образце.

Присутствие кислорода воздуха в растворах практически не оказывало влияния на реакцию образования неспаренных электронов, поскольку при сопоставлении спектров эвакуированных и неэвакуированных ампул не обнаружено значительного влияния O_2 воздуха на окончательную (стационарную) амплитуду фотоиндуцированных сигналов.

Введение восстановителя (аскорбиновой кислоты, фенилгидразина) в растворы пигментов не приводило к усилению реакции на свет. Измерения спектров тройных систем: 10^{-3} *М* растворов хлорофилла *a*, *a*+*b*, феофитина *a*+*b*, содержащих аскорбиновую кислоту (10—100 *мг/мл*), в пиридине, пиперидине и смеси пиридина и этанола (1 : 3); растворов

хлорофилла *a* в этаноле, содержащих фенилгидразин (этанол : фенилгидразин 4 : 1), также показали наличие слабых темновых сигналов. В пиперидине под действием света возникал сложный сигнал независимо от наличия пигмента в системе (рис. 1, *а*, *а'*).

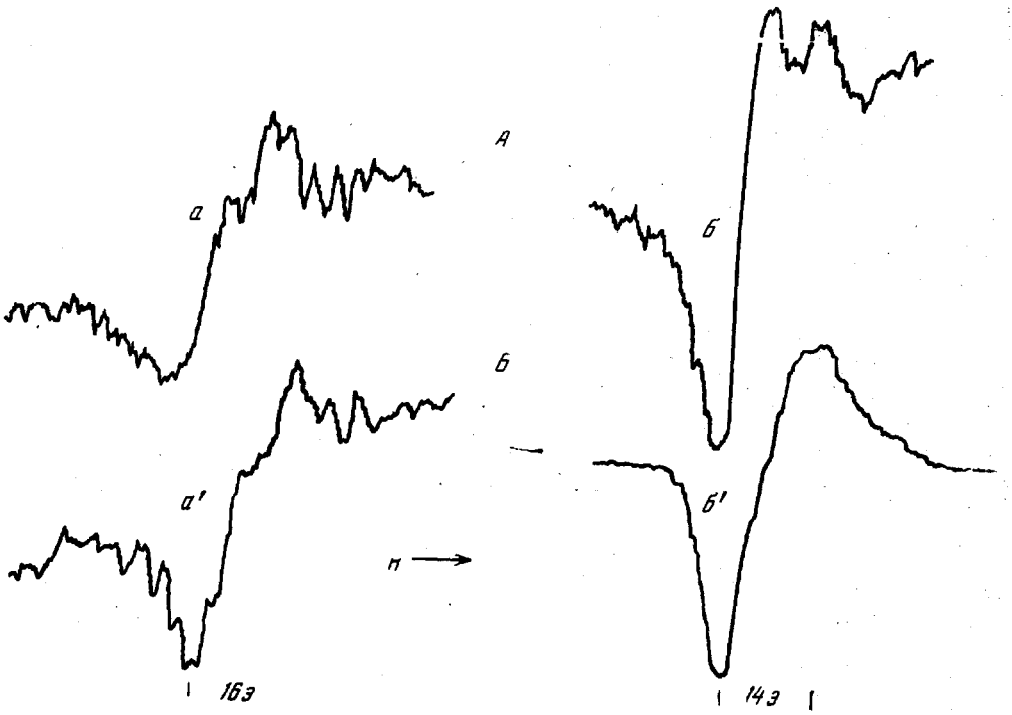


Рис. 1. Спектры ЭПР освещенных растворов аскорбиновой кислоты (10 *мг/мл*) в пиперидине

А — в отсутствие хлорофилла; *Б* — в присутствии хлорофилла (~10^{-3} *М*); *а*, *а'* — экспозиция 5 мин. при 77°К; *б*, *б'* — экспозиция 15 сек. при 293°К (*б'* — уменьшено в 16 раз)

При изменении состояния хлорофилла — адсорбции на белке — под действием света при 77° К также наблюдали образование парамагнитных центров. Такие системы получали путем добавления спиртового раствора хлорофилла к водному актомиозиновому гелю. Белок коагулировал, а пигмент практически полностью переходил из этанола на белок. В этом случае также регистрировали синглетный сигнал ЭПР с $\Delta H \approx 10$ *э*. Концентрация образующихся парамагнитных частиц была того же порядка, что и в растворах хлорофилла (при одинаковом количестве молекул пигмента в сравниваемых системах).

Фотоиндуцированное образование свободнорадикальных состояний при 293° К

При освещении в течение 15—30 сек. спиртовых растворов хлорофиллов *a* и *b* при 293° К и последующей фиксации образцов жидким азотом регистрировали фотоиндуцированные симметричные сигналы ($\Delta H = 9{,}7 \pm 0{,}5$ *э*). Амплитуда фотоиндуцированных сигналов была больше (до 2-х раз) в эвакуированных ампулах, чем в ампулах, содержащих воздух. После добавления воды (10—20%) в этаноловые растворы пигментов образование свободных радикалов происходило более интенсив-

но. Однако в этом случае амплитуда сигнала была больше (до 2-х раз) в присутствии воздуха. Характерно, что свободнорадикальные продукты, образующиеся в эвакуированных спиртовых растворах при 293° К, стабилизировались при фиксации жидким азотом и гибли после размора-

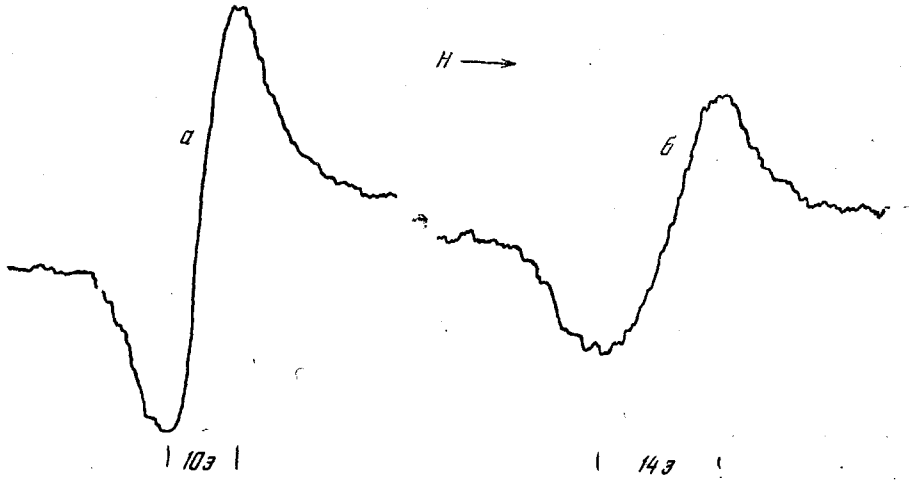


Рис. 2. Спектры ЭПР неэвакуированных этаноловых растворов хлорофилла *а*
а — спектр раствора, освещенного 15 сек. при 293°К и залитого жидким азотом; *б* — спектр этого же раствора после размораживания до комнатной температуры

живания образцов. В неэвакуированных водно-спиртовых и пиридин-спиртовых (1 : 3) растворах после размораживания регистрировали более широкие ($\Delta H = 13{,}5 \pm 0{,}5$ *э* в водно-спиртовых; $\Delta H = 14{,}0 \pm 0{,}5$ *э* в пиридин-спиртовых) и асимметричные сигналы почти такой же интенсивности как и фотоиндуцированные (рис. 2). В этих образцах такие же изменения спектра происходили, если фиксирование жидким азотом производили не «под лучом», а после темнового интервала в 2—5 сек. Изменившиеся сигналы сохранялись по форме и интенсивности после размораживания растворов. Содержание радикальных фотопродуктов в различных растворах составляло $0{,}5—1{,}5 \cdot 10^{15}$ парамагнитных частиц в образце (~0,5—2% от общего количества молекул хлорофилла).

При освещении в течение 15—30 сек. (293° К) пиридиновых и пиперидиновых растворов хлорофиллов и феофитина, содержащих аскорбиновую кислоту, возникал интенсивный асимметричный сигнал с $\Delta H = 13{,}9 \pm 0{,}5$ *э* (рис. 3, *а*). В этаноловых растворах хлорофилла с фенилгидразином в этих условиях появлялся более симметричный сигнал с $\Delta H = 14{,}0 \pm 0{,}1$ *э* (рис. 4, *а*). Присутствие воздуха и воды не оказывало значительного влияния на амплитуду фотоиндуцированных сигналов. Количество образующихся парамагнитных центров в разных образцах достигало $1{,}5—3{,}0 \cdot 10^{15}$. Никаких сигналов не наблюдалось в том случае, если освещаемые растворы охлаждали жидким азотом не «под лучом», а после темнового периода в 1—5 сек., а также при повторном измерении спектров образцов, которые нагревались до комнатной температуры.

Под действием света на системы этанол-фенилгидразин (4 : 1) возникал небольшой симметричный сигнал с $\Delta H = 30$ *э* (рис. 4, *б*). Освещение растворов аскорбиновой кислоты в пиперидине приводило к появлению сложного сигнала. Сравнение сигналов ЭПР, образующихся в этих растворах при 77° К и 293° К (рис. 1, *а*, *б*), показывает, что регистрируемый спектр представляет собой сумму широкого ($\Delta H = 15{,}0 \pm 1{,}0$ *э*) и узкого ($\Delta H = 7{,}5 \pm 1.0$ *э*) сигналов; при 293° К интенсивность узкого сиг-

нала больше. Общее количество парамагнитных центров, образующихся в пиперидиновых растворах аскорбиновой кислоты при 293° К в 5—10 раз меньше, чем в таких растворах с пигментами.

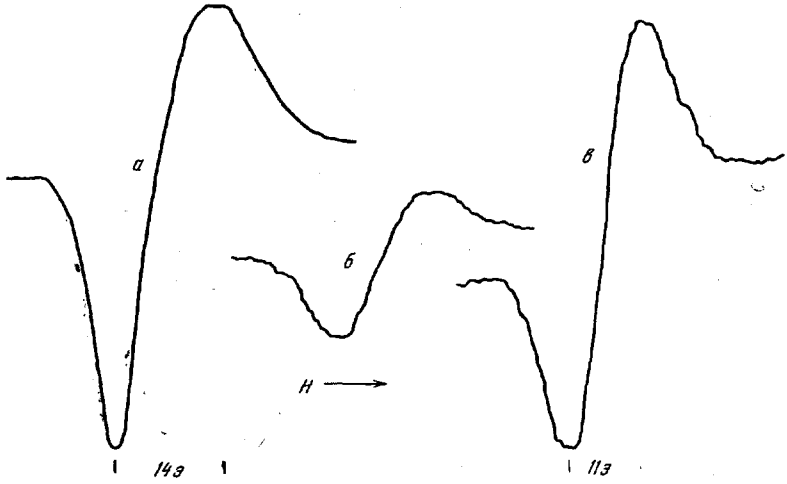


Рис. 3. Спектры ЭПР пиперидинового раствора хлорофилла $a+b$ ($\sim 10^{-3}$ M) и аскорбиновой кислоты (насыщенный раствор), освещенного 30 сек. при 293° К и охлажденного жидким азотом

а — 77°К; *б* — после нагревания до 200°К; *в* — после нагревания до 210° (увеличено в 4 раза)

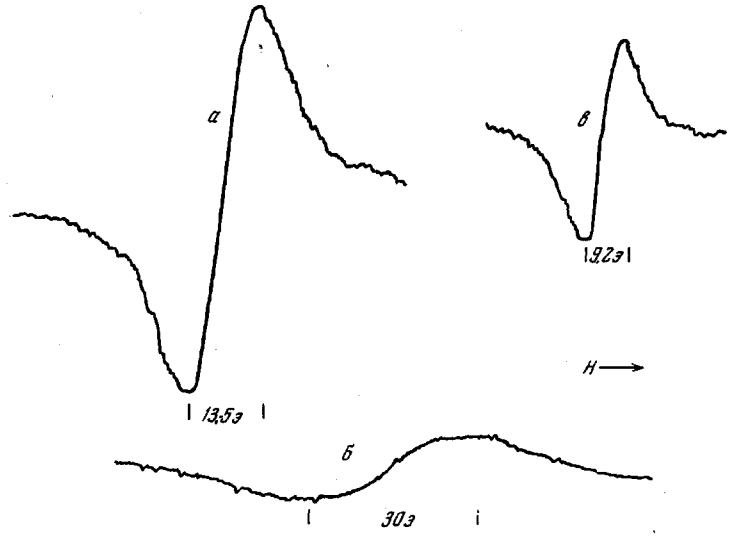


Рис. 4. Спектры ЭПР растворов, освещенных 15 сек. при 293° К

а — хлорофилл *а* — этанол — фенилгидразин; *б* — фенилгидразин в этаноле (1 : 4), *в* — хлорофилл *а* в этаноле

Форма фотоиндуцированного спектра ЭПР в растворах хлорофилла и феофитина в присутствии аскорбиновой кислоты варьировала в разных опытах, в частности, при использовании различных концентраций восстановителя. Этот факт указывает, что регистрируемый спектр является, по-видимому, суммой сигналов, соотношение которых может изменяться.

В процессе размораживания освещенных растворов хлорофилла с аскорбиновой кислотой асимметричный сигнал ($\Delta H = 14$ *э*) уменьшался по амплитуде (рис. 3, *б*, *в*). При 180—190° К изменялась его форма. На-

чиная с этих значений температуры, спектр был представлен симметричным синглетом с $\Delta H = 11$ *э*. Этот сигнал уменьшался при дальнейшем размораживании и становился практически не наблюдаемым при температурах, близких к 273° К.

Обсуждение результатов

Анализируя явление возникновения сигналов ЭПР в освещенных растворах пигмента, можно отметить следующее. Неспаренные электроны образуются при низкой температуре, когда диффузия реагирующих молекул практически отсутствует. В таких условиях неспаренный электрон может возникать либо в самих молекулах пигмента, либо в результате взаимодействия хлорофилла с непосредственным окружением (растворитель, вода, примесь кислорода и т. д.; «активный» контакт пигмента со средой может усиливаться или создаваться благодаря эффектам сольватации, гидратации). Более вероятна вторая возможность. В пользу этого свидетельствует тот факт, что при одинаковой концентрации пигмента в двух используемых (полярных) растворителях обнаруживается зависимость процесса от состава среды. Сигнал отчетливо появляется в пиридине, в то время как в этаноле он возникает только после добавления воды. Следует отметить, что пиридин является наиболее благоприятной средой для фотовосстановления порфириновых пигментов [13].

Таким образом, можно предположить, что в основе процесса переноса электрона в освещенных растворах хлорофилла при 77° К лежит взаимодействие пигмента с молекулами среды. Иначе говоря, имеет место элементарный окислительно-восстановительный процесс.

Сравнительно малые выходы парамагнитных продуктов, наличие фактора светового насыщения указывают на то, что за процесс переноса электрона ответственно ограниченное количество активных центров. Специфика таких центров может быть обусловлена как состоянием хлорофилла (агрегация?), так и благоприятной пространственной конфигурацией реагентов.

Присутствие кислорода воздуха и восстановителей в растворах не усиливало реакции системы на свет. Поскольку известно [3], что реакция между пигментом и восстановителем при 293° К и аналогичных концентрациях реагентов сопровождается накоплением значительных и легко регистрируемых количеств свободно-радикальных полуокисленных форм аскорбиновой кислоты, можно сделать заключение, что при 77° К реакция между пигментом и восстановителем не осуществляется. По-видимому, в этих системах при 77° К отсутствуют необходимые предреакционные условия, в частности наличие реакционного комплекса между хлорофиллом и аскорбиновой кислотой. Более того, даже при наличии комплекса (например в системе с фенилгидразином [14]) для развития процесса, по-видимому, необходима большая подвижность реагентов, чем это имеет место при 77° К.

Полученные данные об образовании свободнорадикальных состояний при 293° К также свидетельствуют о том, что фотопроцесс переноса электрона в растворах хлорофилла осуществляется в результате окислительно-восстановительного взаимодействия пигмента со средой.

В зависимости от условий (присутствие H_2O, O_2) может происходить образование свободнорадикальных форм пигмента как в результате его фотовосстановления (эвакуированные спиртовые растворы), так и в результате фотоокисления (неэвакуированные водно-спиртовые растворы). В неэвакуированных водно-спиртовых растворах после размораживания, по-видимому, в результате вторичных реакций образуются стабильные радикалы, дающие более широкий асимметричный синглетный сигнал ЭПР.

В присутствии восстановителей в растворах пигментов при 293° К образуется значительно большее количество парамагнитных продуктов, чем в растворах хлорофилла. Эти данные могут служить указанием, что в этих условиях освещения осуществляется взаимодействие между пигментом и восстановителем. Тот факт, что никаких сигналов не наблюдается, если фиксация жидким азотом производится через 1—5-секундный темновой период после освещения, свидетельствует об обратимости процесса переноса электрона в системах и о малом времени жизни образующихся радикалов. Кроме того, следует отметить, что образование большого количества восстановленных продуктов пигмента способствует исчезновению (после размораживания) «темновых» сигналов, которые регистрируются при 77° К в неосвещенных растворах пигментов в присутствии и в отсутствие восстановителей. В связи с этим происхождение темновых сигналов можно объяснить наличием в образцах небольших количеств стабильных свободнорадикальных продуктов окисления хлорофилла. Эти состояния характеризуются определенной прочностью связи между пигментом и (по-видимому) кислородом, т. к. дегазирование образцов существенно не изменяло их концентрацию.

Как уже указывалось, вариабильность формы фотоиндуцированного при 293° К спектра ЭПР растворов пигментов с аскорбиновой кислотой в разных опытах (напр., в зависимости от используемой концентрации восстановителя) может указывать, что регистрируемый спектр является суммой сигналов, соотношение которых может изменяться.

Следует отметить, что спектры ЭПР парамагнитных центров, возникающих в разных средах: при 77° К в пиридиновых и водно-спиртовых растворах хлорофилла, при 293° К в спиртовых растворах хлорофилла в присутствии и в отсутствие воды и кислорода воздуха,— обнаруживают близкое сходство ($\Delta H = 10$—11 *э*; симметричная синглетная форма сигнала).

Симметричный синглет с $\Delta H \approx 11$ *э*, появляющийся при промежуточных температурах размораживания тройных систем пигмент — растворитель — восстановитель, не соответствует спектрам ЭПР, возникающим в освещенных растворах восстановителей (фенилгидразин в этаноле; аскорбиновая кислота в пиперидине) и обнаруживает близкое сходство с фотоиндуцированными сигналами в растворах хлорофилла без восстановителей.

В связи с этим о природе синглетного сигнала, который регистрируется в растворах хлорофилла при 77° К и 293° К, а также при размораживании растворов пигмента с восстановителем, можно предположить следующее. Этот сигнал, по-видимому, может принадлежать либо комплексу с переносом заряда, образующемуся между возбужденной молекулой пигмента и молекулой растворителя [16] (в конкретных случаях, по-видимому, с участием H_2O, O_2), либо радикальной (ион-радикальной) форме пигмента. Однако во втором случае (при 77° К) можно было бы ожидать также присутствия в спектре компонентов сигналов ионизированных форм растворителя.

Эксперименты по исследованию фотоиндуцированного парамагнетизма при 77° К в системах с хлорофиллом, адсорбированным на белке, носят предварительный характер. Однако обращает на себя внимание тот факт, что, во-первых, при одинаковом количестве молекул пигмента в водно-спиртовом растворе и в системе вода — спирт — адсорбированный хлорофилл в аналогичных условиях освещения образуются сопоставимые количества парамагнитных центров. И, во-вторых, параметры сигнала ЭПР в системе с пигментом, адсорбированным на белке, близки к параметрам сигнала в растворе. Следует отметить, что фотоиндуцируемый сигнал ЭПР *in vivo* также характеризуется синглетной формой и $\Delta H = 8$—10 *э* [4, 16]. Сопоставления такого рода позволяют считать перспективным изучение фотоиндуцированного ЭПР в описанных модель-

ных системах в целях интерпретации природы первичных свободнорадикальных фотопродуктов, образующихся в фотосинтезирующих клетках.

При расчетах процентного содержания парамагнитных центров по отношению к общему количеству молекул хлорофилла в образце следует отметить, что оптическая плотность образцов в красном максимуме хлорофилла при диаметре ампул 3,0—3,5 *мм* достигала 30 единиц. В таких условиях практически полное поглощение возбуждающего света происходит в поверхностном (~0,1 *мм*) слое раствора. Внесение поправки, учитывающей эти условия, позволит значительно увеличить полученные цифры; по крайней мере, на порядок. Тогда количество парамагнитных центров, образующихся в растворах пигмента при 77° К, достигает нескольких процентов (до 4%), а при 293° К (в эталоне) десятков процентов (до 20%). Такие цифры становятся более убедительными в качестве аргумента против объяснения возникновения сигнала ЭПР за счет нехлорофилловых примесей.

В описанных опытах применялись высокие концентрации пигментов, в которых возможно образование различных типов агрегированных форм хлорофилла [17—19]. В литературе также имеются указания [6, 8], что при 293° К сигналы ЭПР в растворах хлорофилла отчетливо регистрируются только при больших концентрациях пигмента. В связи с этим необходимо учитывать возможность роли агрегатов хлорофилла как центров реакции образования свободно-радикальных состояний. Выяснение этого вопроса требует количественного исследования зависимости выхода парамагнитных продуктов от концентрации хлорофилла в сочетании со спектральным контролем.

Выводы

1. В растворах хлорофилла в пиридине и этаноле (10—20% воды) при 77° К под действием видимого света образуются парамагнитные центры, имеющие синглетный спектр ЭПР с $\Delta H \approx 10$—11 *э*. Присутствие кислорода воздуха практически не влияет на амплитуду фотоиндуцированных сигналов ЭПР. Введение восстановителей (аскорбиновой кислоты, фенилгидразина) не усиливает реакцию системы на свет.

Предполагается, что при 77° К в системах пигмент — растворитель происходит процесс переноса электрона. Синглетный сигнал ЭПР, по-видимому, принадлежит комплексу с переносом заряда, образующемуся между возбужденными молекулами пигмента и молекулами среды.

2. Освещение растворов при 293° К с фиксацией образцов жидким азотом приводит к увеличению количества образующихся парамагнитных центров. В этих условиях концентрация свободнорадикальных фотопродуктов увеличивается при введении кислорода, воды и восстановителя, форма спектра ЭПР в присутствии восстановителя изменяется. Изменение формы спектра ЭПР в присутствии восстановителя, а также вариабельность ее в разных опытах свидетельствуют о том, что регистрируемый спектр, по-видимому, является суммой сигналов различных продуктов радикальной природы.

Поступила в редакцию
4.II.1966

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Умрихина А. В., Докл. АН СССР, **104**, 882, 1955.
Красновский А. А., Умрихина А. В., Биофизика, **3**, 547, 1958.
Бубнов Н. Н., Красновский А. А., Умрихина А. В., Цепалов Б. Ф., Тляпинтох В. Я., Биофизика, **5**, 121, 1960.
Commoner B., Symp. Light and Life, Baltimore, p. 356, 1961.
Ischitz H., Weissmann S. J., Arch. Biochem. Biophys., **67**, 491, 1957.

6. Brody S. S., Newell G., Castner T., J. Phys. Chem., **64**, 554, 1960.
7. Tollin G. and Green G., Biochim. Biophys. Acta, **60**, 524, 1962.
8. Умрихина А. В., Голубев И. Н., Каюшин Л. П., Красновский А. А., Биофизика, **9**, 423, 1964.
9. Холмогоров В. Е., Сидоров А. И., Теренин А. Н., Докл. АН СССР, **147**, 954, 1964.
10. Теренин А. Н., Холмогоров В. Е., В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, Изд-во «Наука», М., 5, 1965.
11. Рихирева Г. Т., Грибова З. П., Каюшин Л. П., Умрихина А. В., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **159**, 196, 1964.
12. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **163**, 491, 1965.
13. Красновский А. А., Успехи химии, **29**, 736, 1960.
14. Красновский А. А., В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, Изд-во «Наука», М., 26, 1965.
15. Даин Б. Я., Дилунг И. И., В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, Изд-во «Наука», М., 53, 1965.
16. Рихирева Г. Т., Красновский А. А., Каюшин Л. П., Докл. АН СССР, **156**, 1451, 1964.
17. Brody S. S., Science, **128**, 838, 1958.
18. Литвин Ф. Ф., Рихирева Г. Т., Красновский А. А., Биофизика, **7**, 576, 1962.
19. Литвин Ф. Ф., В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, Изд-во «Наука», М., 97, 1965.

Доклады Академии наук СССР
1967. Том 174, № 1

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

Г. П. БРИН, А. Н. ЛУГАНСКАЯ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ХЛОРОФИЛЛОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ; ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИСТЕИНА И ТИОМОЧЕВИНЫ В КАЧЕСТВЕ ДОНОРОВ ЭЛЕКТРОНА

Исследованное нами фотовосстановление пиридиннуклеотидов, сенсибилизированное хлорофиллом ([1–3]), можно рассматривать в качестве модели так называемой «первой фотохимической системы» при фотосинтезе растений. В лаборатории Вернона ([4]) было изучено фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление пиридиннуклеотидов в водных средах и показано активирующее действие препаратов фотосинтетической пиридиннуклеотид редуктазы. Возможность участия ферредоксина в качестве промежуточного акцептора электрона в этом процессе ([5]) ставит вопрос о моделировании реакций такого типа в простых системах. Ранее мы сообщали о сенсибилизированном хлорофиллом восстановлении метилвиологена, обладающего той же величиной окислительно-восстановительного потенциала, что и ферредоксин (в присутствии аскорбиновой кислоты) ([6]). Было показано, что метилвиологен ускоряет фотоокисление хлорофилла кислородом ([7]).

В данной работе исследовалось фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена хлорофиллом и его аналогами с использованием цистеина и тиомочевины в качестве доноров электрона, что дало возможность достигнуть глубины реакции, сравнимой с фотовосстановлением виологенов в хлоропластах ([8]).

Пигменты были выделены обычными методами, принятыми в нашей лаборатории. Опыты вели в спиртовых и пиридиновых растворах и в водных растворах в присутствии детергентов в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений. Концентрация пигментов 10^{-5} *M*, метилвиологена 10^{-4} *M*. Трубки освещали через конденсор и светофильтры светом киноламы 300 вт ($0{,}5 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек) при 20°.

В трубку Тунберга помещали раствор пигмента (в пиридине с 10% воды или в этаноле с 20% воды) и раствор донора электрона (всего 4 мл), в головку трубки — раствор метилвиологена (0,5 мл). После удаления воздуха раствор метилвиологена приливали из головки к раствору пигмента. О восстановлении метилвиологена судили по изменению его поглощения в максимумах восстановленной формы при 395 и 610 мμ.

Измеряли зависимость глубины восстановления метилвиологена от концентрации донора электрона. На рис. 1 показано фотовосстановление метилвиологена при разных концентрациях цистеина в присутствии хлорофилла а. Максимальное восстановление наблюдается при использовании $2 \cdot 10^{-4}$ *M* цистеина в этаноле и пиридине и $2 \cdot 10^{-3}$ *M* — в водно-коллоидных растворах (0,5% детергент твин-80). При использовании аскорбиновой кислоты максимум восстановления лежит при ее концентрации 10^{-2} *M*. В опытах с тиомочевиной увеличение количества введенной тиомочевины (до 0,3 *M*) приводит к увеличению количества восстановленного метилвиологена.

Данные опытов представлены в табл. 1. В присутствии тиомочевины и цистеина сенсибилизированная реакция идет глубже, чем с аскорбиновой кислотой. На рис. 2 показана спектрофотометрическая запись опыта восстановления метилвиологена, сенсибилизированного хлорофиллом a и b в присутствии цистеина как донора электрона в этаноле. (В пиридине с цистеином наблюдается медленное восстановление метилвиологена в темноте; в других опытах в темноте реакция не шла (см. рис. 3).)

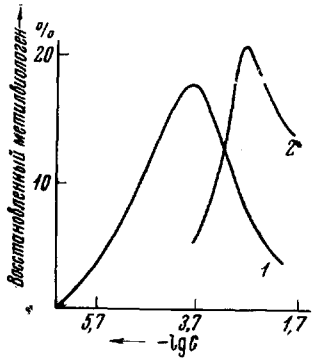


Рис. 1. Зависимость глубины фотосенсибилизированного хлорофиллом a восстановления метилвиологена от концентрации цистеина в этаноле (*I*) и в водно-коллоидном растворе твина-80 (*2*)

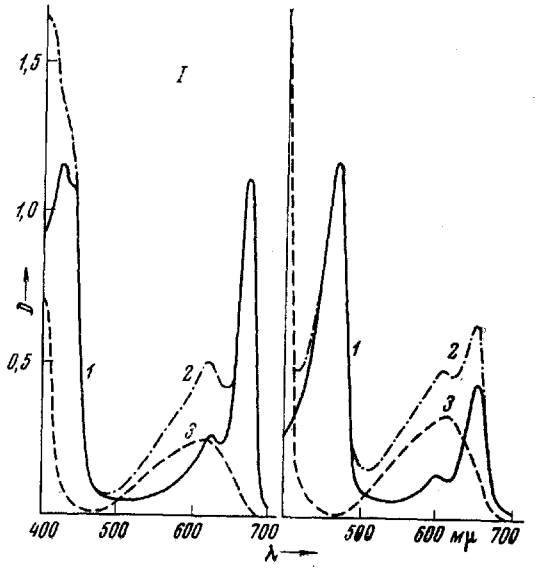


Рис. 2. Фотовосстановление метилвиологена в этаноле в присутствии цистеина ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*), сенсибилизированное хлорофиллом a (*I*) и хлорофиллом b (*II*). *1* — начальный спектр и спектр после обратной реакции с кислородом воздуха; *2* — спектр после 15 мин. освещения красным светом; *3* — разность (*2* — *1*), соответствующая спектру восстановленного метилвиологена в опыте

Контрольные опыты, проведенные в отсутствие доноров водорода, показали, что в этаноле не наблюдается изменения поглощения метилвиологена, а в пиридине, который может играть роль донора электрона, восстановление не превышало 2%.

Таблица 1

Фотовосстановление метилвиологена (МВ), сенсибилизированное хлорофиллом a и b (в процентах от начального количества МВ)

Пигмент	Доноры электрона	Этанол	Пиридин
Хлорофилл a	Аскорбиновая кисл.	7,1	7,5
	Тиомочевина	7,5	7,2
	Цистеин	18,8	20,3
Хлорофилл b	Аскорбиновая кисл.	5,6	4,0
	Тиомочевина	12,2	13,0
	Цистеин	25,1	22,8
Феофитин a	Аскорбиновая кисл.	1,9	2,4
	Тиомочевина	15,0	27,6
	Цистеин	15,9	12,2

Нам удалось наблюдать реакцию в водных растворах пигментов с детергентами, приготовленных путем прибавления 0,1 мл концентрированного раствора хлорофилла в пиридине к 5 мл 0,5% раствора твин-80 ([9]). Водный раствор хлорофилла a в присутствии цистеина ($2 \cdot 10^{-3}$ *M*) как донора электрона восстанавливал 22% метилвиологена, а в случае хлорофилла b 15%.

Чтобы получить дополнительные сведения о течении описанных реакций, было исследовано изменение потенциала инертного платинового электрода в изучаемых системах при помощи обычной методики, принятой в нашей лаборатории ([10]). В предыдущей работе ([6]) мы указывали на то, что при освещении системы хлорофилл a — метилвиологен наблюдается изменение потен-

циала в «отрицательную» сторону. Мы предположили, что появление потенциала может определять образование восстановленной формы метилвиологена (анион-радикала) либо при прямой фотореакции возбужденного хлорофилла с метилвиологеном, либо в результате сенсибилизированного восстановления метилвиологена с использованием растворителя в качестве донора электрона. В последующих работах было найдено тушение флуоресценции ([11]) и дезактивация триплетного состояния хлорофилла метилвиологеном ([12]), что указывает на возможность фотохимического взаимодействия этих соединений.

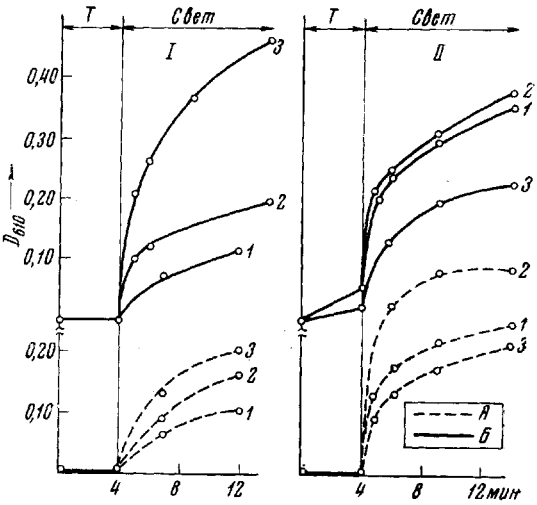


Рис. 3. Кинетика фотовосстановления метилвиологена в присутствии 0,17 *М* тиомочевины (*I*) и $2 \cdot 10^{-4}$ *М* цистеина (*II*) в этаноле (*А*) и в пиридине (*Б*), сенсибилизированного хлорофиллом а (*1*), хлорофиллом b (*2*) и феофитином а (*3*)

Известно, что в системе хлорофилл — аскорбиновая кислота наблюдается изменение фотопотенциала в «отрицательную» сторону за счет образования восстановленной формы хлорофилла. В присутствии метилвиологена наблюдается некоторое усиление эффекта, но в этом случае трудно судить о природе «электродно-активного» соединения. То же наблюдается и в случае цистеина, способного к фотовосстановлению хлорофилла. Мы не смогли обнаружить фотовосстановление хлорофилла тиомочевиной ([13]). В системе тиомочевина — хлорофилл — метилвиологен наблюдается значительное изменение фотопотенциала в «отрицательную» сторону (до —120 мв), которое нельзя объяснить образованием фотовосстановленного хлорофилла и следует приписать образованию восстановленной формы метилвиологена, действующей на электрод. Мы не смогли, однако, найти корреляцию между количеством восстановленного метилвиологена и величиной фотопотенциала (табл. 2).

Таблица 2

Фотопотенциалы при освещении пигментов в присутствии тиомочевины и метилвиологена (МВ) в этаноле (изменение в милливольтах за 1 мин. освещения)

Пигмент	Без МВ	с МВ
Хлорофилл a	—2	—23
Хлорофилл b	0	—73
Феофитин a	—6	—125

Тот факт, что тиомочевина в описанных условиях не приводит к фотовосстановлению хлорофилла, указывает на большую вероятность первичной окислительно-восстановительной реакции возбужденной молекулы пигмента с метилвиологеном в процессе сенсибилизации; вторичным «темновым» процессом должна быть регенерация фотоокисленного пигмента тиомочевиной.

Следует предположить, что использование тиомочевины при сенсибилизированных реакциях, идущих в описанных условиях, может служить тестом на промежуточное фотоокисление возбужденной молекулы пигмента-сенсибилизатора в процессе реакции. В случае доноров электрона, способных к фотовосстановлению пигментов (аскорбиновая кислота, цистеин), следует ожидать конкуренции между реакциями возбужденного хлорофилла с донорами и акцепторами электрона, чем может определяться сложная зависимость глубины восстановления метилвиологена от концентрации донора.

Таким образом, в присутствии цистеина и тиомочевины удается наблюдать сенсибилизированное хлорофиллом и его аналогами восстановление метилвиологена, по своей эффективности сравнимое с восстановлением виологенов хлоропластами.

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

Поступило
3 II 1967

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949). [2] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, 24, 1085 (1959). [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1157 (1963). [4] L. P. Vernen, Acta chem. scand., 15, 1651 (1962). [5] D. Arnon, Photosynthetic Mechanismus of Green Plants, 1963, p. 195. [6] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 163, 761 (1965). [7] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, О. Д. Бекасова, Биофизика, 11, 584 (1966). [8] G. Zweig, M. Avron, Biochim. et biophys. acta, 109, 332 (1965). [9] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, 22, 776 (1957). [10] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 92, 381 (1953). [11] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 167, 928 (1966). [12] А. К. Чибисов, А. В. Карякин и др., Биофизика, 10, 1098 (1965). [13] А. А. Красновский, И. М. Сапожникова, ДАН, 169, 695 (1966).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 1 1967 Вып. 3

УДК 581.132

ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В СВЯЗИ СО СТРУКТУРНЫМИ ОСОБЕННОСТЯМИ МОЛЕКУЛ ПИГМЕНТОВ

М. И. БЫСТРОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Агрегация молекул хлорофилла и его аналогов в белковолипоидных структурах хлоропластов и хроматофоров фотосинтезирующих организмов ныне не вызывает сомнения [1; 2]. В твердых пленках и водных коллоидных растворах наблюдаются те же типы упаковок пигментов, что и в живых фотосинтезирующих организмах; «первичная» химическая структура молекулы пигмента определяет типы упаковки молекул во «вторичных» агрегированных формах. Однако вопрос о молекулярной структуре агрегированных форм еще далек от разрешения.

Сопоставление спектральных свойств твердых пленок пигментов, различающихся по химической структуре молекул, может быть одним из подходов к выяснению механизма агрегации и выяснению связи пигмент-пигментного взаимодействия с особенностями строения молекул. Химическая структура хлорофилла и его аналогов — протохлорофилла, бактериовиридина, бактериохлорофилла, содержащих атом магния в центре молекулы и активные функциональные группировки в порфириновом кольце,— предопределяет различные возможности межмолекулярного взаимодействия. Указанные пигменты содержат карбонильную группу в циклопентановом кольце и в составе сложноэфирных группировок боковых заместителей у 10-го (карбометоксильная группа) и 7-го атомов углерода. Хлорофилл *b* кроме этого имеет альдегидную группу у 3-го атома углерода во втором пиррольном кольце, вместо метильного радикала хлорофилла *a*, и бактериохлорофилл — ацетильную группу — в первом пиррольном кольце, вместо винильной группировки хлорофилла *a*.

Известна [3; 4] возможность комплексообразования за счет соединения кислорода карбонильной группы, имеющего неподеленную пару электронов, с электронофильным магнием. Атом магния в молекуле хлорофилла обладает двумя вакантными координационными местами (перпендикулярно плоскости порфиринового кольца) и может присоединять две молекулы адденда, например, воды или пиридина с образованием комплексов октаэдральной структуры [5].

Применение инфракрасной спектроскопии и измерения спектров ядерного магнитного резонанса [6—9] к изучению агрегации хлорофиллов *a* и *b* в неполярных растворителях показало возможность взаимодействия карбонильной группы циклопентанового кольца одной молекулы пигмента с центральным атомом магния другой молекулы с образованием димеров. У хлорофилла *b* на основании определений молекулярного веса [8] была обнаружена также тенденция к образованию тримеров в тех же условиях за счет дополнительного сцепления между альдегидной группой одной молекулы и атомом магния другой молекулы пигмента.

Для бактериовиридина можно допустить образование координационной связи между центральным атомом магния и гидроксилом, содержащимся в первом пиррольном кольце молекулы пигмента [10].

Строение молекул хлорофилла и его ближайших аналогов, содержащих в своем составе иминогруппы, допускает образование водородных связей при пигмент-пигментном взаимодействии. При образовании молекулярных соединений такие связи могут возникать и через посредство молекул воды, присутствие связанной формы которой в молекулах хлорофиллов *a* и *b*, феофитина установлено в ряде работ [11—14].

Наличие системы сопряженных связей в молекулах пигментов создает условия для взаимодействия облаков π-электронов при развитии вандерваальсовых сил в процессе агрегации. Можно думать, что межмолекулярные связи действуют на симметрию π-электронного облака, определяющего спектральные свойства молекул пигментов. Сцепление молекул может вести также к появлению внутримолекулярных напряжений, приводящих к искажению плоскости порфиринового кольца и возможному смещению атома магния из плоскости, на что мы указывали ранее [15].

При всех типах взаимодействий следует учитывать стерические факторы, играющие существенную роль при ассоциации красителей. Пространственная конфигурация молекулы пигмента может иметь значение для проявления межмолекулярных взаимодействий. Иллюстрацией этому служат наблюдения Литвина и Гуляева над агрегацией *цис-* и *транс*-изомеров β-каротина [16].

В данной работе мы провели сравнительное изучение спектров поглощения твердых пленок хлорофилла *a* и *b*, протохлорофилла, бактериовиридина и бактериохлорофилла, а также безмагниевых аналогов всех указанных пигментов, полученных в одинаковых условиях, чтобы найти связь между химической структурой молекулы пигмента и спектральными особенностями агрегированных форм.

МЕТОДИКА

Пигменты получали методами, принятыми в нашей лаборатории, включающими на последней стадии выделения хроматографическое разделение на сахарозе. Хлорофилл выделяли из высушенных листьев крапивы; протохлорофилл — из внутренних оболочек семян тыквы сорта Мозолевская; бактериовиридин — из культуры зеленых серных бактерий *Chloropseudomonas ethylicum*; бактериохлорофилл — из культуры пурпурных серных бактерий *Rhodopseudomonas palustris*.

Безмагниевые производные получали из соответствующих пигментов путем обработки их эфирных растворов 0.2 н. HCl до полной феофитизации, контролируемой по измерению спектров поглощения. Растворы пигментов в серном эфире многократно промывали водой и высушивали сернокислым натрием, что, однако, не приводило к удалению прочно связанной воды [12; 13] в препаратах феофитина.

Пленки получали из концентрированных эфирных растворов пигментов в трубках Тунберга путем испарения эфира в вакууме и последующей эвакуации при помощи масляного вакуумного насоса в течение 30 мин. для удаления растворителя. Во всех случаях использовали серный эфир, обработанный закисным сернокислым железом для удаления перекисей, высушенный над металлическим натрием и свежеперегнанный.

Спектры поглощения измеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-10. Поправка на светорассеяние пленок не вносилась. При измерении спектров пленок помещенных в сферу Ульбрихта, положения «красных» максимумов поглощения по сравнению с обычным способом измерения практически не изменялись в пределах 1—3 *ммк*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Хлорофилл *a* и феофитин *a*. В согласии с ранними работами [17], хлорофилл *a* образует пленку с максимумом поглощения ~680 *ммк*, спектр поглощения которой представлен на рис. 1, *A*, спектр 2. Общий вид спектра и положение максимумов поглощения не зависят от толщины пленки. Использование вместо серного эфира неполярных растворителей — петролейного эфира и четыреххлористого углерода не вызывало изменений

спектров поглощения пленок пигментов. Пленки, подвергнутые длительному откачиванию (в течение 2—3 час. при 60°), не обнаруживали заметных спектральных изменений. Нагревание пленок до 100° приводило к коротковолновому смещению спектра на 2—3 *ммк*.

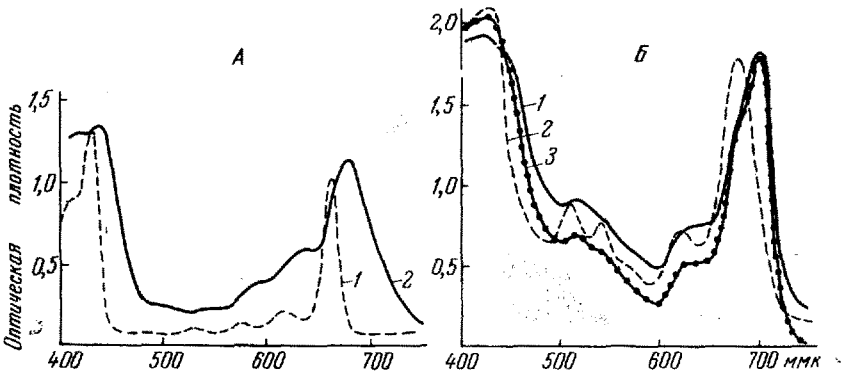


Рис. 1. Спектры поглощения растворов и пленок пигментов

А — хлорофилл *а*: *1* — раствор в серном эфире, *2* — пленка; *Б* — пленка феофитина *а*: *1* — при 20°, *2* — при 70°, *3* — после последующего охлаждения до 20°

Феофитин *а* образует пленку с максимумом при 700 *ммк* и «плечом» ~680 мин. (рис. 1, *Б*). При нагревании до 70° происходит полное исчезновение формы «700» и возрастание поглощения при 680 *ммк* (рис. 1, *Б*, спектр *2*). Аналогичное явление обнаружили Гуринович и Стрелкова [18]

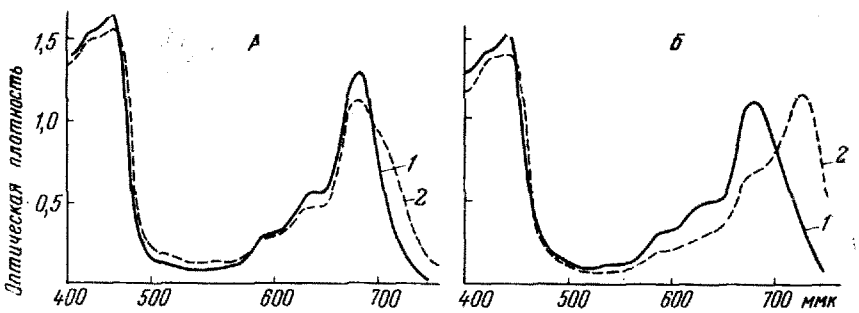


Рис. 2. Спектры поглощения пленок хлорофилла *а*

А — исходная (*1*) и после обработки парами воды (*2*); *Б* — исходная (*1*) и после обработки парами аммиака (*3*)

у коллоидных растворов феофитина *а*, полученных разбавлением спиртовых и ацетоновых растворов пигмента водой. Охлаждение пленки до комнатной температуры, по нашим наблюдениям, приводит к воспроизведению исходного спектра, что видно на рис. 1, *Б*, *3*.

Мы исследовали влияние паров воды, аммиака и формальдегида на спектры пленок хлорофилла *а*. С этой целью в боковые отводы вакуумных трубок Тунберга с пленками пигмента наливали воду, раствор аммиака (26%) или формальдегида, и образцы выдерживали при 20° на протяжении 18—48 час.

Пленки хлорофилла *а* в парах воды (в течение 18 час. при 20° С) обнаруживают отчетливое возрастание поглощения при 710—715 *ммк* (рис. 2, А). Такое же явление наблюдается у пленок пигмента, погруженных в воду, а также при охлаждении пленок до температуры жидкого азота за счет возможной при этом конденсации остаточной влаги на пленку. В парах воды при 50° за 30 мин. наблюдается образование максимума при 745 *ммк*. В связи с этим следует указать на работы Джекоб-

са и соавторов [19] и Белавцевой, Воробьевой, Красновского [20], установивших необходимость воды для кристаллизации хлорофилла *а*, этилхлорофиллида и бактериохлорофилла [19]. Пуцейко и Теренин [21] наблюдали у кристаллических слоев хлорофилла и метилхлорофиллида, обработанных парами воды, сдвиг красного максимума спектра фото-э. д. с. в длинноволновую сторону.

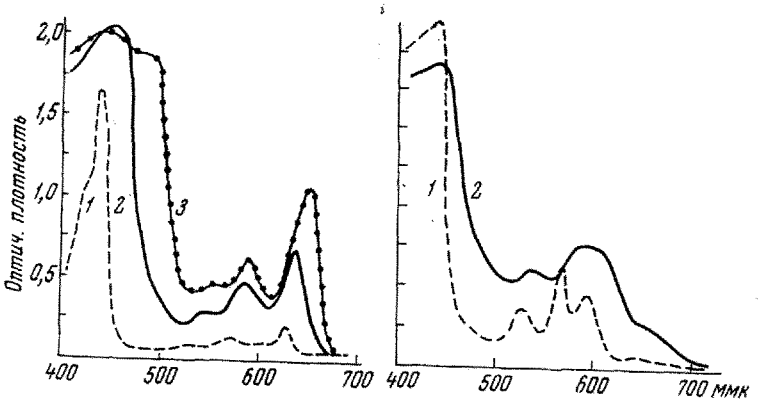


Рис. 3. Спектры поглощения растворов и пленок пигментов
А — протохлорофилл: *1* — раствор в серном эфире, *2* — исходная пленка, *3* — после обработки парами аммиака; *Б* — протофеофитин: *1* — раствор в серном эфире, *2* — пленка

Мы нашли, что пленки хлорофилла *а*, подвергнутые в течение 24—48 час. при 20° действию паров водного раствора аммиака, обнаруживают появление в спектре поглощения длинноволнового максимума в области 725—730 *ммк* и уменьшение исходного максимума при 680 *ммк* (рис. 2, *Б*). После растворения в серном эфире пленки, обработанной аммиаком, в растворе не наблюдается каких-либо существенных спектральных изменений по сравнению с исходным раствором. В пленке, вторично полученной из эфирного элюата, максимум 725—730 *ммк* отсутствует, вторичная обработка парами аммиака снова приводит к его появлению. Длительная эвакуация вызывает значительное уменьшение указанного максимума и возрастание поглощения при 680 *ммк*. Подобного эффекта не удалось наблюдать у пленок феофитина *а*.

Пары водного раствора формальдегида или ацетальдегида аналогично действию аммиака вызывают появление в спектре хлорофилла *а* нового длинноволнового максимума в области 740 *ммк*. Обработка пленок хлорофилла парами органических растворителей (эфир, ацетон, пиридин) приводит к коротковолновому смещению, которое следует приписать дезагрегации.

Протохлорофилл и протофеофитин. На рис. 3, *А* представлен спектр пленки протохлорофилла, максимум поглощения которой ~635 *ммк*. Вид спектра не зависит от толщины пленки и способа получения. Охлаждение до температуры жидкого азота и нагревание до 80° не вызывают существенных спектральных изменений. При температуре выше 60° пленки протохлорофилла начинают плавиться. При обработке парами аммиака обнаруживается заметное (10—12 *ммк*) длинноволновое смещение и возрастание величины поглощения красного максимума (рис. 3, *А*, *3*). Как и в случае хлорофилла *а*, действие паров аммиака обратимо. Пленки протофеофитина по сравнению с раствором не обнаруживают столь далекого длинноволнового смещения, которое свойственно феофитину *а*. Спектры поглощения типичного варианта пленки и раствора протофеофитина даны на рис. 3, *Б*. Смещение максимума достигает 15 *ммк*. Охлаждение до температуры жидкого азота, а также нагревание до 80°

существенно не меняют спектров пленок. Протофеофитин выше 60° начинает плавиться, что приводит к быстрому нарушению структуры пленки в этих условиях.

Хлоофилл *b* и феофитин *b*. Хлорофилл *b* образует пленку с максимумом поглощения при ~660 *ммк* (рис. 4, *А*). При использовании растворов пигмента в четыреххлористом углероде спектральные свойства пленок не изменяются. Нагревание до 80—90° вызывает смещение спектра в коротковолновую сторону, достигающее 5—6 *ммк*. Охлаждение до —196° не вызывает значительных спектральных изменений. В отличие от хлорофилла *a* свойства пленок хлорофилла *b* существенно не изменяются при обработке их парами аммиака и воды.

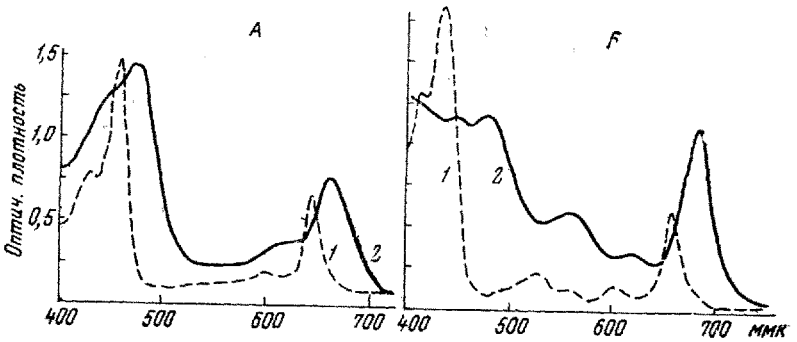


Рис. 4. Спектры поглощения растворов и пленок пигментов
А — хлорофилл *в*: *1* — раствор в серном эфире, *2* — пленка; *Б* — феофитин *в*: *1* — раствор в серном эфире, *2* — пленка

Пленки безмагниевого производного хлорофилла *b* обнаруживают значительное длинноволновое смещение по сравнению с раствором (рис. 4, *Б*, *1*, *2*) почти такое же, как у феофитина *a*. Нагревание до 90—100° так же, как и охлаждение жидким азотом, существенно не изменяют вид спектра.

Бактериовиридин и его безмагниевый аналог. Пигмент зеленых серных бактерий имеет большую склонность к образованию агрегированных форм [22—25]. Пленки бактериовиридина по сравнению с раствором обнаруживают сильное длинноволновое смещение, достигающее ~100 *ммк*. Спектр поглощения пленки, полученной из эфирного раствора, представлен на рис. 5, *А*, *2*. Охлаждение до температуры жидкого азота приводит к более отчетливому обнаружению в спектре максимума ~680 *ммк*. Длительная эвакуация (2—3 часа при комнатной температуре) не изменяет поглощения. Нагревание пленки до 80—90° вызывает дальнейший длинноволновой сдвиг до 745—750 *ммк* и значительное возрастание величины поглощения в этой области. Аналогичное действие, как было замечено, оказывает обработка пленки парами серного эфира (рис. 5, *3*). Можно думать, что при введении эфира происходит переориентировка молекул, вследствие чего в механизм агрегации включаются новые силы межмолекулярного взаимодействия. Как было отмечено, в случае хлорофилла обработка пленок парами серного эфира приводила лишь к коротковолновому смещению спектра, которое мы приписываем дезагрегации.

Безмагниевый аналог бактериовиридина при образовании пленок не обнаруживает значительного длинноволнового смещения [22], которое в предельных случаях достигает 10—12 *ммк*. На рис. 5, *Б* даны спектры поглощения пленки и раствора феофитина бактериовиридина. Толщина пленки и нагревание не оказывают заметного влияния на вид спектра.

Бактериохлорофилл и бактериофеофитин. Пигмент пурпурных серных бактерий — бактериохлорофилл — по данным нашей лаборатории [17; 24; 26], обладает большой способностью к агрегации с образованием форм.

поглощающих в ближней инфракрасной области спектра (800, 850—870 и 890 *ммк*). На рис. 6, *А* представлены спектры поглощения исходного эфирного раствора и свежеполученной пленки бактериохлорофилла. Можно видеть, что крайний длинноволновой максимум в такой пленке

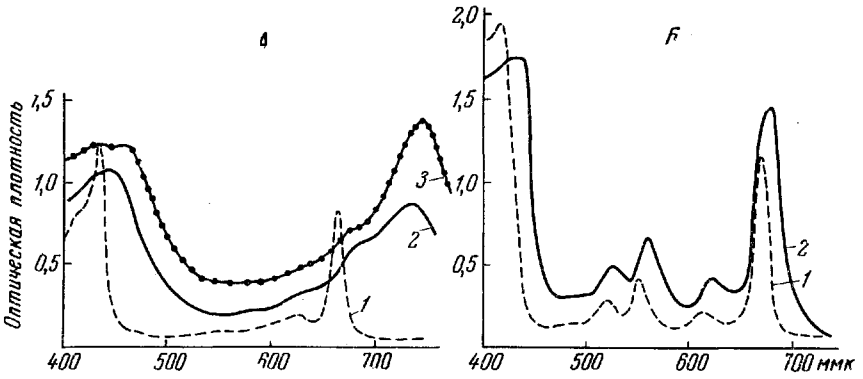


Рис. 5. Спектры поглощения растворов и пленок пигментов

А — бактериовиридин: *1* — раствор в серном эфире, *2* — исходная пленка, *3* — после обработки парами эфира; *Б* — феофитин бактериовиридина: *1* — раствор в серном эфире, *2* — пленка

расположен ~860 *ммк*. Обращает на себя внимание отсутствие заметного сдвига максимума 590 *ммк* в спектре бактериохлорофилла при образовании твердых пленок. Аналогичное явление обнаруживается у пигмента и в бактериальных клетках. Можно предположить, что электрон-

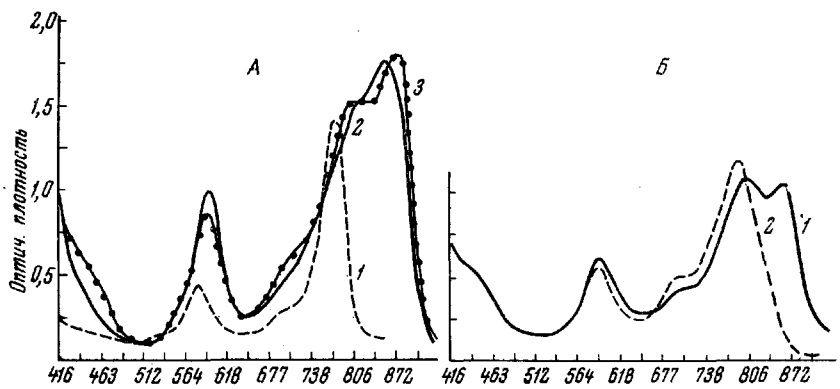


Рис. 6. Спектры поглощения бактериохлорофилла

А: *1* — раствор в серном эфире, *2* — **пленка**, *3* — **та** же пленка после обработки парами воды. *Б*: *1* — пленка при 20° и *2* — при 85°

ный переход, определяющий указанный спектральный максимум, имея иную симметрию, «скрыт» от влияния межмолекулярного взаимодействия.

Обработка пленки парами воды приводит к смещению длинноволнового максимума до 870—880 *ммк* (рис. 6, *А*, *3*). Указанные максимумы, наблюдающиеся в пленках, принадлежат, по-видимому, кристаллическому бактериохлорофиллу, который поглощает при 865 *ммк* [19]. Интересно отметить, что при температуре жидкого азота также наблюдается длинноволновое смещение до 875 *ммк*. В некоторых случаях в присутствии воды удавалось получить пленки бактериохлорофилла с максимумом ~890 *ммк*, однако этот эффект не удавалось четко воспроизвести. Подобный результат наблюдался и ранее [26]. Нагревание до 80—90° вызы-

вало полное исчезновение максимумов 850—875 *ммк* в спектре пленки и возрастание максимума в области 800 *ммк*, который в данных условиях смещается в коротковолновую сторону (рис. 6, *Б*), что согласуется с предыдущей работой нашей лаборатории [26]. Охлаждение пленки до комнатной температуры и даже до —196° не приводит к вторичному появлению длинноволновых форм.

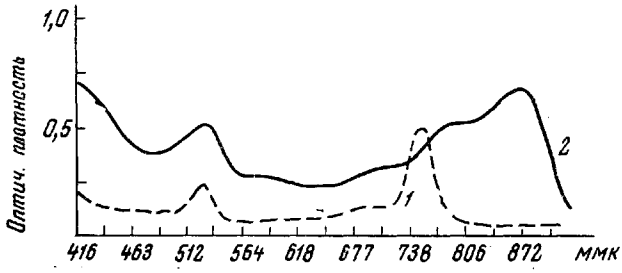


Рис. 7. Спектры поглощения бактериофеофитина
1 — раствор в серном эфире, *2* — пленка

Бактериофеофитин образует пленку с длинноволновым максимумом ~865 *ммк*. На рис. 7 представлены спектры поглощения пленки пигмента и исходного раствора в эфире. Нагревание пленок бактериофеофитина до 80—90°, в отличие от бактериохлорофилла, не вызывает заметных изменений в спектре поглощения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученный экспериментальный материал позволяет высказать ряд общих соображений относительно типа межмолекулярного взаимодействия у каждой из наблюдаемых форм пигментов.

Учитывая результаты работ [6—9], можно допустить, что поглощение 680 *ммк*, наблюдающееся в пленках хлорофилла *а*, принадлежит форме пигмента, в которой атом магния одной молекулы взаимодействует с кислородом карбонильной группы циклопентанового кольца другой молекулы. Указанное взаимодействие, по всей вероятности, приводит к образованию двумерных структур, создавая стерические препятствия для тесного сближения плоскостей сопряженных систем двух молекул и более близкого взаимодействия облаков π-электронов.

Аммиак и вода могут вступать в координационную связь с центральным атомом магния и, возможно, другими группировками молекулы пигмента — циклопентаноновым кольцом, иминогруппировками и т. д. При этом возникают формы, в которых происходит более полное наложение порфириновых колец, чем в форме «680», ведущее к более тесному взаимодействию π-электронных облаков в упорядоченных агрегированных структурах; так, известно [20], что формы хлорофилла с максимумами поглощения при 690 и 740 *ммк* обладают кристаллической структурой.

Выступая в качестве посредников между отдельными компонентами молекулярных соединений хлорофилла *а*, молекулы аммиака, воды и формальдегида приводят к усилению взаимодействия между молекулами пигмента, появлению новых, более длинноволновых максимумов в спектрах поглощения пленок. Можно предположить, что при посредстве воды или аммиака осуществляется «сшивка» — связь между монослоями хлорофилла *а* с образованием трехмерных структур (возможно, бимолекулярных слоев), которые являются, по-видимому, основными структурными компонентами кристаллов хлорофилла *а* [19; 27].

Безмагниевое производное хлорофилла *а* в твердых пленках образует формы с поглощением при 680 и 700 *ммк*. Первая из них по своей термо-

устойчивости и спектру сходна с соответствующей формой хлорофилла *a*. Это указывает, что при образовании формы «680» у феофитина, как и у хлорофилла *a*, могут взаимодействовать карбонильные группировки молекул с центральными частями пиррольных колец. Высокая температурная устойчивость указанной формы феофитина свидетельствует о том, что за ее образование скорее всего ответственны довольно прочные водородные связи, в которых участвуют иминные группировки. Измерения инфракрасных спектров фталоцианина без металла, проведенные Сидоровым и Котляром [28], позволили сделать вывод об образовании кристаллических форм этого пигмента при посредстве межмолекулярных водородных связей с участием иминных групп молекул.

Другая форма феофитина *a* с максимумом поглощения при 700 *ммк* отличается высокой термолабильностью, переходя при нагревании (до температуры 70° и выше) в устойчивую форму «680». С учетом данных по наличию прочно связанной воды у феофитина *a* [12; 13], вероятно, его форма «700» по типу агрегации близка к форме хлорофилла *a*, поглощающей в области 710—715 *ммк* и появляющейся в пленках под действием паров воды. В пользу предположения о близости обеих форм свидетельствует их одинаковая чувствительность к воздействию нагревания. Можно предположить, что форма «700» феофитина *a* является результатом тесного параллельного сближения плоскостей порфириновых колец двух молекул и взаимодействия за счет развития вандерваальсовых сил. Это — слабое взаимодействие, нарушаемое нагреванием. Энергия диссоциации формы феофитина *a* с поглощением при 700 *ммк*, обнаруживаемой в коллоидных растворах пигмента, составляет 2,5 *ккал/моль* [18]. Возможно, что развитие сил межмолекулярного взаимодействия при агрегации феофитина *a* осуществляется между отдельными компонентами монослоев в плоскости, перпендикулярной плоскости последних, что приводит к созданию трехмерных структур, состоящих из бимолекулярных слоев пигмента. Нагревание, приводя к разрыву слабых вандерваальсовых связей, вызывает переориентировку молекул с образованием устойчивой формы «680».

Протохлорофилл и протофеофитин в твердых пленках обнаруживают меньшее по сравнению с хлорофиллом *a* смещение спектра в длинноволновую область. Пары аммиака при действии на пленки протохлорофилла также не вызывают столь далекого длинноволнового сдвига красного максимума поглощения, который наблюдается в этом случае у пленок хлорофилла *a*. Тем не менее рассуждения, касающиеся механизма пигмент-пигментного взаимодействия у хлорофилла *a* и действия аммиака, применимы и для протохлорофилла.

Хлорофилл *b* при образовании твердых пленок обнаруживает такой же сдвиг спектра по сравнению с раствором, что и хлорофилл *a*. Однако мы не смогли заметить изменений спектральных свойств пленок хлорофилла *b* при обработке их водой или аммиаком. Это приводит к мысли, что при агрегации хлорофилла *b* в пленках, по-видимому, реализуются обе добавочные (координационные) валентности магния за счет сочетания центрального атома металла одной молекулы соответственно с альдегидной группой и кетогруппой циклопентанонового кольца двух других молекул.

Безмагниевое производное хлорофилла *b* образует пленки, в которых длинноволновый сдвиг поглощения достигает почти такой же величины, какая свойственна пленкам феофитина *a*. Однако, в отличие от феофитина *a*, длинноволновая форма феофитина *b* устойчива к действию нагревания. Это можно объяснить тем, что при агрегации феофитина *b*, по всей вероятности, вступает в действие дополнительное сцепление молекул за счет взаимодействия альдегидной группы с иминогруппами пиррольных колец.

Бактериовиридин способен к образованию высоко агрегированных форм, поглощающих в крайней красной области спектра (730—750 *ммк*). Это свойство пигмента может быть связано с наличием гидроксильной группы в его молекуле (в первом пиррольном кольце), при участии которой возможны и координационные (с центральным атомом магния) и водородные (с азотом пиррольных колец) связи. Вместе с тем следует иметь в виду и реакционную способность лабильного атома водорода у $C_{(10)}$ в молекуле бактериовиридина. Так, в работе Пеннингтона и др. [29] измерениями инфракрасных спектров и спектров ядерного магнитного резонанса, а также путем определения молекулярного веса показано, что пирохлорофилл *а*, отличающийся от хлорофилла *а* наличием атома водорода вместо карбометоксильной группы у 10-го атома углерода в циклопентановом кольце молекулы, способен в неполярных растворителях агрегировать в большей степени по сравнению с хлорофиллом. По мнению авторов, это связано с тем, что при замене карбометоксильной группы на атом водорода уменьшаются стерические затруднения для образования агрегатов. Мы полагаем, что при агрегации бактериовиридина существенную роль может играть образование межмолекулярных водородных связей с участием водорода у $C_{(10)}$. Высокая термостойкость агрегированных форм пигмента свидетельствует в пользу этого предположения.

Безмагниевый аналог бактериовиридина лишен способности к образованию высоко агрегированных форм, обнаруживая в пленках лишь небольшой (~ 10 *ммк*) длинноволновый сдвиг. Не исключено, что у феофитина бактериовиридина изменена пространственная конфигурация всего 4-пиррольного цикла молекулы с нарушением плоскостной структуры системы сопряженных связей. Это, возможно, является стерическим барьером для тесного контакта и взаимодействия молекул.

Другой бактериальный пигмент — бактериохлорофилл, как и бактериовиридин, способен к пигмент-пигментному взаимодействию с образованием в пленках форм, поглощающих в области 800 и 850—880 *ммк*. Можно предполагать, что одной из особенностей молекулярного строения бактериохлорофилла, определяющих его способность к агрегации, является наличие ацетильной группировки у 2-го атома углерода в первом пиррольном кольце молекулы. За счет активного карбонильного кислорода этой группы, как отмечалось выше, возможно образование координационных связей при межмолекулярном взаимодействии. Высокая термолабильность агрегированных форм бактериохлорофилла наводит на мысль, что в их создании могут принимать участие слабые координационные связи между кислородом карбонильных групп и азотом пиррольных колец молекул. Вместе с тем возможность одновременного образования и связей C=O...Mg при агрегации бактериохлорофилла не может быть полностью исключена.

Вода, вызывая переход формы «860» в форму «870», способствует увеличению степени агрегации бактериохлорофилла, усилению межмолекулярного взаимодействия. Это связано с тем, что при посредстве воды, присоединяющейся, по-видимому, к центральным атомам магния, вступает в действие дополнительное «сцепление» между молекулами так же, как и в случае хлорофилла *а*.

Бактериофеофитин в пленках, как и бактериохлорофилл, образует формы, различающиеся по степени агрегации. Наиболее длинноволновая форма с поглощением ~ 860 *ммк* спектрально близка к соответствующей форме бактериохлорофилла, однако, в отличие от последней, характеризуется значительной термостойкостью. Можно допустить, что в ее образовании принимают участие сравнительно устойчивые водородные связи между иминогруппами пиррольных колец и кислородом карбонильных группировок, из которых активная роль может принадлежать в первую очередь ацетильной группе, а также кетогруппе циклопентанового кольца.

Сравнительное исследование агрегированных форм пигментов фотосинтезирующих организмов свидетельствует об участии разных типов межмолекулярного взаимодействия в процессе агрегации. Однако имеющиеся экспериментальные данные недостаточны для однозначного суждения о конкретном механизме и типах пигмент-пигментного взаимодействия.

ВЫВОДЫ

Установлено, что ряд исследованных пигментов в твердых пленках образует формы, характеризующиеся следующими главными максимумами поглощения в красной области спектра: хлорофилл *a* — 676—680 *ммк*; феофитин *a* — 700 *ммк*; протохлорофилл — 635 *ммк*; протофеофитин — 655 *ммк*; хлорофилл *b* — 660 *ммк*; феофитин *b* — 682 *ммк*; бактериовиридин — 730—750 *ммк*; феофитин бактериовиридина — 680 *ммк*; бактериохлорофилл — 800 и 860 *ммк* и бактериофеофитин — 860—870 *ммк*.

При длительном действии паров воды (20°) на пленки хлорофилла *a* возрастает количество агрегированной формы с максимумом поглощения при 710—715 *ммк*, в случае пленок бактериохлорофилла также наблюдается длинноволновый сдвиг до 880 *ммк*.

При действии на пленки пигментов паров аммиака, формальдегида и ацетальдегида наблюдается образование агрегированных форм с максимумами 725 и 745 *ммк* и у протохлорофилла — с максимумом ~650 *ммк*.

Агрегированные формы хлорофилла *a* (710—745 *ммк*), феофитина *a* (700 *ммк*) и бактериохлорофилла (850—890 *ммк*) термолабильны, переходя при нагревании до 80° в более устойчивые формы с максимумами поглощения соответственно при 675, 680 и 790 *ммк*.

Рассматривается связь типов межмолекулярного взаимодействия с особенностями химического строения молекул хлорофилла и его аналогов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., в кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 41, «Наука», 1965
2. Литвин Ф. Ф., в кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 96, «Наука», 1965
3. Бейлар Д., Буш Д., в кн.: Химия координационных соединений, стр. 10. Изд. иностр. лит-ры, М., 1960
4. Гринберг А. А., Введение в химию комплексных соединений, М — Л., Госхимиздат, 1951
5. Сидоров А. Н., Успехи химии **35**, 366, 1966
6. Anderson A. F. H., Calvin M., Arch. Biochem. Biophys. **107**, 251, 1964
7. Boucher L. I., Strain H. H., Katz J. J., J. Amer. Chem. Soc. 88, 1341, 1966
8. Closs G. L., Katz J. J., Pennington F. C. et al., J. Amer. Chem. Soc. **85**, 3009, 1963
9. Katz J. J., Closs G. L., Pennington F. C., Thomas M. R., J. Amer. Chem. Soc. **85**, 3801, 1963
10. Holt A. S., Hughes D. W., Kende H. J., Purdie J. W., Plant Physiol., **4**, 49, 1963
11. Карякин А. В., Кутюрин В. М., Чибисов А. К., Докл. АН СССР **140**, 1321, 1961
12. Карякин А. В., Чибисов А. К., Биофизика **8**, 441, 1963
13. Кутюрин В. М., Князев В. П., Докл. АН СССР **149**, 456, 1963
14. Сидоров А. Н., Теренин А. Н., Оптика и спектроскопия **8**, 482, 1962
15. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия **27**, 958, 1962
16. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР **169**, 1187, 1966
17. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К., Докл. АН СССР **92**, 1201, 1953
18. Гуринович Г. П., Стрелкова Т. И., Биофизика **8**, 172, 1963
19. Jacobs E. E., Vatter A. E., Holt A. S., Arch. Biochem. and Biophys. **53**, 228, 1954
20. Белавцева Е. М., Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика **4**, 521, 1959
21. Пуцейко Е. К., Теренин А. Н., Докл. АН СССР **136**, 1223, 1961
22. Красновский А. А., Быстрова М. И., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **167**, 691, 1966

23. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР, 152, 1231, 1963
24. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй-цюнь, Докл. АН СССР 143, 456, 1962
25. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР 127, 913, 1959
26. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая К. К., Докл. АН СССР 85, 389, 1952
27. Jacobs E. E., Holt A. S., Rabinowitch E., J. Chem. Phys. 22, 142, 1954
28 Сидоров А. Н., Котляр И. П., Оптика и спектроскопия 11, 175, 1961
29. Pennington F. C., Strain H. H., Svec W. A., Katz J. J., J. Amer. Chem. Soc. 86, 1418, 1964

Поступила в редакцию
17.XI 1966

THE STUDY OF AGGREGATED FORMS OF CHLOROPHYLL AND ANALOGS IN CONNECTION WITH THEIR CHEMICAL STRUCTURE

M. I. BYSTROVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

Absorbtion spectra of solid films of chlorophyll and analogs were studied. The pigments in solid films revealed different forms which possess the following main absorbtion maxima in the red: chlorophyll *a* at 675—680 *mμ*; pheophytin *a* at 700 *mμ*; protochlorophyll at 635 *mμ*; protopheophytin at 655 *mμ*; chlorophyll *b* at 660—665 *mμ*; pheophytin *b* at 682 *mμ*; bacteriovirydin at 730—750 *mμ*; pheophytin of bacteriovirydin at 680 *mμ*; bacteriochlorophyll at 800 and 850—860 *mμ*; bacteriopheophytin at 860—870 *mμ*.

The action of water vapour at 20° on the films of chlorophyll leads to an increase of the aggregated form having an absorbtion maximum at 700—710 *mμ*; in the case of bacteriochlorophyll a shift to the long-wave region up to 880 *mμ* is seen.

The action of ammonia, formaldehyde or acetaldehyde vapour (under water solutions) on chlorophyll films (with maximum at 680 *mμ*) leads to formation of aggregates with maxima at 725—745 *mμ* and in the case of protochlorophyll near 650 *mμ*. The aggregated forms of chlorophyll with absorbtion at 725—745 *mμ*, pheophytin *a* with maximum 700 *mμ* and bacteriochlorophyll with absorbtion at 850—880 *mμ* are termolabile; by heating to 80° they are converted into more stable forms with maxima at 675, 680 and 790 *mμ* respectively.

Том XII, вып. 2 1967

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА НИЗКОТЕМПЕРАТУРНУЮ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОПЛАСТОВ И ГОМОГЕНАТОВ ЛИСТЬЕВ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

При исследовании процесса зеленения этиолированных листьев было обосновано представление о наличии в растениях «мономерных» и агрегированных форм хлорофилла, отличающихся по спектральным и фотохимическим свойствам [1, 2]. Производная спектроскопия [3, 4], измерения «спектра действия» эффекта Эмерсона [5] и люминесценции листьев при низкой температуре [6, 7] обнаружили наличие разных форм хлорофилла и его аналогов. Различным формам хлорофилла приписывается участие в разных стадиях фотосинтеза.

Для выявления свойств различных форм пигментов в хлоропластах мы систематически исследовали действие органических растворителей. Изучение спектров поглощения при добавлении возрастающих концентраций ряда растворителей еще в 1952 году показало ступенчатый характер изменения свойств пигментов [8], что было подтверждено в последующих работах [9—11].

Измерения флуоресценции при комнатной температуре подтвердили ступенчатый характер экстракции хлорофилла из структур хлоропластов. Добавление ацетона [8, 11] и этилового спирта [8] до 50% приводило к постепенному незначительному возрастанию интенсивности флуоресценции; при концентрации растворителя выше 50% наблюдалось резкое увеличение флуоресценции, связанное с переходом пигмента в растворенное состояние. При добавках ацетона до 30% происходил небольшой сдвиг максимума флуоресценции в коротковолновую сторону [11].

Измерение флуоресценции при —196° позволяет разделить флуоресценцию мономерной и агрегированных форм пигментов, так как понижение температуры способствует увеличению квантового выхода флуоресценции длинноволновых форм [12, 13]. В данной работе в красной области спектра измеряли низкотемпературную флуоресценцию листьев, приготовленных из них хлоропластов и гомогенатов и исследовали изменения, происходящие при добавлении возрастающих концентраций растворителей. Особый интерес представлял вопрос о спектральных свойствах хлорофиллида, присутствующего в листьях и образующегося за счет эндогенной хлорофиллазы, активируемой под влиянием органических растворителей.

Методика

Опыты проводили с листьями растений, обладающих активной хлорофиллазой (сахарная свекла) и отличающихся низкой активностью фермента (фасоль). Бо́льшая часть методических приемов, примененных в данной работе, описана ранее [9, 16]. Измерение спектров флуорес-

ценции при —196° производили на регистрирующем спектрофлуорометре [14]; образец погружали в прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутную лампу ДРШ-250 с конденсором и светофильтрами УФС-3 и ЗС-3, выделяющими линию ртути 365 *ммк*.

Спектры флуоресценции на рисунках даны без поправки на спектральную чувствительность прибора. На рис. 1 совмещены спектры ряда

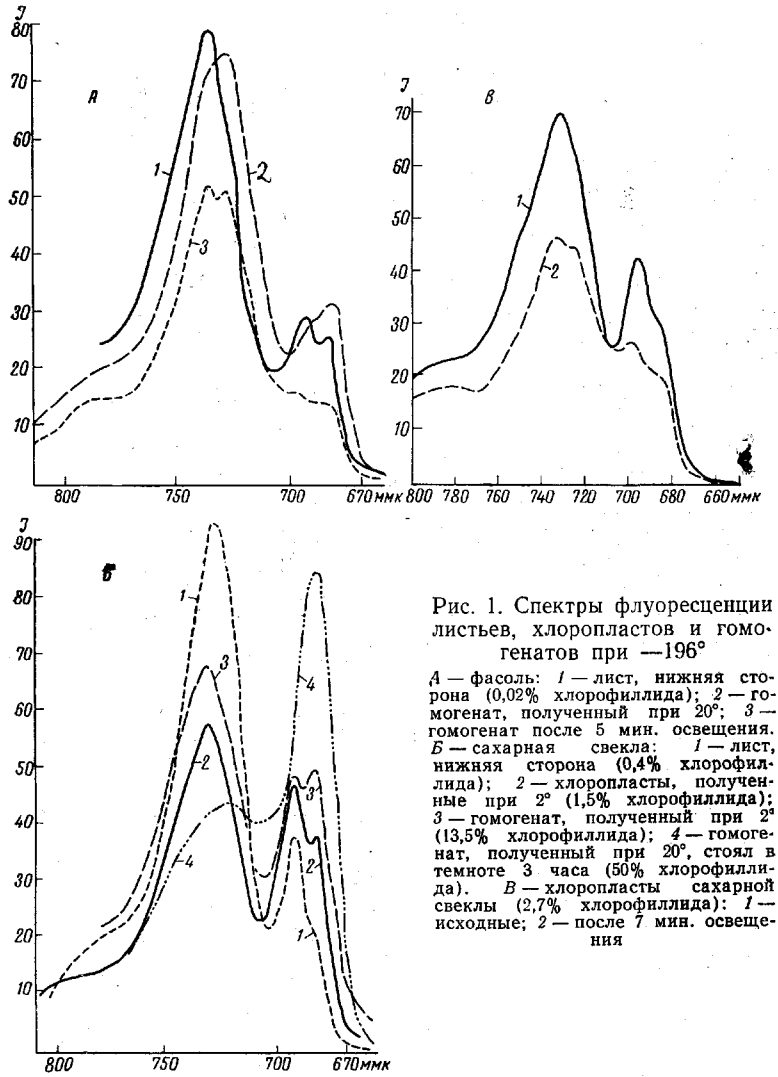


Рис. 1. Спектры флуоресценции листьев, хлоропластов и гомогенатов при —196°

А — фасоль: *1* — лист, нижняя сторона (0,02% хлорофиллида); *2* — гомогенат, полученный при 20°; *3* — гомогенат после 5 мин. освещения. *Б* — сахарная свекла: *1* — лист, нижняя сторона (0,4% хлорофиллида); *2* — хлоропласты, полученные при 2° (1,5% хлорофиллида); *3* — гомогенат, полученный при 2° (13,5% хлорофиллида); *4* — гомогенат, полученный при 20°, стоял в темноте 3 часа (50% хлорофиллида). *В* — хлоропласты сахарной свеклы (2,7% хлорофиллида): *1* — исходные; *2* — после 7 мин. освещения

объектов, измеренные в разных условиях фокусировки возбуждающего света и с различным усилением регистрирующего устройства, по приведенным кривым нельзя сравнивать интенсивность флуоресценции, а можно лишь судить об общем виде спектра и относительной интенсивности флуоресценции в максимумах. Спектры флуоресценции препаратов, содержащих различные концентрации органического растворителя, записывали при одной и той же фокусировке возбуждающего света, но в ряде случаев с различным усилением; в этом случае величина усиления обозначена в скобках в подписях к рисункам. Спектры до и после освещения препаратов красным светом ($\sim 10^6$ *эрг·см*$^{-2}$ *сек*$^{-1}$ [9]) записывали в одинаковых условиях, следовательно, в этом случае можно

судить о величине изменения интенсивности флуоресценции в результате действия света.

Для исследования влияния пиридина и диоксана использовали хлоропласты и гомогенаты листьев сахарной свеклы и фасоли, действие ацетона и детергентов изучали на гомогенатах листьев фасоли. С растворителями образцы стояли 1 час при 0° или при комнатной температуре.

Результаты

Спектры флуоресценции листьев, хлоропластов и гомогенатов при —196°

Листья. В работе получены спектры, соответствующие описанным ранее [6, 7]. Главные максимумы коротковолновых форм пигментов наблюдались при 683—685 и 694—695 *ммк*, главный длинноволновый максимум в листьях фасоли и свеклы отличался по положению, что уже отмечалось ранее [7] и видно на рис. 1. У листа фасоли длинноволновый максимум расположен при 738—740 *ммк*, у листа свеклы около 730—735 *ммк*. Небольшой максимум наблюдался также в области 780—790 *ммк*.

Хлоропласты и гомогенаты. Из сравнения спектров листьев, хлоропластов и гомогенатов следует, что нарушение структуры листа приводит к существенным изменениям (наблюдающимся и в случае выделения хлоропластов при 2° с применением изотонических растворов). В хлоропластах и гомогенатах наблюдалось относительное понижение интенсивности флуоресценции длинноволновых максимумов, особенно отчетливое в случае растирания листьев при комнатной температуре.

У хлоропластов и гомогенатов из листьев фасоли длинноволновый максимум смещался по сравнению с листом от 740 до 730 *ммк*, максимум 740 *ммк* сохранялся в виде плеча (рис. 1). В листьях, хлоропластах и гомогенатах сахарной свеклы не наблюдалось различия в положении (~730 *ммк*). Стояние суспензии хлоропластов фасоли в дистиллированной воде или фосфатном буфере при комнатной температуре приводило к еще большему сдвигу длинноволнового максимума (после 2—3 часов он сдвигался от 740 до 723 *ммк*).

В гомогенатах листьев фасоли и свеклы максимум при 684 *ммк* становился выше максимума 695 *ммк*, тогда как в листьях наблюдалось обратное соотношение (рис. 1). Стояние гомогената свеклы при комнатной температуре, сопровождающееся накоплением хлорофиллида, проводило к еще большему усилению флуоресценции при 684 *ммк*. Нарушение структуры листа вело к активации хлорофиллазы [15, 16] и количество хлорофиллида оказывалось в гомогенатах значительно выше, чем в листьях. В спектре флуоресценции гомогената свеклы при 50% хлорофиллида обнаруживался один максимум при 684 *ммк*, что следует приписать образующемуся хлорофиллиду. Можно предполагать, что сразу после приготовления гомогената весь образующийся дезагрегированный хлорофилл гидролизуется хлорофиллазой, но по мере падения активности фермента [16] часть этого хлорофилла может сохраняться без перехода в хлорофиллид. Максимум флуоресценции при 684 *ммк* в гомогенатах свеклы, содержащих 50% хлорофиллида, в этом случае может определяться также и хлорофиллом.

В хлоропластах из листьев свеклы, помимо понижения длинноволнового максимума и увеличения флуоресценции при 684 *ммк*, наблюдалось относительное возрастание максимума 695 *ммк* (рис. 1) по сравнению с листом.

В препаратах ряда водорослей и хлоропластах шпината, полученных диспергированием ультразвуком, Броди, Броди и Левин [17] обнаружи-

ли усиление низкотемпературной флуоресценции в области 685—690 *ммк*. Надосадочная жидкость после 30 мин. центрифугирования (из них 10 мин. при 150 000 *g*) обладала одним максимумом при 685 *ммк*. Обработка ультразвуком любых плотных частиц в водной среде приводит вследствие кавитации к локальному повышению температуры [18]. Следствием разогревания может быть дезагрегация пигментов, а также активация хлорофиллазы; мы показали, что препараты листьев шпината обладают заметной хлорофиллазной активностью [16]. Сходство спектров флуоресценции, полученных в работе Броди, Броди и Левина [17] и изображенных на рис. 1, заставляет приписать большую часть флуоресценции при 685 *ммк* хлорофиллиду. Обогащение надосадочной жидкости хлорофиллидом было нами показано ранее [15, 16].

Хранение хлоропластов при 20°. Можно было полагать, что при стоянии хлоропластов, суспендированных в гипотонических растворах при 20°, спектральные свойства препаратов будут приближаться к свойствам гомогенатов, полученных при комнатной температуре, т. е. будет возрастать максимум 684 *ммк*. Однако во всех случаях наблюдалось лишь общее значительное ослабление флуоресценции; у хлоропластов фасоли отмечалось также небольшое относительное увеличение свечения в области 701—703 *ммк*.

Эти явления можно объяснить тем, что набухание в гипотонических растворах приводит

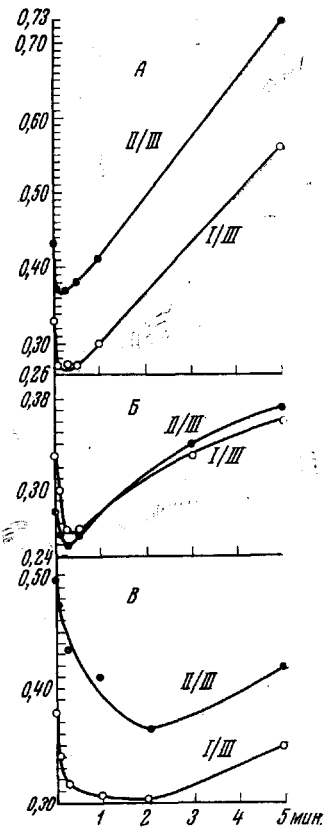


Рис. 2. Изменение при освещении соотношений высоты максимумов флуоресценции (—196°), 684 (*I*), 695 (*II*) и 730—740 *ммк* (*III*):
А — хлоропласты фасоли; *Б* — гомогенат фасоли; *В* — хлоропласты свеклы

к нарушению упорядоченности молекул пигмента в ламеллах хлоропластов; пока не ясно, происходит ли при этом изменение связи с белковым компонентом.

Кок наблюдал обратимое изменение поглощения при 700 *ммк* в хлоропластах под влиянием освещения [20]. Обращает на себя внимание указание автора на то, что в свежеприготовленных хлоропластах изменений при 700 *ммк* почти не наблюдалось и эти изменения нарастали при стоянии хлоропластов в течение нескольких часов. Возможно, этот эффект обусловлен нарушением структурной упорядоченности пигментов хлоропластов.

Действие интенсивного красного света. Ранее уже отмечалось, что при —196° наиболее значительно выцветает коротковолновая форма с максимумом флуоресценции при 685 *ммк* [6, 7]. Мы исследовали влияние освещения при 22° на спектры флуоресценции хлоропластов и гомогенатов листьев фасоли и сахарной свеклы, измеренные при —196°. Критерием изменений после освещения служила относительная величина максимумов флуоресценции, которую выражали как соотношение величины максимума при 684 (*I*) или 695 *ммк* (*II*) к длинноволновому максимуму при 730—740 *ммк* (*III*).

Наблюдалось два основных этапа изменений этих величин (рис. 2). В первые секунды освещения хлоропластов и гомогенатов наблюдалось уменьшение отношений *I/II* и *II/III*, что свидетельствовало о более бы-

стром уменьшении флуоресценции коротковолновых форм по сравнению с длинноволновой. Дальнейшее освещение вызывало возрастание этих соотношений, что, по-видимому, связано со световой дезагрегацией и выцветанием вследствие этого агрегированной длинноволновой формы. В первые секунды освещения наблюдалось также резкое падение отношений *I/II*.

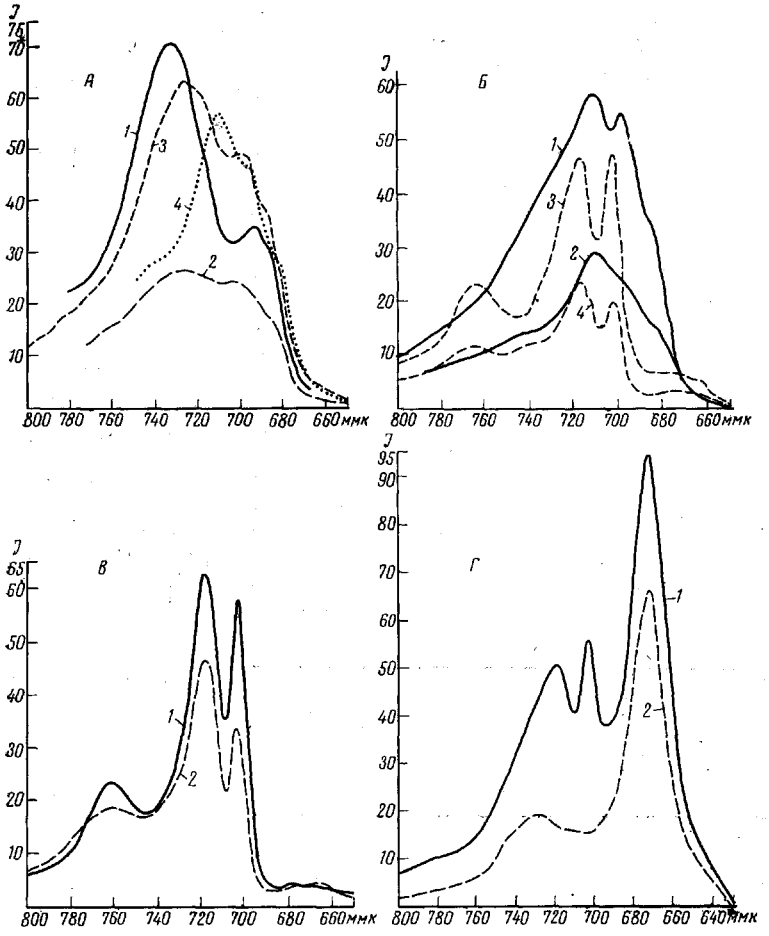


Рис. 3. Влияние возрастающих концентраций диоксана на спектр флуоресценции (при —196°) хлоропластов листьев фасоли (смесь стояла 1 час при 0°)

А: 1 — без диоксана (6,5); *2* — после 7 мин. освещения; *3* — 5% диоксана (6,5); *4* — после 7 мин. освещения. *Б: 1* — 10—20% диоксана (6,5); *2* — после 7 мин. освещения; *3* — 30% диоксана (6,5); *4* — после 7 мин. освещения. *В:* 1—50% диоксана (6,5); *2* — после 7 мин. освещения. *Г: 1*—80% диоксана (3); *2* — после 7 мин. освещения. Здесь и далее в скобках — величина усиления

Следовательно в хлоропластах и гомогенатах листьев быстрее выцветают коротковолновые формы пигментов с максимумом флуоресценции при 684 *ммк* и медленнее — длинноволновые формы пигментов.

На рис. 1, 3 и 4 видно, что освещение хлоропластов листьев фасоли приводило к значительному снижению интенсивности флуоресценции; в случае гомогенатов процесс в большинстве опытов шел менее глубоко. В соответствии с этим в гомогенатах наблюдалось более медленное увеличение соотношений *I/II* и *II/III* (рис. 2).

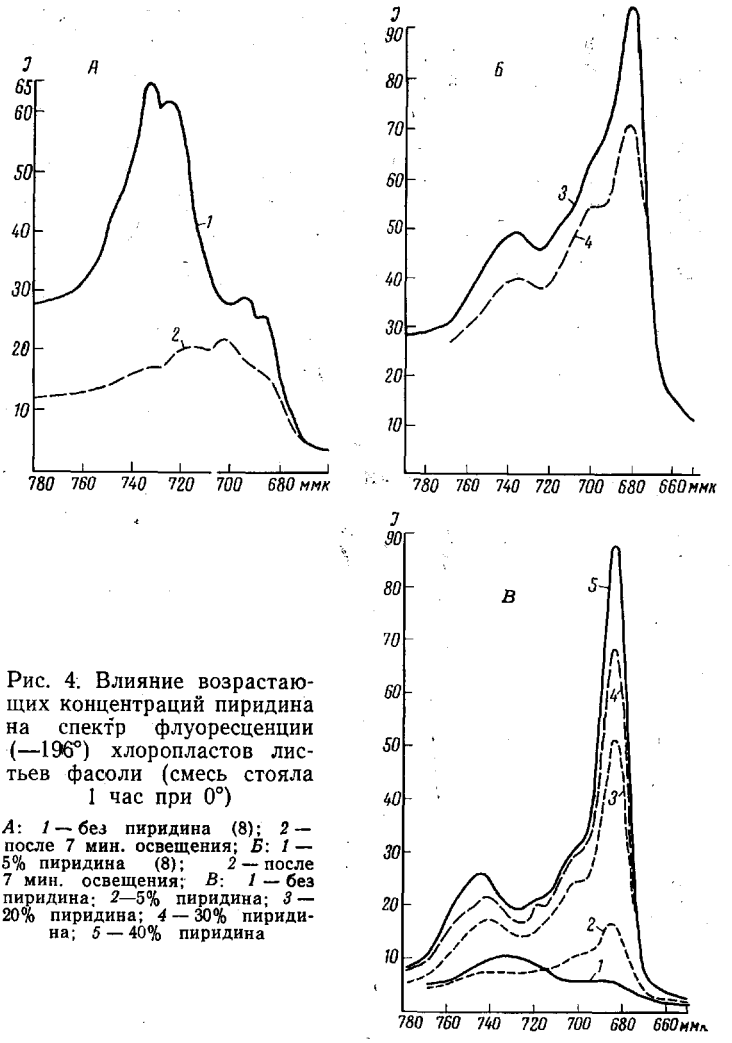


Рис. 4. Влияние возрастающих концентраций пиридина на спектр флуоресценции (—196°) хлоропластов листьев фасоли (смесь стояла 1 час при 0°)

А: *1* — без пиридина (8); *2* — после 7 мин. освещения; *Б*: *1* — 5% пиридина (8); *2* — после 7 мин. освещения; *В*: *1* — без пиридина; *2*—5% пиридина; *3* — 20% пиридина; *4* — 30% пиридина; *5* — 40% пиридина

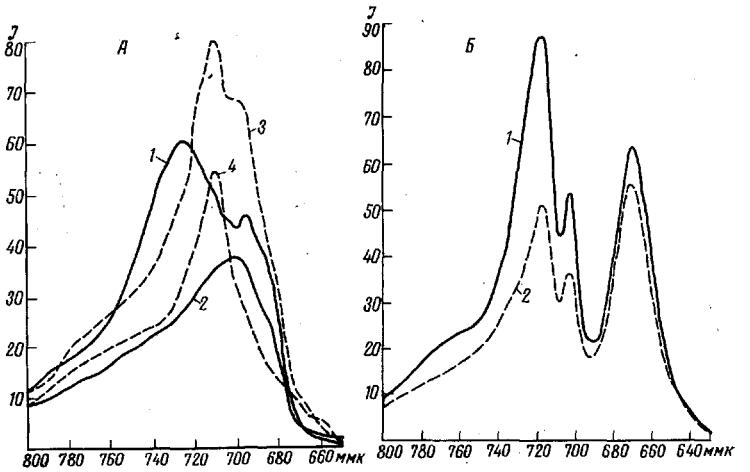


Рис. 5. Влияние возрастающих концентраций диоксана на спектр флуоресценции (—196°) хлоропластов листьев фасоли (смесь взбалтывалась 1 час при 18°)

А: *1* — без диоксана (8); *2* — после 7 мин. освещения; *3* — 5% диоксана (8); *4* —после 7 мин. освещения. *Б*: *1* — 60% диоксана (5); *2* —после 7 мин. освещения

При освещении хлоропластов листьев фасоли, хранившихся в течение нескольких часов при 18° в гипотоническом растворе наиболее устойчивой оказалась форма пигмента с максимумом флуоресценции около 703 *ммк* (рис. 5).

Изменение спектров флуоресценции (—196°) хлоропластов и гомогенатов при добавлении растворителей и детергентов

При добавлении к хлоропластам и гомогенатам возрастающих концентраций растворителей хлорофиллазная активность увеличивалась и проходила через максимум, характерный для данного растворителя и вида растения [9]. В хлоропластах и гомогенатах свеклы за 1 час при комнатной температуре накапливалось до 90% хлорофиллида, в препаратах листьев фасоли — до 2%.

Наши опыты показали, что добавление растворителей к препаратам листьев сахарной свеклы и фасоли ведет к сходным изменениям низкотемпературной флуоресценции в красной области спектра.

Диоксан. Действие диоксана специфично. Упорядоченные упаковки пигмента образуются при добавлении растворителя до 30—60%, что выражалось в сдвиге максимума поглощения пигмента до 690 *ммк*, характерного для «диоксановой» формы пигмента [8, 19].

Измерения флуоресценции показали, что в присутствии 5% диоксана происходит интенсификация коротковолновой части спектра, особенно в области 695 *ммк*. Помимо этого, в большинстве опытов наблюдалось смещение главного длинноволнового максимума до 720—724 *ммк* (рис. 3 и 5).

При дальнейшем увеличении концентрации диоксана наблюдалось постепенное формирование характерной структуры максимумов при 702—704, 716—719 и 760—770 *ммк*; небольшой максимум был обнаружен в области 670 *ммк*. Начиная с 60% диоксана происходило возрастание интенсивности флуоресценции при 673 *ммк*. Однако и при 80% диоксана в спектре, помимо основной коротковолновой флуоресценции растворенного хлорофилла при 673 *ммк*, наблюдались максимумы 703 и 717 *ммк* (рис. 3 и 5).

Коллоидные растворы из диоксана. Для сравнения мы измерили спектры водных коллоидных растворов хлорофилла $a+b$ в диоксане. В спектрах низкотемпературной флуоресценции коллоидных растворов хлорофилла, содержащих до 50% диоксана, наблюдались максимумы при 672—673 и 718—720 *ммк*. На коротковолновом склоне максимума 718 *ммк* обнаруживалось «плечо» в области 702 *ммк*. Дальнейшее увеличение концентрации диоксана в коллоидном растворе сопровождалось, как и при диоксановой обработке препаратов листьев, возрастанием максимума 673 *ммк* при сохранении характерной структуры спектра. Ряд максимумов в длинноволновой области спектра наблюдался в опытах с раствором хлорофилла $a+b$ в диоксане.

При комнатной температуре хлорофилл $a+b$ в диоксане обладал одним максимумом флуоресценции при 672 *ммк*. В спектре коллоидного раствора с 50% диоксана при комнатной температуре было обнаружено наличие максимумов, характерных для низкотемпературной флуоресценции хлоропластов при диоксановой обработке. Различия заключались лишь в перераспределении относительной высоты максимумов вследствие уменьшения квантового выхода флуоресценции длинноволновых агрегированных форм при повышении температуры.

Действие света. Излучение в красной области спектра вызывало в хлоропластах и гомогенатах, содержащих до 30% диоксана, значительное понижение флуоресценции; в ряде случаев при 20% диоксана после 5—7 мин. освещения флуоресценция отсутствовала. В интервале от 30 до

50% диоксана фотохимическая устойчивость возрастала. В этом интервале концентраций растворителя освещение вызывало предпочтительное разрушение формы, флуоресцирующей при 703 *ммк* (рис. 3).

При 60% диоксана действие света сопровождалось выцветанием длинноволновых форм пигментов (рис. 5), максимум 672 *ммк* понижался менее всего. Наблюдаемый эффект можно приписать световой дезагрегации.

При 70—80% диоксана происходило разрушение длинноволновой структуры максимумов, и после 7 мин. освещения в спектре флуоресценции обнаруживался один максимум в области 670 *ммк* (рис. 3). Снижение длинноволновых максимумов флуоресценции (при —196°) наблюдалось также при освещении коллоидных растворов хлорофилла $a+b$ из диоксана.

Пиридин. Ранее уже отмечалось, что пиридин оказывает сильное дезагрегирующее действие на хлорофилл в естественном комплексе, вызывая сдвиг максимума поглощения в коротковолновую сторону и сильную активацию хлорофиллазы уже при низких концентрациях растворителя [8, 9]. Измерения флуоресценции (—196°) показали, что добавление пиридина вызывает постепенное возрастание коротковолнового максимума в области 682—684 *ммк* и относительное понижение флуоресценции в длинноволновой части спектра (рис. 4 и 6).

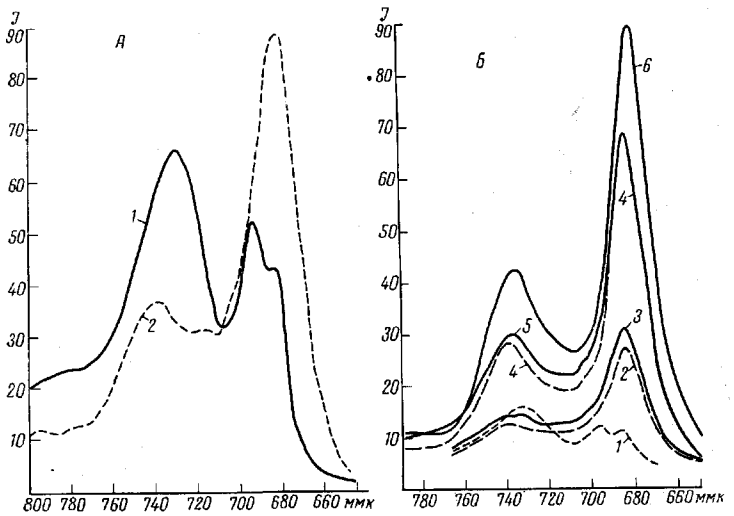


Рис. 6. Влияние возрастающих концентраций пиридина на спектр флуоресценции (—196°) хлоропластов листьев сахарной свеклы (смесь взбалтывалась 1 час при 20°)

А: *1* — без пиридина (8); *2* — 5% пиридина (6). *Б*: *1* — без пиридина; *2*—5% пиридина; *3* — 20% пиридина; *4* — 30% пиридина; *5* — 40% пиридина; *6* — 60% пиридина

Уже при 5% пиридина самый высокий максимум флуоресценции лежит при 683 *ммк*. Помимо него, как и в опытах с диоксаном, наблюдались максимумы при 703 и 718 *ммк*, в большинстве случаев проявляющиеся как «плечи» на основном (683 *ммк*) максимуме при добавлении пиридина от 5 до 20—40%. При дальнейшем увеличении концентрации растворителя они исчезали.

Освещение красным светом. При добавлении пиридина к гомогенатам листьев фасоли до 20% освещение в течение 5 мин. не вызывало уменьшения флуоресценции; при 30% растворителя наблюдалось значительное понижение, при 40% после освещения флуоресценция отсутствовала.

В опытах с хлоропластами картина была несколько отличной: при 5—10% пиридина освещение вызывало значительное падение коротковолнового максимума флуоресценции (683 *ммк*), при 20% растворителя освещение не оказывало заметного действия, при 30% наблюдалось резкое падение флуоресценции, при 40% флуоресценция отсутствовала (рис. 4).

Ацетон. При добавлении растворителя постепенно возрастали коротковолновые максимумы и понижалась длинноволновая часть флуоресценции. Уже при 5% ацетона происходило образование коротковолновой формы пигмента, флуоресцирующей в области 670—680 *ммк*. Главный максимум флуоресценции в красной области спектра при низких концентрациях ацетона (5—10%) был расположен при 675—680 *ммк*, максимум 695 *ммк* обнаруживался в виде «плеча». Даже кратковременное освещение в течение 5 сек., не ведущее к заметному выцветанию пигмента в красном максимуме поглощения, вело к перемещению максимума низкотемпературной флуоресценции до 672—673 *ммк* и понижению длинноволновой части спектра. При длительном освещении этот процесс был еще более заметным. По-видимому, освещение ускоряет дезагрегацию пигмента, медленно протекающую и в темноте (рис. 7).

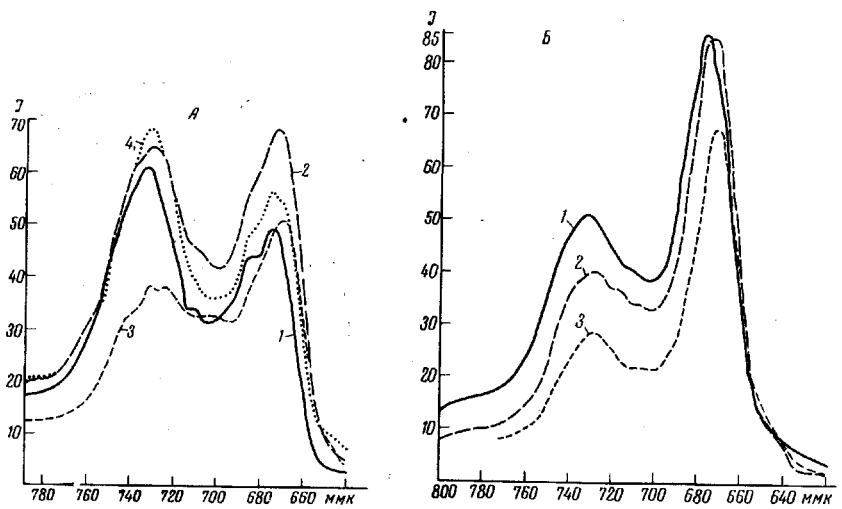


Рис. 7. Влияние возрастающих концентраций ацетона на спектр флуоресценции (—196°) гомогената листьев фасоли (смесь взбалтывалась 1 час при 18°)

А: 1 — 10% ацетона (8); *2* — после 5 сек. освещения; *3* — после 5 мин. освещения. *4* — (*1*) после 2 часов пребывания в темноте при 18°

Б: 1 — 30% ацетона (7); *2* — после 5 сек. освещения; *3* — после 5 мин. освещения

При 20—30% ацетона в коротковолновой части красной полосы флуоресценции наблюдали максимумы при 683, 675—676 и 671—673 *ммк*. Высота максимумов при 672 и 675 *ммк* была различной у разных образцов, иногда обнаруживалось присутствие только одного из них. В тех случаях, когда присутствовали оба максимума, освещение в течение 5 сек. приводило к смещению максимума флуоресценции до 672 *ммк*, после 5 мин. освещения происходило снижение длинноволновой части (рис. 7).

Наиболее высоким (при 20% ацетона) является максимум 672 *ммк*, по положению соответствующий флуоресценции хлорофилла в ацетоновом растворе, однако полного исчезновения флуоресценции в результате длительного (5—7 мин.) освещения гомогената не происходило.

Действие света резко возрастало при 50% ацетона; после 5 мин. освещения оставался только небольшой максимум в области 672 *ммк*. При 60% ацетона освещение такой продолжительности вызывало полное исчезновение флуоресценции.

У гомогенатов фасоли, содержащих 5—30% ацетона, при —196° наблюдали небольшие максимумы в области 700—703 и 708 *ммк*.

Детергенты. Дигитонин, дезоксихолат и додецилсульфат натрия оказывали на хлоропласты и гомогенаты однотипное действие.

Додецилсульфат и дезоксихолат в концентрации 0,5% переводили весь присутствующий пигмент в форму, по спектральным и фотохимическим свойствам приближающуюся к растворам пигмента в органических растворителях (рис. 8). При этом максимум флуоресценции был расположен при 682—684 *ммк*. Под влиянием 0,5%-ного дигитонина только часть пигмента переходила в коротковолновую быстро выцветающую форму. Этот процесс не отражался на положении красного максимума по-

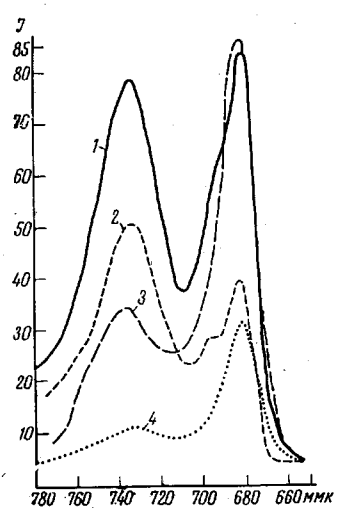


Рис. 8. Спектр флуоресценции (—196°) гомогената листьев фасоли в присутствии дигитонина и додецилсульфата натрия

1 — 0,5% дигитонина (0,42% х-да); *2* — после 5 мин. освещения; *3* — 0,5% додецилсульфата натрия (0,54% х-да); *4* — после 5 мин. освещения

глощения обработанного дигитонином гомогената листьев фасоли (9), но хорошо был виден на спектрах флуоресценции (рис. 8). При освещении гомогената, содержащего 0,5% дигитонина, в течение 5 мин. наблюдалось предпочтительное разрушение коротковолновой формы с максимумом флуоресценции 683 *ммк*.

Обсуждение

Низкотемпературная флуоресценция листьев, хлоропластов и гомогенатов. Измерение спектров красной полосы флуоресценции листьев, хлоропластов и гомогенатов при температуре жидкого азота, проведенное в данной работе, подтвердило существование нескольких флуоресцирующих форм хлорофилла. На всех рисунках видна сложная структура максимумов, сходных по положению у листьев разных видов растений, хлоропластов и гомогенатов и различающихся лишь относительной высотой. Можно полагать, что имеется несколько определенных типов упаковки молекул хлорофилла в агрегированных формах, ответственных за эти максимумы флуоресценции, по положению одинаковые для большинства видов растений. Высота отдельных максимумов может определяться видовыми различиями [7].

Спектральные свойства хлорофиллида в листьях и их препаратах. Полученные данные не дают определенного ответа на вопрос о флуоресценции хлорофиллида in vivo. Можно лишь утверждать, что хлорофиллид, образованный в гомогенатах листьев свеклы и, по-видимому, фасоли обладает флуоресценцией около 683 *ммк*. Большая часть хлорофиллида, образующегося в хлоропластах, обладает более длинноволновой флуоресценцией. Сравнительное возрастание в хлоропластах свеклы флуоресценции в области 695 *ммк* позволяет предполагать, что этот максимум также обусловлен образующимся хлорофиллидом. В гомогенатах свеклы происходит изменение состояния пигментов и образуется коротковолновая форма хлорофиллида с максимумом 683—685 *ммк*. Это яв-

ление сходно с наблюдавшимся нами ранее смещением максимумов низкотемпературной флуоресценции протохлорофиллида и хлорофиллида в коротковолновую сторону в результате приготовления гомогенатов из этиолированных и зеленеющих листьев [15]. Изменение относительной высоты максимумов флуоресценции в хлоропластах и гомогенатах по сравнению с листом, по-видимому, может усиливаться в результате частичного фракционирования форм пигментов при центрифугировании, что показано пока только для хлорофиллида [15, 16].

Можно полагать, таким образом, что и в зеленых листьях хлорофиллид обладает флуоресценцией около 695 *ммк*. Смещение может объясняться частичной реабсорбцией.

По-видимому, хлорофиллид в листьях и препаратах листьев присутствует в разных формах, частично совпадающих по спектральным свойствам с хлорофиллом. Спектральные свойства разных пигментов могут совпадать или различаться в зависимости от состояния пигмента. Так, протохлорофиллид в этиолированных листьях обладает максимумом поглощения при 645 *ммк*, в гомогенате — при 630 *ммк* [15], протохлорофилл — в листе 630 *ммк*, в оболочках семян тыквенных — 645 *ммк* [21]. Новообразованный хлорофилл *а* имеет максимум поглощения 672 *ммк*, однако на ранних стадиях зеленения этиолированных проростков при содержании хлорофилла до 60% в спектре поглощения виден один максимум, расположенный при 686 *ммк*, по положению совпадающий с максимумом хлорофиллида [15].

Можно думать, что спектральные свойства фитольных и бесфитольных пигментов в листьях определяются ориентацией и характером связи молекул в пигмент-белковом комплексе.

Влияние растворителей. Результаты наших опытов подтверждают вывод о сходстве спектральных свойств хлорофилла и хлорофиллида, так как не было обнаружено максимумов флуоресценции, которые можно было бы с полной определенностью приписать только хлорофиллиду.

Изложенные в работе факты хорошо согласуются с представлением о двух стадиях изменения свойств и состояния пигментов при добавлении растворителей [8, 9]. Постепенное «расшатывание» структуры пигмент-белкового комплекса завершается отрывом пигмента от белковой структуры и образованием коллоидных частиц пигмента. Специфичность действия зависит от природы растворителя. Растворители, в которых пигменты хорошо растворимы — пиридин, ацетон, вызывают на первой стадии постепенную интенсификацию коротковолнового максимума флуоресценции (совпадает по положению с флуоресценцией пигмента в данном растворителе), связанную, по-видимому, с постепенным нарушением упорядоченности пигмента в ламеллах хлоропластов и, возможно, отрывом пигмента от белкового носителя, но без перехода в растворенное состояние. Коллоидные частицы, образующиеся из пиридина и ацетона, не отличаются высокой упорядоченностью, так как в спектре флуоресценции при —196° наблюдаются лишь невысокие максимумы в длинноволновой области при 703 и 718 *ммк*, характеризующие вторичную упорядоченность молекул пигмента.

В тех случаях, когда имеется тенденция к образованию пигмент-пигментных комплексов, по-видимому, содержащих молекулы растворителя (в наших опытах диоксан), после частичной дезагрегации, связанной с нарушением нативного состояния пигмента, происходит вторичное образование упорядоченных агрегированных частиц, по спектру низкотемпературной флуоресценции совпадающих с коллоидными микрокристаллическими частицами из диоксана, и обладающих максимумами 703, 718 *ммк* и небольшими максимумами при 672 и 765 *ммк*.

Изменения флуоресценции при освещении интенсивным красным светом. Опыты показали, что скорость изменения отдельных максимумов флуоресценции различны. Это свидетельствует о различиях в свойствах

пигментных форм — «мономерные» отличаются фотолабильностью, агрегированные — более устойчивы к освещению. Выцветанию длинноволновых форм, по-видимому, предшествует процесс предварительной дезагрегации. Именно отсутствием или нарушением процесса дезагрегации можно объяснить меньшее понижение флуоресценции при освещении гомогенатов по сравнению с хлоропластами, уменьшение или отсутствие изменений флуоресценции у освещаемых хлоропластов и гомогенатов, содержащих низкие концентрации растворителей.

Коротковолновый максимум флуоресценции при —196° на стадии образования коллоидного состояния пигмента по положению соответствует хлорофиллу в органических растворителях, однако он более устойчив к выцветанию, чем в случае раствора. В ряде случаев этот максимум отличался крайней стабильностью, например при добавлении пиридина к гомогенатам листьев фасоли. По-видимому, при низких концентрациях растворителей коротковолновый максимум отражает флуоресценцию не «мономерных», а начально агрегированных (димерных?) форм пигментов.

В последнее время уделяется внимание изучению быстро выцветающей формы пигмента, открытой Коком [22], обладающей максимумом поглощения 700 *ммк*. В данной работе наблюдалось образование формы пигмента с низкотемпературной флуоресценцией около 703 *ммк* при хранении хлоропластов в гипотонической среде и при добавлении растворителей. Обращает на себя внимание тот факт, что фотохимические свойства этой формы различны в зависимости от способа получения. В набухающих хлоропластах форма «703» была светоустойчивой. При «диоксановой обработке» хлоропластов, в результате которой большая часть пигментов присутствует в форме «703», этот максимум был наиболее чувствительным к освещению.

Выводы

1. Проведено сравнительное изучение спектров флуоресценции при —196° листьев, хлоропластов и гомогенатов. В процессе хранения хлоропластов листьев фасоли наблюдалось возрастание флуоресценции при 703 *ммк*; в гомогенатах листьев сахарной свеклы увеличивался максимум при 684 *ммк*.

2. В отличие от хлоропластов и гомогенатов листьев фасоли, препараты из листьев сахарной свеклы обладали высокой хлорофиллазной активностью и поэтому рост максимума флуоресценции при 684 *ммк* следует приписать образующемуся хлорофиллиду.

3. Изучено действие растворителей — диоксана, ацетона и пиридина — вызывающее большие изменения спектров флуоресценции, связанные с изменением состояния пигментов. Начальные изменения связаны с дезагрегацией пигмент-белкового комплекса, затем происходит вторичная агрегация с образованием квазикристаллических форм и при концентрациях растворителя, превышающих 50%,— переход пигмента в раствор.

4. Исследование выцветания пигментов показало, что в хлоропластах и гомогенатах листьев вначале разрушаются наиболее коротковолновые формы; дальнейшее освещение приводит к выцветанию длинноволновых форм, протекающему, по-видимому, через стадию образования дезагрегированных форм пигментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **85**, 177, 1952.
2. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **91**, 343, 1953.
3. French C. S., Brookhaven Symp. Biol., **11**, 65, 1958.
4. Brown J. S., French C. S., Plant. Physiol., **34**, 305, 1959.

5. Рабинович Е., Тр. V Междунар. биохим. конгресса. Симп. VI, стр. 21, Изд. АН СССР, М., 1962.
6. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР, **135**, 1528, 1960.
7. Литвин Ф. Ф., Рихирева Г. Т., Красновский А. А., Биофизика, **7**, 578, 1962.
8. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А., Биохимия, **18**, 340, 1953.
9. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биохимия, **31**, 573, 1966.
10. Thomas J. B., Flight W. F. G., Biochim. et biophys. acta, **79**, 490, 1964.
11. Thomas J. B., Vander Wal U. P., Biochim. et biophys. acta, **79**, 500, 1964.
12. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **120**, 764, 1958.
13. Brody S. S., Science, **128**, 838, 1958.
14. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика, **4**, 392, 1961.
15. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А., Биохимия, **28**, 524, 1963.
16. Воробьев Л. М., Красновский А. А., Физиол. растений, **13**, 929, 1966.
17. Brody S. S., Brody M., Levine J. H., Biochim. et biophys. acta, **94**, 310, 1965.
18. Бергман Л., «Ультразвук и его применение в науке и технике». ИЛ, М., 1956.
19. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР, **95**, 611, 1954.
20. Кок Б., Тр. V Междунар. биохим. конгресса. Симп. VI, стр. 76. Изд-во АН СССР, М., 1962.
21. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А., Биохимия, **19**, 37, 1954.
22. Кок В., Biochim. et biophys. acta, **22**, 399, 1956.

Поступила в редакцию
13.VI.1966

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 1 1967 Вып. 3

УДК 581.132

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В РАСТВОРАХ И В ХЛОРОПЛАСТАХ

Н. Н. ДРОЗДОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследование тушения флуоресценции хлорофилла и его аналогов связано с выяснением участия возбужденных состояний пигментов в первичных реакциях фотосинтеза. Изучению этого вопроса посвящено большое количество работ.

Тушение флуоресценции хлорофилла кислородом наблюдали Каутский [1], Франк и Леви [2], Вейль-Мальерб и Вейс [3]. Измерения тушения флуоресценции хлорофилла и фталоцианина магния в нашей лаборатории [4] веществами, обладающими различным сродством к электрону, показали, что молекулы-окислители (хинон, кислород) сильно тушат флуоресценцию в отличие от восстановителей (аскорбиновая кислота, гидрохинон, иодистый калий). Ливингстон и Ки [5] провели систематическое исследование тушения флуоресценции хлорофилла в растворе рядом органических соединений и некоторыми газами и пришли к заключению, что хорошими тушителями являются окислители. Карякин и Шабля [6], исследуя тушение флуоресценции адсорбированного на силикагеле хлорофилла и некоторых его аналогов, показали, что этот процесс обратим и ослабление флуоресценции происходит равномерно по всему спектру испускания. Дилунг и Чернюк [7; 8] на примере тушения флуоресценции пигментов нитросоединениями и некоторыми восстановителями, показали зависимость степени тушения флуоресценции хлорофилла и его аналогов от величины окислительно-восстановительного потенциала тушителя и пигмента. Степень тушения тем сильнее, чем больше электроноакцепторная активность соответствующих тушителей. Эти авторы нашли также, что введение донора электрона в раствор пигмента усиливает степень тушения флуоресценции хлорофилла и феофитина ароматическими соединениями и связывают этот эффект со смещением электронной плотности от электронодонорных веществ к пигменту, что обеспечивает в дальнейшем перенос электрона в акте тушения. Шахвердов и Теренин [9], исследуя тушение флуоресценции фталоцианина магния также показали, что тушители с большим сродством к электрону оказывают большее тушащее действие.

В наших работах [10] установлено тушение флуоресценции хлорофилла, бактериохлорофилла, бактериовиридина, протохлорофилла и феофитина кислородом, различными хинонами, метилвиологеном и уменьшение степени тушения кислородом и п-бензохиноном в присутствии каротина. Тушение флуоресценции хлорофилла и его аналогов восстановителями незначительно [4; 5; 7—10]; наиболее детально изучено действие фенилгидразина в полярных и неполярных растворителях [11]. Эффект тушения флуоресценции пигментов связывают с обратимым «одноэлектронным» фотохимическим взаимодействием возбужденной молекулы пигмента с тушителем [12—14] или с переходом пигмента из его флуоресцентного состояния в нижнее триплетное с одновременным переходом тушителя из основного состояния в нижнее триплетное [15].

Тушение флуоресценции хлорофилла наблюдали не только в растворах, но и в хлоропластах. Шио и Франк [16] в опытах с интактными и разрушенными хлоропластами показали уменьшение интенсивности флуоресценции при добавлении хинона и при подщелачивании суспензии. В работе Арнона [17] было установлено тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах кофакторами фосфорилирования — менадионом и феназином, а также ферредоксином. Следует отметить, однако, что феназин слабо тушит флуоресценцию растворенного хлорофилла. Тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах метилвиологеном и кислородом показано в одной из наших работ [10].

Целью настоящего исследования явилось изучение тушения флуоресценции тетрапиррольных пигментов в растворах и в хлоропластах, уста-

новление связи между структурой аналогов хлорофилла, их фотохимическими свойствами и эффектом тушения, изучение влияния температуры, кислотности и вязкости среды на эффект тушения, а также зависимости степени тушения от величины окислительно-восстановительного потенциала тушителя. Представляло интерес выяснить влияние каротина и некоторых других соединений, тормозящих фотохимические реакции хлорофилла, на степень тушения флуоресценции последнего окислителями и восстановителями.

МЕТОДИКА

В работе были использованы хлорофилл *а* и *в*, бактериовиридин, бактериохлорофилл и протохлорофилл, выделенные обычными методами с конечной хроматографией на сахарозе. Феофин *а* получили из хлорофилла *а* по методу Фишера и Штерна. Тушителями флуоресценции служили кислород, различные хиноны, фотохимическое взаимодействие которых с хлорофиллом и его аналогами изучалось в предыдущих работах [18; 19], метилвиологен, фенилгидразин и некоторые другие восстановители. В качестве растворителей использовали перегнанные ацетон (х. ч.), пиридин (чистый, содержащий до 0,2% воды), этиловый спирт (ректификат).

Люминесценцию возбуждали желтыми и зелеными (578 и 546 *ммк*) линиями ртути с использованием светофильтров ЖС-18 и СЗС-21 при постоянном режиме работы ртутной лампы СВД-120, контролируемом амперметром (осветитель ОИ-18). Пучок света фокусировали на трубку с опытной смесью, помещенную в специальную приставку для измерения флуоресценции, присоединенную к спектрофотометру СФ-4. Интенсивность люминесценции регистрировалась фотоэлементом спектрофотометра, перед которым устанавливались светофильтры: в случае хлорофилла *а* и *в*, бактериовиридина и феофитина *а* — КС-15, в случае протохлорофилла — КС-14, при измерении люминесценции пиридинового раствора бактериохлорофилла — КС-19 и ацетонового раствора — интерференционный светофильтр с максимумом пропускания — 775 *ммк*. Скрещенность светофильтров в условиях опыта проверялась и всегда была удовлетворительной. Измерения проводили с использованием отсчетной системы спектрофотометра. Измерения флуоресценции проводили в вакуумных трубках Тунберга. Сначала определяли интенсивность флуоресценции раствора исследуемого пигмента, а затем — того же раствора в присутствии тушителя (следили за тем, чтобы при введении тушителя не происходило изменения концентрации пигмента). Степень тушения выражалась отношением начальной интенсивности флуоресценции раствора пигмента ($Ф_0$) к интенсивности в присутствии тушителя (Ф). Для проведения опытов при низкой температуре применяли охладительную смесь (этиловый спирт с твердой угольной кислотой) и жидкий азот. Во всех опытах регистрировали оптическую плотность в максимуме поглощения пигмента до и после введения тушителя. Для измерения применяли растворы пигментов с оптической плотностью в красном максимуме поглощения от 0,6 до 0,9, что соответствует концентрации около $1 \cdot 10^{-5}$ *М*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Тушение флуоресценции пигментов в растворах

Кислород. В трубку Тунберга вводили требуемое количество эфирного раствора пигмента, снятого с хроматограммы, эфир удаляли испарением в вакууме. Приливали 6 *мл* растворителя, в котором вели измерения, эвакуировали при сильном взбалтывании (с охлаждением до —150° в случае ацетона) с испарением растворителя до определенного объема (5 *мл*). Измеряли начальную интенсивность флуоресценции в вакууме ($Ф_0$), пускали воздух, измеряли величину флуоресценции в присутствии воздуха ($Ф_в$), пропускали через раствор кислород и опять производили измерение флуоресценции ($Ф_к$).

Из данных табл. 1 видно, что в пиридиновом растворе тушение флуоресценции всех пигментов меньше, чем в ацетоне, что может быть связано с меньшей растворимостью кислорода в пиридине [14].

Повышенное тушение флуоресценции и феофитина по сравнению с хлорофиллом в ацетоне находится в согласии с данными Ливингстона [20], который наблюдал более сильное тушение флуоресценции мезо- и протопорфиринов кислородом, чем хлорофиллов. Возможно, что отсутствие магния в молекуле пигмента облегчает подход молекулы кислорода к системе сопряженных двойных связей. Откачивание кислорода

приводило к практически полному возвращению начальной интенсивности флуоресценции пигментов в вакууме. В присутствии кислорода оптическая плотность (D) в «красном» максимуме практически не изменялась.

Далее мы изучали влияние температуры и вязкости среды на эффект тушения флуоресценции кислородом. Для этого измеряли флуоресценцию растворов пигментов в разных растворителях в вакууме при температуре +20 и —70° (спирт, спирт+глицерин, ацетон) и при —55° (пиридин), пропускали через раствор кислород при +20° и опять измеряли флуоресценцию при соответствующей температуре. В табл. 2 приведены результаты этих опытов.

Таблица 1

Тушение флуоресценции растворов пигментов кислородом

Приведены средние значения из 4—5 опытов

Пигмент	Ацетон		Пиридин	
	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$
Хлорофилл *a*	1,07	1,30	1,07	1,23
Хлорофилл *b*	1,08	1,35	1,06	1,21
Феофитин *a*	1,11	1,58	1,02	1,18
Протохлорофилл	1,09	1,42	1,03	1,19
Бактериохлорофилл	1,07	1,33	1,03	1,15
Бактериовиридин	1,12	1,67	1,06	1,21

Из данных табл. 2 видно, что тушение флуоресценции пигментов кислородом сильно зависит от температуры. Понижение температуры до —70° приводит практически к полному прекращению эффекта тушения. Возвращение интенсивности флуоресценции пигментов к первоначальной величине при откачивании кислорода и данные табл. 2 указывают, что тушение флуоресценции кислородом не сопровождается образованием стабильного продукта присоединения — фотооксида, а ограничивается преходящим взаимодействием возбужденной молекулы пигмента с кислородом.

Таблица 2

Влияние температуры и вязкости среды на эффект тушения хлорофилла *a* и феофитина *a* кислородом

Приведены значения $\Phi_0/\Phi_к$

Растворитель	Хлорофилл *a*		Феофитин *a*	
	+20°	—70°	+20°	—70°
Спирт	1,21	1,03	1,40	1,07
Спирт + глицерин (1:1)	1,21	1,02	—	—
Ацетон	1,35	1,15	—	—
Пиридин	1,25	1,04	1,2	1,05

Тушение флуоресценции кислородом при разных значениях pH измеряли в ацетоне с 10%-ным содержанием воды. Изменение кислотности достигали прибавлением к растворителю разных количеств HCl и NaOH (pH изменяли примерно от 3 до 10). Показано, что величина тушения флуоресценции хлорофилла *a* кислородом (в пределах от 3 до 10) не зависит от pH среды; во всех случаях величина $\Phi_0/\Phi_к$ лежала в пределах $1{,}2 \pm 0{,}06$.

Для выяснения связи эффекта тушения флуоресценции пигментов кислородом с фотохимическим окислением растворы хлорофилла *a* и феофитина *a* освещали красным светом (светофильтр КС-13) после пропускания через них кислорода в течение 3 мин. Опыты проводили со спиртовыми и спирто-глицериновыми (1 : 1) растворами при +20° и —70°. На рис. 1 приведены результаты опытов, из которых следует, что нет корреляции между величиной тушения флуоресценции и фотохимическим окислением пигментов. Так, например, в опытах с феофитином *a* тушение флуоресценции кислородом сильнее, чем в опытах с хлорофиллом *a*; а величина флуоресценции при освещении растворов остается неизменной. Еще нагляднее это видно в опыте с хлорофиллом *a* в спирто-глицериновом растворе (рис. 1, *Б*), где наблюдается слабое тушение флуоресценции при —70° и резкое уменьшение ее при освещении, объясняющееся быстрым фотоокислением пигмента в этих условиях [18].

Хиноны. Опыты по тушению флуоресценции хинонами проводили без откачивания воздуха, так как ранее [10] нами было показано, что присутствие воздуха, в пределах ошибки измерения, не влияет на эффект тушения хинонами. Исследовали действие *n*-бензохинона в ацетоне и в пиридине.

Таблица 3

Концентрации *n*-бензохинона при «половинном» тушении флуоресценции пигментов в ацетоне и пиридине

Пигмент	Ацетон, *M*	Пиридин, *M*	Пигмент	Ацетон, *M*	Пиридин, *M*
Бактериовиридин	0,0080	0,0138	Фесфитин *a*	0,0138	0,0210
Хлорофилл *a*	0,0090	0,0120	Протохлорофилл	0,0182	—
Хлорофилл *b*	0,0120	0,0200	Бактериохлорофилл	0,0145	0,0260

В табл. 3 приведены значения концентрации *n*-бензохинона, соответствующие «половинному» тушению флуоресценции исследованных пигментов. Тушение в пиридине всех пигментов требует соответственно более высокой концентрации тушителя. Исключение представляет протохлорофилл, в пиридиновом растворе которого наблюдается сильное тушение флуоресценции хиноном, сопровождающееся изменением спектра поглощения.

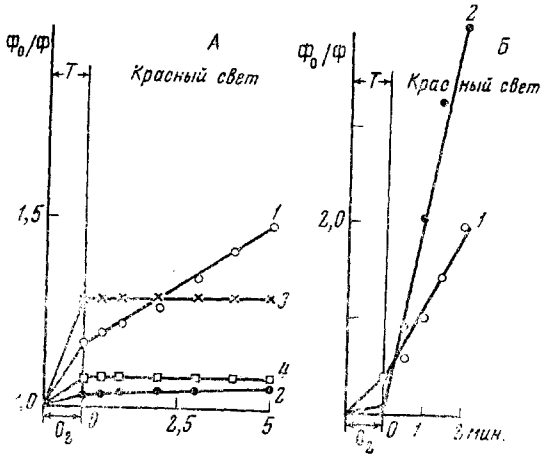


Рис. 1. Изменение флуоресценции хлорофилла *a* и феофитина *a* при освещении красным светом после пропускания кислорода

A — хлорофилл *a* (*1, 2*) и феофитин *a* (*3, 4*) в спиртовом растворе. *1, 3* — +20°; *2, 4* — 70°. *Б* — хлорофилл *a* в спирто-глицериновом растворе, *1* — +20°, *2* — —70°. *T* — темнота

Тушение флуоресценции в ацетоне и пиридине нельзя приписать изменению концентрации пигментов в результате необратимой фотохимической реакции с тушителем, так как за время опыта практически не изменяется оптическая плотность в максимуме поглощения. На рис. 2 показана зависимость тушения флуоресценции пигментов от концентрации *n*-бензохинона. Наиболее сильно тушится люминесценция хлорофилла *a* и бактериовиридина и менее сильно — феофитина и бактериохлорофилла. Изучение фотохимического взаимодействия пигментов с *n*-бензохиноном в наших предыдущих работах [18; 19] показало, что наиболее глубоко реакция шла с бактериальными пигментами и практически отсутствовала с феофитином. Эти данные не согласуются с измеренной величиной тушения флуоресценции хиноном. Так, тушение нереагирующего феофитина мало отличается от тушения активно реагирующего с хиноном бактериохлорофилла.

На рис. 3 приведены результаты опытов тушения флуоресценции хлорофилла *a* разными хинонами. Использованы *n*-бензохинон, как наиболее сильный окислитель, 2,3-диметокси-5-метилбензохинон, 2-метил-1,4-нафтохинон и антрахинон. Тушение флуоресценции этими соединениями подчиняется линейной зависимости Штерна-Фольмара ($\Phi_0/\Phi = 1 + KC$; где K — постоянная тушения, C — концентрация тушителя).

Следует отметить, что тушение флуоресценции хлорофилла *а* перечисленными хинонами качественно соответствует фотореакции хлорофилла [18; 19]; так, реакция обратимого фотоокисления хлорофилла *а* идет

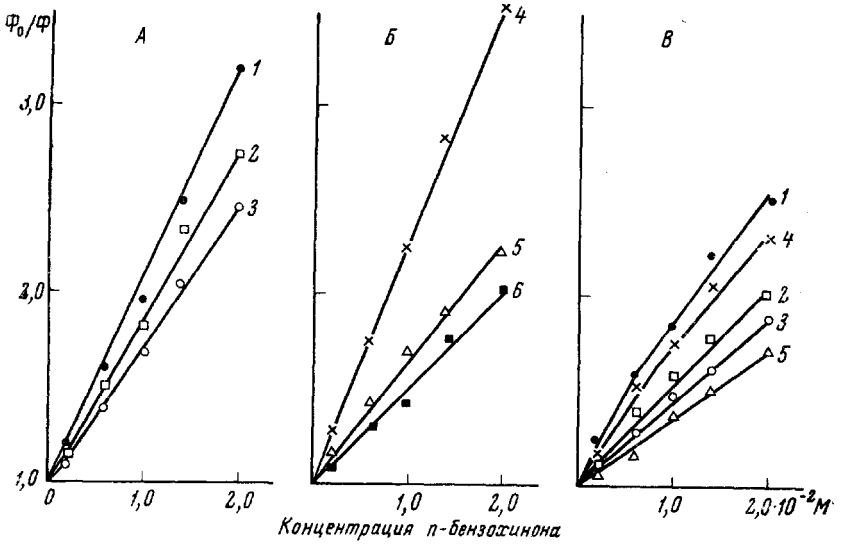


Рис. 2. Тушение флуоресценции пигментов *п*-бензохиноном в ацетоне (*А*, *Б*) и в пиридине (*В*)

Цифры в скобках — изменение оптической плотности, выраженное отношением *D* после опыта к начальной *D*; первая цифра для ацетона, вторая — для пиридина. *1* — хлорофилл *а* (1,0; 1,0); *2* — хлорофилл *b* (0,98; 0,92), *3* — феофитин *а* (1,0; 1,0); *4* — бактериовиридин (0,89; 0,97); *5* — бактериохлорофилл (0,97; 0,93); *6* — протохлорофилл (0,96)

наиболее глубоко с *п*-бензохиноном и практически не идет с антрахиноном. Опыты с 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном проводили в ацетоне, так как при добавлении к раствору пигмента в пиридине небольшого количества этого хинона происходит сильное падение интенсивности красной флуоресценции, сопровождающееся изменением оптической плотности хлорофилла. По-видимому, в этих условиях имеет место фотохимическая реакция между молекулами пигмента и тушителя.

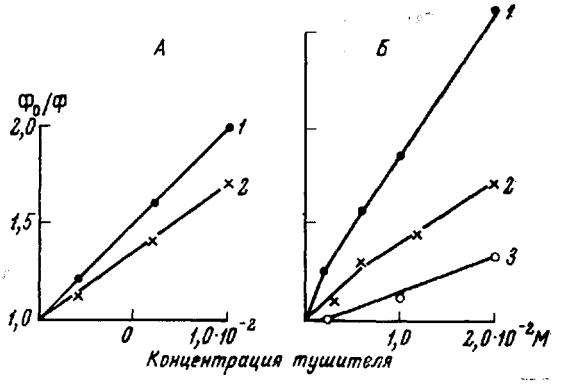


Рис. 3. Тушение флуоресценции хлорофилла *а* разными хинонами в ацетоне (*А*) и в пиридине (*Б*)

А: *1* — *п*-бензохинон; *2* —2,3-диметокси-5-метилбензохинон. *Б*: *1* — *п*-бензохинон; *2* — 2-метил-1,4-нафтохинон; *3* — антрахинон

Зависимость степени тушения от вязкости среды показана в опытах по сравнительному тушению флуоресценции хлорофилла *а* *п*-бензохиноном и менадионом при разных температурах (+20° и —70°) в спиртовом и спирто-глицериновом растворах. На рис. 4 приведены результаты опытов, показывающие, что при увеличении вязкости путем добавления глицерина или понижения температуры до —70° происходит уменьшение степени тушения флуоресценции хлорофилла *а*, объясняющееся тем, что с увеличением вязкости затрудняется диффузия и уменьшается число столкновений возбужденных

молекул пигмента с молекулами тушителя. Однако в опытах с менадионом в спиртовом растворе при —70° наблюдали увеличение эффекта тушения флуоресценции хлорофилла *а*, что свидетельствует о возможном образовании комплекса пигмента с тушителем.

Тушение флуоресценции хлорофилла *а* *п*-бензохиноном и менадионом при разных значениях pH измеряли в спирте, ацетоне и пиридине.

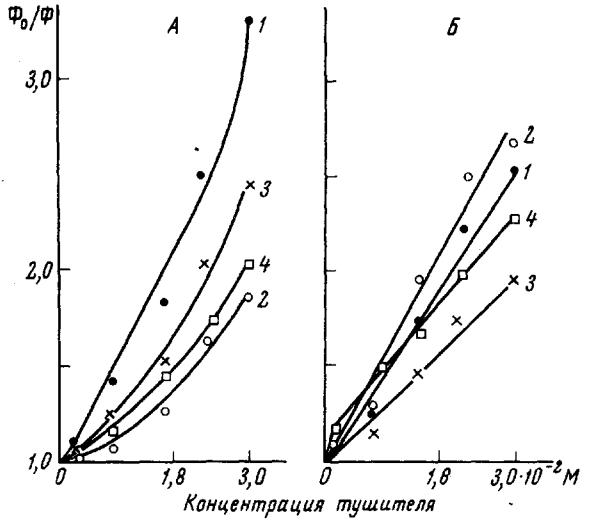


Рис. 4. Тушение флуоресценции хлорофилла *а* *п*-бензохиноном (*А*) и менадионом (*Б*) при разных температурах

1, 2 — спиртовые растворы; *3, 4* — спирто-глицериновые; *1, 3* — +20°; *2, 4* — —70°

Для каждого растворителя степень тушения Φ_0/Φ не зависит от величины pH. Так, например, при изменении pH от 3 до 10 Φ_0/Φ меняется в пределах ошибки измерения ±0,06. Во всех случаях степень тушения флуоресценции хлорофилла *а* менадионом была несколько меньше по сравнению с хиноном.

Метилвиологен. Исследовали тушение флуоресценции хлорофилла *а* и его аналогов метилвиологеном, обладающим наиболее «отрицательной» величиной окислительно-восстановительного потенциала, близкой к водородному электроду ($E_0^1 = -0{,}446$ *в*). Измерения проводили в трубке Тунберга в вакууме при 20° со спиртовыми растворами пигментов. Опыты показали, что метилвиологен тушит флуоресценцию хлорофилла *а* с эффективностью, близкой хинону, несмотря на большую разницу в величине редокс-потенциала этих тушителей. Плохая растворимость метилвиологена в пиридине не позволила использовать весь ряд концентраций; незначительный эффект тушения флуоресценции хлорофилла *а* наблюдался лишь при $4 \cdot 10^{-3}$ *М*. Флуоресценция феофитина практически не тушится метилвиологеном, что соответствует большой устойчивости феофитина к фотоокислению. По той же причине флуоресценция хлорофилла *b* тушится слабее, чем у хлорофилла *а* (рис. 5, *А*). Однако легко окисляющийся бактериохлорофилл тушится метилвиологеном менее эффективно, чем хлорофилл *а*, что можно связать с более низким возбужденным уровнем бактериохлорофилла (максимум поглощения этого пигмента в растворе более, чем на 100 *ммк* сдвинут в длинноволновую область по сравнению с хлорофиллом *а*). Своеобразно поведение бактериовиридина. Введение начального количества метилвиологена вело не к тушению, а к возгоранию флуоресценции; увеличение концентрации тушителя вело к «обычному» тушению, однако эффективность этого про-

цесса была более низкой, чем у хлорофилла *а* (рис. 5, *Б*), хотя бактериовиридин легче окисляется кислородом, чем хлорофилл *а*. Это явление может быть объяснено следующим образом: бактериовиридин (более склонный к агрегации, чем хлорофилл [21]) находится в спиртовом растворе частично в агрегированной форме; введение метилвиологена вначале ведет к дезагрегации и, следовательно, к усилению флуоресценции; далее происходит тушение флуоресценции «мономерной» формы пигмента.

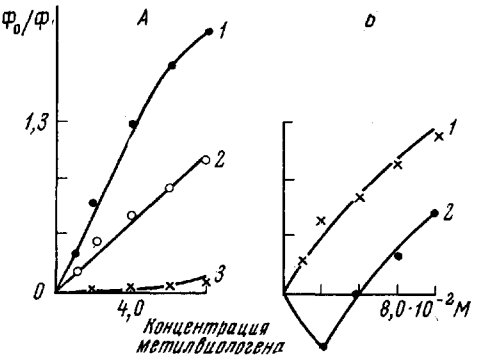


Рис. 5. Тушение флуоресценции пигментов метилвиологеном в этиловом спирте
А: 1 — хлорофилл а; 2 — хлорофилл b. Б: 1 — бактериохлорофилл; 2 — бактериовиридин

Восстановители. Исследовали действие аскорбиновой кислоты, гидрохинона, тиомочевины и фенилгидразина. Все перечисленные восстановители за исключением фенилгидразина практически не тушат флуоресценцию хлорофилла *а* в концентрации от $1\cdot10^{-2}$ до $5\cdot10^{-2}$ *М* в пиридине и в ацетоне. Тушение флуоресценции фенилгидразином измеряли в ацетоновых растворах. Сравнивали тушение флуоресценции хлорофилла *а* и феофитина *а*. Фенилгидразин добавляли из головки трубки Тунберга после удаления из раствора растворенного воздуха. Концентрацию фенилгидразина в опытах доводили до $7{,}2\cdot10^{-1}$ *М*. Мы подтвердили данные Дилунга и Чернюк [7] о том, что фенилгидразин сильнее тушит флуоресценцию феофитина, чем хлорофилла.

Таблица 4

Влияние восстановителей на тушение флуоресценции хлорофилла кислородом в пиридине

Здесь и в табл. 5 величина тушения выражена отношением Φ_0/Φ_K

Восстановитель	Концентрация восстановителя, *М*			
	$1\cdot10^{-2}$	$3\cdot10^{-2}$	$5\cdot10^{-2}$	без восстановителя
Аскорбиновая кислота	1,21	1,12	1,10	1,23
Тиомочевина	1,17	1,17	1,17	1,23
Гидрохинон	1,17	1,16	1,16	1,23

Таблица 5

Тушение флуоресценции хлорофилла *а* *п*-бензохиноном ($1\cdot10^{-2}$ *М*) в присутствии восстановителей в пиридине

Восстановитель	Концентрация восстановителя, *М*			
	$1\cdot10^{-2}$	$3\cdot10^{-2}$	$5\cdot10^{-2}$	без восстановителя
Аскорбиновая кислота	1,39	1,07	1,03	1,61
Тиомочевина	1,62	1,61	1,62	1,62
Гидрохинон	1,61	1,62	1,59	1,61

Влияние восстановителей на тушение флуоресценции окислителями. Изучали действие аскорбиновой кислоты, гидрохинона и тиомочевины на эффект тушения флуоресценции кислородом и *п*-бензохиноном. Проводили тушение флуоресценции кислородом и хиноном на фоне разных количеств выше перечисленных соединений. Результаты приведены в табл. 4 и 5.

Из данных табл. 4 видно, что большие количества восстановителя несколько уменьшают эффект тушения флуоресценции кислородом. Интересно отметить, что действие кислорода в присутствии аскорбиновой кислоты сказывалось только в первые минуты после пропускания, затем происходило увеличение интенсивности флуоресценции до первоначальной величины. Это явление, по-видимому, связано с удалением кислорода из среды за счет сенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты.

Полученные результаты показывают, что изученные восстановители практически не влияет на величину тушения флуоресценции хлорофилла *a* *n*-бензохиноном. Уменьшение эффекта тушения в присутствии аскорбиновой кислоты, по-видимому, можно объяснить изменением концентрации хинона за счет темновой реакции с образованием гидрохинона, который не тушит флуоресценцию.

Влияние каротина на эффект тушения. Исследования сводились к измерению интенсивности флуоресценции в присутствии тушителя и разных количеств каротина. Ранее мы показали, что каротин не тушит флуоресценцию хлорофилла [22]. Тушителями флуоресценции служили в опытах с хлорофиллом *a* — кислород и *n*-бензохинон, а в опытах с феофитином — фенилгидразин. Чтобы исключить экранирующее действие «хвоста» поглощения каротина в области возбуждения, начальную флуоресценцию измеряли в опыте с каротином, после чего вводили тушитель. Результаты этих опытов показали, что в присутствии каротина уменьшается эффект тушения флуоресценции кислородом (табл. 6), хиноном (рис. 6) и феофитина *a* — фенилгидразином. Так, концентрация «половинного» тушения феофитина фенилгидразином в ацетоне составляет 0,45 *M*, а в присутствии $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ каротина — 0,63 *M*.

Таблица 6

Влияние каротина на тушение флуоресценции хлорофилла *a* кислородом

Концентрация каротина, *M*	Пиридин		Ацетон	
	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$	$\Phi_0/\Phi_в$	$\Phi_0/\Phi_к$
Без каротина	1,07	1,23	1,08	1,30
Каротин $1{,}5 \cdot 10^{-4}$	1,00	1,12	1,06	1,22
» $5{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,00	1,05	—	—

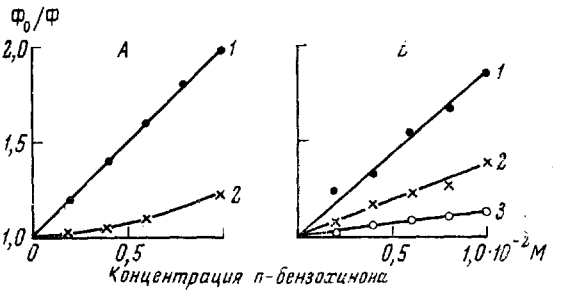


Рис. 6. Влияние каротина на тушение флуоресценции хлорофилла *a* *n*-бензохиноном в ацетоне (*А*) и в пиридине (*Б*)

А: *1* — контроль (хлорофилл *a* без каротина); *2* — $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ *M* каротин. *Б*: *1* — контроль; *2* — $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ *M* каротин; *3* — $5{,}0 \cdot 10^{-4}$ *M* каротин

Представляло интерес выяснить влияние других соединений, тормозящих фотохимические реакции хлорофилла и его аналогов, на величину тушения флуоресценции. Нами было показано, что феназин в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ *M* и акридин в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ *M* сильно тормозят фотовосстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой [22]. Однако эти соединения, так же как и каротин, не влияют на флуоресценцию, но в противоположность последнему не оказывают действия на эффект тушения кислородом и хиноном. Сафранин по данным Баннистра [23] в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ *M* полностью блокирует фотовосстановление, но уменьшает выход флуоресценции только на 20%. Следовательно, в опытах с этими соединениями не наблюдается параллелизма между торможением фотохимической реакции и тушением флуоресценции.

Тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах

Препараты хлоропластов выделяли из проростков гороха по методу [24]. Осадок центрифугированных «целых» хлоропластов суспендировали в буферном растворе и измеряли флуоресценцию при разных значениях pH. Измерение флуоресценции хлоропластов имеет специфику по сравнению с измерениями флуоресценции в растворах, так как интенсивность флуоресценции суспензии после приготовления непостоянна (особенно при кислых значениях pH), и требуется некоторое время

(10 мин.) для достижения стационарной величины, которую принимали за начальную интенсивность флуоресценции ($Ф_0$), после чего добавляли тушитель и опять производили измерение (Ф). Измеренная начальная флуоресценция хлоропластов увеличивается с переходом в кислую область. Добавление глицерина до 70% к суспензии хлоропластов мало влияет на величину интенсивности флуоресценции, при этом не только сохраняется их активность к выделению кислорода в реакции Хилла, но происходит даже некоторое увеличение ее.

Мы изучали зависимость тушения флуоресценции хлоропластов кислородом, хинонами, метилвиологеном и некоторыми восстановителями в зависимости от величины pH, температуры и вязкости среды.

Кислород. Тушение флуоресценции хлоропластов кислородом проводили при добавлении к суспензии 60% глицерина для того, чтобы сделать суспензию хлоропластов более стойкой. В опытах без добавления глицерина при пропускании кислорода или при откачивании воздуха из раствора происходит сильное уменьшение оптической плотности за счет коагуляции и оседания суспензии. За начальную величину принимали, интенсивность флуоресценции суспензии после трехминутного откачивания воздуха. Кислород пропускали из газометра в течение 1,5 мин. и следили за тем, чтобы ток газа был равномерным и не вспенивал сильно раствор. Опыты, проведенные при pH 7,3 и температуре 20°, показали, что величина тушения флуоресценции хлорофилла в хлоропластах воздухом и кислородом близка к величине тушения в растворах и равняется соответственно 1,07 и 1,25. Откачивание кислорода в большинстве опытов приводило к полному восстановлению начальной интенсивности флуоресценции в вакууме. Понижение температуры до —60° приводит к почти полному исчезновению эффекта тушения кислородом, что наблюдалось нами и для растворов хлорофилла.

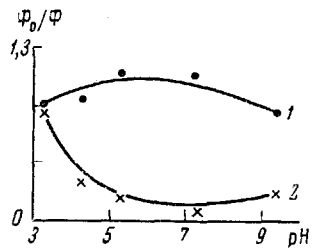


Рис. 7. Зависимость изменения величины $Ф_0/Ф$ от pH для хлоропластов при пропускании кислорода (*1*) и азота (*2*)

На рис. 7 приведены результаты опытов, показывающие зависимость величины тушения флуоресценции хлоропластов кислородом от кислотности среды. Чтобы убедиться в том, что наблюдаемые изменения интенсивности флуоресценции соответствуют «истинному» тушению кислородом, мы в контрольных опытах пропускали через раствор хлоропластов при тех же значениях pH азот, очищенный от следов кислорода. Как видно из хода кривых, тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах мало зависит от pH среды; пропускание азота сказывается на величине флуоресценции только в крайних точках исследуемой области pH, где, по-видимому, происходит коагуляция белков на границах раствор/газовый пузырь. Параллельно с измерениями флуоресценции проводили запись спектров поглощения исследуемых растворов в вакууме и после пропускания через раствор кислорода и азота. Существенно, что пропускание газа вызывает уменьшение оптической плотности по всему спектру поглощения, которое обратимо при удалении газа из раствора (рис. 8). Это интересное явление требует дальнейшего исследования.

Хиноны. Исследуемые хиноны добавляли к суспензии хлоропластов в спиртовом растворе (0,2 *мл*); предварительно было проверено, что прибавление такого количества спирта не влияет на величину начальной флуоресценции и на оптическую плотность растворов. Опыты проводили в трубках Тунберга без откачивания воздуха. На рис. 9 приведены результаты опытов по сравнению способности *n*-бензохинона, менадиона и 2,3-диметокси-5-метилбензохинона тушить флуоресценцию хлорофилла в хлоропластах. Тушение флуоресценции этими соединениями в данном

случае сильно отличается от их действия в растворах хлорофилла. Так, например, в растворах наибольшую активность проявляет *п*-бензохинон и слабую — менадион. В опытах с хлоропластами менадион сильно тушит флуоресценцию хлорофилла уже в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ *М*, *п*-бензохинон и 2,3-диметокси-5-метилбензохинон также более активны в этом

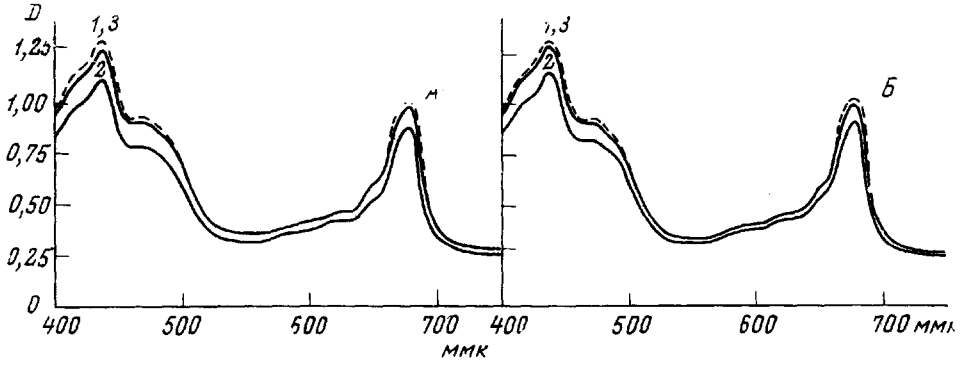


Рис. 8. Изменение спектра поглощения суспензии хлоропластов при пропускании кислорода (*А*) и азота (*Б*) при pH 5,8
1 — в вакууме; *2* — после пропускания газа; *3* — после удаления газа

случае, их действие начинает проявляться уже примерно в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ *М*. В этих опытах не наблюдалось изменения оптической плотности растворов после прибавления тушителя.

В следующей серии опытов мы исследовали зависимость степени тушения флуоресценции хлоропластов *п*-бензохиноном и менадионом от

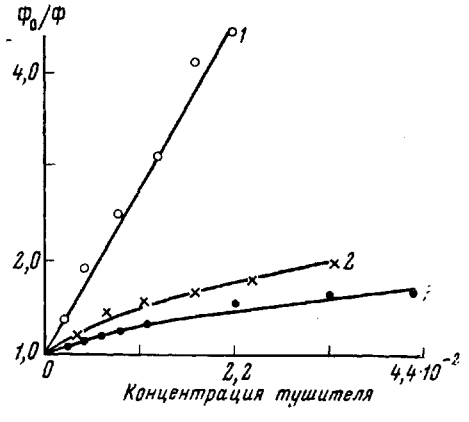


Рис. 9. Тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах разными хинонами
1 — менадион; *2* — *п*-бензохинон; *3* — 2,3-диметокси-5-метилбензохинон

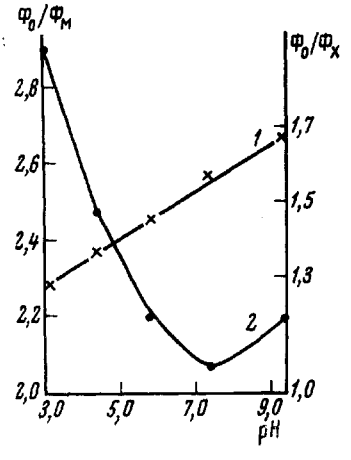


Рис. 10. Зависимость эффекта тушения флуоресценции хлоропластов хиноном (*1*) и менадионом (*2*) от pH

pH. Была исследована область pH от 3,0 до 9,4. Как видно из данных, представленных на рис. 10, эффективность действия менадиона сильно возрастает при кислых значениях pH, но у *п*-бензохинона, наоборот, тушение больше при щелочном pH. Возможно, этот эффект связан с различной проницаемостью оболочки хлоропластов для этих соединений.

Сравнительное изучение тушения флуоресценции хлоропластов менадионом и *п*-бензохиноном при разных температурах (+20, —60, —196°) (табл. 7) показало, что при понижении температуры происходит увели-

чение степени тушения флуоресценции в отличие от растворов, что объясняется, по-видимому, образованием комплекса между пигмент — белково-липоидным соединением и молекулами тушителя. Измерения флуоресценции при —196° проводили путем погружения трубки Тунберга с раствором в сосуд с жидким азотом; спектры флуоресценции регистри-

Таблица 7

Тушение флуоресценции хлорофилла в хлоропластах *n*-бензохиноном и менадионом при разных температурах

Даны величины Φ_0/Φ

Тушитель	+20°		−60°		−196°	
	без глицерина	с глицерином	без глицерина	с глицерином	без глицерина	с глицерином
$5 \cdot 10^{-4}$ Хинон	2,21	1,88	—	2,16	4,25	2,00
$1 \cdot 10^{-4}$ Менадион	3,52	2,21	—	4,80	12,10	4,20

ровали на записывающем приборе [25]. В этом случае степень тушения выражали отношением высоты максимума исходного раствора к высоте максимума после прибавления тушителя. Добавление к раствору хлоропластов 60% глицерина вызывает уменьшение эффекта тушения флуоресценции хлоропластов хинонами, что объясняется, по-видимому, увеличением вязкости, препятствующей диффузии и сближению молекул пигмента и тушителя. Можно предполагать, что увеличение тушения флуоресценции глицеринового раствора хлоропластов при понижении температуры вызвано стабилизацией уже образовавшегося комплекса.

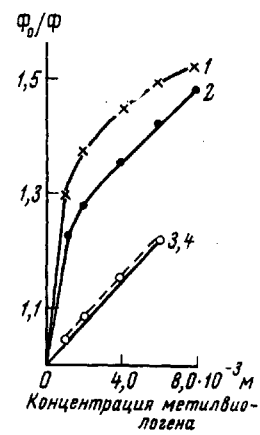


Рис. 11. Тушение флуоресценции хлоропластов (*2*) и их фрагментов (*1*) метилвиологеном

3 — контрольный опыт с хлоропластами; *4* — с фрагментами при той же процедуре опыта, но без введения метилвиологена

Метилвиологен добавляли к суспензии хлоропластов в буферном растворе. После введения виологена в суспензию растворенный воздух откачивали из трубки Тунберга. Измерения вели при комнатной температуре. На рис. 11 показана зависимость тушения флуоресценции в хлоропластах при pH 7,3 от концентрации метилвиологена в растворе. Тушение виологеном в хлоропластах гораздо эффективнее, чем в растворах. На рис. 11 показано также изменение флуоресценции в контрольных опытах, в которые добавляли 0,1 *мл* фосфатного буфера без метилвиологена и откачивали воздух. Эта процедура ведет к некоторому уменьшению флуоресценции хлоропластов.

Восстановители. Исследовали действие восстановителей в концентрации от $1 \cdot 10^{-2}$ до $5 \cdot 10^{-2}$ *M* при разных значениях pH суспензии хлоропластов. Тиомочевина, гидрохинон и цистеин практически не тушат флуоресценцию хлоропластов. Аскорбинат натрия обладает лишь слабым действием, не зависящим от pH раствора. С гидрохиноном наблюдался эффект тушения только при pH 9,4; эффект обратим при добавлении аскорбиновой кислоты, что говорит о том, что тушение, по-видимому, обусловлено хиноном, образующемся при окислении гидрохинона в щелочной среде.

Влияние восстановителей на тушение флуоресценции кислородом и хинонами. Аскорбинат натрия, тиомочевина и гидрохинон не влияют на величину тушения флуоресценции хлорофилла в хлоропластах кислородом. В опытах с менадионом исследовали действие аскорбината натрия, тиомочевины и цистеина. Первые два соединения не влияют на степень

тушения флуоресценции менадионом при разных значениях pH. Цистеин сильно увеличивает эффективность тушения менадионом и его действие наиболее выражено при нейтральном и щелочном pH (табл. 8).

В опытах с хиноном цистеин и аскорбинат натрия полностью снимали эффект тушения, по-видимому, за счет восстановления хинона этими соединениями. Тиомочевина не влияет на степень тушения флуоресценции хлоропластов хиноном при всех исследованных pH, но наблюдается некоторое различие в изменении интенсивности флуоресценции после стояния (3 мин.). При кислых значениях pH (3,0 и 4,4) наблюдается быстрое возвращение флуоресценции до первоначальной величины. При pH 5,8 интенсивность свечения не меняется; при pH 7,3 и 9,4 за это же время происходит увеличение степени тушения примерно в 1,5 раза. Таким образом, влияние восстановителя может быть связано с «темновым» или фотохимическим восстановлением хинона.

Таблица 8

Влияние восстановителей на тушение флуоресценции хлоропластов менадионом (Φ_0/Φ)

pH	Контроль	Аскорбинат натрия	Тиомочевина	Цистеин
3,0	2,90	2,90	2,90	2,50
4,4	2,47	2,40	2,40	1,71
5,8	2,20	2,15	2,20	1,74
7,3	2,07	2,01	2,00	1,20
9,4	2,20	2,10	2,20	1,07

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительное изучение тушения флуоресценции хлорофилла соединениями различной химической природы в растворах и в хлоропластах показало, что наряду с доминирующим сходством наблюдаются некоторые различия между эффектом тушения флуоресценции пигментов в растворах и в хлоропластах. Обратимое тушение люминесценции кислородом обнаруживается у всех аналогов хлорофилла как в растворах, так и в хлоропластах. Существенно, что в этом и другом случае эффект мало зависит от pH среды. Понижение температуры до —70° приводит к сильному уменьшению эффекта тушения в растворах и в хлоропластах, что свидетельствует о малой вероятности образования стабильного комплекса пигмента с молекулой кислорода; согласно Теренину [14], тушение флуоресценции кислородом может быть связано с парамагнитными свойствами молекулы кислорода, которая способствует переходу молекулы пигмента из возбужденного синглетного состояния в близлежащее триплетное состояние.

Исследование тушения флуоресценции пигментов хинонами и метилвиологеном указывает на отсутствие прямой связи между величиной окислительно-восстановительного потенциала тушителя и эффектом тушения. Тушение флуоресценции метилвиологеном ($E'_0 = -0{,}44$ *в*) в растворах такого же порядка, как и хиноном ($E'_0 = +0{,}36$), а в хлоропластах метилвиологен тушит флуоресценцию гораздо эффективнее, и его действие сопровождается насыщением. Тушение флуоресценции пигментов метилвиологеном указывает на возможность одноэлектронного взаимодействия хлорофилла с виологеном (вероятно, в комплексе с переносом заряда) подобно реакциям, более детально изученным в системе хлорофилл — хинон [19], в которой в основе тушения лежит элементарный акт фотопереноса электрона от донора — пигмента к акцептору — тушителю.

Исследование действия хинонов, различающихся величиной окислительно-восстановительного потенциала показало, что тушение флуоресценции хлорофилла этими соединениями в ацетоне и в пиридине связано с электроно-акцепторной способностью тушителя. Так, *п*-бензохинон, как наиболее сильный окислитель эффективнее тушит флуоресценцию хлорофилла по сравнению с другими хинонами, имеющими меньший по-

тенциал. В этих опытах наблюдался параллелизм между тушащим действием хинонов и глубиной фотореакции хлорофилла. В данном случае реакция хлорофилла с хинонами может идти с участием синглетных возбужденных состояний пигмента. В случае хлоропластов такой закономерности не наблюдалось; менадион, тушащий флуоресценцию хлорофилла в растворе слабее, чем бензохинон, в хлоропластах тушит флуоресценцию хлорофилла более активно.

В суспензии хлоропластов четко выражена зависимость величины тушения от кислотности среды, которая отсутствует в истинных растворах пигментов. Это явление следует связать с тем, что в хлоропластах хлорофилл, тушение флуоресценции которого мы наблюдаем, находится в связи с белками и липоидами, состояние которых находится в зависимости от концентрации водородных ионов; вероятно, вхождение молекулы тушителя в «контакт» с хлорофиллом в белково-липоидном комплексе зависит от pH. Нужно полагать, что в наших опытах мы наблюдали тушение флуоресценции «мономерного» хлорофилла, входящего в состав коротковолновой формы хлорофиллов, управляющих ветвью цепи фотосинтетического переноса электрона (фотохимическая система II).

Исследование тушения флуоресценции пигментов в растворах и хлорофилла в хлоропластах показало, что хорошими тушителями являются окислители; восстановители практически не тушат флуоресценцию. Влияние восстановителей на величину тушения флуоресценции хлорофилла окислителями в растворах и в суспензии хлоропластов также невелико.

Исследование влияния каротина и других соединений, тормозящих фотохимические реакции хлорофилла, на эффект тушения флуоресценции хлорофилла *a* в растворах показало, что только каротин уменьшает величину тушения флуоресценции кислородом, хинонами и фенилгидразином. Известно защитное действие каротина при реакциях фотоокисления, фотовосстановления [22; 26; 28] и фотофеофитинизации [29] хлорофилла в растворах. Элементарный механизм действия каротина в этих реакциях до сих пор не установлен с полной определенностью. Ливингстон и Фужимори [30], используя технику импульсной спектроскопии, показали возможность тушения каротином триплетного возбужденного состояния хлорофилла. Мы нашли, что каротин не тушит флуоресценцию хлорофилла, возбуждаемую красным светом [22], т. е. не реагирует с синглетным возбужденным состоянием хлорофилла; недавно Мурти и Рабинович [31] наблюдали тушение флуоресценции хлорофилла при возбуждении в «синем» максимуме поглощения хлорофилла. Механизм блокирующего действия каротина не ясен; эффект наблюдается с тушителями разной химической природы — кислородом, хиноном и фенилгидразином и поэтому трудно объясним образованием комплексов каротина с тушителем. В опытах Литвина и Гуляева [32] установлено образование комплексов хлорофилла с каротином в монослоях. Требует исследования вопрос о возможности образования комплекса каротина с хлорофиллом в растворе и дезактивация каротином триплетного состояния пигментов, возможно, образующегося в акте тушения флуоресценции.

Полученные результаты приводят к заключению, что следует искать корреляцию между эффектом тушения и первичным быстро обратимым процессом, а не сравнительно медленно идущими, более глубокими фотохимическими изменениями пигмента. Возможно, что наблюдаемый эффект включает различные типы тушения: «физический» и «химический».

ВЫВОДЫ

Проведено сравнительное исследование тушения флуоресценции хлорофилла в растворах и хлоропластах рядом акцепторов и доноров электрона. Тушение флуоресценции кислородом обратимо и наблюдается как в растворах, так и в хлоропластах. Этот эффект не зависит от структу-

ры пигмента, от его состояния и не связан со скоростью фотохимического окисления. Предполагаются «физический» механизм тушения и фотореакция кислорода с триплетным возбужденным состоянием пигмента.

Тушение флуоресценции хлорофилла и его аналогов хинонами и метилвиологеном в растворе указывает на отсутствие прямой связи между величиной окислительно-восстановительного потенциала и эффектом тушения, хотя в ряду химически сходных соединений (хиноны) такая связь наблюдается. При тушении флуоресценции аналогов хлорофилла кислородом и хинонами нет четкой связи между эффектом тушения и глубиной наблюдаемой фотохимической реакции.

Степень тушения кислородом и хинонами уменьшается при понижении температуры (от 20 до —70°), что связано с увеличением вязкости, препятствующей сближению молекул пигмента и тушителя.

Сравнительное исследование тушения флуоресценции хлорофилла в растворе и в изолированных хлоропластах показывает, что эффективность тушения кислородом в том и другом случае имеет близкое значение, тогда как тушение хинонами более эффективно в хлоропластах. Понижение температуры водно-глицериновой суспензии хлоропластов в отличие от растворов ведет к увеличению степени тушения хинонами, что может быть связано с образованием комплекса между тушителем и белково-липоидным соединением хлорофилла. Тушение флуоресценции хлорофилла восстановителями незначительно. Присутствие восстановителей практически не влияет на тушение окислителями, за исключением случаев, в которых наблюдается темновое или фотохимическое восстановление окислителя.

Каротин, не тушащий флуоресценцию хлорофилла, ингибирует эффект тушения окислителями и восстановителями.

Предполагается, что в опытах с хлоропластами наблюдается эффект тушения «коротковолновых», «мономерных» и начально-агрегированных форм хлорофилла, связанных с белками и липоидами хлоропластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kautsky H., Hirsch A., Ber. Deut. Chem. Ges. **64**, 2677, 1931; **66**, 1588, 1933; **68**, 152, 1935
2. Frank J., Levi H., Z. Phys. Chem. **27**, 409, 1935
3. Weil-Malherbe H., Weiss J., Nature **149**, 471, 1942
4. Евстигнеев В. Б., Красновский А. А., Докл. АН СССР **60**, 623, 1948
5. Livingston R., Ke-Chmlin., J. Amer. Chem. Soc. **72**, 909, 1950
6. Карякин А. В., Шабля А. В., Оптика и спектроскопия **5**, 655, 1958
7. Дилунт И. И., Чернюк Н. И., Докл. АН СССР, **140**, 162, 1961; **156**, 149, 1964
8. Дилунг И. И., Чернюк Н. И., Ж. физ. хим. **37**, 1100, 1963
9. Шахвердов П. А., Теренин А. Н., Докл. АН СССР **160**, 1141, 1965
10. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР **166**, 223, 1966; **167**, 928, 1966
11. Watson W. E., Trans. Farad. Soc. **77**, 6495, 1955
12. Даин Б. Я., Дилунг И. И., в сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 53, «Наука», М., 1965
13. Weiss J., Trans. Farad. Soc. **32**, 1331, 1936; **34**, 451, 1938; **35**, 48, 1939
14. Теренин А. Н., Фотохимия красителей. Изд. АН СССР, М., 1947
15. Livingston R., Quart Rev. **14**, 174, 1960
16. Shiau J., Frank J., Arch. Biochem. **14**, 253, 1947
17. Arnon D., Tsujimoto H., McSwain B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **54**, 927, 1965
18. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР **150**, 1378; **153**, 723, 1963; **158**, 730, 1964
19. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия **30**, 605, 1965
20. Livingston R., Thompson L., Ramarao M., J. Amer. Chem. Soc. **74**, 1073, 1952
21. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **127**, 913, 1959
22. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Биохимия **26**, 80, 1961
23. Bannister T., Photochem. Photobiol. **2**, 519, 1963
24. Сисакян Н. М., Филиппович И. И., Светайло Э. Н., Докл. АН СССР **147**, 488, 1962
25. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика **4**, 392, 1961
26. Красновский А. А., Биофизика **4**, 5, 1959

27. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Пакшина Е. В., Биохимия **25**, 288, 1960
28. Cleas H., Z. Naturforsch. **16b**, 445, 1961
29. Пакшина Е. В., Красновский А. А., Биохимия **29**, 1132, 1964
30. Fujimori E., Livingston R., Nature **180**, 1936, 1957
31. Murty N., Rabinowitch E., J. Amer. Chem. Phys. **41**, 62, 1964
32. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Синещеков В. А., Докл. АН СССР **162**, 5, 1965.

Поступила в редакцию
15.XII 1966

THE STUDY OF THE FLUORESCENCE QUENCHING OF CHLOROPHYLL AND ANALOGS IN SOLUTIONS AND CHLOROPLASTS

N. N. DROSDOVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

The quenching of fluorescence of tetrapyrrolic pigments by oxidants and reductants was studied in solutions and chloroplasts suspension. The quenching by oxygen is reversible and is of the same order in solutions and chloroplasts. The fluorescence quenching of chlorophyll and analogs by quinones and methylviologen points the absence of correlation between redox potentials of the quencher and the quenching effect; such a correlation is seen only in the case of chemically analogous compounds (quinones). There is no correlation between quenching effect and the efficiency of photochemical reaction. The quenching of chlorophyll luminescence by quinons is more effective in chloroplasts as compared with solutions. Unlike the solutions the efficiency of quenching in chloroplasts increases at low temperatures. The quenching of luminescence by reductants is negligible. Carotene which does not quench chlorophyll luminescence inhibits the quenching by oxidants and reductants. In the chloroplasts the fluorescence of the shortwave forms of chlorophyll are probably quenched under action of oxidants.



Академик А. Н. ТЕРЕНИН

18 января 1967 г. на семьдесят первом году жизни после продолжительной болезни скончался выдающийся физико-химик Герой Социалистического труда академик Александр Николаевич Теренин.

Вся его жизнь до последнего вздоха была отдана науке. Еще будучи учеником Калужского реального училища в предреволюционные годы, А. Н. Теренин осуществил свое первое исследование по спектроскопии; уже будучи тяжело больным, он в конце 1966 г. закончил свою монографию «Фотоника красителей». Эта книга — лучший памятник его жизни в науке, и на ней будут воспитаны новые поколения ученых.

До последних дней жизни А. Н. Теренин был близко связан со своими учениками и сотрудниками, пристально следил за текущей научной литературой и готовился к участию в научных конгрессах. Он ни на минуту не хотел отставать от развития науки, поражала широта научных интересов А. Н. Теренина. Он был блестящим физиком-спектроскопистом и выдающимся физико-химиком, родоначальником советской школы фотохимии. Еще в сороковых годах А. Н. Теренин предвидел внедрение идей и методов физики в биологию. Первым из наших физико-химиков он распространил свои исследования на область биологии.

Круг основных научных интересов А. Н. Теренина в течение почти пятидесяти лет активной научной работы был связан с проблемой взаимодействия кванта света с молекулой.

Начиная со своих ранних работ, А. Н. Теренин использовал поглощение кванта света не только как средство анализа энергетических уровней атомов и молекул, но и как средство активного воздействия на молекулу, ведущее, в конечном счете, к ее разнообразным фотохимическим трансформациям. Отсюда — тесная связь спектроскопии и фотохимии, характерная для научной школы А. Н. Теренина. Формирование научной индивидуальности А. Н. Теренина происходило в эпоху бурного развития знаний в области электронной структуры атомов и молекул.

Уже школьные годы определили острый интерес А. Н. Теренина к проблеме взаимодействия кванта света с атомом и молекулой. Этот интерес был закреплен в Центральной научно-исследовательской лаборатории Военного ведомства, где А. Н. Теренин проходил военную службу. Первая научная работа А. Н. Теренина была посвящена расшифровке германского люминесцирующего состава, которым покрывали мушку винтовки. Эта задача была успешно решена с помощью эмиссионного анализа и послужила основой первой научной публикации А. Н. Теренина, посвященной фотометрированию светящихся составов.

После демобилизации А. Н. Теренин поступает на физическое отделение Петроградского Университета и будучи на первом курсе начинает исследовательскую работу под руководством Д. С. Рождественского.

В научной работе, проведенной в Университете («нормальная орбита электрона в атоме ртути»), проявляются особенности научного дарования А. Н. Теренина — умение простыми и изящными экспериментальными средствами добиваться исчерпывающего решения вопроса; нужно было вести спектральные измерения в области

около 1 микрона, что потребовало сенсибилизации фотопластинки к этой области спектра; А. Н. Теренин разработал метод сенсибилизации эффекта Гершеля красителями, блестяще решив поставленную научную задачу.

По окончании Университета в 1922 г. А. Н. Теренин работает на кафедре оптики физического факультета Университета, выбрав для самостоятельной работы исследование спектральных уровней — «термов» атомов металлов (1922—1925).

Исследования люминесценции паров солей под действием искрового ультрафиолета (1925—1932) приводят его к открытию оптической диссоциации молекул с образованием возбужденных атомов и радикалов, идентифицированных по спектру собственного испускания. Этот цикл исследований изложен в монографии «Фотохимия паров солей». Далее А. Н. Теренин распространил метод люминесцентного фотораспада к изучению фотохимии более сложных органических молекул в газовой фазе и в адсорбированном состоянии.

В 1932 г. А. Н. Теренин избирается членом-корреспондентом Академии Наук СССР и организует в Ленинградском Университете Лабораторию оптики поверхностных явлений, преобразованную впоследствии в Лабораторию фотокатализа. После этого интересы А. Н. Теренина сосредоточиваются на оптике и фотохимии адсорбированных молекул, что является важным для теории гетерогенного катализа; он все глубже входит в круг решений химических проблем — изучает адсорбированные молекулы методами инфракрасной спектроскопии, тушение люминесценции твердых тел адсорбированными молекулами, «вылет» адсорбированных молекул «в объем» после возбуждения квантом света. Одновременно создается новое направление по изучению фотоионизации и распада газовых молекул методом масс-спектрометрии. Это годы интенсивной работы и все возрастающего потока научных публикаций.

В 1939 г. А. Н. Теренин избирается действительным членом Академии Наук СССР по отделению химических наук. В предвоенные годы научные интересы А. Н. Теренина расширяются в область изучения обмена колебательной энергии между возбужденными и невозбужденными молекулами; проводятся первые работы по изучению инфракрасных спектров молекул при высоких давлениях.

Наблюдения фосфоресценции и фотохимии органических молекул, в том числе органических красителей приводят его к сформулированной в 1943 г. гипотезе о бирадикальном (триплетном) состоянии метастабильных молекул, обладающих повышенной химической реакционной способностью.

Представление о фотохимической активности триплетных и синглетных возбужденных состояниях органических молекул и последовательная трактовка первичного фотоакта в конденсированной фазе, связанного с миграцией возбуждения и переносом электрона, позволили А. Н. Теренину объединить и систематизировать громадный экспериментальный материал по фотохимии органических соединений — в книге «Фотохимия красителей и родственных органических соединений», вышедшей в 1947 г.

Дальнейшее исследование метастабильных молекул приводит А. Н. Теренина к открытию переноса энергии между молекулами на триплетном уровне. Изучение этого фундаментального явления привело к большому и ежегодно растущему числу работ; этот тип элементарного процесса приобретает все большее значение в фотохимии органических молекул.

В своей речи «Свет и химия» на общем собрании Академии наук СССР в 1943 г. А. Н. Теренин сформулировал дальнейшие задачи развития фотохимии, обратив особое внимание на необходимость развития работ по общей биологии, биохимии и фотосинтеза.

После войны все больше растут интересы А. Н. Теренина к биофизике и биохимии, к применению спектральных и фотохимических методов для решения биологических проблем.

В 1945 г. А. Н. Терениным организована в Москве, в Институте биохимии им. А. Н. Баха, лаборатория фотобиохимии, задачей которой являлось изучение первичных фотохимических процессов фотосинтеза — преимущественно вопросов фотохимии хлорофилла и его аналогов. Эта лаборатория стала центром подготовки советских фотобиологов.

Проблема первичных фотореакций в органических соединениях в конденсированных средах тесно связана с фотоэлектрическими процессами в этих соединениях. Еще с довоенных лет А. Н. Теренин уделял большое внимание развитию фотоэлектроники органических красителей, изучению фотопроводимости пленок органических соединений, внешнего фотоэффекта и эффекта Беккереля на фазовых границах твердая пленка — раствор. В лаборатории А. Н. Теренина было установлено наличие электронной и дырочной проводимости ряда органических соединений; в том числе у хлорофилла и его аналогов обнаружено и изучено явление оптической сенсибилизации фотоэффекта неорганических полупроводников при их окрашивании красителями. Эти работы продолжены в сторону изучения фотоэлектрических свойств органических полупроводников.

А. Н. Теренин уделял большое внимание изучению краткоживущих фотопродуктов в конденсированной фазе с использованием методов скоростной импульсной спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса.

Работы А. Н. Теренина служат прекрасным примером использования результа-

тов фундаментальных теоретических исследований в технике; казалось бы, отвлеченные исследования сенсибилизации фотопроводимости окиси цинка красителями привели к использованию этого явления в электрофотографии; число таких примеров можно было бы умножить.

Напряженную исследовательскую работу А. Н. Теренин все годы совмещал с большой педагогической работой. С 1932 г. он профессор ЛГУ и автор курса «Спектроскопия молекул», а в последние годы руководил кафедрой фотонной физики в Ленинградском Университете. Им была воспитана целая плеяда ученых, успешно работающих в области спектроскопии, фотохимии и физической химии. У А. Н. Теренина был дар прекрасного педагога. Он учил примером своей жизни, своим горением, своей полной отдачей науке.

А. Н. Теренин был выдающимся ученым-организатором. В течение 10 лет он осуществлял научное руководство Государственным оптическим институтом. Деятельность А. Н. Теренина имела большое значение для развития оптической промышленности Советского Союза. Под его руководством создавались советские спектральные приборы. Своими трудами А. Н. Теренин внес большой вклад в оборону страны в годы Великой Отечественной войны.

А. Н. Теренин вел широкую научно-общественную деятельность. Он был председателем Научного совета по проблеме «Фотосинтез» АН СССР, координирующего научную деятельность в этом направлении в Советском Союзе. Его громадный авторитет и человеческое обаяние позволили ему в работе над проблемой сплотить людей различных специальностей.

Выдающиеся заслуги А. Н. Теренина в области развития фотохимии и фотофизики получали неоднократное признание в нашей стране и за ее пределами. В 1945 г. ему была присуждена Государственная премия 1-й степени по химии. В 1954 г. за работы по люминесценции А. Н. Теренину была присуждена золотая медаль имени С. И. Вавилова по физике. За работы в области молекулярной спектроскопии А. Н. Теренину в 1959 г. была присуждена золотая медаль имени итальянского фотохимика — Чиамичиана. За работы по межмолекулярному переносу энергии на Международном конгрессе по фотобиологии в Лондоне в 1964 г. А. Н. Теренину была вручена золотая медаль имени Финзена.

А. Н. Теренин был членом редколлегий ряда советских и международных журналов, состоял почетным членом французского общества физической химии и английского химического общества. Он достойно представлял СССР в ряде международных научных организаций.

Советское правительство высоко оценило выдающиеся научные заслуги А. Н. Теренина, наградив его четырьмя орденами Ленина, орденом Трудового Красного Знамени, орденом Красной Звезды и медалями. В 1966 г. ему было присвоено высокое звание Героя Социалистического Труда.

А. Н. Теренин был глубоко принципиальным и доброжелательным человеком, требовательным к себе, отзывчивым и внимательным к окружающим; его светлый облик будет служить примером ученикам и последователям всей теренинской школы ученых.

А. А. Красновский.

Доклады Академии наук СССР
1967. Том 174, № 2

УДК 581.19

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. И. БЫСТРОВА

ПЕРЕСТРОЙКА АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА

Взаимодействие между близкорасположенными молекулами хлорофилла и его аналогов в твердых пленках, коллоидных мицеллах, кристаллах и сжатых монослоях обычно приводит к сдвигам поглощения в длинноволновую область с образованием различных типов упаковки пигментов в агрегированных формах ([1], [2]). Существенно выяснить способ участия молекул воды, спиртов и других низкомолекулярных соединений в образовании агрегированных пигментных структур. Есть данные, что наличие воды благоприятствует кристаллизации хлорофилла и бактериохлорофилла ([3], [4]); в мономолекулярных слоях хлорофилла а, полученных на воде в присутствии ионов Са, обнаруживается образование кристаллической формы пигмента с максимумом поглощения при 735—740 мμ ([5], [6]); кристаллическая форма хлорофилла с максимумом поглощения при 690 мμ образуется в присутствии диоксана ([4], [7]); пары воды влияют на спектр пленок бактериохлорофилла ([8]).

В настоящей работе систематически изучалось действие паров воды и других соединений на спектральные свойства твердых пленок хлорофилла и бактериохлорофилла.

Пигменты выделяли обычными методами, принятыми в нашей лаборатории, с конечной хроматографией на сахарозе; использовали серный эфир, освобожденный от перекисей и свежеперегнанный над металлическим натрием; измерения производили в трубках Тунберга на спектрофотометре СФ-10, приспособленном для регистрации спектров в области 400—950 мμ.

Опыты ставили следующим образом. В трубку Тунберга с боковым отводом вводили 1—2 мл раствора пигмента в сухом эфире с концентрацией 10^{-3} *M*, откачивали сначала водоструйным, а затем масляным вакуумным насосом в течение 30 мин. При этом в нижней части трубки получали пленку пигмента. Затем открывали трубку, вводили в боковой отвод 1 мл воды или растворителя, закрывали трубку, выдерживали пленку в парах растворителя при 20—70°, погружая трубку целиком в водяную баню термостата. При этом пары воздействовали на пленку, не конденсируясь на ней. Измерения спектров поглощения вели при комнатной температуре, периодически вынимая трубку из термостата.

Получены следующие результаты.

Хлорофилла. При испарении эфирных растворов обычно получается пленка с максимумом поглощения около 680 мμ. Под действием паров воды при комнатной температуре в течение 10—15 час. наблюдается «выпячивание» длинноволнового склона кривой поглощения; на дифференциальном спектре видно образование формы с максимумом поглощения около 715 мμ (рис. 1*А*). В ряде опытов при нагревании пленки в парах воды при 50° в течение 30—45 мин. удалось наблюдать образование формы пигмента с максимумом поглощения около 740 мμ (рис. 1*Б*). Если открыть трубку и удалить воду из отвода, то нагревание

пленки до 70° приводит к нарушению форм 740 и 715 мμ и возврату коротковолновой формы с поглощением около 675 мμ. В случае водных растворов аммиака (25%), ацетальдегида (14%) и формальдегида образование формы 740 мμ наступает скорее, чем в парах воды, и наблюдается уже при комнатной температуре.

В парах метилового спирта при комнатной температуре через несколько минут происходит образование формы с поглощением в области 710—715 мμ, через 30—60 мин. возникает форма, поглощающая при 740 мμ, которая доминирует в спектре (рис. 2). В парах этилового спирта (ректификата) при 20° в течение 30—60 мин. из пленки хлорофилла а также образуется форма 740 мμ.

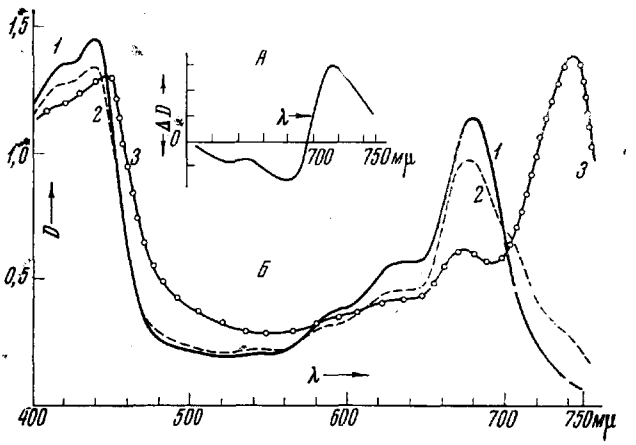


Рис. 1. *А* — дифференциальный спектр поглощения пленки хлорофилла а (спектр пленки, обработанной парами воды в течение 15 час. при 20°, минус спектр исходной пленки); *Б* — спектры поглощения пленки хлорофилла а: исходной (*1*) и после обработки парами воды при 50° в течение 15 мин. (*2*) и 1,5 час. (*3*)

В парах диоксана наблюдается образование «диоксановой» упаковки ([4], [7]) с максимумом поглощения при 690 мμ; обращает на себя внимание «острота» спектральной кривой (рис. 3).

Интересно отметить, что пары метанола и этанола не оказывают действия на пленки, обработанные диоксаном. Пары указанных спиртов не вызывают образования длинноволновых форм и в пленках, полученных из серного эфира с добавлением некоторого количества метанола.

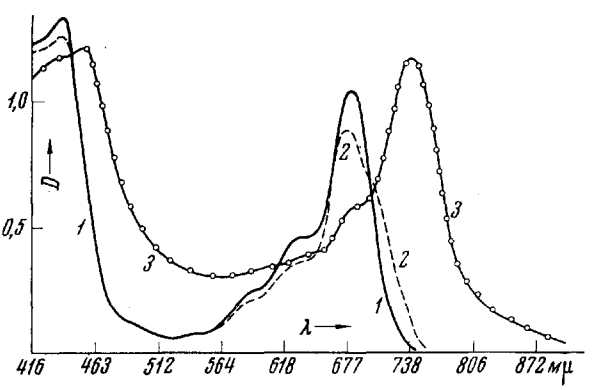


Рис. 2. Спектры поглощения пленки хлорофилла а: исходной (*1*) и после обработки парами метанола при 19° в течение 10 мин. (*2*) и 55 мин. (*3*)

В парах пиридина не наблюдается образования длинноволновых форм. И, наоборот, пары пиридина через 10—15 мин. устраняют длинноволновую «выпуклость» в спектре поглощения исходной пленки (форма 695 мμ), смещая положение главного максимума до 676—674 мμ. Такое положение сохраняется, пока существует пленка; лишь ее частичное растворение вызывает более коротковолновый сдвиг. Полярные молекулы, присоединяясь по центральному атому магния молекулы пигмента ([9]), образуют достаточно прочные координационные соединения.

Хлорофилл b образует твердую пленку с максимумом поглощения при 658—660 мμ. В парах воды и других соединений длинноволновый сдвиг не превышает 3 мμ. По-видимому, это связано с прочностью образуе-

мых в пленках агрегатов пигмента, в которых центральный атом магния одной молекулы сочленен координационными связями с альдегидной и карбонильной группировками других молекул ([10]). Таким образом, в случае хлорофилла b координационные вакансии центрального атома магния насыщаются путем сочленения с другими молекулами пигмента, образуя достаточно прочные связи. Это явление не наблюдается у хлорофилла a, который не обладает альдегидной группировкой.

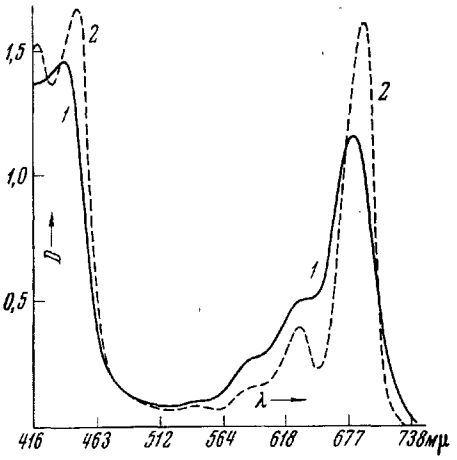


Рис. 3. Спектры поглощения пленки хлорофилла a: исходной (*1*) и после обработки парами диоксана при 18° в течение 10 мин. (*2*)

Феофитин a образует пленки с максимумом поглощения при 700 мμ. Действие паров воды и других соединений не приводит к перестройке агрегированных форм, что, по-видимому, связано с отсутствием центрального атома магния, по которому идет присоединение полярных молекул.

Бактериохлорофилл образует твердую пленку с максимумами поглощения при 800 и 860 мμ ([8]). Выдерживание в парах воды приводит к сдвигу до 875 мμ. Однако при использовании воды, насыщенной серным эфиром, за 30—40 мин. при 50° удается наблюдать длинноволновую форму с максимумом поглощения ~910 мμ (рис. 4*А*). Образование формы 900—920 мμ наблюдается в парах ацетальдегида и метилового спирта, но лишь в присутствии паров серного эфира (рис. 4*Б*). По-видимому, молекулы эфира сольватируют и расшатывают гидрофобную структуру пленки, делая ее доступной для проникновения паров воды. Таким образом, в модельных системах удается наблюдать наиболее длинноволновые формы бактериохлорофилла, существующие в живых фотосинтезирующих бактериях.

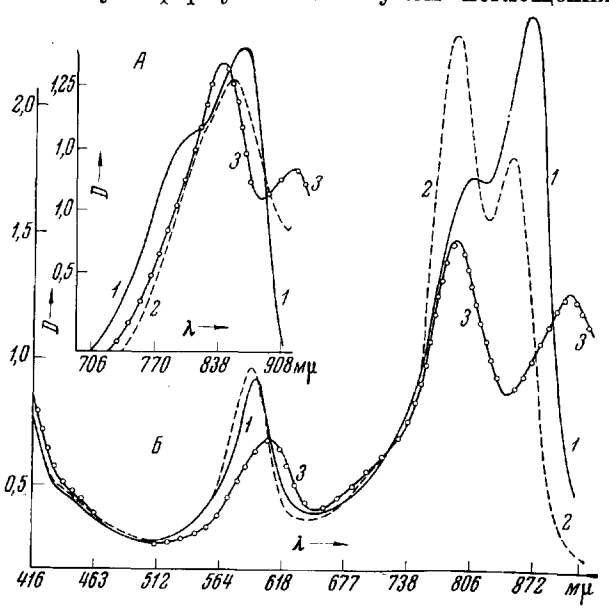


Рис. 4. *А* — спектры поглощения пленки бактериохлорофилла: исходной (*1*) и после обработки парами воды и серного эфира при 45° в течение 15 мин. (*2*) и при 50° в течение 45 мин. (*3*); *Б* — спектры поглощения пленки бактериохлорофилла: исходной (*1*) и после обработки парами серного эфира при 20° в течение 30 мин. (*2*) и с последующей обработкой парами метанола в течение 45 мин. (*3*)

Пока не ясно, связаны ли наблюдаемые эффекты с присоединением «кристаллизационной» воды к молекуле пигмента ([11]) или происходит более полная сольватация с участием других полярных группировок молекул хлрофилла a и бактериохлорофилла.

Изученные полярные соединения, способные к координационному взаимодействию с центральным атомом магния, могут образовывать «мостики» между молекулами пигмента, приводя к возникновению «длинноволновых» агрегированных форм, обладающих более упорядоченной структурой ([4]).

Итак, совокупность описанных данных указывает на включение молекул воды или других низкомолекулярных полярных соединений в длинноволновые агрегированные структуры хлорофилла и бактериохлорофилла.

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

Поступило
21 II 1967

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 41. [2] Ф. Ф. Литвин, Там же, 1965, стр. 96. [3] E. E. Jacobs, A. S. Vatter, A. S. Holt, Arch. Biochim. and Biophys., 53, 228 (1954). [4] Е. М. Белавцева, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биофизика, 4, 521 (1959). [5] E. E. Jacobs, A. S. Holt, E. Rabinowitch, J. Chem. Phys., 22, 142 (1954). [6] Ф. Ф. Литвин, Б. А. Гуляев, ДАН, 158, 460 (1964). [7] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 95, 611 (1954). [8] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952). [9] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский, ДАН, 70, 261 (1950). [10] J. J. Katz, G. L. Closs et al., J. Am. Chem. Soc., 85, 3801 (1963). [11] В. М. Кутюрин, В. П. Князев, ДАН, 149, 456 (1963).

Доклады Академии наук СССР
1967. Том 177, № 5

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Н. И. ДРОЗДОВА, И. М. САПОЖНИКОВА

УСЛОВИЯ ОБРАТИМОГО И НЕОБРАТИМОГО ФОТООКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА

Давно известна способность бактериохлорофилла в растворе к быстрому фотоокислению в присутствии кислорода воздуха. Шнейдер [1] показал, что бактериохлорофилл при действии ряда окислителей может превращаться в зеленый пигмент, подобный хлорофиллу. В нашей лаборатории была установлена способность бактериохлорофилла к обратимому фотохимическому окислению кислородом воздуха и к необратимому окислению *о*-бензохиноном с образованием хлорофиллоподобного продукта [2]. Способность бактериохлорофилла к фотоокислению была подтверждена в работах Годхера [3, 4]. В последующих работах мы обнаружили обратимое фотоокисление бактериохлорофилла *п*-бензохиноном в вязкой спирто-глицериновой среде при —70° [5, 6]. В этих условиях происходит стабилизация фотопродуктов и делается возможной запись спектров промежуточных окисленных соединений, обладающих характерным максимумом поглощения при 430 мμ. Смит и Кальвин [7] недавно изучали образование «зеленого» окисленного продукта бактериохлорофилла, который представляет собой 2-дезвинил-2-ацетилхлорофилл а, согласно Холту и Джекобсу [8]. Нами были сопоставлены свойства продуктов фотоокисления бактериохлорофилла и бактериовиридина [9].

Целью настоящей работы явилось установление условий, ведущих к обратимому и необратимому окислению бактериохлорофилла различными окислителями в средах различной природы.

Методика. В вакуумную трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, вводили 5 мл раствора бактериохлорофилла в соответствующем растворителе. Окислители приливали к раствору пигмента из бокового отвода трубки после откачивания воздуха. Перед введением окислителя измеряли спектр поглощения на модифицированном спектрофотометре СФ-10, затем производили запись спектра после добавления окислителя в темноте и после освещения. Обратная реакция в темноте протекала самопроизвольно либо после добавления восстановителей; в случае проведения опыта при —70° обратную реакцию ускоряли путем размораживания, а перед записью спектра опять замораживали раствор. Освещение — через темно-красный фильтр КС-19 в области главного максимума поглощения бактериохлорофилла. Источник света — лампа накаливания (300 вт) с конденсором и водяным фильтром. Интенсивность света 10^5 эрг/см^2·сек. Освещение при —70° в прозрачном сосуде Дьюара в смеси спирта с твердой углекислотой. Растворители: толуол, ацетон, этиловый спирт и смесь спирта с глицерином (1 : 3). Окислители: кислород воздуха, *п*-бензохинон, *о*-бензохинон, перекись бензоила. *п*-Бензохинон очищали возгонкой, *о*-бензохинон получали по Вильштеттеру [10] окислением пирокатехина.

Кислород. Фотохимическое окисление бактериохлорофилла наиболее глубоко идет в спирте [2, 9]. Наблюдается падение поглощения в области главного максимума поглощения пигмента и появление новых полос поглощения в области 550—700, 430 и 860—900 мμ. Как уже указывалось, наблюдается постепенная регенерация пигмента после добавления в среду аскорбиновой кислоты. Опыты без кислорода показали, что бактериохлорофилл не разрушается при освещении в ацетоне, спирте и толуоле.

п-Бензохинон. Необратимое фотоокисление растворов бактериохлорофилла *п*-бензохиноном (10^{-3} *М*) наблюдалось при комнатной тем-

пературе в ацетоне и толуоле; в спирте реакция практически не идет. Наиболее глубокая фотореакция, которая ведет к образованию продукта с максимумом поглощения при 680 мμ, наблюдалась в ацетоне. Добавление аскорбиновой кислоты после реакции не вызывает изменения полученного продукта. Освещение при —70° с измерением через 30 сек. не приводит к заметным изменениям поглощения в спиртовом растворе, тогда как в ацетоне в этих условиях наблюдается выцветание,

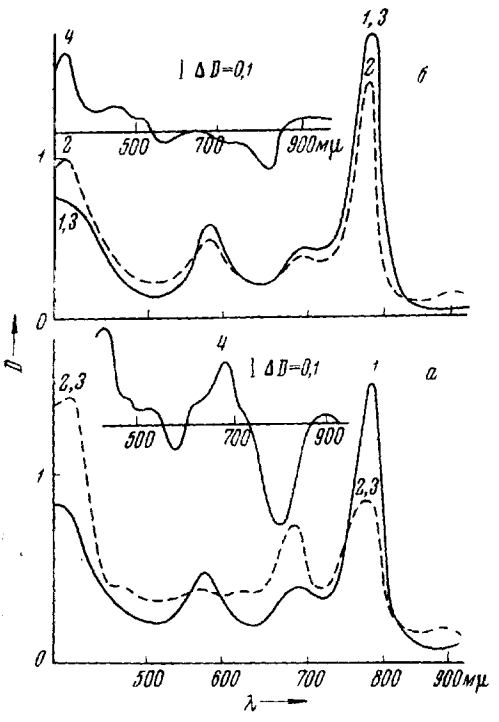


Рис. 1

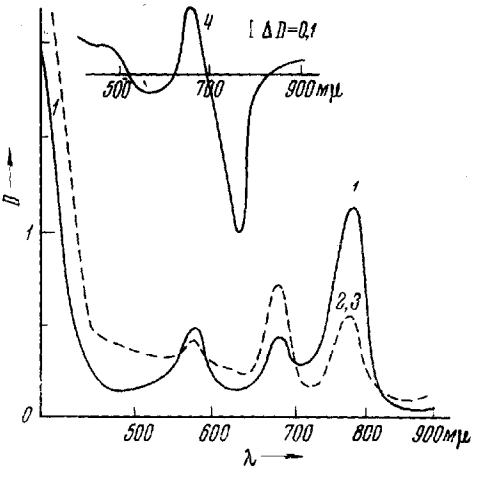


Рис. 2

Рис. 1. Фотохимическое окисление бактериохлорофилла *n*-бензохиноном (10^{-3} *M*) в ацетоне. *а* — необратимое окисление при +20°; *1* — исходный спектр, *2* — после освещения в течение 1,5 мин., *3* — после стояния в темноте, *4* — дифференциальный спектр (*2*—*1*); *б* — обратимое окисление при —70°: *1* — исходный спектр, *2* — после освещения в течение 1,5 мин., *3* — обратная реакция в темноте, *4* — дифференциальный спектр (*2*—*1*)

Рис. 2. Необратимое фотохимическое окисление бактериохлорофилла *о*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-3}$ *M*) в ацетоне при +20°. *1* — исходный спектр, *2* — после освещения в течение 1,5 мин., *3* — после стояния в темноте, *4* — дифференциальный спектр (*2*—*1*)

обратимое при размораживании раствора. Глубина обратимой реакции зависит от количества образовавшегося продукта с максимумом поглощения при 680 мμ: чем больше накопление этого продукта, тем меньше обратимость реакции. Применение спирто-глицериновой среды и низкой температуры приводит к более четким обратимым эффектам взаимодействия пигмента с *n*-бензохиноном, описанным нами ранее ([5], [6]). Реакция идет обратно в темноте и очень быстро — при размораживании раствора. На рис. 1*а* приведены спектры, полученные при фотоокислении бактериохлорофилла *n*-бензохиноном в ацетоне при +20°; падает поглощение в главном максимуме пигмента (770 мμ) и появляются новые полосы при 430 и 650—680 мμ. На рис. 1*б* приведены результаты опыта, где освещение проводилось при —70°; в этом случае отсутствует полоса поглощения при 680 мμ. В спирто-глицериновой среде при —70°, где наблюдается обратимая реакция при выключении света, тоже отсутствует полоса поглощения при 680 мμ ([6]). Результаты опытов приведены в табл. 1. Таким образом, при данной технике эксперимента обратимое окисление удается наблюдать при —70°, тогда как при +20° наблюдается необратимая реакция.

о-Бензохинон. Раствор *о*-хинона получали непосредственно перед реакцией в головке трубки Тунберга, куда вводили окись серебра и пирокатехин, растворенный в соответствующем растворителе. После отка-

чивания воздуха сливали из головки трубки полученный *о*-хинон к раствору бактериохлорофилла. Скорость окисления бактериохлорофилла *о*-хиноном зависит от количества окислителя. При $6 \cdot 10^{-2}$ *M* *о*-хинона окисление бактериохлорофилла в толуоле и в ацетоне при +20° протекает практически мгновенно; при $2 \cdot 10^{-3}$ *M* *о*-хинона требуется около 1 часа для получения подобного эффекта. Существенно, что в этом случае реакция ускоряется при освещении. При этом происходит исчезновение главного максимума поглощения и появление полосы при 680 мμ (рис. 2). В спирте эта реакция проходит не столь глубоко. Добавление восстановителей (фенилгидразина или аскорбиновой кислоты) не приводит к регенерации пигмента. В ацетоновом растворе при —70° наблюдается обратимое фотохимическое взаимодействие бактериохлорофилла с *о*-хиноном: падение оптической плотности при 770 мμ и возвращение в темноте при размораживании раствора. В толуоле при —70° реакция лишь частично обратима; в этом случае образуется небольшое количество продукта 680 мμ и гораздо большее увеличение поглощения в области 480—560 мμ. В спиртовых растворах при —70° происходит четкое обратимое взаимодействие пигмента с *о*-хиноном (рис. 3). В этом случае при падении поглощения в главном максимуме отсутствует увеличение поглощения в красной части спектра и наблюдается лишь увеличение поглощения в области 430, 480—560 мμ, характерное для обратимо реагирующих продуктов. При более длительном освещении (до двух минут) наблюдается некоторое увеличение поглощения при 670—690 мμ, что влечет за собой неполную регенерацию пигмента при выключении света. Результаты опытов сведены в табл. 2. Таким образом, при +20° в темноте и на свету происходит необратимое образование хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения при 680 мμ, что свидетельствует о «двуэлектронном» взаимодействии пигмента с окислителем, тогда как при —70° наблюдаются обратимые эффекты, которые следует приписать «одноэлектронному» окислению.

Таблица 1

Взаимодействие бактериохлорофилла (10^{-5} *M*) с *п*-бензохиноном (10^{-3} *M*), освещение 3 мин. $-\Delta D$ — прямая фотореакция, уменьшению *D* при освещении раствора; $+\Delta D$ — обратная темновая реакция, увеличение *D* в темноте после освещения

Растворитель	+20°		—70°	
	$-\Delta D$	$+\Delta D$	$-\Delta D$	$+\Delta D$
Толуол	—0,520	0	—0,160	+0,080
Ацетон	—0.750	0	—0,210	+0,120
Спирт + глицерин	0	0	—0,480	+0,480

Таблица 2

Фотохимическое окисление бактериохлорофилла (10^{-5} *M*) *о*-хиноном ($4 \cdot 10^{-4}$ *M*), 2 мин. освещения

Растворитель	Необратимая реакция при +20°		Обратимая реакция при —70°		
	$-\Delta D_{770}$	$+\Delta D_{680}$	$-\Delta D_{770}$	$+\Delta D_{770}$	$-\Delta D_{680}$
Толуол	—0,700	+0,400	—0,250	+0,130	—0,060
Ацетон	—0,700	+0,300	—0,750	+0,570	—0,040
Спирт	—0,420	+0,080	—0,400	+0,400	—0,050

Перекись бензоила. Окисление хлорофилла и фталоцианина магния перекисью бензоила, обратимое при добавлении аскорбиновой кислоты, было обнаружено нами в 1947 г. ([11]). Смешивание раствора пигмента (10^{-5} *M*) в толуоле, ацетоне, спирте и спиртоглицериновой среде с раствором перекиси бензоила 10^{-3} *M* в соответствующих растворителях в темноте приводит к одинаковым изменениям в спектре поглощения пигмента, подобным тем, которые наблюдались при фотоокислении бактериохлорофилла исследованными выше окислителями при комнатной температуре. При действии перекиси бензоила во всех растворителях наблюдается сдвиг главного максимума поглощения пигмента в сторону коротких волн

на 15—20 мμ. Это соответствует опытам Годхера ([4]) по обратимому окислению бактериохлорофилла ионами церия в хроматофорах Rhodospirillium rubrum, при этом тоже наблюдался коротковолновый сдвиг максимума поглощения на 20 мμ. Проведение опыта в спирте при +20° и при —35° (при —70° реакция практически не идет) с меньшим количеством перекиси бензоила ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*) позволило наблюдать образование первичного продукта окисления

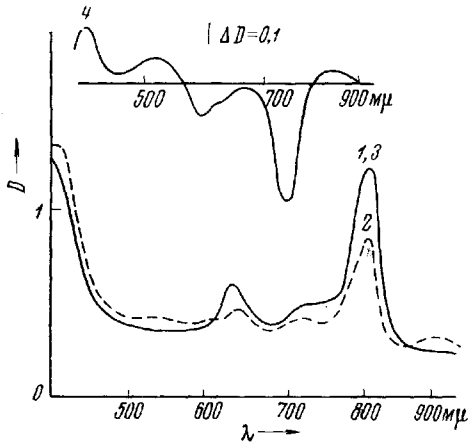


Рис. 3*

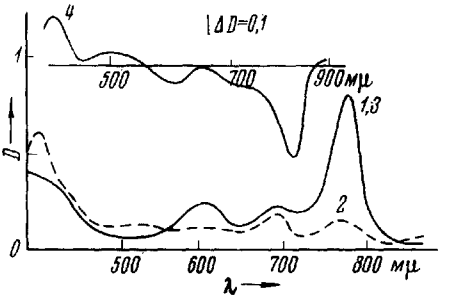


Рис. 4

Рис. 3. Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла *о*-хиноном ($2 \cdot 10^{-3}$ *M*) в спирте при —70°. *1* — исходный спектр, *2* — после освещения в течение 1,5 мин., *3* — обратная реакция в темноте, *4* — дифференциальный спектр (*2—1*)

Рис. 4. Окисление бактериохлорофилла перекисью бензоила (10^{-3} *M*) в спирте при —35°. *1* — исходный спектр, *2* — после добавления перекиси бензоила, *3* — после добавления аскорбиновой кислоты, *4* — дифференциальный спектр (*2—1*)

бактериохлорофилла с полосой поглощения при 430 мμ и отсутствие образования хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения при 680 мμ (рис. 4). В этом случае происходит мгновенная регенерация бактериохлорофилла после добавления аскорбиновой кислоты, которая не только реагирует с окисленной формой пигмента, но и взаимодействует с избытком окислителя, удаляя его из сферы реакции. Спектр окисленного продукта соответствует фотопродукту, образующемуся при фотоокислении пигмента *п*-бензохиноном в спиртоглицериновой среде при —70° и *о*-хиноном в спирте и в ацетоне при —70°.

Изложенный материал указывает на то, что в случае фотоокисления бактериохлорофилла при комнатной температуре различными окислителями наблюдается преимущественно необратимая реакция «двухэлектронного» окисления с отнятием двух атомов водорода в положении 7, 8 и образованием хлорофиллоподобного продукта; в отличие от этого, проводя фотореакцию при низкой температуре, удается наблюдать обратимое, вероятно, «одноэлектронное» окисление, ведущее к появлению промежуточного продукта с поглощением при 430 мμ. Следует полагать, что эти два типа фотореакции могут быть независимыми либо продукт «680» может образоваться путем промежуточного образования продукта «430».

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

Поступило
1 IX 1967

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] E. Schneider, Hoppe — Seyler's Zs. Physiol. Chem., 226, 221 (1934). [2] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [3] J. C. Goedheer, Biochim. et biophys. acta, 27, 478 (1958). [4] J. C. Goedheer, Bacterial Photosynthesis, Ohio, 1963, p. 413. [5] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 153, 722 (1963). [6] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [7] J. K. L. Smith, M. Calvin, J. Am. Chem. Soc., 88, 4500 (1966). [8] A. S. Holt, E. E. Jacobs, Am. J. Bot., 41, 718 (1954). [9] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, И. М. Сапожникова, ДАН, 172, 727 (1967). [10] K. Willstätter, F. Müller, Ber. Deutsch. chem. Ges., 111, 258 (1908). [11] А. А. Красновский, ДАН, 58, 835 (1947).

* На рис. 3 шкала длин волн ошибочно сдвинута на 30 мμ влево от истинного положения.

Доклады Академии наук СССР
1967. Том 172, № 3

УДК 576.851.12

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. В. ПАКШИНА, И. М. САПОЖНИКОВА

СРАВНЕНИЕ ФОТООКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИОВИРИДИНА И БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА. РЕАКЦИИ ФОТОПРОДУКТОВ С ВОССТАНОВИТЕЛЯМИ

Пигменты, выделенные из фотосинтезирующих бактерий, фотохимически окисляются в растворе в присутствии кислорода гораздо быстрее, чем хлорофиллы зеленых растений; агрегация пигментов в водных коллоидных растворах и твердых пленках чрезвычайно увеличивает их устойчивость к фотоокислению.

В нашей лаборатории в 1951 г. была обнаружена способность бактериохлорофилла к обратимому фотоокислению (1). При действии восстановителей (аскорбат, сернистый натрий) на продукты фотоокисления происходит регенерация исходного пигмента. Гудхер подтвердил эти данные и расширил число окислителей, использованных в реакциях этого типа (2).

В нашей лаборатории удалось наблюдать обратимое фотоокисление бактериохлорофилла и бактериовиридина хинонами в вязких спирто-глицериновых средах, что дало возможность измерить спектры поглощения промежуточных продуктов (3, 4).

В настоящей работе сопоставлены свойства продуктов фотохимического окисления бактериохлорофилла и бактериовиридина кислородом воздуха.

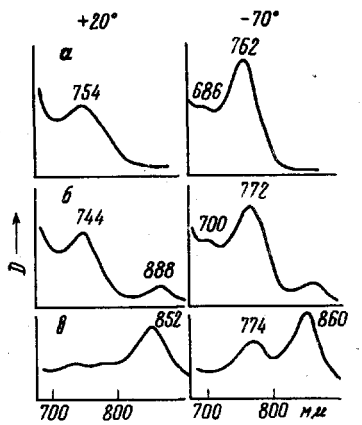


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов фотоокисления бактериовиридина после 3 мин. освещения в спирте (*а*), в пиридине (*б*) и в эфире (*в*). Исходный раствор 10^{-4} *М*

Пигменты выделяли из фотосинтезирующих бактерий обычными методами с конечной хроматографией на сахарозе. Фотореакцию осуществляли в цилиндрических кюветах в присутствии кислорода воздуха в этиловом спирте (ректификат), пиридине и серном эфире. Освещение осуществляли лампой накаливания 300 вт с конденсором через светофильтр КС-11 и водяной фильтр при +20, —50 и —70°. Интенсивность света от 10^3 до 10^5 эрг/см^2·сек. Спектры поглощения измеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-10.

Фотоокисление бактериовиридина. Освещение растворов пигмента в присутствии воздуха вызывает быстрое фотоокисление. Реакция идет быстро в пределах температуры от +20 до —70°; за 3—5 мин. освещения разрушается практически весь пигмент (10^{-5} *М*). При реакции образуются промежуточные соединения, обладающие характерными максимумами поглощения в близкой и.-к. области спектра, на что мы указывали ранее (5). На рис. 1 показаны спектры поглощения образующихся при фотоокислении соединений, которые варьируют в зависимости от природы растворителя и температуры освещения. В спирте образуется продукт окисления с максимумом поглощения при 754 мμ, в пиридине при 744 мμ, в серном эфире при 852 мμ.

Казалось, что эти спектральные эффекты могли быть следствием фотоагрегации пигмента, так как агрегированные формы бактериовиридина также обладают поглощением в близкой и.-к. области спектра ([6]). Однако эти спектральные эффекты наблюдаются лишь в присутствии кислорода, освещение растворов пигмента после откачивания воздуха не приводит к изменениям спектров поглощения.

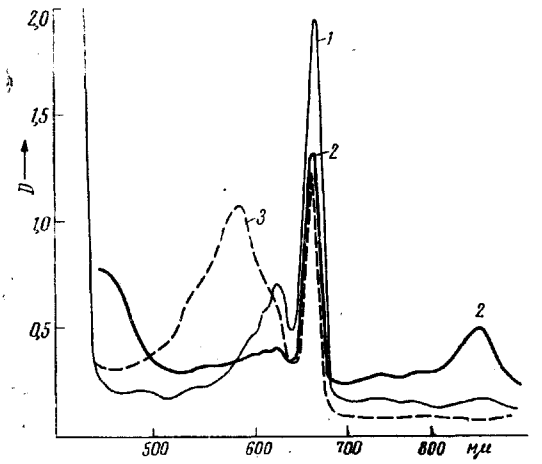


Рис. 2. Фотоокисление бактериовиридина в серном эфире при +20°. Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после 5 мин. освещения; *3* — после добавления 10 *мг* фенилгидразина

Охлаждение растворов бактериовиридина до —70° в спирте ведет к появлению небольшого максимума при 730—740 мμ, который следует приписать агрегированной форме пигмента. Освещение при —70° приводит к образованию фотопродуктов, поглощение которых сдвинуто в длинноволновую сторону по сравнению с продуктами, образующимися при комнатной температуре; наблюдаются дополнительные максимумы, вероятно связанные со стабилизацией промежуточных продуктов при низкой температуре (см. рис. 1).

Введение в раствор после освещения аскорбиновой кислоты или фенилгидразина при +20 или —70° приводило к резкому изменению цвета: раствор приобретал фиолетовую окраску и яркую видимую флуоресценцию *. При этом не удалось наблюдать регенерации «красной» полосы поглощения бактериовиридина; исчезали описанные выше максимумы в близкой и-к. области спектра и появлялись новые максимумы в зеленой области спектра при 500—600 мμ (рис. 2 и 3). Спектры этих вновь образуемых при добавлении восстановителей продуктов варьировали в зависимости от условий опыта (природа растворителя, температура, восстановитель).

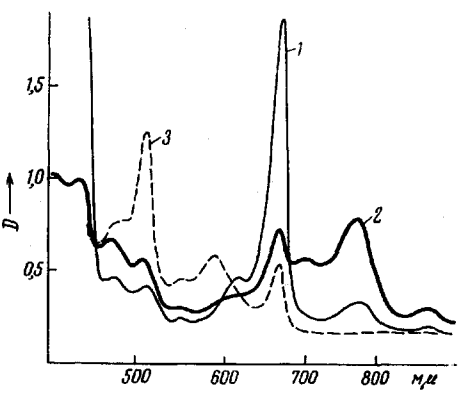


Рис. 3. Фотоокисление бактериовиридина в пиридине при —70°. Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после 5 мин. освещения; *3* — после добавления 10 мг фенилгидразина

На рис. 2 представлена картина изменения спектра поглощения бактериовиридина при его фотоокислении в серном эфире при +20°. В данном опыте при добавлении к продукту окисления бактериовиридина фенилгидразина образующийся продукт имел главный максимум поглощения около 600 мμ. В пиридиновом растворе при добавлении как аскорбиновой кислоты, так и фенилгидразина образуется продукт с максимумами 510; 552 и 586 мμ при +20° и 518; 556 и 590 мμ при —50° (рис. 3), напоминающий по типу системы полос спектр поглощения фикоэритрина.

Фотоокисление бактериохлорофилла ведет к совершен-

* В эфирном растворе при —70° максимум флуоресценции лежит при 650 мμ.

но отличным спектральным эффектам. В согласии с предыдущей работой ([1]) показано, что при окислении бактериохлорофилла падает главный максимум поглощения при 770 мμ и появляется характерный спектр с четырьмя небольшими, почти равными по интенсивности максимумами в области 550—700 мμ. Такая реакция наблюдается при +20 и —70° в спирте. Если после реакции вводить аскорбиновую кислоту, то происходит достаточно полная регенерация бактериохлорофилла (см. рис. 4).

Существенным различием в свойствах изучаемых пигментов является то, что из продуктов окисления бактериохлорофилла (в отличие от бактериовиридина) удается регенерировать исходный пигмент, тогда как продукты, образующиеся при фотоокислении бактериовиридина кислородом, при добавлении восстановителей образуют соединения, отличные от исходного пигмента.

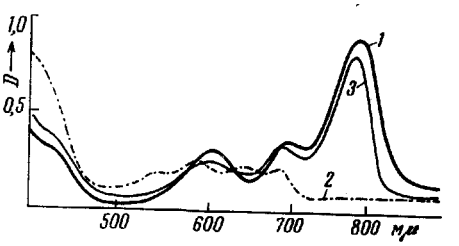


Рис. 4. Фотоокисление бактериохлорофилла в спирте при +20°. Спектры поглощения: *1* — исходный раствор, *2* — после 15 сек. освещения, *3* — после добавления 10 мг аскорбиновой кислоты и 30 мин. стояния в темноте

Можно высказать следующие соображения о природе этих различий. Гуринович и др. ([7]) нашли, что фотоокисление порфиринов кислородом ведет к появлению максимума поглощения, соответствующего хлорину. Это привело к предположению, что кислород присоединяется по месту «полуизолированных» связей молекулы пигмента. Возможно, таким образом, что появление максимумов поглощения в близкой и.-к. области при фотоокислении молекул бактериовиридина происходит в результате присоединения кислорода по месту полуизолированной связи второго пиррольного кольца с появлением спектра поглощения «бактериохлоринового» типа. Следует полагать, что этому сравнительно стойкому соединению предшествует короткоживущий «мольоксид», из которого возможно регенерировать пигмент при иной процедуре эксперимента.

Понятно, что в бактериохлорофилле, в молекуле которого «полуизолированные» двойные связи восстановлены, присоединение кислорода ведет к другим спектральным эффектам. В этом случае следует ожидать присоединения кислорода с нарушением системы сопряженных по кругу двойных связей молекулы пигмента, о чем свидетельствует исчезновение «бактериохлоринового» максимума и появление системы максимумов в средней части видимого спектра (см. рис. 4).

В согласии с изложенным можно объяснить действие восстановителей на продукты фотоокисления. В случае бактериовиридина происходит восстановление фотоокисленной формы с разрывом сопряжения по кругу и образованием «линейного» тетрапиррольного соединения, спектр поглощения которого напоминает фикоэритрин. В случае бактериохлорофилла продукт фотоокисления восстанавливается с регенерацией сопряженной по кругу системы двойных связей.

Следует обратить внимание на то, что при фотоокислении хлорофилла не наблюдается эффектов, ясно выраженных в случае бактериовиридина. Очевидно, различное поведение этих пигментов при фотоокислении и большая устойчивость молекулы хлорофилла объясняются другими известными различиями ([8]) в химическом строении этих пигментов. Задачей является исследование химической структуры продуктов фотоокисления.

Есть предположения, что зеленые серные бактерии являются эволюционными предшественниками наиболее древних аэробных фотосинтетиков — синезеленых водорослей, которые обладают, кроме хлорофилловых пигментов, фикобилинами. Т. Н. Годнев с сотрудниками ([9]) указывают на возможность образования фикобилинов в синезеленых водорослях пу-

тем распада гематиновых соединений и протопорфирина. Описанные опыты дают возможность предположить, что образование фикобилинов в процессе эволюции фотосинтетиков могло быть следствием фотоокисления хлорофилловых пигментов по мере перехода автотрофов от анаэробного к аэробному типу обмена.

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

Поступило
14 X 1966

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [2] J. C. Goedheer, Biochim. et biophys. acta, 27, 478 (1958). [3] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 158, 730 (1964). [4] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [5] А. А. Красновский, И. М. Сапожникова, ДАН, 169, 695 (1966). [6] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, 127, 913 (1959). [7] И. Ф. Гуринович, Г. П. Гуринович, ДАН, 164, 201 (1965). [8] A. S. Holt, D. W. Hughes et al., Plant. Cell Physiol., 4, 49 (1963). [9] Т. Н. Годнев, Р. М. Ротфарб, В. Н. Гвардиян, ДАН, 169, 1191 (1966).

ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Г. Т. РИХИРЕВА, А. В. УМРИХИНА, Л. П. КАЮШИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

(Институт биологической физики АН СССР, Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, Москва)

Использование в исследованиях фотосинтетических систем метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), который дает возможность изучать образование свободнорадикальных продуктов непосредственно в нативной структуре клетки, позволяет получить информацию, существенную для выяснения механизма фотосинтеза. Изучение спектров ЭПР фотосинтезирующих организмов в связи с изменением состояния пигментов может привести к получению данных о функциональном значении отдельных пигментов или их форм в процессе образования первичных продуктов фотосинтеза.

Мы исследовали спектры ЭПР фотосинтезирующих организмов различных филогенетических групп: листьев высших растений, клеток хлореллы и клеток пурпурных и зеленых фотосинтезирующих бактерий [1, 2]. Замораживание образцов жидким азотом позволило измерять спектры без предварительного высушивания препаратов. В этом случае для организмов первой группы (высшие растения, водоросли) оказалось характерным: 1) наличие «темнового» спектра со сверхтонкой структурой, сходной с той, которую удается наблюдать при измерении влажных образцов хлоропластов при комнатной температуре [3]; 2) быстрое возникновение синглетного ЭПР — поглощения в ответ на освещение видимым (красным) светом: 3) стабилизация при низкой температуре фотоиндуцированно образующихся свободнорадикальных состояний.

Листья, предварительно высушенные, в измерениях при комнатной температуре давали только синглетный сигнал ЭПР и в темноте, и на свету. Для таких образцов также характерна быстрая реакция на свет. Образующиеся на свету свободные радикалы исчезали после выключения света за несколько минут (3—7 мин.).

Исследования клеток пурпурных бактерий подтвердили наличие бесструктурного синглетного ЭПР-поглощения (в темноте, на свету) [4]. В новой группе исследованных бактерий (зеленых фотосинтезирующих) также обнаружен «бактериальный» тип ЭПР, характеризующийся синглетным спектром, большой скоростью образования и затухания сигналов (при включении и выключении света) как при комнатной, так и при низких (77° К) температурах.

и, следовательно, отсутствием стабилизации фотоиндуцированных парамагнитных центров при низкой температуре.

В опытах с высушенными препаратами листьев и бактерий обнаружено, что при впуске воздуха в эвакуированные ампулы с образцами происходит увеличение амплитуды и темнового, и светового сигналов. На аналогичное «стимулирующее» влияние кислорода на ЭПР влажных препаратов хлоропластов есть указания в литературе [5].

При детальном исследовании влияния нагревания объектов на процесс образования свободнорадикальных продуктов в листьях и бактериях было обнаружено, что при определенных температурах можно накопить первичные фотопродукты. Максимальная концентрация «неиспользуемых» фотопродуктов наблюдается при 65—70° С, когда, по-видимому, цепь фотосинтетического переноса электрона оказывается нарушенной и происходит разобщение фотохимических и последующих энзиматических звеньев. В листьях, нагретых выше 70° С, способность к фотоиндуцированному образованию свободных радикалов резко падает.

Данные электронномикроскопического исследования, проведенного нами совместно с С. В. Тагеевой, а также аналогичные исследования в лаборатории Кеттеринга в США [6] показали, что способность к фотоиндуцированному образованию свободных радикалов исчезает одновременно (при тех же температурах) с разрушением ламеллярной структуры хлоропластов.

Забегая несколько вперед, следует сопоставить такие факты. В фотосинтезирующих клетках, о чем уже было сказано выше, парамагнитные центры возникают на свету при очень низких температурах. При этих же температурах (77° К) в модельных экспериментах при наличии больших концентраций хлорофилла ($\geqslant 10^{-3}$ *моль/л*) и акцепторов электрона ($\geqslant 10^{-2}$ *моль/л*, хиноны [7]) или доноров электрона ($\geqslant 10^{-1}$ *моль/л*, аскорбиновая кислота [8]) по спектрам ЭПР не удается наблюдать фотохимического взаимодействия между пигментами и этими веществами. В связи с этим экспериментально установленный факт наличия корреляции между структурой фотохимического аппарата in vivo и способностью к фотоиндуцированному образованию свободнорадикальных состояний, по нашему мнению, заслуживает внимания.

При исследовании ЭПР в зеленеющих листьях удается разделить свободнорадикальные продукты фотохимических реакций разных пигментных систем. В первые часы зеленения, когда отсутствуют (по спектрам поглощения и люминесценции) длинноволновые формы хлорофилла, наблюдается незатухающий фотоиндуцированный сигнал ЭПР. Через 7—24 часа зеленения листья дают обычный затухающий сигнал. Появление затухающего типа ЭПР на заключительных стадиях зеленения, по-видимому, можно считать результатом сопряжения фотореакций двух пигментных систем.

Эти данные, а также результаты измерения обработанных пиридином листьев позволяют утверждать о связи между типом наблюдаемого ЭПР в клетке и состоянием пигментной системы.

Следует отметить, что интерпретация природы парамагнитных центров в сложном биологическом материале крайне затруднительна. В таких случаях полезную и часто решающую по значению информацию можно получить при исследовании более простых модельных систем. В связи с этим нами была начата серия исследований методом ЭПР фотохимических превращений в растворах хлорофилла и ряда порфиринов [8—10].

При 77° К в освещенных видимым светом этанольных растворах хлорофилла *b*, порфина, протопорфирина и гематопорфирина (для двух последних также в пиридиновых растворах) в поле ~1600 *э* регистрируется синглетное ЭПР-поглощение, обусловленное переходом пигментов в триплетное возбужденное состояние. В этанольных и пиридиновых растворах порфиринов также при освещении светом с длинами волн больше 380—400 *ммк* образуются и стабилизируются при низкой температуре свободнорадикальные состояния, дающие синглетный спектр ЭПР в поле 3300 *э* ($g=2$, $\Delta H = 9$—13 *э*). На примере растворов гематопорфирина в этаноле установлено, что амплитуда фотоиндуцированной синглетной полосы ЭПР значительно больше в присутствии кислоты (5%-ной HCl), чем в нейтральном спирте или в присутствии щелочи (5%-ного KOH). В этанольных растворах порфина в аналогичных условиях регистрируется многокомпонентный спектр, который представляет собой наложение синглетной полосы и полос свободнорадикальных продуктов

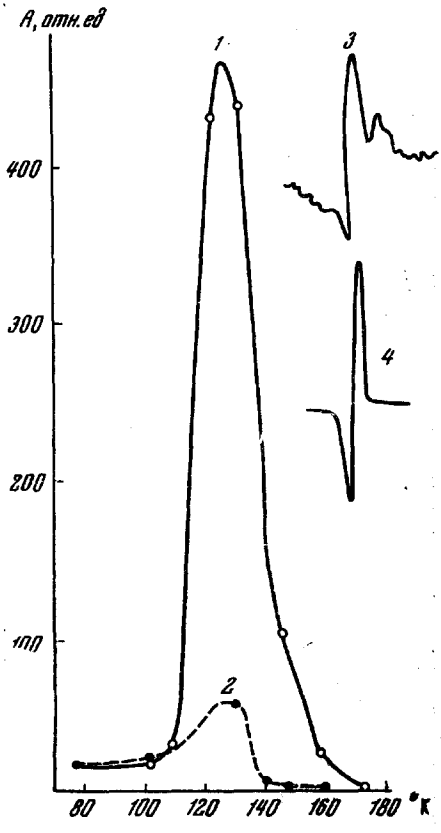


Рис. 1. Изменение амплитуды A синглетной компоненты спектров ЭПР, освещенных видимым светом спиртовых растворов порфирина в процессе размораживания образцов.

1 — в вакууме; *2* — в присутствии воздуха; *3* — исходный (77° К) спектр ЭПР; *4* — спектр ЭПР растворов, нагретых до 125—170° К;

превращения спирта (рис. 1). Разделение компонент спектра освещенного порфина удается проследить в процессе постепенного нагревания образцов от 77 до 200° К. При 110—120° К спиртовые радикалы исчезали и спектр был представлен синглетной линией. В интервале последующих 20—30° К наблюдали резкое увеличение амплитуды синглетного сигнала в 10—25 раз, а затем резкое падение ее до полного исчезновения при 180—190° К. Следует отметить, что в неэвакуированных ампулах увеличение амплитуды синглетного сигнала при промежуточных температурах было выражено значительно слабее.

Измерения спектров поглощения растворов порфина и протопорфирина при 77° К показали, что освещение вызывает резкие изменения спектров — ослабление основных полос поглощения (у порфина практически полное исчезновение) и появление новых максимумов: в порфине — при 435 *ммк*, в протопорфирине — при 455 *ммк*. В процессе размораживания образцов происходило постепенное восстановление исходных (до освещения) спектров. Картина изменения спектра порфина при размораживании оказалась сложнее. В частности, при 150—160° К происходило необратимое образование продукта с максимумами поглощения при 410 и 610 *ммк*. Появление продукта с красной полосой поглощения может свидетельствовать, по-видимому, о частичном гидрировании порфина [11]. Интересно отметить, что на промежуточных стадиях процесса фотовосстановления порфина при 293° К также появляется полоса поглощения 433 *ммк*.

Сопоставляя описанные данные измерений спектров поглощения и ЭПР, следует подчеркнуть тот факт, что, во-первых, образование свободнорадикальных состояний в системе прослеживается по спектрам ЭПР одновременно с сильным изменением спектра поглощения пигментов и, во-вторых, очевидной является одинаковая направленность изменений тех и других спектров при нагревании образцов (исчезновение ЭПР-поглощения и восстановление исходных спектров поглощения). Сходство максимума 435 *ммк* и максимума, появляющегося на начальных стадиях фотовосстановления порфина аскорбиновой кислотой (при 293° К), влияние присутствия кислорода воздуха на ход изменения спектров ЭПР при размораживании образцов, а также характер спектра поглощения необратимо образующегося продукта в растворах порфина позволяют предположить, что в регистрируемый спектр ЭПР вносят вклад промежуточные свободнорадикальные продукты реакции фотовосстановления пигмента. Большая сложность спектра ЭПР (наличие радикалов спирта) и изменений спектра поглощения в растворе порфина (по сравнению с остальными порфиринами) позволяет предположить наличие нескольких стадий фотоиндуцированных превращений в исследуемых системах. Создается впечатление, что возбужденная молекула порфин-иона более активно реагирует с молекулами матрицы, чем гематопорфирин и

протопорфирин. Таким образом, синглетная компонента спектра ЭПР освещенного порфина может принадлежать ион-радикалу пигмента, возникшему в результате восприятия электрона катионом порфина от молекулы спирта, иначе говоря, является результатом фотопереноса электрона в комплексе пигмент — растворитель.

Исследования фотохимии хлорофилла показали менее интенсивное по сравнению с порфиринами образование фотоиндуцированных свободнорадикальных состояний при 77° К. В связи с этим, помимо освещения непосредственно замороженных образцов, была использована методика освещения растворов пигментов при комнатной температуре с последующей фиксацией образующихся продуктов жидким азотом.

Фотореактивными при 77° К системами оказались растворы хлорофилла в пиридине, бензоле и этаноле (при добавлении 10—20% воды), а также хлорофилл, адсорбированный на белковом геле из спиртового раствора. При 77° К в тройных системах: пигмент (10^{-3} *моль/л*) — растворитель — восстановитель ($\geqslant 10^{-1}$ *моль/л*; аскорбиновая кислота) или окислитель ($\geqslant 10^{-2}$ *моль/л*; хинон) фотохимического взаимодействия хлорофилла (феофитина) с восстановителем или окислителем не наблюдалось. Так как при более высоких температурах, о чем будет сказано ниже, такое взаимодействие происходит, отсутствие реакции при 77° К, по-видимому, можно объяснить отсутствием необходимых для этой реакции условий диффузии реагентов.

При комнатной температуре интенсивное образование радикалов шло в спиртовых растворах хлорофилла, в водно-спиртовых растворах хлорофилла, содержащих аминокислоты — аланин и триптофан, а также в пиридиновых и пиперидиновых растворах хлорофилла *a* и феофитина *a* + *b*, содержащих аскорбиновую кислоту. В растворах пигментов с аскорбиновой кислотой после освещения и фиксации азотом регистрируется асимметричный сигнал неправильной формы. Образующиеся свободнорадикальные продукты являются короткоживущими. Если фиксирование азотом производилось не во время освещения, а после 2—5 сек. темнового периода, никакого спектра ЭПР не регистрировали. Но если такие образцы (феофитина) размораживали, то одновременно с размягчением леденца происходило изменение окраски — появлялся фиолетовый цвет. Такой фиолетовый раствор, замороженный жидким азотом, давал синглетный спектр ЭПР.

Обобщая результаты исследования фотохимии порфиринов и хлорофиллов, можно предположить, что одной из первых стадий фотохимических превращений в исследуемых системах, которая соответствует уменьшению основных полос спектров поглощения пигментов, появлению новых максимумов в синей области спектра (в порфине 435 *ммк*, в протопорфирине 455 *ммк*, в феофитине 470 *ммк*) и возникновению синглетного ЭПР-поглощения, является

донорно-акцепторное взаимодействие возбужденной молекулы пигмента с молекулами растворителя (восстановителя), образование парамагнитных центров типа комплексов с переносом заряда. Вторичные стадии процесса идут в условиях больших скоростей диффузии и связаны, возможно, с диссоциацией первично образующихся комплексов на ион-радикалы.

Относительно природы фотоиндуцированных свободнорадикальных состояний в клетке, по-видимому, можно сказать, что механизм их образования обусловлен наличием определенным образом структурированных элементов, включающих хлорофилл и его партнеров по первичным реакциям. Именно эта структурная организация обеспечивает эффективность реакций переноса электрона с близкими скоростями как при комнатной, так и при очень низких температурах.

Результаты модельных экспериментов свидетельствуют в пользу предположения о природе первичных актов фотосинтеза как донорно-акцепторном взаимодействии возбужденной молекулы пигмента с соответствующими химическими компонентами хлоропластов, выполняющими роль доноров или акцепторов электрона. Весьма вероятно, что спектр ЭПР, фотоиндуцированный при 77° К in vivo, в значительной степени обусловлен образованием парамагнитных центров типа комплекса с переносом заряда, одним из компонентов которого является хлорофилл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Т. Рихирева, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский. 1964. Биофизика, 9, 390.
2. Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский, Л. П. Каюшин. 1964. Докл. АН СССР, 156, 1451.
3. B. Commoner. 1961. Sympos. Light and Life. Baltimore. John Hopkins Press,, 356.
4. G. M. Androes. 1962. Biophys. J., 2, N 2, pt 2, 217.
5. W. H. Storey, C. M. Monita, D. G. Cadena. 1962. Nature, 195, N 4845, 963.
6. R. W. Treharne, C. W. Melton, R. M. Roppel. 1964. J. Molec. Biol., 10, N 1, 57.
7. G. Tollin, G. Green. 1962. Biochim. et biophys. acta, 60, 524.
8. Г. Т. Рихирева, А. В. Умрихина, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский. 1965. Докл. АН СССР, 163, 491.
9. Г. Т. Рихирева, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. В. Умрихина, А. А. Красновский. 1964. Докл. АН СССР, 159, 196.
10. Г. Т. Рихирева, А. В. Умрихина, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский. 1965. Докл. АН СССР, 163, 219.
11. Е. Рабинович. 1953. Фотосинтез, т. 2, М., ИЛ.

Доклады Академии наук СССР
1967. Том 175, № 6

УДК 581.132

БИОХИМИЯ

А. В. УМРИХИНА, Г. А. ЮСУПОВА,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ АНАЛОГОВ ХЛОРОФИЛЛА В КИСЛЫХ СРЕДАХ

Обратимое фотохимическое восстановление порфиринов было обнаружено в нашей лаборатории [1]; наблюдалось образование восстановленных форм с максимумами поглощения при 740 и 650 мμ, связанных условиями кислотно-основного равновесия [2]. В водном растворе серной кислоты реакция приводила к образованию формы с максимумом 500 мμ, обратимо окисляющейся в исходный пигмент [3].

Мазерол [4, 5] детально изучал фотовосстановление порфиринов и показал, что «форма 500» образуется под действием света из «первой» формы с максимумами 440 и 750 мμ.

Фотовосстановление порфиринов описано в недавних обзорах Гуриновича [6] и Сидорова [7]. Исследованию фотовосстановления порфириновых пигментов в кислых средах уделялось гораздо меньше внимания, чем изучению этой реакции в среде оснований [8].

В настоящей работе проводилось сравнительное исследование восстановления в кислых средах протопорфирина, гематопорфирина, протофеофитина, феофитина а, бактериофеофитина — пигментов, различающихся по степени восстановленности «полуизолированных» двойных связей.

Реакцию проводили в водной кислой среде и кислом этаноле (5% HCl) при температуре от +20 до —196°. Пигменты выделяли принятыми в нашей лаборатории методами с конечной хроматографией на сахарозе. Освещение лампой 300 вт накаливания с конденсором без светофильтра (10^5 эрг/см^2·сек). Запись спектров поглощения производили на регистрирующем спектрофотометре СФ-10. На рис. 1*А* видно, что гематопорфирин восстанавливается с образованием трех форм. Форма I (рис. 1*А*, *2*) с максимумами поглощения при 440 и 750 мμ образуется при освещении раствора пигмента в вакууме с аскорбиновой кислотой в 5% HCl при температуре от +20 до —10° и в кислом этаноле лишь при —70°. В условиях комнатной температуры в спирте не наблюдается образования этой формы. Пуск воздуха к форме I вызывает превращение ее в исходный пигмент. Кратковременное (5—10 сек.) действие света на восстановленную форму I чрезвычайно ускоряет ход обратного процесса, приводя к мгновенной регенерации порфирина.

Если раствор продолжать освещать после образования предельного количества продукта с максимумами 440 и 750 мμ, то поглощение в этих максимумах начинает падать и одновременно растет поглощение при 500 мμ (форма II). Дальнейшее освещение раствора с формой II приводит к его обесцвечиванию. Таким образом, форма II образуется в результате превращения формы I под действием света в вакууме. В водной кислой среде этот переход можно отчетливо наблюдать при комнатной температуре (рис. 1*А*, 3*а*, 3*б*).

В присутствии воздуха форма II медленно, но не полностью регенерирует в исходный пигмент, причем освещение ее на воздухе не ускоряет хода обратной реакции (сравни действие света на форму I на воздухе).

В отличие от водной среды, в кислом этаноле форма I отчетливо образуется только при —70°; при +20° в ходе освещения одновременно появляются два продукта: с максимумом 500 мμ — это форма II, и с максимумом около 625 мμ — мы обозначаем его как форму III (рис. 1*А*, *4*). Эта форма, обладающая полосой поглощения в красной области спектра, ха-

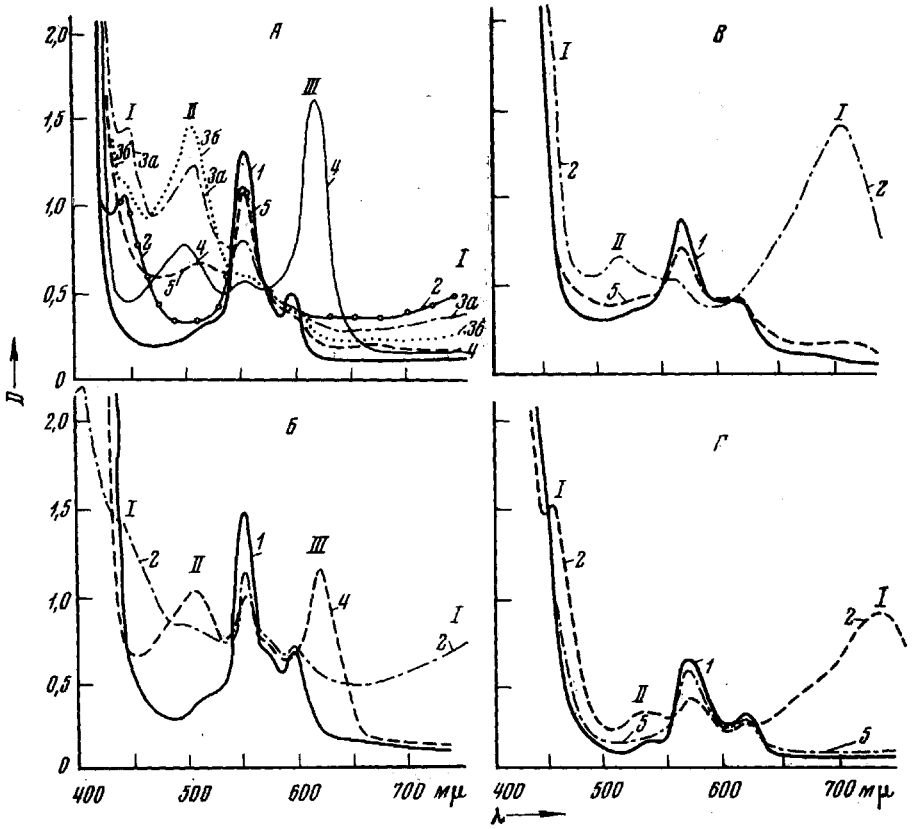


Рис. 1. Фотовосстановление порфиринов аскорбиновой кислотой в вакууме в кислых средах. *А* — гематопорфирин, *Б* — протопорфирин, *В* — протофеофитин, *Г* — производное протофеофитина с разорванным циклопентаноновым кольцом. *1* — исходный пигмент в 5% HCl или кислом этаноле; *2* — после освещения раствора при —70° в кислом этаноле или при —10° в 5% HCl; *3а*, *3б* — в ходе освещения гем атопорфирина при комнатной температуре в 5% HCl; *4* — при освещении раствора в кислом этаноле при комнатной температуре; *5* — в ходе обратной реакции после пуска воздуха в темноте

рактерной красной флуоресценцией (формы I и II не флуоресцируют), и интенсивной полосой Соре, соответствует хлорину.

Аналогичные результаты, т. е. последовательное образование трех форм: 440/750; 500 и 625 мμ получены в ходе фотовосстановления протопорфирина в кислой среде — воде и этаноле (рис. 1*Б*).

При фотовосстановлении протофеофитина (рис. 1*В*) и его аналога с разорванным при действии сильных оснований циклопентаноновым кольцом (рис. 1*Г*) удалось обнаружить две формы: первую — с максимумами поглощения 470 и 720 мμ, и вторую — с максимумом 520 мμ. Форма II образовалась в незначительном количестве: перехода ее в форму III (хлорин), которая в данном случае представляла бы феофитин, в наших условиях обнаружить не удалось.

При фотовосстановлении феофитина в кислом этаноле (рис. 2*А*) при +20 и —70° обнаруживается восстановленная форма с максимумом в обла-

сти 500—520 мμ; поглощение в области 600—700 мμ увеличивается. В дифференциальном спектре («свет» минус «темнота») намечается максимум около 630—640 мμ, который можно приписать восстановлению феофитина до бактериофеофитина в цис-форме ([9]). Необходимо отметить, что при восстановлении феофитина (хлорина) форма с максимумами 440 и 750 мμ, столь характерная для порфиринов, отсутствовала, тогда как положение максимума поглощения формы II порфиринов (500—520 мμ) и восстановленной формы феофитина (500—520 мμ) и свойства этого продукта в обоих случаях сходны.

Восстановление бактериофеофитина (рис. 2*Б*) в кислом этаноле приводит к обесцвечиванию раствора, при этом не появляются новые максиму-

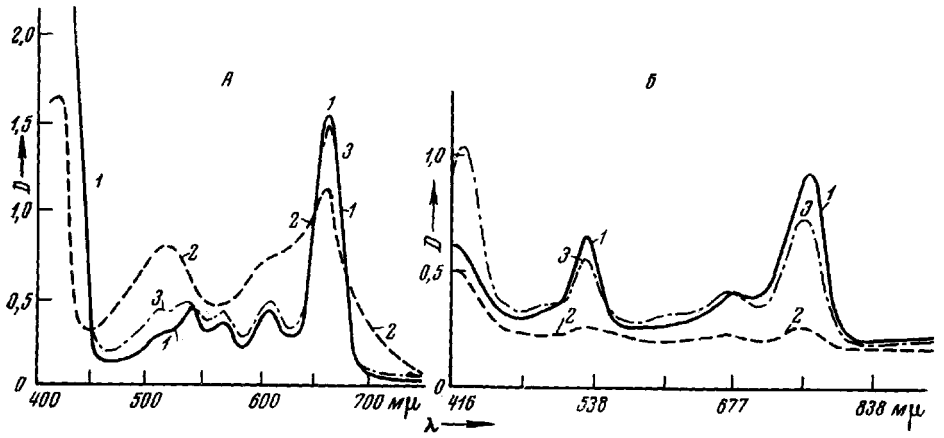


Рис. 2. Фотовосстановление феофитина (*А*) и бактериофеофитина (*Б*) в кислом этаноле (5% HCl) аскорбиновой кислотой в вакууме. *1* — исходный пигмент, *2* — после освещения; *3* — после обратной реакции

мы поглощения в видимой области спектра. После пуска воздуха регенерирует исходный пигмент с одновременным образованием побочного продукта с максимумом при 426 мμ.

Мы исследовали действие света на растворы пигментов в кислом этаноле без восстановителя при температуре жидкого азота. Ранее в этих условиях мы наблюдали возникновение сигнала э.п.р. ([10]).

Оказалось, что изменение спектра поглощения наблюдается только при освещении растворов гемато- и протопорфирина. Так, в ходе освещения гематопорфирина при —196° появляется максимум при 440 мμ (рис. 3, *2*). Из сравнения свойств этого продукта со спектром восстановленной формы I видно, что в этих условиях длинноволновый максимум отсутствует, тогда как положение коротковолнового максимума совпадает. Возможно, что форма 440 мμ является свободным радикалом, определяющим появление сигнала э.п.р. ([10]). После размораживания раствора поглощение при 440 мμ быстро падало, увеличивалось поглощение в исходном максимуме и одновременно появлялся новый максимум при 630 мμ (хлорин).

Эти опыты свидетельствуют о том, что при температуре жидкого азота возможен фотохимический перенос электрона между пигментом и растворителем с образованием свободных радикалов, при этом донором электрона служит растворитель. Существенно то, что введение восстановителя (аскорбиновой кислоты) во всех опытах при —196° не приводило к увеличению эффекта. Рассмотрение полученного материала указывает на то, что спектральные свойства продуктов восстановления определяются главным образом уровнем восстановления исследуемого пигмента.

Порфирины, имеющие в молекуле две «полуизолированные» двойные связи, восстанавливаются с образованием двух промежуточных форм

(440/750 и 500 мμ), при этом в качестве конечного продукта реакции возможно образование, наряду с исходным порфирином, хлорина (635 мμ) и, вероятно, бактериохлорина. Наличие циклопентанонового кольца и боковых заместителей, имеющихся в пигментах группы хлорофилла, накладывает ограничения, по-видимому, стерического характера на возможность перехода формы I или II в хлорин (в данном случае в феофитин). Продукты восстановления порфирина по уровню восстановления соответствуют хлорину (дигидроформа 440/750 мμ), восстановленным хлоринам (тетрагидроформа 500 мμ), которые в благоприятных условиях могут изомеризоваться в бактериохлорин.

Хлорины восстанавливаются с образованием одной восстановленной формы 500 мμ, возможно соответствующей по уровню восстановления форме II порфиринов, или бактериохлоринам. Поэтому понятно, что бактериохлорины не могут восстанавливаться с образованием продуктов, имеющих поглощение в видимой области спектра. Общая картина восстановления в кислых средах сходна с таковой в основных средах, например в пиридине.

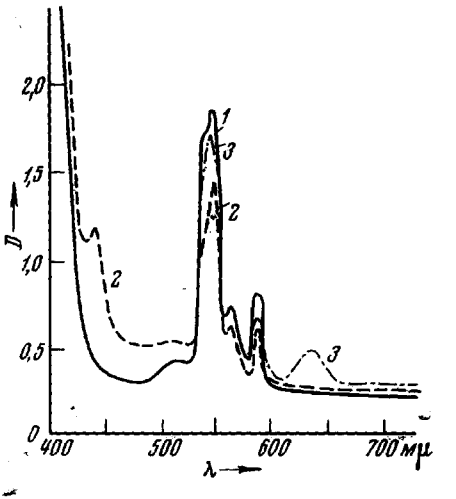


Рис. 3. Спектральные изменения гематопорфирина в кислом этаноле при —196° в вакууме без восстановителя. *1* — исходный пигмент; *2* — после длительного освещения, *3* — после обратной реакции при комнатной температуре

Совокупность данных позволяет представить следующую упрощенную схему светового восстановления порфиринов:



При осуществлении темнового и фотохимического восстановления порфиринов доминируют показанные на схеме формы, в качестве промежуточных продуктов образуются «одноэлектронные» формы типа свободных радикалов, которые в зависимости от кислотно-основных свойств среды могут быть анион- или катион-радикалами.

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

Поступило
18 V 1967

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **96**, 1209 (1954). [2] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **120**, 581 (1958). [3] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, **122**, 1061 (1958). [4] D. Mauzerall, J. Am. Chem. Soc., **82**, 1834 (1960). [5] D. Mauzerall, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2438 (1962). [6] Г. П. Гуринович, В кн. Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 83. [7] А. Н. Сидоров, В кн. Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 267. [8] А. А. Красновский, Усп. хим., **29**, 736 (1960). [9] G. R. Seely, K. Talmadge, Photochem. Photobiol., **3**, 165 (1964). [10] Г. Т. Рихирева, А. В. Умрихина, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский, ДАН, **163**, 491 (1965).

Доклады Академии наук СССР
1967. Том 175, № 3

УДК 541.14 + 547.979.4

БИОХИМИЯ

А. К. ЧИБИСОВ, А. В. КАРЯКИН, Н. Н. ДРОЗДОВА,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ В РЕАКЦИИ ФОТООКИСЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ *n*-ХИНОНОМ

Изучение обратимых фотохимических окислительно-восстановительных превращений хлорофилла представляет интерес в связи с механизмом участия пигментов в первичных реакциях фотосинтеза. Было показано ([1, 2]), что под действием непрерывного освещения охлажденного до —70° раствора хлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина в спирто-глицериновой смеси в присутствии *n*-хинона происходит обратимое изменение спектра поглощения пигментов. При комнатной температуре изменений в поглощении не наблюдалось вследствие малого времени жизни промежуточных (переходных) состояний, ответственных за появление нового спектра поглощения. Низкая температура и вязкая среда способствуют стабилизации промежуточных состояний хлорофилла; в сходных условиях ранее наблюдалось появление сигнала э.п.р., обусловленного образованием радикала семихинона ([3, 4]). Для растворов феофитина эти условия стабилизации (—70°) переходных состояний оказались недостаточными, и изменения в поглощении не удалось наблюдать. Вместе с тем мы смогли фиксировать обратимые кратковременные спектральные изменения при комнатной температуре при импульсном фотовозбуждении хлорофилла в этаноле в присутствии хлоранила ([5]). В кислой спиртовой среде реакция с *n*-хиноном идет глубже, и потенциометрические измерения указывают на образование электродноактивных промежуточных продуктов ([6]).

Настоящая работа является продолжением начатых исследований и посвящена изучению взаимодействия фотовозбужденных молекул хлорофиллов a, b и феофитина a с *n*-хиноном в этаноле при комнатной температуре.

Измерения проводили методом импульсного фотолиза ([7]). Растворы пигментов в этаноле (ректификат, разогнанный на колонке) возбуждали световым импульсом 300—600 дж ($\tau_{1/2} = 4 \cdot 10^{-5}$ сек.) через красный фильтр КС-10, что, в частности, исключало возбуждение *n*-хинона. Отдельные опыты проводили с растворами пигментов, содержащих гидрохинон. Концентрации пигментов составляли 10^{-6} г-мол/л, *n*-хинона и гидрохинона 10^{-3} г-мол/л.

Импульсное освещение дегазированных растворов хлорофиллов a и b в этаноле в присутствии *n*-хинона приводит к кратковременным изменениям спектра поглощения пигментов. На рис. 1 приведены разностные (дифференциальные) спектры поглощения, полученные вычислением из спектра пигментов в промежуточном (переходном) состоянии спектра синглет-синглетного поглощения. Из рассмотрения дифференциальных спектров поглощения следует, что под действием фотоимпульса происходит выцветание (ослабление) основных полос поглощения хлорофиллов. Одновременно в «зеленой» области спектра, а также в области 400—410 мμ наблюдается усиление поглощения в результате появления новых полос. Приведенные дифференциальные спектры похожи на спектры продуктов, измеренных в спирто-глицериновых средах при стационарном освещении ([8]). Появление поглощения при 400—410 мμ характерно для

радикалов семихинона [9]. В случае феофитина в тех же условиях эксперимента не удалось наблюдать изменений оптической плотности в «красном» максимуме поглощения пигмента и в «зеленой» области спектра, однако в «синей» области наблюдается интенсивная полоса с максимумом при 430 мμ (см. рис. 1), характерная для радикала семихинона [9]. В описанных условиях мы исследовали возможность фотовосстановления хлорофилла а и феофитина а гидрохиноном. Однако при концентрации гидрохинона 10^{-3} г-мол/л не было обнаружено тушения триплетного состояния пигментов. Осциллограммы спектральных изменений пигментов под действием фотоимпульса состоят из одной короткоживущей компоненты, характерной для триплетного состояния пигментов, в отличие от осциллограмм, измеренных для растворов пигментов в пиридине в присутствии аскорбиновой кислоты [10]. Таким образом, описанные обратимые изменения спектров поглощения в реакции возбужденных молекул хлорофиллов с *n*-хиноном следует связать с обратимым фотоокислением пигмента, а не с фотовосстановлением гидрохинона, обычно находящимся в равновесии с *n*-хиноном. На это указывает также тот факт, что присутствие O_2 воздуха в импульсно освещаемом растворе пигмента, содержащего *n*-хинон, не сказывается на величине спектральных изменений. Реакция также не наблюдается с избытком гидрохинона; кроме того, в случае феофитина, дающего более устойчивые фотовосстановленные формы по сравнению с хлорофиллом, отсутствуют характерные для радикал-аниона поглощение в «зеленой» области и выцветание в «красном» максимуме пигмента.

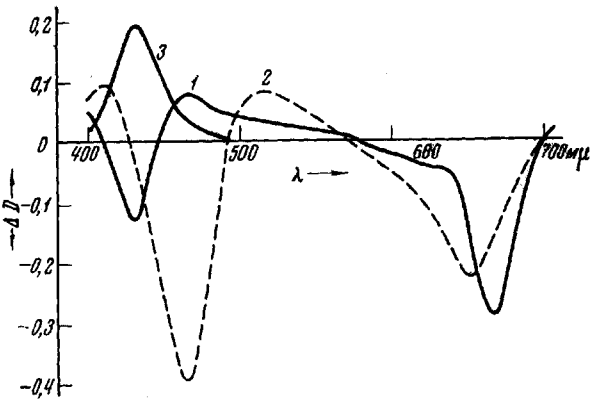


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения продуктов фотовозбуждения хлорофилла а (*1*), хлорофилла b (*2*) и феофитина а (*3*) в этаноле в присутствии *n*-хинона

Таким образом, вероятным объяснением дифференциального спектра, наблюдаемого под импульсным освещением пигментов в присутствии *n*-хинона, является образование радикалов пигментов и семихинона:

$$Хл^* + Q \rightarrow \cdot Хл^+ + \cdot Q^-, \quad (1)$$

$$Хл(Т) + Q \rightarrow \cdot Хл^+ + \cdot Q^-, \quad (2)$$

$$\cdot Q^- + H^+ \rightleftarrows \cdot QH, \quad (3)$$

где $Хл^*$ — синглетно-возбужденное и Хл(Т) — триплетное состояние хлорофилла; Q — основное состояние *n*-хинона.

Кинетические измерения гибели радикалов $\cdot Хл^+$ и $\cdot Q^-$ позволили установить высокую эффективность реакции рекомбинации:

$$\cdot Хл^+ + \cdot Q^- \rightarrow Хл + Q. \quad (4)$$

Многократное импульсное освещение раствора пигмента и *n*-хинона приводит к полной регенерации пигмента после прекращения возбуждения. Измерения кинетики регенерации хлорофилла, проводимые при $\lambda =$ $=$ 665 мμ для хлорофилла а, обнаружили существование наряду с реакцией (4) реакции (5):

$$\cdot Хл^+ + C_2H_5OH \rightarrow Хл + \cdot C_2H_5OH^+. \quad (5)$$

Уравнение для скорости гибели $\cdot Хл^+$ запишется в виде

$$\frac{d}{dt}\ln \Delta D_0/\Delta D = K_5 [C_2H_5OH] + \frac{K_4}{\Delta\varepsilon_{665} l}\Delta D \quad (1),$$

преобразованном из (4) и (5) заменой выражения для концентрации $[\cdot Хл^+]$ через ΔD, где ΔD_0 (ΔD) — изменение оптической плотности, измеренной к моменту $t_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ сек. после вспышки и к последующему времени соответственно; $\Delta\varepsilon_{665} = \varepsilon_{665}^{\cdot Хл^+} - \varepsilon_{665}^{Хл}$. На рис. 2 представлена полученная зависимость для трех независимых измерений, выполненных на растворе хлорофилла a и *n*-хинона, откуда $K_5 = (8{,}6 \pm 2{,}1) \cdot 10^2$ сек$^{-1}\cdot$м$^{-1}\cdot$л и $K_4 = (2{,}0 \pm 0{,}5) \cdot 10^9$ сек$^{-1}\cdot$м$^{-1}\cdot$л при условии, что $\varepsilon_{665}^{\cdot Хл^+} \ll \varepsilon_{665}^{Хл} = 6{,}9 \cdot 10^4$ м$^{-1}\cdot$л$\cdot$см$^{-1}$ (11). В присутствии O_2 воздуха скорость гибели $\cdot Хл^+$ увеличивается. Измерения скорости реакции (4), проведенные для хлорофилла b при $\lambda = 660$ мμ, обнаружили, что гибель $\cdot Хл^+$ следует уравнению 2-го порядка, откуда $K_4' / \Delta\varepsilon_{660} = (1{,}6 \pm 0{,}3) \cdot 10^5$ сек$^{-1}\cdot$см, где K_4' — константа скорости реакции (4) для хлорофилла b и $\Delta\varepsilon_{660} = \varepsilon_{660}^{\cdot Хл^+} - \varepsilon_{660}^{Хл}$. Так как $\varepsilon_{660}^{\cdot Хл^+} \ll \varepsilon_{660}^{Хл}$ и полагая $\varepsilon_{660}^{Хл} = 2{,}9 \cdot 10^4$ м$^{-1}\cdot$л$\cdot$см$^{-1}$, оцениваем $K_4' = (4{,}7 \pm 1{,}2) \cdot 10^9$ сек$^{-1}\cdot$м$^{-1}\cdot$л. Измерения, выполненные при $\lambda = 470$ мμ, обнаружили подчиняемость скорости гибели $\cdot Хл^+$ уравнению 1-го порядка. Кроме того, степень регенерации хлорофилла b после вспышки значительно меньше, чем у хлорофилла a. По-видимому, реакция взаимодействия $\cdot Хл^+$ с молекулами среды необратима и ответственна за 1-й порядок реакции.

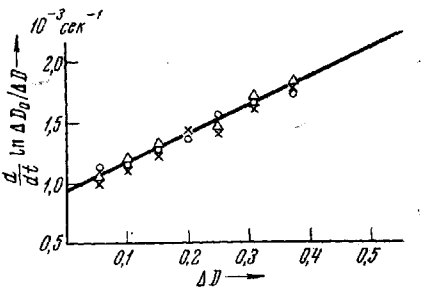


Рис. 2. Графическое определение констант скоростей гибели радикал-катиона хлорофилла a в этаноле в присутствии *n*-хинона

Измерения, проведенные при $\lambda = 410$ мμ, позволили проследить за путями превращения $\cdot Q^-$. Скорость гибели $\cdot Q^-$ подчиняется уравнению 2-го порядка в результате реакции (4) и реакции диспропорционирования $\cdot Q^-$ (9):

$$2 \cdot Q^- \rightarrow Q^{=} + Q, \quad (6)$$

откуда $(K_4' + K_6) / \Delta\varepsilon_{410} = (1{,}5 \pm 0{,}4) \cdot 10^5$ сек$^{-1}\cdot$см, где $\Delta\varepsilon_{410} = (\varepsilon^{\cdot Q^-} - \varepsilon^{Q})_{410} - (\varepsilon^{\cdot Хл^+} - \varepsilon^{Хл})_{410}$.

Из сравнения результатов, полученных для реакции обратимого фотоокисления хлорофиллов a и b *n*-хиноном, следует, что радикал-ион хлорофилла a более стабилен, чем радикал-ион хлорофилла b. Подобное обстоятельство нами уже отмечалось при наблюдении за кинетикой гибели радикал-ионов хлорофиллов a и b, генерируемых импульсным освещением хлорофилла a + b в присутствии хлоранила (5).

Известно (12), что способность пигментов к обратимому фотоокислению уменьшается в ряду хлорофилл a — феофитин b. Последнее обстоятельство, вероятно, связано с различием в устойчивости радикал-ионов пигментов. В таком случае отсутствие поглощения в «зеленой» области спектра и отсутствие выцветания «красной» полосы феофитина a под действием фотоимпульса в присутствии *n*-хинона связано с малым временем жизни радикал-иона пигмента. Вероятно, образующийся радикал-ион $ФФа^+$ энергично взаимодействует с C_2H_5OH, что приводит к регенерации пигмента:

$$ФФа\,(Т) + Q \rightarrow \cdot ФФа^+ + \cdot Q^-, \quad (7)$$

$$\cdot ФФа^+ + C_2H_5OH \rightarrow ФФа + \cdot C_2H_5OH^+. \quad (8)$$

В таком случае время жизни $\cdot ФФа^+ \leqslant 4 \cdot 10^{-5}$ сек. (время разрешения установки). Наблюдающаяся полоса при $\lambda = 430$ мμ относится к $\cdot Q^-$.

Измерения кинетики гибели $\cdot Q^-$, выполненные при $\lambda = 430$ мμ, обнаружили справедливость применения уравнения 2-го порядка, откуда $(K_6 + K_9) / \Delta\varepsilon_{430} = (6 \pm 1) \cdot 10^3$ сек$^{-1} \cdot$ см, при этом

$$\cdot Q^- + \cdot C_2H_5OH^+ \rightarrow Q + C_2H_5OH. \quad (9)$$

При проведении измерений в подкисленной среде было обнаружено смещение полосы при 430 мμ до 410 мμ в соответствии со смещением равновесия (3) в сторону $\cdot$QH.

Таким образом, можно считать, что элементарный механизм реакции фотоокисления пигментов *n*-хиноном в вязких спиртово-глицериновых средах и спиртовых растворах под действием импульсного освещения одинаков; различие заключается в том, что в вязких средах под действием стационарного освещения происходит накопление промежуточных продуктов, стабилизирующихся в этих условиях, в то время как в спиртовом растворе при комнатной температуре происходят быстрые реакции первичных продуктов.

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

Поступило
6 IV 1967

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1378 (1963); **153**, 721 (1963). [2] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, **30**, 605 (1965). [3] G. Tollin, G. Green, Biochem. et biophys. acta, **60**, 524 (1962). [4] G. Tollin, K. Chatterjee, G. Green, Photochem. Photobiol., **4**, 593 (1965). [5] А. К. Чибисов, А. В. Карякин, М. Е. Зубрилина, ЖФХ, **39**, 2291 (1965). [6] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **165**, 1435 (1965). [7] А. К. Чибисов, А. В. Карякин. Оптика и спектроскопия, **15**, 636 (1963). [8] А. А. Красновский, В сборн. Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 213. [9] N. K. Bridge, G. Porter, Proc. Roy. Soc., **A224**, 259, 276 (1958). [10] А. К. Чибисов, А. В. Карякин, М. Е. Зубрилина, ДАН, **161**, 483 (1965). [11] G. R. Seely, R. G. Jensen, Spectrochim. acta, **21**, 1835 (1965). [12] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **100**, 131 (1955).

studia biophysica

Sonder-
druck

studia biophysica

Mitteilungsblatt der Gesellschaft für reine und angewandte Biophysik in der Deutschen Demokratischen Republik

Herausgegeben im Auftrage des Vorstandes der Gesellschaft von
Prof. Dr. rer. nat. habil. Karlheinz Lohs,
Direktor des Institutes für Biophysik der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Forschungsgemeinschaft, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Redaktion: Adalbert Rakow
Institut für Biophysik der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Forschungsgemeinschaft, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Das Mitteilungsblatt der Gesellschaft für reine und angewandte Biophysik in der DDR dient den Mitgliedern und Freunden der Gesellschaft zur gegenseitigen Schnellinformation über eigene wissenschaftliche Arbeiten in Form von Kurzmitteilungen. Die Hefte erscheinen zweimonatlich; Übersichtsreferate und in Ausnahmefällen größere Originalarbeiten sowie Tagungsberichte werden nach Bedarf in Sonderheften publiziert. Von Verlagen eingesandte Besprechungsexemplare werden in kürzest möglicher Zeit referiert.

Manuskripte nehmen der Herausgeber oder die Redaktion entgegen. Die Hefte erscheinen in der Mitte der Monate Februar, April, Juni, August, Oktober und Dezember. Wenn die angenommenen Manuskripte bei Redaktionsschluß, jeweils am 10. Tag des Vormonats, in reproduzierbarer Form in der Redaktion vorliegen, erscheinen die Arbeiten innerhalb von etwa 4 Wochen. Die Autoren müssen darauf achten, daß bei der Herstellung der Manuskripte die Schreibanleitung genau eingehalten wird. Die Manuskripte werden fotografisch verkleinert und im Offsetverfahren gedruckt. Sie erscheinen genau so, wie sie eingereicht werden, ohne jede Bearbeitung. **Der Autor ist deshalb nicht nur für den wissenschaftlichen Inhalt des Manuskriptes, sondern auch für den Stil, die Rechtschreibung und die äußere Form voll verantwortlich.** Eine Fahnenkorrektur erfolgt nicht. Angenommene Arbeiten, die nicht direkt fotografisch reproduzierbar sind, erhält der Einsender mit einer Schreibanleitung zum Neuschreiben zurück. Als Entgelt werden den Autoren nach dem Erscheinen des Mitteilungsblattes insgesamt 50 Sonderdrucke kostenlos zur Verfügung gestellt. Wird eine größere Anzahl von Sonderdrucken gegen Erstattung der Unkosten gewünscht, ist dies bei Manuskripteinsendung zu vermerken; eine Bestätigung der Bestellung erfolgt bei Annahme des Manuskriptes.

Alle Rechte der in diesem Mitteilungsblatt abgedruckten Beiträge liegen bei den jeweiligen Autoren.

Copyright by the authors.

studia biophysica, Berlin, Band 5, 1967, S. 165 – 170
Printed in the German Democratic Republic

THE PARTICIPATION OF CHLOROPHYLL AND BACTERIOCHLOROPHYLL IN PHOTOSYNTHETIC HYDROGEN TRANSFER

A. A. KRASNOVSKY
A. N. Bach Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences
Moscow, USSR

Vortrag gehalten auf dem Symposium "Plastidenpigmente und ihre Rolle im Photosyntheseprozeß", Gatersleben, 2.–6. Oktober 1967

Herein is presented a brief summary of the studies of my laboratory on the photochemistry of chlorophyll and its analogs, the state of pigments in organisms, their transformations and function in the electron transfer chain.

The properties of chlorophyll, bacteriochlorophyll, bacterioviridin (chlorobium chlorophyll) and their analogs and derivatives in solutions, solid films and in living organisms are compared.

I begin with photochemistry. Excited pigments easily react with electron donors such as ascorbic acid and dienols, some ferrous compounds, $NADH_2$, hydroquinone, phenylhydrazine etc. In the course of the reaction intermediate free radicals were traced (by ESR and polymerisation technique) as well as the more stable photoreduced compounds (such as the "pink" reduced chlorophyll). The unpaired electron of the ion-radical molecule is probably located in the π-electron system of circulary conjugated double bonds of the pigment molecule; the location of hydrogen atoms in more stable intermediates is still unclear.

The photoreduced pigments easily react with oxidants, regenerating the initial pigment molecule. Among the oxidants we used are oxygen, quinones, safranine, riboflavin, viologens, NAD and NADP, etc.

The reduced pigments easily exchange the central magnesium atom for hydrogen; thus photochemical pheophytin formation is a criterion of reversible photoreduction.

We have studied the reversible photooxidation of pigments

by p-quinon in viscous glycerol-alcohol media at -70°C; the intermediate photooxidized pigments are stabilized and react back upon thawing. In the case of p-quinone an one-electron reversible reaction occurs; the reaction with o-quinone which is accelerated by light is irreversible at +20°C and in the case of bacteriochlorophyll leads to chlorophyll-like products; at -70°C the reaction is reversible.

Oxidized chlorophyll and its analogs react with reductants - ascorbic acid, phenylhydrazine, thiourea, etc. regenerating the initial pigment. Unlike reduced pigments, in oxidized pigments the central magnesium atom is stable with respect to hydrogen exchange. After photooxidation of pigments by oxygen, chemiluminescence was found to be inhibited by free radical scavengers.

Photosensitized hydrogen (electron) transfer was studied in triple systems (electron donor-pigment-electron acceptor) illuminated in the longwave absorption band of the pigments. We used as electron donors ascorbic acid, cysteine, thiourea, $NADH_2$, etc. and as electron acceptors - oxygen, different dyes, pyridine nucleotides, viologens. Illumination of chlorophyll solutions (in alcohol, pyridine, aqueous media with detergents) containing cysteine and methylviologen leads to sensitized reduction of more than 30% of the viologen dye.

The elementary mechanism of the reactions studied involves primary oxidation or reduction of the pigment-sensitizer accompanied by "dark" stage of the photoproducts with an electron donor or acceptor molecule. The predominance of a given type of primary photoreaction depends on the nature of the medium and on the properties of the reactants.

The question is what mechanism of electron transfer is operative in living organisms. Elucidation of this problem requires a knowledge of the state of pigments in living cells. The absorption and fluorescence spectra of pigments in cells are shifted towards long waves compared with dissolved pigments.

Some years ago we found that pigment solid films and colloids reveal the types of aggregation observed in living

cells. Chlorophyll a solid films (obtained by evaporation of ether solution) has an absorption maximum near 680 nm; in water vapour a shoulder appears at 705-715 nm; the vapours of methanol, ethanol, aqueous solutions of acetaldehyde, formaldehyde and ammonia produced the crystalline from absorbing at 740-745nm. Solid films of bacteriochlorophyll usually possess two absorption maxima, at 800 and 860 nm; in the vapours of water, alcohols or acetaldehyde containing ether a longwave maximum appears at 900-920nm. Chlorobium chlorophyll films display the same longwave shift (740-760 nm) as that of the pigment in green bacteria. Similar effects are seen in low temperature fluorescence spectra of aggregated pigments.

To study the pigment forms separately one must fractionate the solubilized chloroplast and chromatophore material. There is a danger of chlorophyllide formation as an artifact in the case of tissues having active chlorophyllase (sugar beet leaves, chenopodium); we have separated this component by centrifugation along with the "shortwave" forms of chlorophyll.

Successful fractionation of solubilized chloroplast material on acrylamide gel (Shibata) requires a study of the properties of the isolated fraction. This technique was used in our laboratory to fractionate the "890" form bound to cytochrome and the "850" forms probably bound to lipoproteins. The results are in agreement with Vernon et al. who resolved the fractions by using an ultracentrifuge.

The problem is to observe the pigment transformations in intact living cells. A study of green leaves light-dark differential spectra revealed a pronounced red fluorescence burst (excited by scanning monochromatic beam) induced by the actinic light pulse. This phenomenon prevented the measurement of small optical density changes in the red.

The light-dark spectra observed in the case of bacteria differ from the oxidoreductive spectral changes. A study of light-dark spectra during thermal inactivation of purple bacteria showed the difference between the properties of 890, 800 nm maxima and the 850 nm maximum may be due to functional differences of these forms.

According to the wide spread ideas the migration of excitation energy from different pigment forms proceeds to the longwave pigment (reaction center) involved into the reactions of electron transfer.

The mechanism of light energy conversion at the level of the lowest trap (reaction center) is a matter of discussion and both working hypotheses are valid - that of reversible oxidoreductive transformation of the excited pigment molecule and that of electron tunnelling through the conduction band of the longwave aggregated pigment from electron donor to electron acceptor in the photosynthetic electron transfer chain. By considering both elementary events as an electron exchange in the pigment molecule it may be possible to bridge the gap between the two extreme points of view.

D I S C U S S I O N

Amesz: I think that there is reasonably good evidence that the absorption difference band at 515 nm is due to some reactions of chlorophyll b, rather than of chlorophyll a. The change is correlated with an absorption decrease at 480 nm and, as WITT's group has found, at 650 nm, were the absorption bands of chlorophyll b in vivo are. Moreover, these absorption changes are absent in blue-green and red algae, which do not have chlorophyll b, and in a barley mutant which does not contain chlorophyll b, but has a normal rate of photosynthesis.

Krasnovsky: I suppose the 515 nm band in difference spectra has two or three components; may be, one of them is due to chlorophyll b, but it is not clear now.

Frackowiak: Have you measured chemiluminescence immediately after photooxidation of chlorophyll?

Krasnovsky: Yes, there are two components - one short duration afterglow and a long one, lasting minutes.

Frackowiak: Are the chlorophyll films fluorescent or not?

Krasnovsky: Yes, the fluorescence is enhanced at liquid nitrogen temperature.

Sironval: You have presented curves showing the changes of the low temperature fluorescences at 730 and 680 nm during greening of etiolated leaves after their transfer in light. I think, it is worthwhile for discussion of these changes and especially the 730 nm increase, to take in account the fact, that the pigments accumulate, and that the absorption at 680 nm increases during greening. This increase in absorption at 680 nm may cause a selective reabsorption of fluorescence at 680 nm, and cause in this way a relative increase of the fluorescence observed at longer wavelengths.

Krasnovsky: You are right for the 680 nm maximum; the long-wave one at 740 nm does not undergo selfabsorption. To avoid selfabsorption we used very thin layers.

Sapozhnikov: In what way are the spectra influenced by the cytochrome changes?

Krasnovsky: The cytochrome absorption lies in another spectral region.

SCHREIBANLEITUNG (überarbeitet Januar 1967)

1. Die Manuskripte sind mit **Schreibmaschine** normaler Schriftgröße (keine Perlschrift) zweizeilig (eine ganze Zeile Zwischenraum) auf reinweißem holzfreien **Papier** mit Abmessungen von 21 cm × 29,7 cm (DIN A 4) ohne Durchschlag zu schreiben. Die wissenschaftlichen Kurzmitteilungen sollen einen **Umfang** von 8 Seiten nicht überschreiten; aus drucktechnischen Gründen wird jedem Autor eine gerade Anzahl von Seiten (2, 4, 6 oder 8 Manuskriptseiten) zur Verfügung gestellt.

2. Beim Schreiben ist an den Seiten ein **Rand** von je 2 cm und unten von 1,5 cm frei zu lassen. Auf der ersten Seite jeder Arbeit muß oben ein Rand von 5 cm, auf jeder weiteren Seite ein Rand von 2,5 cm von der Oberkante frei bleiben. Es soll darauf geachtet werden, daß auch der rechte Rand keinesfalls überschritten wird. Die Worttrennungen sind so durchzuführen, daß die Schrift möglichst bis an den Rand heranreicht. **(Geeignetes Papier mit in blauer Farbe eingedrucktem Schriftspiegel wird von der Redaktion an die Autoren geliefert.)**

3. Für das Schreiben der Druckvorlage ist unbedingt ein tiefschwarzes, nicht schmierendes **Farbband** zu verwenden; blaue Farbe ist nicht reproduzierbar.

4. Beim Schreiben muß darauf geachtet werden, daß die Typen klar und sauber sind. Durchschläge vermindern die Schärfe des **Schriftbildes.** Fehlanschläge, Schmutzflecken, Bleistift- und Tintenkorrekturen, Radierungen, überschriebenes Deckweiß sowie Kniffe sind unzulässig. Bei **Schreibfehlern** darf in Ausnahmefällen die ganze Zeile herausgeschnitten und dann, neu geschrieben, an beiden Rändern festgeklebt werden.

5. Die Überschrift der Arbeit wird in Großbuchstaben symmetrisch zur Mittellinie der ersten Seite, 5 cm vom oberen Seitenrand entfernt, geschrieben, nach einer Leerzeile die **Autorennamen** und auf der nächsten Zeile die **Institutsanschriften.** Nach drei weiteren Leerzeilen folgt eine kurze **Zusammenfassung** der Ergebnisse und anschließend der Text der Arbeit. Zu Beginn eines jeden Absatzes ist die erste Zeile um 5 Anschläge nach rechts einzurücken.

6. Alle **Autorennamen** müssen (auch im Kopf der Arbeit) in Großbuchstaben geschrieben werden.

7. Zur Erhöhung der Klarheit des Schriftbildes ist es ratsam, innerhalb der Arbeit **Zwischenüberschriften** anzubringen. Diese müssen symmetrisch zur Mittellinie der Seite geschrieben, unterstrichen und durch je eine zusätzliche halbe Leerzeile vom Text abgehoben werden.

8. **Tabellen** sind möglichst als Teil des Textes zu schreiben und klar vom Text abzuheben. Die Abkürzung TAB. soll in Großbuchstaben zusammen mit der Tabellen-Nummer in der Mitte über der Tabelle stehen, darunter die Tabellenüberschrift. Die Autoren sorgen dafür, daß auch die Tabellen nicht den Schreibspiegel einer Seite überragen.

9. Symbole, **Formelzeichen,** Strukturformeln usw., die nicht mit der Schreibmaschine geschrieben werden können, müssen sorgfältig mit schwarzer Tinte eingetragen werden.

10. Skizzen, Diagramme und andere **Abbildungen** sind so in den Text einzufügen, daß sie die vorgesehene Schreibfläche nicht überschreiten. Die Anzahl der Halbtonabbildungen bitte auf das Notwendigste beschränken. Alle Abbildungen müssen als Hochglanzabzüge in der vorgesehenen Größe gesondert mitgeliefert werden. Sie sind auf der Rückseite mit Bleistift zu numerieren. Bei der Abbildungsgröße muß der Autor berücksichtigen, daß die Abbildungen trotz Verkleinerung noch lesbar bleiben müssen. Die Abbildungsunterschriften werden engzeilig geschrieben, damit sie sich vom übrigen Text abheben. Die Abkürzung ABB. soll gemeinsam mit der Abbildungsnummer mitten über der Bildunterschrift stehen.

11. **Fußnoten** werden engzeilig auf der vorgesehenen Textseite, durch eine Linie über der Fußnote abgetrennt, geschrieben.

12. Die laufenden **Seitenzahlen** sind mit blauem Stift ganz unten rechts auf der Rückseite einzutragen.

13. **Literaturzitate** sind im Text durch aufeinanderfolgende, eingeklammerte Nummern zu kennzeichnen, z. B. (1,2). Das volle Zitat wird in einer numerierten Liste am Ende des Textes aufgeführt. Es muß die Namen der Autoren mit ihren Initialen (bei mehr als 3 Autoren wird nur der erste Autor mit dem Zusatz „u. a." oder „et al" geschrieben), den Namen der Zeitschrift (nach Möglichkeit abgekürzt entsprechend „Periodica Chimica", Akademie Verlag, Berlin 1961), Bandnummer, erste Seitenzahl und Jahr (wie unten im Beispiel) enthalten. Bei Buchzitaten werden Titel, Band, Erscheinungsjahr, Verlag und Erscheinungsort angegeben.

   Beispiel:

   1. AUSTIN, J. D. and PIERCE, D. H., J. Amer. chem. Soc. **55**, 661 (1933)
   2. YOFFE, G. T. and NESMEYANOV, A. N., Handbook of Magnesium-Organic Compounds **II**, 239 (1956), Pergamon Press, London
   3. BURLAKOWA, E. W. u. a., in TARUSOW, B. N. (Red.); Praktikum pd obstschei biofisike. Wip. III-IV, (1961) Gos. Isd. „Wysschaja Schkola" Moskwa

14. Wenn die Arbeit nicht in englischer Sprache abgefaßt ist, müssen außerdem zum Schluß der Arbeit deren Überschrift (unterstrichen) und die **Zusammenfassung in englischer Sprache** geschrieben werden.

Nur wenn diese Schreibanleitung einwandfrei berücksichtigt wird, können Herausgeber und Redaktion schnellstmögliches Erscheinen garantieren. Vermeiden Sie daher bitte zeitraubende Rücksendungen!

УДК 581.12

ХРАНЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ БЕЗ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Р. М. БЕКИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Описан метод хранения изолированных хлоропластов без потери наиболее лабильной фотохимической функции — фотофосфорилирования. Для обеспечения в процессе хранения целостности систем переноса e^- и сопряженного с ним образования АТФ необходимо совместное применение низких температур (—79° и ниже) и защитных веществ (глицерин).

На протяжении последних лет внутриклеточные структуры как животного, так и растительного происхождения стали объектом интенсивных биохимических исследований. Значительные успехи в области биохимии фотосинтеза достигнуты в исследованиях с внутриклеточными фотосинтезирующими структурами.

В связи с широким использованием изолированных хлоропластов в качестве объекта для изучения фотосинтеза возник вопрос о хранении этих структурных элементов. Не требуют специальных доказательств очевидные преимущества условий работы, когда исследователь располагает в любое время года достаточным количеством однородного биологического материала с постоянной биохимической активностью.

Такой распространенный способ консервации, как замораживание и хранение при низких температурах, был применен к хлоропластам с целью сохранить их фотохимическую активность. В нашей лаборатории [1, 2] был использован метод хранения хлоропластов сахарной свеклы в виде замороженной в жидком воздухе или жидком азоте суспензии структур в фосфатном буфере (pH 6,5). При таком способе хранения в течение 13 дней (более длительные сроки не исследовались) хлоропласты после размораживания обнаруживали такую же активность реакции Хилла, как и свежевыделенные структуры.

Дюан и Крогман [3] сообщили, что хлоропласты шпината полностью сохраняют в течение месяца активность реакции Хилла и фотофосфорилирование, если суспензию хлоропластов в 0,4 *М* сахарозе быстро замораживать и затем хранить при —196°. Быстрое замораживание и оттаивание является, по данным авторов, обязательным условием сохранения активности. Поэтому замораживание проводили небольшими порциями (1 *мл*) в закрытом вращающемся цилиндре в смеси ацетона и сухого льда. Цилиндр с замерзшей в виде тонкой пленки суспензией хранили затем в жидком азоте. Аналогичным образом осуществляли и размораживание: вращающийся цилиндр погружали на короткое время (5 *сек*) в водяную баню с температурой 35° и процедуру повторяли несколько раз до полного оттаивания суспензии.

Многочисленные поиски оптимальных условий длительной консервации биологического материала с сохранением его жизнеспособности показали необходимость совместного применения низкой температуры и защитных веществ, предотвращающих повреждающее действие замораживания [4, 5]. При консервации различных тканей и органов холодом

широко используются такие защитные вещества, как глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и другие [6, 7].

Пэкер и Бэрнард [8] применили глицериновую среду для хранения хлоропластов шпината при —20°. Препарат хлоропластов при этой температуре сохраняет в течение некоторого периода основные фотохимические функции, в том числе фотофосфорилирование. Так, к концу недельного срока хранения активность фотофосфорилирования составляла 50% от исходной. Если в среде отсутствовал глицерин, то уже через 24 часа происходила полная потеря активности. В работе показано также, что устойчивость различных фотохимических систем при хранении хлоропластов при —20° в глицериновой среде неодинакова. Наиболее лабилен процесс фотохимического образования АТФ. Затем в порядке возрастания устойчивости идут фотогидролиз АТФ, способность к конформационным изменениям и фотовосстановление НАДФ.

В настоящей работе исследовали сохранность наиболее лабильной функции хлоропластов — фотосинтетического фосфорилирования — при длительном хранении препаратов хлоропластов в водно-глицериновой среде при различных температурных режимах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили с хлоропластами, изолированными из 10—14-дневных проростков гороха сорта Победитель. Горох выращивали в условиях водной культуры на калийной питательной смеси следующего состава (%): $Ca(NO_3)_2$ — 0,005; KNO_3 — 0,03; CaH_2PO_4 — 0,008; $MgSO_4$ — 0,006; железо лимонно-аммиачное — 0,004; H_3BO_3 — 0,00002; $MnSO_4$ — 0,00003 [9]. Хлоропласты выделяли на холоде при 1—5° в 0,35 *М* NaCl и 0,2 *М трис*-HCl-буфере, pH 7,8 (среда I) по методу Уотлей и Арнона [10] с небольшими изменениями. Кроме этой среды, выделение проводили по той же схеме в среде, которую применяли Пэкер и Бэрнард [8]: 0,35 *М* NaCl, 0,02 *М* ЭДТА и 0,4 *М* фосфатный буфер. pH 7,5 (среда II). Обычно хлоропласты выделяли из 500 *г* проростков. Проростки растирали в фарфоровой ступке с 1100 *мл* измельчающей среды I (соотношение растворов NaCl и *трис*-буфера 10 : 1) или 1000 *мл* среды II. Растертую массу отжимали через полотно и фильтрат центрифугировали при 200 *g* 1 *мин*. Осадок отбрасывали, а из центрифугата хлоропласты осаждали при 1000 *g* в течение 7 *мин*. Осадок хлоропластов промывали один раз 500 *мл* 0,35 *М* NaCl или среды II и вновь осаждали при 1000 *g* 7 *мин*. Полученный таким образом осадок хлоропластов суспендировали в 9 объемах раствора, содержащего 50% глицерина, 0,125 *М* KCl и 0.02 *М* *трис*-HCl-буфера, pH 7,5 [8].

Суспензия «глицериновых» хлоропластов хранилась при трех температурах: —20°, —79° (сухой лед) и —196° (жидкий азот). В случае хранения при температуре —20° и —79° суспензию сразу же после получения разливали небольшими порциями (~1 *мл*) в пробирки и помещали соответственно в холодильник или в сухой лед. Для хранения при —196° суспензию закапывали в сосуд Дюара с жидким азотом, в котором она мгновенно застывала в виде небольших шариков. Перед опытом замерзшую суспензию хлоропластов (—79° и —196°) извлекали из сосуда Дюара в необходимых количествах и размораживали при комнатной температуре.

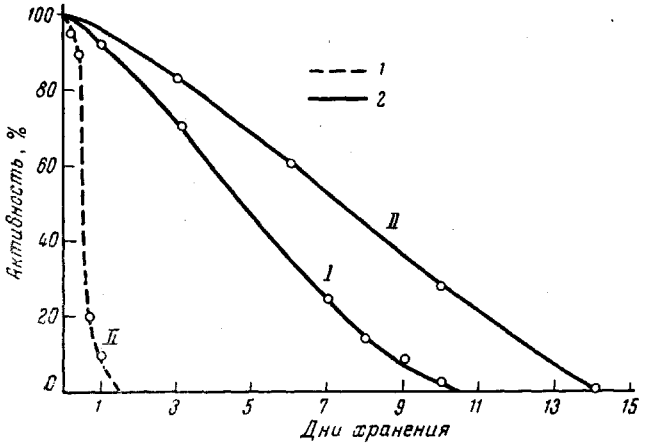
Реакцию фотофосфорилирования проводили в конических колбах емкостью 25 *мл* в водяном термостате при постоянном перемешивании проб. Для этих целей использовали аппарат Варбурга. Инкубационная смесь содержала суспензию «глицериновых» хлоропластов, которую разводили перед опытом 0,035 *М* NaCl, и следующие компоненты в *мкмоль* : *трис*-HCl-буфер — 40, pH 7,6 — 7,8; АДФ-Na-соль — 5; K_2HPO_4 — 5; $MgCl_2$ — 2,5; аскорбат Na — 5; феназинметасульфат (ФМС) — 0,03. Общий объем проб 1,5 *мл*. Продолжительность инкубации 20 *мин*. Температура инкубации 20°. Газовая фаза — воздух. Источником света служила обычная лампа накаливания, вмонтированная в осветитель, который помещали на дно ванны. Освещенность примерно 15 000 *люкс* на уровне дна колб. Инкубацию начинали включением света, прекращали — выключением света и добавлением 0,025 *мл* 50%-ной трихлоруксусной кислоты.

О процессе фотофосфорилирования судили по разнице в убыли неорганического фосфора между темновыми и освещаемыми пробами. Неорганический фосфор определяли по методу Конопашевой и соавт. [11]; хлорофилл — по Арнону [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Устойчивость системы фотофосфорилирования у «глицериновых» хлоропластов при хранении в различных температурных режимах неодинакова. При —20° сохранить активность на постоянном уровне в течение

продолжительного времени не удается, хотя в этих условиях инактивация происходит значительно медленнее, чем при более высоких температурах. Так, если при хранении хлоропластов при 0° полная потеря активности фотофосфорилирования происходит в течение 24—30 часов, то при —20° — в течение 9—14 суток (рисунок).



Активность ФМС фотофосфорилирования у «глицериновых» хлоропластов при хранении при 0° (*1*) и при —20° (*2*)

I и *II* — хлоропласты выделялись в соответствующих средах (см. раздел «Методика»)

Эти данные близки к результатам Пэкера и Бэрнарда, которые, работая с хлоропластами шпината, нашли, что инактивация способности синтезировать АТФ на свету происходила в течение 2—3 недель хранения при —20° в зависимости от типа определяемой реакции [8].

При —20° не происходит замерзания глицериновой суспензии хлоропластов. Эта температура недостаточно низка, чтобы предотвратить инактивацию системы фотохимического образования АТФ.

Активность ФМС фотофосфорилирования при хранении «глицериновых» хлоропластов

Температура хранения, °С	Среда для выделения хлоропластов	Поглощение $P_{неорг}$, *мкг*/0,05 *мг* хлорофилла на пробу	
		исходная величина	после 9 месяцев хранения
—79°	I	87	100
—196°	I	87	94
	II	130	122

Из области криобиологии известно, что только низкие температуры (от —80° и ниже) способны обеспечить сохранение биологического материала без потери функциональной активности после оттаивания [13]. Проверка двух низкотемпературных режимов —79° и —196° на сохранность фотофосфорилирующей функции «глицериновых» хлоропластов показала, что в этих условиях не наблюдается изменений активности системы фотохимического образования АТФ. Проверен 9-месячный срок хранения (таблица).

Из данных таблицы следует, что температуры от —79° до —196° вполне достаточны для длительного сохранения фотофосфорилирующей активности хлоропластов в присутствии 50% глицерина. Следует еще раз подчеркнуть необходимость присутствия при этом защитных веществ, так как если замораживание проводить без глицерина в 0,35 *М* NaCl+ +*трис*-HCl (среда I, см. раздел «Методика») или 0,035 *М* NaCl, который обычно используется для суспендирования хлоропластов при опреде-

лении фотофосфорилирования, то уже через сутки хранения при —196° происходит полная потеря активности. Приведенные на рисунке и в таблице данные свидетельствуют также о том, что состав среды, используемой для выделения хлоропластов, не сказывается существенным образом на устойчивости системы фотофосфорилирования в процессе хранения в глицериновой среде.

Таким образом, описанный метод хранения изолированных хлоропластов достаточно прост и удобен; он не требует никакого специального оборудования для замораживания препарата структур. Применение метода в лабораторной практике позволит иметь вне зависимости от сезона необходимый запас хлоропластного материала с неизменяющейся в процессе хранения фотохимической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верещинский И. В., Красновский А. А., Биохимия, **16**, 621, 1951
2. Верещинский И. В., Биохимия, **16**, 350, 1951
3. Duane W. C., Krogmann D. W., Biochim. et biophys. acta, **71**, 195, 1963
4. Рэ Л., Консервация жизни холодом, «Медгиз», 1962
5. Смит О., Клетка и температура среды, стр. 101, «Наука», 1964
6. Huggings C. E., Federat. Proc. **24**, № 2, part III, 190, 1965
7. Meryman H. T., Cryobiology, p. 2, Acad. Press, 1966
8. Packer L., Barnard A. C., Biochim. et biophys. acta, **126**, 443, 1966
9. Новоселов А. А., Комнатное растениеводство методом водных культур, Учпедгиз, 1959
10. Whatley F. R., Arnon D. I., Methods in Enzymology, v. 6. Acad. Press, 1963
11. Кондрашева М. Н., Лесогорова М. Н., Шноль С. Э., Биохимия, **30**, 567, 1965
12. Arnon D. I., Plant physiol., **24**, 1, 1949
13. Trump B. F., Young D. E., Arnold E. A., Stowell R. E., Federat. Proc., **24**, № 2, part III, 144, 1965

Поступила в редакцию
25.VIII.1967

STORAGE OF ISOLATED CHLOROPLASTS WITHOUT CHANGES IN THE ACTIVITY OF PHOTOPHOSPHORYLATION

R. M. BEKINA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A method is described of storage the isolated chloroplasts without loss of the most labile photochemical function — photophosphorylation. In order to provide the safety of the phosphorylative function of chloroplasts by long-term storage a combined use of low temperatures (=79° C and lower) and protective substances (glycerol, for example) is necessary.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 2 1968 Вып. 6

УДК 581.132

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ТВЕРДЫХ ПЛЕНКАХ

М. И. БЫСТРОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследовались спектры люминесценции твердых пленок хлорофиллов *a* и *b*, протохлорофилла, бактериовиридина и соответствующих феофитинов. При комнатной температуре пленки исследованных пигментов обладают люминесценцией в области 680—810 *ммк*, которую у магниевых комплексов удается наблюдать лишь в отсутствие воздуха. Охлаждение до −196° усиливает люминесценцию пленок пигментов. Низкотемпературные спектры отличаются постоянством структуры, в большинстве случаев смещены в длинноволновую область и не содержат коротковолновых максимумов, наблюдаемых у пленок пигментов при 20°. Пленки хлорофиллов *a* и *b*, протохлорофилла, бактериовиридина в присутствии кислорода воздуха при освещении обнаруживают быстрое падение люминесценции в области 750—770 *ммк*. Безмагниевые пигменты в тех же условиях более устойчивы. Рассматриваются предположения о природе длинноволнового излучения агрегированных форм пигментов и связи спектров люминесценции с характером межмолекулярного взаимодействия.

Большой экспериментальный материал, появившийся в последние годы, не только доказывает существование агрегированных форм хлорофилла в фотосинтезирующих организмах, но и свидетельствует об участии этих форм в первичных процессах фотосинтеза. Изучение спектральных свойств агрегированного хлорофилла в модельных системах является одним из путей к выяснению молекулярной организации пигментной системы хлоропластов и хроматофоров фотосинтезирующих организмов [1—3].

Для изучения свойств агрегированных форм хлорофилла и его аналогов удобными моделями являются твердые пленки пигментов; в них можно получать наиболее плотно упакованные структуры с предельно высокой степенью взаимодействия между молекулами. Спектры поглощения и люминесценции таких систем изучались в нашей лаборатории [4—12].

Исследование разнообразных типов агрегации в концентрированных растворах, монослоях, твердых пленках привело к обнаружению тонкой структуры спектров низкотемпературной люминесценции и поглощения и установлению близкого сходства спектров пигментов в агрегированных формах и фотосинтезирующих организмах [13—18].

Данная работа посвящена сравнительному исследованию спектров люминесценции твердых пленок хлорофиллов *a* и *b*, протохлорофилла, бактериовиридина и их безмагниевых аналогов, а также изучению влияния нагревания, охлаждения, паров воды и растворителей на спектральные свойства пленок. Мы надеялись, что это исследование позволит получить новую информацию о молекулярной упаковке пигментов в агрегированных формах и природе длинноволновой люминесценции этих форм.

МЕТОДИКА

Пигменты выделяли обычными методами, принятыми в нашей лаборатории, с конечным хроматографическим разделением на сахарозе. Пленки пигментов получали следующим образом: 1 *мл* раствора пигмента в этиловом эфире с концентрацией около 10^{-3} *М* наливали в вакуумную трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений. При испарении эфира в вакууме на стенках сосуда получали прозрачную пигментную пленку. Использовали свежеперегнанный эфир, предварительно освобожденный от перекисей с помощью закисного сернокислого железа и высушенный над металлическим натрием. Откачивали эфир масляным вакуумным насосом (до 10^{-2} *мм* рт. ст.). Спектры поглощения пленок измеряли на спектрофотометре СФ-10.

Спектры люминесценции регистрировали на установке, состоящей из монохроматора ИСП-51, фотоэлектрической приставки ФЭП-1 с фотоумножителем ФЭУ-22, чувствительным в красной и ближней инфракрасной областях спектра, и электронного автоматического потенциометра ЭПП-09 для записи спектров. Люминесценцию возбуждали ртутной лампой ДРШ-250 со стороны передней стенки сосуда с пленкой.

Спектральную область возбуждения (360—580 *ммк*) выделяли при помощи светофильтра СЗС-22. Для регистрации люминесценции в разных температурных условиях объект помещали в прозрачный сосуд Дюара, наполненный дистиллированной водой с требуемой температурой или жидким азотом. На рисунках интенсивность люминесценции дана без поправки на спектральную чувствительность ФЭУ-22.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Хлорофилл *а*. При испарении эфирных растворов хлорофилла *а* получаются пленки с максимумом поглощения 678±2 *ммк*, полушириной ~48 *ммк* и средней оптической плотностью ~1. Спектры поглощения таких пленок были исследованы нами ранее [11; 12].

Было установлено, что пленки хлорофилла *а* при комнатной температуре в вакууме обладают отчетливой длинноволновой люминесценцией в области 690—810 *ммк* с основным максимумом около 745 *ммк* и двумя

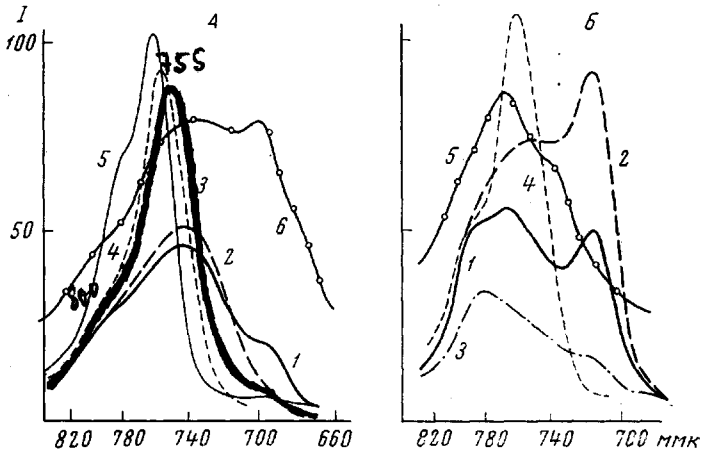


Рис. 1. Спектры люминесценции пленок пигментов

А — хлорофилл *а*: *1* — при 20°; *2* — после обработки парами воды, 20°; *3*— после обработки парами метанола, 20°; *4*— при —196°; *5*— после обработки парами метанола, —196°; *6*— после обработки парами пиридина, 20°. *Б* — феофитин *а*: *1, 2*— при 20°; *3*— после освещения возбуждающим светом; *4*— при —196°; *5*— при 20° после охлаждения до —196°

другими в виде «плеч» на его склонах — в области 695 и 795 *ммк* соответственно (рис. 1, *А*, кривая *1*). Коротковолновый максимум в спектре люминесценции по своему положению соответствует основному максимуму поглощения.

В предыдущих работах люминесценцию пигментных пленок измеряли в присутствии воздуха, что не давало возможности наблюдать свечение при комнатной температуре. Если в трубку с пленкой налить глице-

рин, то спектр люминесценции удается измерить без откачивания воздуха также и при комнатной температуре. Общая структура спектров постоянна у различных пленок и хорошо воспроизводится (за исключением случая с пленками феофитина). Нахождение пленок в вакууме с разрежением до 10^{-5} *мм* рт. ст. не оказывало влияния на вид спектров люминесценции.

В спектре поглощения пленок хлорофилла *а* после обработки парами воды наблюдается образование максимума 710—715 *ммк* [11; 12]. В спектрах люминесценции таких пленок, как правило, не обнаруживается присутствия коротковолнового максимума (рис. 1, *А*, кривая *2*).

Ранее [12] мы обнаружили в спектре поглощения пленок хлорофилла *а*, обработанных парами метанола, образование интенсивного максимума поглощения ~735 *ммк*, вероятно, обязанного кристаллическому пигменту. Такие пленки обладают длинноволновой люминесценцией с максимумом ~755 *ммк* и «плечом» около 800 *ммк*. Это свечение четко регистрируется в вакууме (рис. 1, *А*, кривая *3*) и заметно превышает по интенсивности свечение пленок до обработки парами метанола. При —196° интенсивность свечения хлорофилла *а* значительно возрастает. Спектр люминесценции смещается в длинноволновую сторону по сравнению с комнатной температурой, в нем резко выражен максимум ~750 *ммк* с «плечом» ~805 *ммк* (рис. 1, *А*, кривая *4*). У пленок, обработанных парами метанола, при —196° также наблюдается возрастание люминесценции и сдвиг основного максимума в длинноволновую сторону (рис. 1, *А*, кривая *5*).

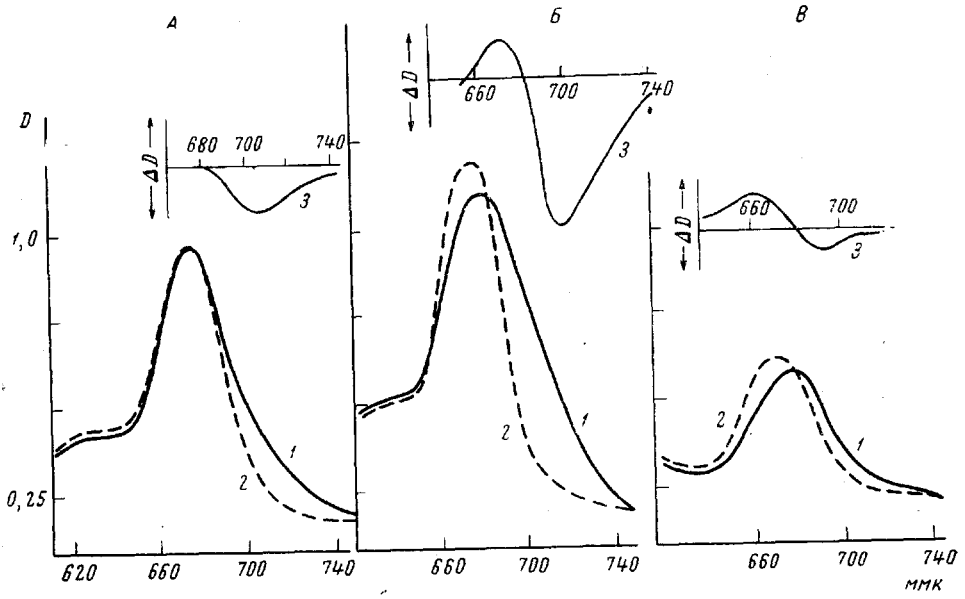


Рис. 2. Изменение поглощения пленок пигментов после нагревания до 90° и обработки парами пиридина

А — спектры поглощения пленки хлорофилла *а*: *1* — при 20°; *2* — при 90°; *3* — дифференциальный спектр (*2* минус *1*). *Б* — спектры поглощения пленки хлорофилла *а*: *1* — исходной; *2* — после обработки парами пиридина в течение 20 мин.; *3* — дифференциальный спектр (*2* минус *1*). *В* — спектры поглощения пленки феофитина *б*: *1* — 20°; *2* — 90°; *3* — дифференциальный спектр (*2* минус *1*)

При нагревании до 80—90° интенсивность люминесценции пленок хлорофилла *а* понижается вдвое. Последующее охлаждение до 20° восстанавливает начальный уровень свечения. Вид спектра люминесценции пленок хлорофилла *а* при 90° мало отличается от вида спектров, измеряемых при 20°.

Параллельные измерения спектров поглощения позволили обнаружить, что нагревание «срезает» длинноволновую часть склона основного максимума, приводя к появлению отчетливого отрицательного максимума около 705 *ммк* в разностном спектре (рис. 2, *А*). Последующее охлаждение до комнатной температуры восстанавливает длинноволновую часть спектра.

Действие паров пиридина. 1—2 *мл* пиридина наливали в боковой отвод трубки Тунберга с пленкой пигмента, охлаждали сухим льдом и откачивали в течение 15 мин. Спектры поглощения и люминесценции измеряли при охлаждении сухим льдом отвода с пиридином. Низкая температура уменьшает упругость паров пиридина, что позволяет уловить начальные стадии его действия на пленку. Из рис. 2, *Б* (кривые *1* и *2*) можно видеть, что начальные стадии его действия на пленку вызывают исчезновение длинноволновой части спектра поглощения, еще не приводя к значительному возрастанию поглощения при 672 *ммк*, свойственного пиридиновому раствору хлорофилла; в разностном спектре резко проявляется отрицательный максимум при 700 *ммк*. Люминесценция пленок при комнатной температуре на начальных этапах действия пиридина сохраняет основную структуру спектра (рис. 1, *А*, кривая *6*), хотя и появляется новый небольшой максимум при 680 *ммк*, свойственный пиридиновому раствору пигмента.

Влияние освещения. Было замечено, что люминесценция ($\sim$750 *ммк*) пленок хлорофилла *а* при комнатной температуре под действием возбуждающего света ($\sim 10^5$ *эрг/см²сек*) резко падает в присутствии кислорода воздуха. После 10-минутного освещения интенсивность свечения пленок сокращается до 10% от первоначального уровня. Падение интенсивности люминесценции под действием света необратимо; кинетика представлена на рис. 3, *1*. Откачка воздуха препятствует изменению люминесценции под возбуждающим лучом (рис. 3). К сходному эффекту приводит наливание глицерина в сосуд с пленкой. В отличие от опытов при 20°, люминесценция пленок при температуре жидкого азота практически не изменяется в течение 30-минутного освещения возбуждающим светом. Пленки с максимумом поглощения 735 *ммк* (после обработки парами метанола) в присутствии кислорода воздуха обнаруживают под действием освещения при комнатной температуре столь же быстрое падение люминесценции ($\sim$755 *ммк*), какое свойственно исходным пленкам пигмента. Следует заметить, что флуоресценция спиртового раствора хлорофилла *а* (с максимумом при 680 *ммк*) при комнатной температуре в присутствии кислорода воздуха изменяется под лучом возбуждающего света гораздо медленнее по сравнению с люминесценцией пленок. Еще большую устойчивость к освещению обнаруживает флуоресценция пленок хлоропластов (с максимумами около 680 и 735 *ммк*), которая практически не изменяется после 30-минутного действия возбуждающего света при комнатной температуре в присутствии воздуха.

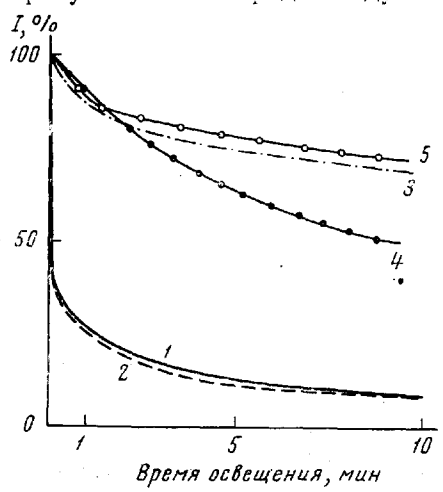


Рис. 3. Изменение люминесценции (750—770 *ммк*) пленок пигментов под действием возбуждающего света при 20°

1 — хлорофилл *а*; *2* — хлорофилл *b*; *3* — хлорофилл *а*, в вакууме; *4* — феофитин *а*; *5* — феофитин *b*

В связи с описанными наблюдениями следовало выяснить, как изменяется под действием света поглощение пленок хлорофилла *а*. Пленки освещали в присутствии воздуха 750-ваттной лампой накаливания через конденсатор ($\sim 10^5$ *эрг/см²сек*) при температуре 20 и 5° в условиях тер-

мостатирования. До освещения пленки выдерживались в тех же условиях в течение 10 мин. в темноте. По мере освещения регистрировали спектры поглощения. В первые 15—45 сек. действия света поглощение пленок практически не меняется. Дальнейшее освещение приводит к

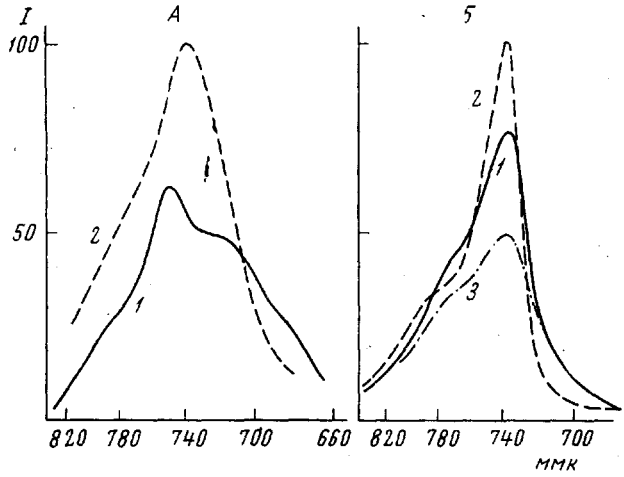


Рис. 4. Спектры люминесценции пленок пигментов
А — хлорофилл *b*: *1* — при 20°; *2* — при —196°. *Б* — феофитин *b*: *1* — при 20°; *2* — при —196°; *3* — при 90°

уменьшению поглощения в области 695—705 *ммк*. Более продолжительное освещение вызывает падение поглощения и в более коротковолновых областях (670—690 *ммк*) основного максимума, т. е. форма хлорофилла с поглощением около 700 *ммк* выцветает быстро, а остающиеся типы упаковки изменяются медленно.

Феофитин *a*. Пленки феофитина *a* при комнатной температуре люминесцируют в области 690—800 *ммк*. Спектры люминесценции, записанные в вакууме, обнаруживают ряд максимумов; их число, соотношение интенсивностей и точное положение изменялись в различных вариантах опытов (рис. 1, *Б*, кривые *1*, *2*), но общий вид спектров сохранялся постоянным. В спектрах люминесценции при комнатной температуре всегда отчетливо обнаруживается максимум около 715 *ммк*, соответствующий основному максимуму поглощения (700 *ммк*) пленок.

В вакууме спектры люминесценции пленок феофитина *a* устойчивы к освещению. В присутствии воздуха под действием возбуждающего света происходит постепенное уменьшение интенсивности люминесценции, особенно заметное в максимуме около 715 *ммк* (рис. 1, *Б*, кривые *2*, *3*). Изменение люминесценции пленки феофитина *a* в области 760 *ммк* при 20° в присутствии воздуха под действием возбуждающего света представлено на рис. 3. Падение люминесценции у пленок феофитина *a* при освещении происходит гораздо медленнее, чем у хлорофилла *a*.

При —196° люминесценция пленок феофитина *a* в области 760 *ммк* возрастает в несколько раз. В низкотемпературном спектре люминесценции, как и у пленок хлорофилла *a*, резко выражен максимум при 758 *ммк*, наряду с которым в большинстве случаев наблюдается более длинноволновое плечо около 790 *ммк* (спектр *4*, рис. 1, *Б*). Коротковолновый склон максимума крутой, и, как у низкотемпературных спектров пленок хлорофилла *a*, не имеет структуры. Изменения люминесценции при низкой температуре под действием света практически не происходит. В спектре люминесценции, измеренном после охлаждения жидким азотом и после-

дующего повышения температуры до 20°, в большинстве случаев не обнаруживается коротковолновой области с максимумом 710—715 *ммк* (рис. 1, *Б*, спектр *5*). Аналогичное явление было отмечено и для пленок хлорофилла *a*.

При нагревании до 90° люминесценция пленок феофитина *a* уменьшается (в среднем на 40%) и снова восстанавливается при 20°. Вид спектра люминесценции при нагревании практически не изменяется, однако в спектре поглощения при этом уменьшается максимум при 700 *ммк* [11].

Хлорофилл *b*. Полученные при испарении эфирного раствора пленки хлорофилла *b* характеризуются основным максимумом поглощения при 658—660 *ммк* и полушириной ~48 *ммк*. Эти пленки обладают люминесценцией при комнатной температуре. Структура спектра (рис. 4, *А*, кривая *1*) хорошо воспроизводится при различных вариантах получения пленок пигмента и более постоянна, чем у пленок феофитина *a* и хлорофилла *a*.

Люминесценция пленок хлорофилла *b* устойчива в вакууме и не изменяется после 15-минутного действия возбуждающего света. В присутствии воздуха люминесценция пленок хлорофилла *b* при комнатной температуре быстро и необратимо падает под действием возбуждающего света, как и у пленок хлорофилла *a*.

Охлаждение до —196° увеличивает люминесценцию пленок хлорофилла *b* в несколько раз (рис. 1, *Б*, спектр *2*).

При нагревании до 90° люминесценция пленок хлорофилла *b* уменьшается в среднем на 40%. Это уменьшение также обратимо. Нагревание приводит к уменьшению длинноволновой части основной полосы поглощения, но спектры люминесценции при 90° сохраняют ту же структуру, что и при 20°.

Феофитин *b*. Пленки феофитина *b* обладают люминесценцией при комнатной температуре, спектры которой в отличие от пленок феофитина *a* не изменялись в разных вариантах опытов и обычно имеют вид, представленный на рис. 4, *Б* (спектр *1*). В вакууме люминесценция пленок устойчива при освещении. В присутствии воздуха наблюдается ее постепенное падение под действием возбуждающего света, но более медленное по сравнению с пленками феофитина *a*.

Охлаждение до —196° увеличивает интенсивность люминесценции пленок в несколько раз. Основной максимум несколько смещается в длинноволновую сторону и становится более острым (рис. 4, *Б*, спектр *2*). Освещение возбуждающим светом при —196° не изменяет люминесценцию пленок. В спектрах люминесценции, измеренных при 20° после охлаждения жидким азотом, коротковолновый склон основного максимума оказывается более крутым, чем у исходных пленок.

Нагревание до 90° обратимо снижает люминесценцию пленок в среднем на 30%. В спектре поглощения при 90° исчезает длинноволновая часть основного максимума (рис. 2, *В*). У спектров люминесценции при 90° (рис. 4 *Б*, кривая *3*) сохраняется та же структура, что и при комнатной температуре.

Протохлорофилл. Пленки, получающиеся при испарении эфирных растворов, характеризуются максимумом поглощения при 635 *ммк* и полушириной ~40 *ммк*. При комнатной температуре пленки протохлорофилла люминесцируют в области 690—800 *ммк*. Свечение пленок, полученных в разных вариантах опытов, варьирует по числу отдельных максимумов, проявляющихся в спектре, по их форме, положению и соотношению интенсивностей (рис. 5, *А*, кривые *1*, *2*). В присутствии кислорода воздуха люминесценция в области 760 *ммк* так же, как и у пленок хлорофилла *a* и *b*, быстро падает под действием возбуждающего света. Охлаждение жидким азотом увеличивает (менее чем в 1,5 раза) интенсивность люминесценции пленок протохлорофилла в области 770 *ммк*,

причем величина коротковолнового максимума (около 705 *ммк*) относительно понижается (рис. 5, *А*, кривая *3*). Нагревание до 70° уменьшает свечение пленок протохлорофилла приблизительно на 30%, но спектр не изменяется.

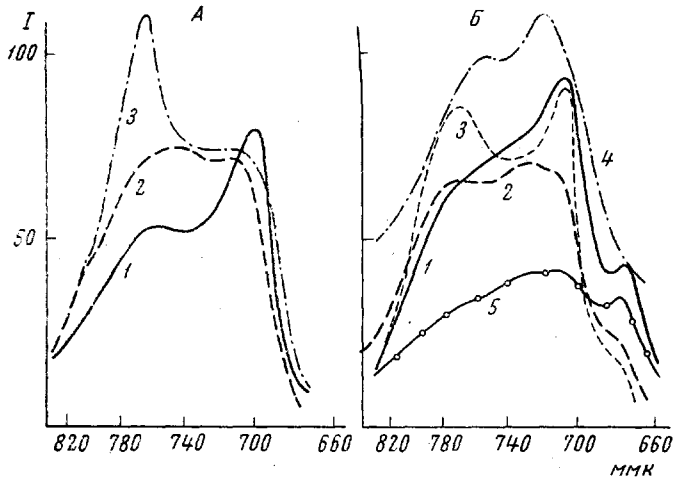


Рис. 5. Спектры люминесценции пленок пигментов
А — протохлорофилл: *1*, *2* — в различных вариантах опытов, при 20°; *3* — при —196°. *Б* — протофеофитин: *1* — *3* — в различных вариантах опытов, при 20°; *4* — при —196°; *5* — при 70°

Протофеофитин. Пленки протофеофитина интенсивно люминесцируют при комнатной температуре в области 670—800 *ммк*. Спектры пленок в разных вариантах опытов обнаруживают большую изменчивость по числу максимумов, их форме, положению и соотношению интенсивностей (рис. 5, *Б*, кривые *1*—*3*). Добавление воды, предварительное охлаждение жидким азотом, а также нагревание до 70° оказывают влияние на общий вид спектров.

В присутствии воздуха люминесценция пленок протофеофитина под действием возбуждающего света при комнатной температуре постепенно уменьшается. Максимум около 700 *ммк* падает быстрее, чем максимум в области 760 *ммк*. Охлаждение жидким азотом мало изменяет люминесценцию пленок протофеофитина в области 760—770 *ммк*. Структура спектров люминесценции при —196° в различных опытах не постоянна. Один из вариантов низкотемпературных спектров представлен на рис. 5, *Б* (кривая *4*). Нагревание до 70° вызывает уменьшение люминесценции в области 760—770 *ммк* и увеличение — в области 675—730 *ммк*. Интенсивность самых коротковолновых максимумов (~675 и 705—710 *ммк*) при 70° относительно повышается (рис. 5, *Б*, кривая *5*), что связано с частичным плавлением пленки пигмента.

Бактериовиридин. Пленки бактериовиридина, полученные из эфирных растворов, имеют основной максимум поглощения около 750 *ммк*. Они обнаруживают интенсивную люминесценцию при комнатной температуре с четко выраженным максимумом при 772 *ммк* (рис. 6, *А*, кривая *1*), более интенсивную, чем пленки хлорофилла *а*. В вакууме люминесценция пленок устойчива при освещении. В присутствии воздуха при комнатной температуре наблюдается столь же резкое падение люминесценции под действием возбуждающего света, какое свойственно пленкам других пигментов, содержащих атом магния.

Охлаждение до —196°, как правило, приводит к увеличению люминесценции пленок бактериовиридина. В низкотемпературном спектре на длинноволновом склоне основного максимума более заметно проявляется

плечо около 800 *ммк*. Коротковолновый склон максимума более крутой, чем при комнатной температуре, и не имеет структуры (рис. 6, *А*, спектр *2*).

Люминесценция пленок бактериовиридина с предельно длинноволновым максимумом поглощения (~760 *ммк*) мало изменяется при нагревании до 90°. У пленок с более коротковолновым максимумом поглощения (730—740 *ммк*) нагревание приводит к заметному увеличению свечения. Этот эффект соответствует образованию максимума поглощения

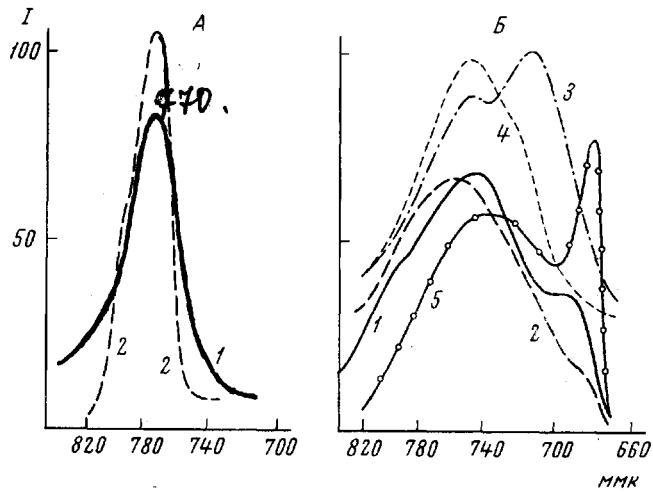


Рис. 6. Спектры люминесценции пленок пигментов
А — бактериовиридин: *1* — при 20°; *2* — при —196°. *Б* — феофитин бактериовиридина: *1*, *2* — в различных вариантах опытов, при 20°; *3*, *4* — при —196°; *5* — при 90°

~755 *ммк* с более высокой величиной оптической плотности (см. также [11]). Спектры люминесценции пленок бактериовиридина при 90° идентичны спектрам при 20°.

Феофитин бактериовиридина. Пленки феофитина бактериовиридина, получающиеся при испарении эфирных растворов, характеризуются основным максимумом поглощения при 675 *ммк* и полушириной 26—28 *ммк*. Пленки феофитина бактериовиридина, как и всех исследованных пигментов, люминесцируют при комнатной температуре в области 690—800 *ммк*. Спектры люминесценции различных пленок варьируют по структуре (рис. 6, *Б*, спектры *1*, *2*). Предварительное охлаждение жидким азотом, а также нагревание до 90° влияют на вид спектров. Обращает внимание сходство некоторых спектров (например, кривая *1*) со спектрами пленок хлорофилла *а*. В вакууме пленки устойчивы к освещению. В присутствии воздуха при комнатной температуре интенсивность люминесценции медленно падает под действием возбуждающего света.

Охлаждение до —196° увеличивает люминесценцию пленок феофитина бактериовиридина в несколько раз. Структура низкотемпературных спектров не постоянна в разных вариантах опытов (рис. 6, *Б*, спектры *3*, *4*).

Нагревание до 90°, как правило, снижает свечение пленок в области 760 *ммк* (в среднем на 30%). В поглощении пленок при этом нет существенных изменений. У спектров люминесценции при 90° сохраняется общая структура, наблюдаемая при комнатной температуре. В ряде случаев при нагревании удавалось наблюдать возрастание коротковолново-

го максимума (около 680 *ммк*) (рис. 6, *Б*, спектр *5*), частично обратимое при комнатной температуре. Это явление, возможно, связано с плавлением пленки пигмента при нагревании.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Природа люминесценции пленок. Описанные опыты показывают, что все исследованные пигменты в агрегированном состоянии, в виде твердых пленок, обладают отчетливой люминесценцией при комнатной температуре. В присутствии кислорода воздуха наблюдается падение люминесценции под действием возбуждающего света — быстрое у магниевых комплексов и более медленное у феофитинов. Несмотря на то, что исследованные пигменты различаются по химическому строению и характеру межмолекулярного взаимодействия в процессе агрегации, их пленки люминесцируют в одном и том же спектральном диапазоне — от 680—690 до 800—810 *ммк*.

В спектрах люминесценции пленок при комнатной температуре всегда более или менее отчетливо обнаруживается коротковолновый компонент, расположенный в области 675—715 *ммк* и соответствующий по своему положению основному максимуму поглощения. Его присутствие обусловлено обычной «мономерной» флуоресценцией основных форм, присутствующих в пленках; максимум этот значительно уменьшен, однако маловероятно, что это уменьшение связано с реабсорбцией. Область колебательных подуровней основного максимума флуоресценции перекрывается с областью длинноволнового излучения (720—810 *ммк*) агрегированных форм пигментов.

Вероятно, длинноволновая люминесценция пигментных пленок является флуоресценцией агрегированных форм пигментов. В этом случае при наличии сходства верхней и нижней систем возбужденных уровней и соблюдении закона зеркальной симметрии спектров основному максимуму флуоресценции, расположенному в инфракрасной области спектра, должен соответствовать свой максимум в спектре поглощения, который, однако, не удается наблюдать при нашей методике измерения. Самые «дальние» максимумы поглощения в пленках, находящиеся на спаде основной полосы и принадлежащие согласно [13; 14; 17; 18] определенным типам агрегированных кристаллических структур, могут быть скрыты значительным светорассеянием. Тем не менее благодаря эффективной миграции энергии с более коротковолновых форм пигментов [17; 19] свечение форм с самым длинноволновым поглощением заметно.

Наряду с этим, отсутствие корреляции между максимумами длинноволнового излучения и поглощения, а также резкое нарушение зеркальной симметрии спектров можно объяснить искажением положения электронных уровней молекул пигментов при агрегации. Так, длинноволновая люминесценция наблюдается у пленок всех исследованных пигментов независимо от положения и структуры длинноволнового максимума в спектре поглощения. Пленки протохлорофилла, которые имеют наиболее длинноволновый максимум в спектре поглощения, расположенный около 635 *ммк*, тем не менее люминесцируют в близкой инфракрасной области спектра с максимумом около 760 *ммк*. Пленки безмагниевого производного бактериовиридина, у которых основной максимум в спектре поглощения отличается гораздо большей «остротой» (полуширина $\sim$27 *ммк*) по сравнению с основным максимумом в пленках других пигментов (полуширина максимумов в пределах 40—50 *ммк*), также отчетливо люминесцируют в длинноволновой области с максимумом около 750 *ммк*.

Воздействия, приводящие к заметному уменьшению длинноволнового поглощения пленок, не оказывают влияния на общий спектральный состав люминесценции. Пары пиридина в начальной стадии действия на

пленки хлорофилла *а* мало изменяют структуру спектров люминесценции, хотя наиболее длинноволновая часть спектров поглощения при этом исчезает. Нагревание пленок хлорофилла вызывает заметное уменьшение длинноволнового поглощения; однако у нагретых пленок сохраняется та же структура спектров люминесценции, что и при комнатной температуре.

Электронные состояния молекул в агрегированных структурах твердых пленок испытывают возмущения под влиянием сил межмолекулярного взаимодействия. Система уровней энергии подвергается деформации. В таких условиях за счет снятия запретов некоторых энергетических переходов могут образоваться новые возбужденные уровни, лежащие ниже верхнего синглетного уровня молекулы хлорофилла и вместе с тем отличающиеся по своему положению и природе от триплетного метастабильного состояния. С этих новых уровней, возможно, и происходят переходы, приводящие к появлению длинноволновых полос излучения, свойственных агрегированным формам пигментов. Измерения, произведенные на фосфороскопе Шуваловым, не привели к обнаружению свечения пленок с длительностью жизни более чем 10^{-4} сек.

Относительно низкий по сравнению с растворами выход люминесценции может быть связан как с интенсивно протекающими в пленках процессами межмолекулярной дезактивизации энергии возбуждения, так и с увеличением вероятности безызлучательных переходов.

Для окончательного выяснения природы люминесценции агрегированных форм пигментов нужны дальнейшие исследования.

Связь со структурой пигмента. При сравнительном исследовании люминесценции различных пленок были получены результаты, свидетельствующие о связи тонкой структуры спектров с особенностями химического строения пигментов и степенью межмолекулярного взаимодействия. Удалось наблюдать, что пигменты, содержащие в молекуле магний, обнаружвают большее постоянство в структуре спектров пленок в разных вариантах опытов, чем их безмагниевые аналоги. Наибольшее разнообразие спектров свечения проявляется у протохлорофилла, наименьшее — у бактериовиридина. Пленки хлорофилла *а* оказываются более изменчивыми в этом отношении, чем пленки хлорофилла *b*. Можно думать, что постоянство спектрального состава излучения пигментных пленок определяется постоянством структуры образующихся из них агрегированных форм, что в свою очередь связано со способностью молекул образовывать устойчивые агрегаты. Безмагниевые пигменты (протофеофитин, феофитин *а*, феофитин бактериовиридина) в этом отношении обладают меньшими возможностями по сравнению с бактериовиридином и хлорофиллом из-за отсутствия возможности образования связей с участием магния. По всей вероятности, в процессе агрегации «наугад» может осуществляться большее количество вариантов взаиморасположения и взаимной ориентации молекул, т. е. большее структурное разнообразие образующих агрегатов, чем и определяется значительная изменчивость спектров люминесценции пленок пигментов. Из числа безмагниевых производных у пленок феофитина *b* обнаруживается наибольшее постоянство в структуре спектров люминесценции. Это может быть связано со способностью его молекул вступать во взаимодействие друг с другом за счет координационного связывания карбонильных группировок с атомами азота пиррольных колец, что было отмечено нами ранее [11].

При —196° у пленок исследованных пигментов возрастает интенсивность люминесценции; в большинстве случаев происходит длинноволновое смещение спектров, а также резко падает относительная величина коротковолновых максимумов. Возрастание интенсивности излучения пленок при низкой температуре связано главным образом с замедлением

конкурирующих с люминесценцией межмолекулярных процессов дезактивации возбуждения.

Длинноволновое смещение спектров можно объяснить изменением относительной конфигурации молекул при увеличении степени межмолекулярного взаимодействия при низкой температуре.

Глубокое охлаждение меньше сказывается на характере люминесценции пленок безмагниевых пигментов — феофитина бактериовиридина, протофеофитина и протохлорофилла. Низкотемпературные спектры люминесценции этих пигментов обнаруживают большую изменчивость сравнительно со спектрами магниевых комплексов. Это может быть связано со способностью феофитина бактериовиридина, протофеофитина и протохлорофилла образовывать формы с относительно слабым пигмент-пигментным взаимодействием, характер которого мало изменяется при охлаждении.

Действие света. Резкое падение люминесценции в пленках хлорофиллов *a* и *b*, бактериовиридина и протохлорофилла в первые секунды действия света наблюдается лишь в присутствии воздуха и только у магниевых комплексов, способных к более быстрому окислению при освещении. Это явление связано с фотохимическим взаимодействием определенных типов агрегированных форм пигментов с кислородом, приводящим к образованию устойчивых окисленных продуктов, поглощение которых может находиться в спектральной области, близкой к поглощению исходных пленок. Последнее обстоятельство может быть причиной отсутствия корреляции между уменьшением интенсивности люминесценции и поглощения пленок при освещении. Окисленные формы пигментов, образующиеся в ходе фотохимической реакции с кислородом, могут выступать в качестве тушителей люминесценции. В условиях резонансной миграции энергии люминесценция агрегированных форм может быть очень чувствительна даже к малой концентрации тушителя.

Люминесценция феофитинов, гораздо более устойчивых к фотоокислению, при освещении мало изменяется по сравнению с пленками пигментов, содержащих магний.

При глубоком охлаждении процесс фотоокисления пленок хлорофилла и его аналогов сильно тормозится. После откачивания воздуха фотохимическое изменение люминесценции у обычных пленок хлорофилла *a* оказывается более заметным, чем у пленок хлорофилла, обработанных метанолом (с формой «740»), и пленок бактериовиридина (с формой «750»). Это, по-видимому, связано с тем, что в двух последних случаях пигментные агрегаты отличаются гораздо большей плотностью что затрудняет диффузию кислорода.

При исследовании фотохимических изменений пленок хлорофилла *a* на воздухе было обнаружено, что поглощение меняется гораздо меньше, чем люминесценция. После 15—45 сек. действия света изменений в спектре поглощения практически не наблюдается. При дальнейшем освещении (в течение 1—5 мин.) быстрее всего падает поглощение на длинноволновом склоне основного максимума — в области 695—705 *ммк*. Возможно, что выцветающие формы сходны по структуре с фотолабильными формами хлорофилла (695—710 *ммк*) фотосинтезирующих организмов [20—23]. Фотолабильные формы хлорофилла *a* в пленках, вместе с тем, оказываются и наименее термостойкими; при нагревании пленок, в дифференциальном спектре поглощения проявляется отрицательный максимум при 705 *ммк*.

Таким образом, сравнительное исследование спектральных свойств твердых пленок хлорофилла и его аналогов позволяет получить данные о характере межмолекулярного взаимодействия в агрегированных формах пигментов, что может быть использовано для понимания природы молекулярной организации пигментной системы фотосинтезирующих организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krasnovskii A. A., Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 363. 1960; Красновский А. А., в кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 41. «Наука», М., 1965
2. Литвин Ф. Ф., в кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 96. «Наука», М., 1965
3. Brody S. S., Brody M., in: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants, p. 455. Natl Acad. Sci., Washington, 1963
4. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР **85**, 389, 1952
5. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К., Докл. АН СССР **92**, 1201, 1963
6. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР, **95**, 611, 1954
7. Красновский А. А., Пашкина Е. В., Докл. АН СССР, **127**, 913, 1959
8. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун-Юй-Цюнь, Докл. АН СССР **143**, 456, 1962
9. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР **152**, 1231, 1963
10. Красновский А. А., Быстрова М. И., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **167**, 691, 1966
11. Быстрова М. И. Красновский А. А., Мол. биол. **1**, 362, 1967
12. Красновский А. А., Быстрова М. И., Докл. АН СССР **174**, 480, 1967
13. Литвин Ф. Ф., Рихирева Г. Т., Красновский А. А., Биофизика **7**, 578, 1962
14. Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф., Биофизика **12**, 845, 1967
15. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР **158**, 460, 1964
16. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР **169**, 1187, 1966
17. Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Докл. АН СССР **175**, 1175, 1967
18. Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Красновский А. А., Докл. АН СССР **154**, 460, 1964
19. Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Биофизика **12**, 433, 1967
20. Kok B., Biochim. et biophys. acta **22**, 433, 1967
21. Kok B., Acta Botan. Neerl. **6**, 316, 1957
22. Coleman J. M., Holt A. S., Rabinowitch E., Science **123**, 795, 1956
23. Brown J., French C., Plant Physiol. **34**, 305, 1959

Поступила в редакцию
17.IV 1968

COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE LUMINESCENCE OF AGGREGATED FORMS OF CHLOROPHYLL AND ITS ANALOGUES IN SOLID FILMS

M. I. BYSTROVA and A. A. KRASNOVSKII

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

The luminescence spectra of solid films of chlorophylls *a* and *b*, protochlorophyll, bacterioviridin and corresponding phaeophytins were studied. The luminescence of the pigment films was revealed at 20° in the region 680—810 *m*μ. In the case of Mg-complexes this phenomenon was observed under anaerobic conditions. Freezing to —196° enhanced the luminescence of pigment films. The luminescence spectra of films at — 196° were shifted to the longwave region as compared with that at 20°. The films of chlorophylls *a* and *b*, protochlorophyll and bacterioviridin illuminated in the presence of oxygen exhibited sharp decrease of longwave luminescence; phaeophytins were more stable in the same conditions. The suggestions about the nature of luminescence of the aggregated pigment forms are presented.

Том XIII, вып. 3 1968

ВЫЦВЕТАНИЕ ПИГМЕНТНЫХ ФОРМ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕНЕЮЩИХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Изучение образования и накопления пигментов путем исследования спектров поглощения гомогенатов зеленеющих листьев фасоли привело к представлению о существовании форм хлорофилла, различающихся по спектральным свойствам. Наиболее отчетливо мы наблюдали образование формы с максимумом поглощения при 670 *ммк* и агрегированных форм с доминирующим максимумом поглощения при 678 *ммк* [1, 2].

Исследование устойчивости пигментов в гомогенатах листьев показало, что на ранних стадиях зеленения этиолированных проростков, фасоли, где доминирует фотохимически неустойчивая форма «670», хлорофилл быстро разрушается при освещении гомогената светом высокой интенсивности [2]. По мере зеленения листьев и накопления в них хлорофилла светоустойчивость пигмента быстро возрастала и через сутки достигала той же виличины, что и у нормальных зеленых листьев фасоли. Наблюдаемые в процессе зеленения листьев изменения светоустойчивости пигмента объяснялись агрегацией молекул хлорофилла на белковых структурах хлоропластов, защищавшей пигмент от разрушения.

Нахождение в этиолированных и зеленеющих листьях, помимо протохлорофилла и хлорофилла, бесфитольных форм этих пигментов [3—6] и результаты измерений спектров поглощения [7] и низкотемпературной флуоресценции [8—10] в процессе зеленения усложнили спектральную и химическую картину трансформации пигментов при их образовании и накоплении в листе. Изменения спектральных свойств бесфитольных пигментов в результате процеруры приготовления водных гомогенатов [11, 12] показали, что пигменты в гомогенатах по свойствам могут отличаться от пигментов в неповрежденных листьях. Возникла необходимость в исследовании фотохимических свойств пигментов в целых листьях на разных стадиях зеленения этиолированных проростков, что может дать информацию о состоянии и связи отдельных форм пигментов в белковом комплексе хлоропластов.

Методика

Работу вели с десятидневными проростками фасоли сорта Сакса, выращенными в темноте при 27°. Этиолированные проростки освещали светом 450 *лк*, при 20°, лампой накаливания. Листья на различных стадиях зеленения зажимали между пластинками из плексигласа и измеряли спектр флуоресценции при комнатной температуре на установке, описанной ранее [13] при возбуждении светом ртутно-кварцевой лампы ДРШ-250 через светофильтры УФС-2 и ЗС-3, выделяющими линию ртути 365 *ммк*. Бо́льшая часть инфракрасного излучения лампы поглоща-

лась 5 *см* слоем воды в стеклянном сосуде с плоскопараллельными стенками. Интенсивность возбуждающего света —1×10^5 *эрг/см*^{2} · *сек* в плоскости объекта. Не изменяя положения листа, вынимали светофильтры и производили освещение «полным» светом лампы ДРШ-250, чтобы произошло деструктивное фотохимическое окисление — выцветание пигментов — и вновь записывали спектр флуоресценции с указанными светофильтрами. Интенсивность полного света лампы —5×10^6 *эгр/см*^{2} · *сек.* Таким образом, выцветание происходило под действием ртутных линий в видимой и близкой ультрафиолетовой части спектра; более короткий ультрафиолет задерживался стеклом. Фокусировка объекта и настройка прибора, производившиеся для каждого листа заново, занимали не менее минуты.

Спектры флуоресценции зеленеющих листьев

Освещение этиолированных листьев приводит к быстрому превращению протохлорофиллида в хлорофилл, одновременно с этим происходит присоединение фитола к хлорофиллиду, ведущее к образованию хлорофилла. После пяти минут освещения этиолированных листьев светом

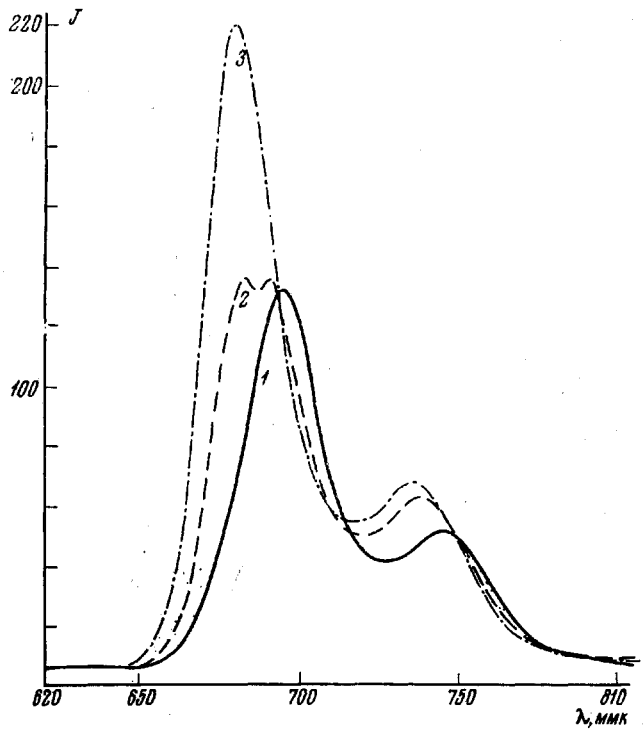


Рис. 1. Изменения под лучом возбуждающего света спектра флуоресценции этиолированного листа фасоли, освещенного в течение 5 *мин* светом 450 *лк*

1 — начальный спектр; *2* — 10 *мин*; *3* — 20 *мин* после начала измерения

450 *лк* около половины пигментов, образующихся на свету, представлено хлорофиллом [11]. В этом случае в спектре флуоресценции листа, записанном при 20° сразу после пяти минут освещения (450 *лк*), наблюдался главный максимум при 693 *ммк*, аналогичный наблюдавшемуся в сходных условиях при —196° [8—10]. Под лучом возбуждающего света происходило быстрое смещение максимума в коротковолновую сторону, что, по-видимому, связано с переходом хлорофиллида в хлорофилл. Через 7—10 *мин* наблюдения максимум разделялся на два, равные по

величине, при 690 и 683 *ммк*, а через 20—30 *мин* обнаруживался один максимум флуоресценции хлорофилла *а* при 680 *ммк* (рис. 1). По спектрам флуоресценции, измеряемым при комнатной температуре, прослеживается смена форм пигментов, которая ранее наблюдалась в низкотемпературных спектрах флуоресценции [8]. При комнатной температуре не удается лишь наблюдать протохлорофиллид с максимумом флуоресценции 655 *ммк* вследствие его быстрого фотопревращения в форму «690» под действием света, возбуждающего флуоресценцию.

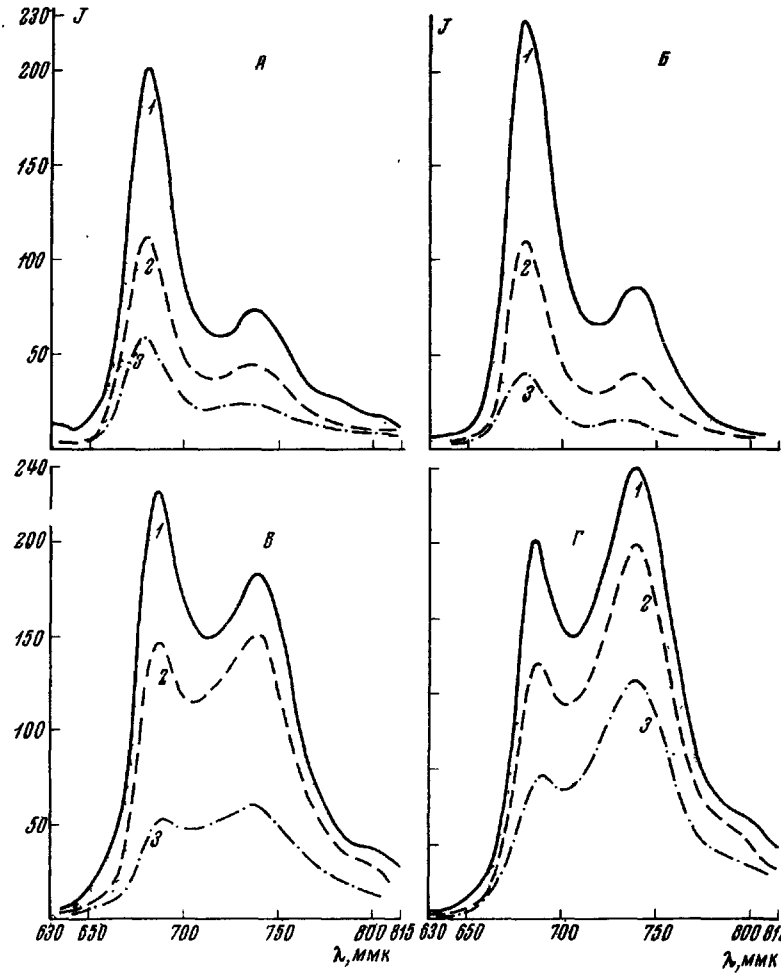


Рис. 2. Спектры флуоресценции зеленеющих листьев фасоли до и после выцветания

А — 5 *мин* зеленения листьев, 30 *мин* темноты; *Б* — 1 *час*, *В* — 14 *час*, *Г* — 3 суток зеленения; *1* — исходный спектр; *2* — 30 сек; *3* — 5 *мин* выцветания

До 1 *час* зеленения максимум располагался при 680 *ммк*, по мере дальнейшего накопления хлорофилла наблюдалось относительное понижение «красного» максимума флуоресценции и его перемещение в длинноволновую сторону, объясняемые обычно реабсорбцией флуоресценции [14]. Главный максимум постепенно перемещался до 686 *ммк* (рис. 2), длинноволновый максимум при 736—738 *ммк* возрастал без изменения положения. На поздних стадиях зеленения наблюдалось образование максимума в области 800 *ммк*.

Выцветание пигментов

Исходным объектом при исследовании выцветания пигментов служили этиолированные листья, освещенные пять минут светом 450 *лк* и выдержанные после этого в темноте 30 *мин*; в этом случае листья обладали максимумом флуоресценции при 680 *ммк*. Ранее уже было показано, что переход 690→680 *ммк* происходит в отсутствие света [7, 9].

Под влиянием «полного» света лампы ДРШ-250 наблюдалось понижение флуоресценции зеленеющих листьев во всех наблюдаемых максимумах (рис. 2), связанное с разрушением пигментов; в первые часы зеленения проростков пятиминутное освещение нефильтрованным ультрафи-

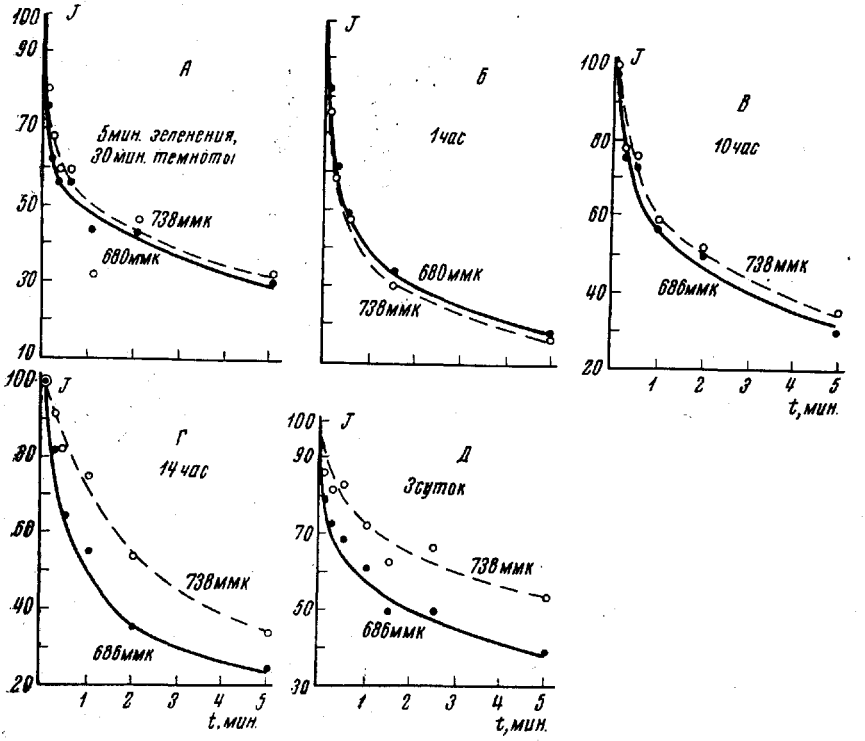


Рис. 3. Понижение максимумов флуоресценции зеленеющих листьев фасоли при выцветании (*А*—*Д* — различное время зеленения)

Ось ординат — интенсивность флуоресценции в % от исходной величины; ось абсцисс — время выцветания

олетом вызывало образование на листьях светлого пятна в месте падения светового луча, через трое суток зеленения такое пятно наблюдать не удавалось, так как к этому времени бо́льшая часть хлорофилла находилась в фотохимически устойчивом состоянии.

На рис. 3 изображена кинетика падения флуоресценции пигментов зеленеющих листьев в двух максимумах, 680—686 и 736—738 *ммк*, выраженная в процентах понижения высоты максимума (от исходной величины) в результате выцветания пигмента. Понижение коротковолнового максимума после пяти минут выцветания составляло близкую величину на всех стадиях зеленения — 70—80%, — уменьшаясь у зеленых листьев после трех суток зеленения лишь до 60%. Исходя из этих данных, можно полагать, что на всех стадиях зеленения падение этого максимума отражает выцветание фотохимически неустойчивой мономерной формы пигмента в согласии с нашими опытами в хлоропластах и гомогенатах зеленых листьев [12]. Однако одинаковая степень понижения

флуоресценции в данном случае была неожиданной, так как по мере возрастания реабсорбции этого максимума следовало бы ожидать уменьшения величины его падения при выцветании пигментов на поздних стадиях зеленения.

На первых стадиях зеленения (4—10 *час*) вследствие разрушения части молекул пигмента в результате выцветания происходило уменьшение реабсорбции, сопровождающееся перемещением главного максимума флуоресценции в коротковолновую сторону в результате пятиминутного освещения проростков нефильтрованным ультрафиолетом (после 4 *час* зеленения — с 683 до 680 *ммк*, после 10 *час* зеленения — с 686 до 683 *ммк*). Однако на более поздних стадиях зеленения выцветание приводило к дальнейшему перемещению максимума флуоресценции в длинноволновую область до 688—690 *ммк* (рис. 2). Весьма заманчивым было бы связать это явление с разрушением быстровыцветающей формы хлорофилла, обладающей более коротковолновым максимумом и выявлением вследствие этого флуоресценции более устойчивой к освещению длинноволновой формы «690». Более отчетливо возрастание флуоресценции длинноволновых форм в результате быстрого выцветания коротковолновых видно при сравнении понижения флуоресценции в максимумах 686 и 738 *ммк* на конечных стадиях зеленения проростков (рис. 2—4). На начальных фазах зеленения листьев (до 10 *час*) наблюдалась одинаковая скорость падения максимумов при выцветании, однако по мере накопления хлорофилла происходило «отставание» в выцветании длинноволнового максимума, несмотря на несомненную реабсорбцию главного «красного» максимума флуоресценции. В ряде опытов «красный» максимум в результате облучения ультрафиолетом становился ниже длинноволнового.

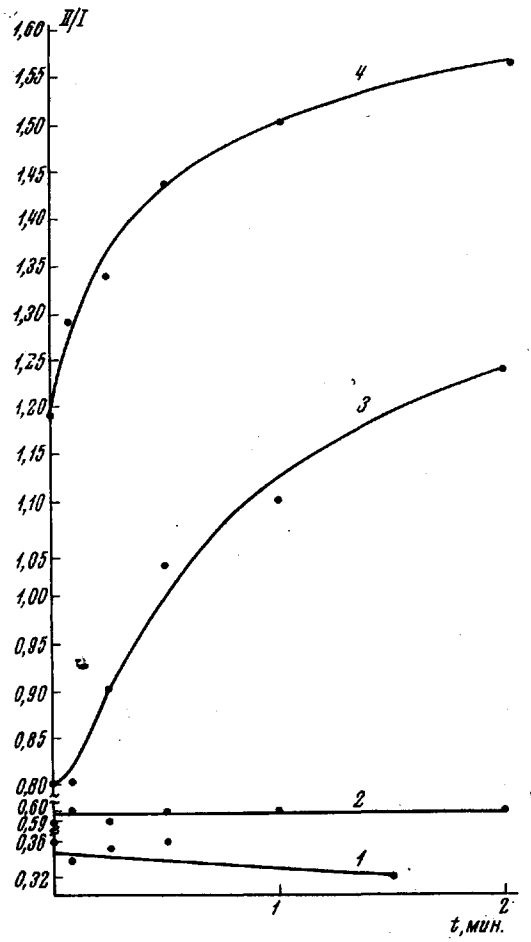


Рис. 4. Отношение интенсивности флуоресценции длинноволнового максимума 738 *ммк* (*II*) к интенсивности коротковолнового 680—686 *ммк* (*I*) при выцветании зеленеющих листьев фасоли

По оси абсцисс — время выцветания. *1* — 1 *час*; *2* — 10 *час*; *3* — 14 *час*; *4* — 3 суток зеленения

В спектре флуоресценции листьев в процессе зеленения наблюдалось постепенное изменение отношения максимума 738 *ммк* (*II*) к коротковолновому (*I*). На начальных стадиях зеленения соотношение интенсивностей флуоресценции *II/I* составляло ~0,35. По мере накопления хлорофилла в этиолированных листьях соотношение возрастало до 1,2 после трех суток зеленения (рис. 4). Относительное возрастание длинноволнового максимума при зеленении обычно объясняют реабсорбцией «красной» полосы флуоресценции при высокой концентрации пигмен-

тов. Это явление впервые было описано в работе Френча и Янг [14], где были сняты спектры флуоресценции темно-и светло-зеленых листьев.

В наших опытах с листьями на начальных стадиях зеленения по мере выцветания пигментов соотношение *II/I* не изменялось (10 *час* зеленения) или даже несколько уменьшалось (1 *час*). Выцветание пигментов при более длительном зеленении вызывало постепенное возрастание величины *II/I* до 1,6, т. е. относительное возрастание длинноволнового максимума (рис. 4).

В спиртовом растворе низкой концентрации ($\sim 10^{-6} M$) хлорофилл *a* обладает главным максимумом флуоресценции (*I*) при комнатной температуре при 673 *ммк* и максимумом (*II*), принадлежащим колебательному подуровню молекулы при 727—728 *ммк* с соотношением *II/I* равным 0,33, близким к величине этого же соотношения, для пигмента в листьях в начале зеленения, что отражает свойства мономерной формы пигмента. При постепенном разбавлении или выцветании такого раствора наблюдалось одинаковое понижение обоих максимумов флуоресценции, при этом отношение *II/I* практически не изменялось; новообразованный в процессе зеленения этиолированных листьев «мономерный» хлорофилл сходен с пигментом в разбавленных растворах, не обладающих эффектом реабсорбции флуоресценции.

При использовании концентрированных растворов хлорофилла *a* в спирте ($\sim 10^{-3} M$), в которых наблюдается сильная реабсорбция флуоресценции (положение максимума при 676,5 *ммк*, отношение $II/I = 0{,}50$), наблюдалось при выцветании постепенное коротковолновое смещение главного максимума и более быстрое понижение флуоресценции при 728 *ммк*, чем в коротковолновом максимуме; отношение *II/I* понижалось.

Таким образом, «отставание» понижения максимума флуоресценции при 738 *ммк* по сравнению с коротковолновым «красным» максимумом при выцветании пигментов в процессе зеленения этиолированных проростков следует объяснить тем, что агрегированные формы хлорофилла в листьях обладают собственной флуоресценцией в этой области спектра (735—740 *ммк*), наблюдаемой и при комнатной температуре. Это явление ранее трудно было обнаружить в листьях растений при измерении спектров флуоресценции из-за наложения эффекта реабсорбции, и флуоресценция агрегированных форм (собственная флуоресценция агрегированных форм) проявляется отчетливо при комнатной температуре только после более быстрого фотохимического разрушения «мономерных» (или начально агрегированных) форм хлорофилла.

По своему положению максимум флуоресценции агрегированной формы при $+20^{\circ}$ близок к положению «второго» колебательного максимума молекулы хлорофилла; замораживание листьев приводит вследствие возрастания квантового выхода флуоресценции агрегированных форм к перераспределению высоты максимумов отдельных форм, и при -196° флуоресценция при 740 *ммк* регистрируется у листьев фасоли как главный максимум в красной области спектра.

Тот факт, что после выцветания пигментов в зеленеющих листьях при комнатной температуре максимум 738 *ммк* в ряде опытов становился более интенсивным, чем коротковолновый максимум, говорит в пользу того, что в ненарушенных листьях не происходит быстрой равновесной дезагрегации пигментов. Это явление, по-видимому, защищает бóльшую часть хлорофилла от разрушения при интенсивном освещении.

Выводы

1. Измерения флуоресценции при комнатной температуре зеленеющих этиолированных листьев фасоли обнаруживают смену форм пигментов, которая ранее наблюдалась по спектрам низкотемпературной флуоресценции.

2. Измерения спектров флуоресценции в процессе выцветания пигментов зеленеющих листьев подтвердили наличие быстровыцветающих и более фотохимически устойчивых агрегированных форм хлорофилла, ранее наблюдавшихся нами в гомогенатах листьев.

3. Деструктивное фотохимическое разрушение коротковолновых форм пигмента в листьях позволяет выявить флуоресценцию агрегированных форм хлорофилла, проводя измерения при комнатной температуре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **85**, 177, 1952.
2. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **91**, 343, 1953.
3. Wolf J. B., Price L., Arch. Biochem. and Biophys., **72**, 293, 1957.
4. Loeffler J. E., Carnegie Inst. Wash. Y. B., **54**, 159, 1954—55.
5. Годнев Т. Н., Шлык А. А., Ляхнович Я. П., Физиол. раст., **4**, 393, 1957.
6. Virgin H. J., Physiol. Plant., **13**, 155, 1960.
7. Shibata K., J. Biochem., **44**, 147, 1957.
8. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **117**, 106, 1957.
9. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. Изв. АН СССР, Сер. физ., **23**, 82, 1959.
10. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия, **25**, 168, 1960.
11. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А., Биохимия, **25** 524, 1963.
12. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика, **12**, 240, 1967.
13. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика, **4**, 392, 1961.
14. French C. S., Young V. K., J. Gen. Physiol., **35**, 873, 1952.

Поступила в редакцию

УДК 542.97

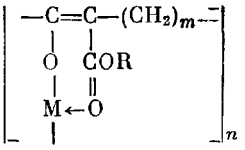
ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ КОМПЛЕКСОВ С МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ (ОКСИДАЗНОЕ И КАТАЛАЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ)

С. Л. Давыдова, Н. А. Платэ, Г. П. Брин, С. Ш. Рашидова, А. А. Красновский, В. А. Каргин

Исследована аскорбиноксидазная и каталазная активности макромолекулярных комплексов поли-β-кетоэфирного типа I ($m = 2, 6, 7, 9$); каталитическая активность макромолекулярных комплексов в первом случае уменьшается в ряду Cu > Ni > Mn, Co, Fe; каталазная активность падает в ряду Co > Mn > Fe > Ni, Cu. Показано, что каталитическая активность комплексов зависит не только от природы металла и его содержания, но и от природы макромолекулярного лиганда. Максимальной аскорбиноксидазной активностью обладают комплексы переходных металлов типа I ($m = 9$), полученные поликонденсацией диэтилового эфира декандикарбоновой кислоты; наибольшей каталазной активностью обладают комплексы типа I ($m = 6$), полученные на основе диэтилового эфира азелаиновой кислоты.

Ранее [1] наблюдалась каталитическая активность комплексов (фталоцианина) в реакциях окисления аскорбиновой кислоты. В настоящей работе исследовалась каталитическая активность комплексов некоторых переходных металлов с макромолеку-

лярными лигандами поли-β-кетоэфирного типа в реакциях окисления аскорбиновой кислоты и разложения перекиси водорода. Комплексы были получены методом сложно-эфирной поликонденсации диалкиловых эфиров дикарбоновых кислот [2, 3]



(I)

где M = Cu, Ni, Co, Fe, Mn, m = 2, 6, 7, 9, $R = C_2H_5$, n = 12—18.

Характеристика комплексов представлена в таблице.

Индекс	M в звене комплекса (теорет.), %	M в звене комплекса (СФ-метрич.) %	Удельная поверхность $s_{уд}$, $м^2/г$
I-Co	12,95	13,0	4,9
I-Mn	11,34	6,6	2,1
I-Ni	12,97	9,8	8,7
I-Cu	13,88	10,3	2,3
I-Fe	11,54	9,3	24,55

Экспериментальная часть. Комплексы переходных металлов Cu, Ni, Co, Fe, Mn типа (I) получали сливанием 1%-ного раствора поли-β-кетоэфира (молекулярная масса 1100—1600) в диоксане или диметилформамиде с раствором соли соответствующего металла в 50 *мл* дистиллированной воды; соотношение макромолекулярного лиганда — соли (в молях) 2 : 1. Полученную водно-диоксановую или водно-диметилформамидную суспензию встряхивали на качалке в течение нескольких часов, затем многократно промывали растворителем и дистиллированной водой до отрицательной реакции в промывных водах на металл; хелаты сушили и хранили над P_2O_5.

Окисление аскорбиновой кислоты исследовали на приборе Варбурга [4] при 20° С, на каждое определение брали навеску полимера ~100 *мг*, 5 *мг* аскорбиновой кислоты и 10 *мл* воды. Поглощение кислорода измеряли в $мм^3$ O_2.

Разложение перекиси водорода проводили по методике Варбурга — Баркрофта [4] при 20° С, на определение брали навеску вещества 20 *мг*, дистиллированной воды 9 *мл*, 5%-ной перекиси водорода 1 *мл*. Выделение кислорода измеряли в $мм^3$ O_2.

Определение содержания металлов в макромолекулярных комплексах переходных металлов типа (I) проводили по известной методике [5] на спектрофотометре СФ-4а.

Удельную поверхность макромолекулярных комплексов определяли газо-хроматографическим методом (в лаборатории адсорбции МГУ Т. Б. Гаврилова).

Исследование аскорбиноксидазной активности. На рис. 1 представлена кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии макромолекулярных комплексов типа (I) (m = 6). Каталитическая активность комплексов поли-β-кетоэфиров уменьшается в ряду Cu > Ni > Co, Mn, Fe; отметим, что повторное использование катализаторов не влияет на их каталитическую активность.

Нами были определены константы образования (замещения) для макромолекулярных комплексов поли-β-кетоэфиров тех же переходных металлов; полученные константы образования убывают в ряду Cu > Ni > Co > Mn. Из рис. 1 видно, что в этом же ряду убывает каталитическая активность комплексов переходных металлов типа (I) в реакции окисления аскорбиновой кислоты.

Была исследована также зависимость каталитической активности макромолекулярных комплексов (I) от содержания в них металла, для чего был выбран в качестве объекта наиболее активный образец — макромолекулярный хелат меди типа (I) (m = 6). На рис. 2 приведена кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии макромолекулярных хелатов I-Cu, из которого следует, что каталитическая активность комплексов поли-β-кетоэфиров и меди уменьшается с уменьшением содержания в них меди (линии *1—4*), то же наблюдается и при уменьшении степени закомплексованности (линии *1'—4'*). В последнем случае дело заключается, по-видимому, в уменьшении числа активных центров на поверхности макромолекулярного комплекса, доступных для реакции.

Наряду с макромолекулярными комплексами типа (I), в которых полиметиленовая цепь между координационными узлами состоит из шести звеньев — CH_2 —, были синтезированы [3] и изучены в реакции окисления аскорбиновой кислоты медные комплексы с макромолекулярными лигандами с различной длиной полиметиленовой цепи (I, m = 2, 7, 9). Кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии этих комплексов представлена на рис. 3. С увеличением длины полиметиленовой цепи между координационными узлами возрастает активность хелатов, достигая максимального

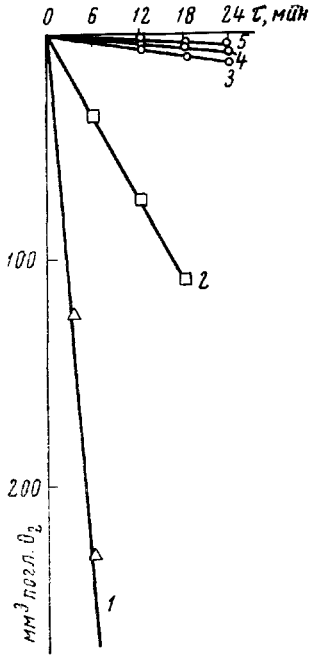


Рис. 1. Кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии комплексов I ($m = 6$); содержание металлов: *1* — Cu = 3, *2* — Ni = 4,9, *3* — Mn = = 3,3, *4* — Co = 2,6 и *5* — Fe = = 4,7 *мг*

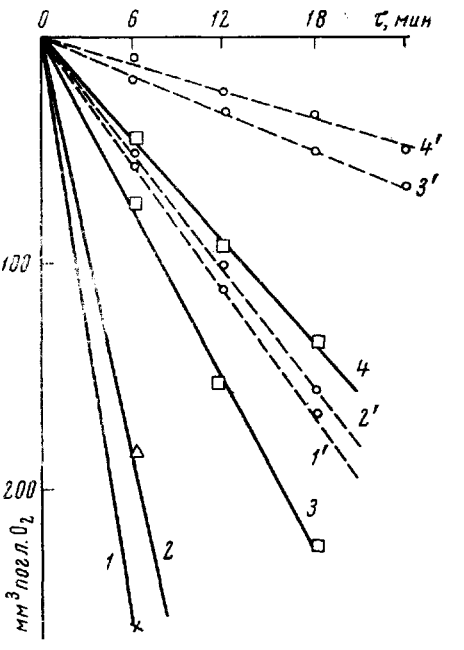


Рис. 2. Зависимость аскорбиноксидазной активности макромолекулярных комплексов типа I ($m = 6$) от содержания меди (*1*—*4*): *1* — 15, *2* — 11, *3* — 8, *4* — 6 *мг*, *1′*—*4′* — от степени закомплексованности кординационных центров (Cu = 1,1 *мг*): *1′* — 100, *2′* — 70, *3′* — 50 и *4′* — 40%

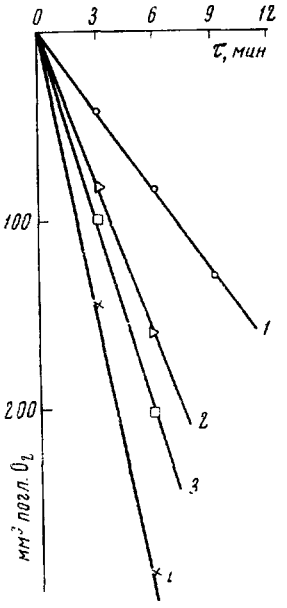


Рис. 3. Кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии макромолекулярных комплексов типа I для различных значений m: *1* — 2, *2* — 6, *3* — 7, *4* — 9; содержание меди во всех образцах 8,47 *мг*

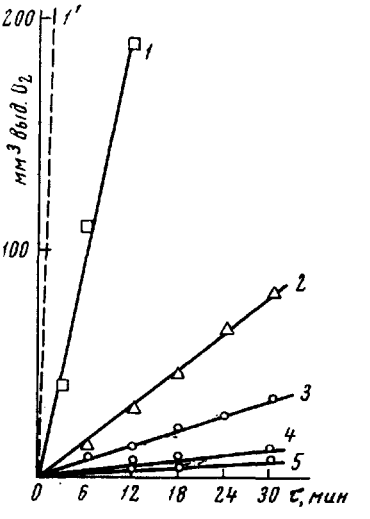


Рис. 4. Кинетика разложения перекиси водорода в присутствии макромолекулярных комплексов типа I ($m = 6$): *1* — Co = 2,8, *2* — Mn = = 1,3, *3* — Fe = 1,8, *4* — Ni = 1,9 и *5* — Cu = 2 *мг*; *1′* — разложение H_2O_2 в присутствии I-Co (2,8 *мг*) при pH = 10

значения для медного хелата поли-β-кетоэфира, полученного поликонденсацией диэтилового эфира декандикарбоновой кислоты.

Попытки провести сравнения полученных нами рядов активности переходных металлов в макромолекулярных комплексах (I) с рядами, предложенными в литературе (на примере оксидазного действия), оказались неудачными, поскольку для случаев использования разных комплексообразователей получены трудносравнимые результаты [6].

Исследование каталазной активности. На рис. 4 показана кинетика разложения перекиси водорода в присутствии макромолекулярных комплексов, из которого видно, что каталитическая активность комплексов типа (I) ($m = 6$) в реакции разложения H_2O_2 уменьшается в ряду: Co > Mn > Fe, Ni, Cu; повторное использование макромолекулярных комплексов не влияет на их каталитическую активность (рис. 5). Полученный ряд убывающей активности является обратным ряду, в котором уменьшаются значения констант

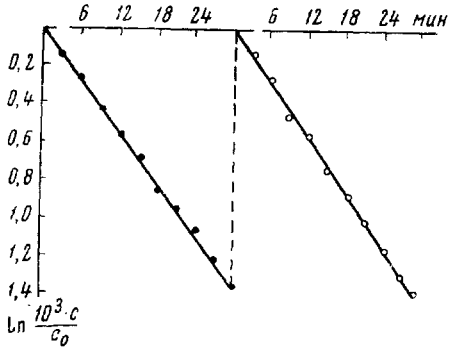


Рис. 5

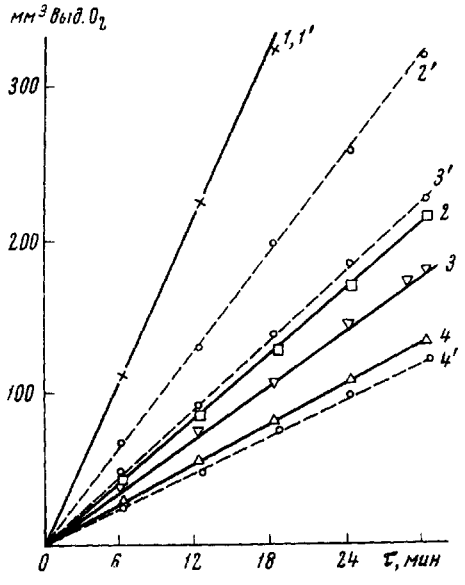


Рис. 6

Рис. 5. Кинетика разложения H_2O_2 в присутствии макромолекулярных комплексов I-Co (2,8 *мг*); линии — параллельные опыты

Рис. 6. Зависимость каталазной активности макромолекулярных комплексов типа I ($m = 6$): *1—4* от содержания кобальта; *1* — 2,8, *2* — 2, *3* — 1,8 и *4* — 1,6 *мг*; *1′—4′* — от степени закомплексованности координационных центров (Co-2,8 *мг*): *1′* — 100, *2′* — 70, *3′* — 60 и *4′* — 50%

образования (замещения), определенными нами для этих же макромолекулярных комплексов. Как и при исследовании оксидазной активности, выбрав в качестве объекта дальнейшего изучения разложения перекиси водорода наиболее активный образец — макромолекулярный хелат кобальта I-Co, мы исследовали зависимость каталитической активности этого хелата от содержания в нем металла.

На рис. 6 представлена кинетика разложения H_2O_2 в присутствии макромолекулярных хелатов I-Co в зависимости от содержания металла при одинаковой навеске хелата (линии (*1—4*) и от степени закомплексованности координационных центров при эквивалентном содержании кобальта во всех образцах (линии *1′—4′*). Полученные закономерности аналогичны таковым для случая окисления аскорбиновой кислоты, и каталитическая активность комплексов поли-β-кетоэфиров и кобальта уменьшается с уменьшением содержания в них кобальта; то же наблюдается и в случае уменьшения степени закомплексованности.

Среди макромолекулярных комплексов кобальта с различной длиной полиметиленовой цепи между координационными узлами (I, $m = 6, 7, 9$) в реакции разложения H_2O_2 наиболее активными являются кобальтовый хелат поли-β-кетоэфира, полученного поликонденсацией диэтилового эфира азелаиновой кислоты (рис. 7). Кроме того, обнаружено значительное увеличение каталитической активности макромолекулярного комплекса I-Co ($m = 6$) при повышении значения pH до 10 (рис. 4, линия *1′*), подобно тому, как это наблюдали Н. П. Кейер и сотрудники [7] при исследовании разложения H_2O_2 в присутствии поликоординационных хелатов меди.

Объяснение инверсии ряда активности при окислении аскорбиновой кислоты и разложении H_2O_2 следует искать в известном принципе антибатности оксидазной и каталазной активностей [8]. Отметим здесь же, что в исследованной нами реакции полимеризации виниловых мономеров на макромолекулярных комплексах типа (I) ($m = 6, 7, 9$) ряд активности последних совпадает с рядом активности, полученным для реакции разложения H_2O_2 [9].

С целью оценки количества доступных активных центров для одного из макромолекулярных комплексов (I-Mn) была снята изотерма адсорбции азота по методу БЭТ [10, 11], имеющая типичный вид изотермы веществ с активной поверхностью (рис. 8).

Ориентировочный расчет количества координационных центров, непосредственно участвующих в катализе реакций окисления аскорбиновой кислоты и разложения H_2O_2, показывает, что только 0,3% координационных центров находится на поверхности и участвует в каталитическом акте.

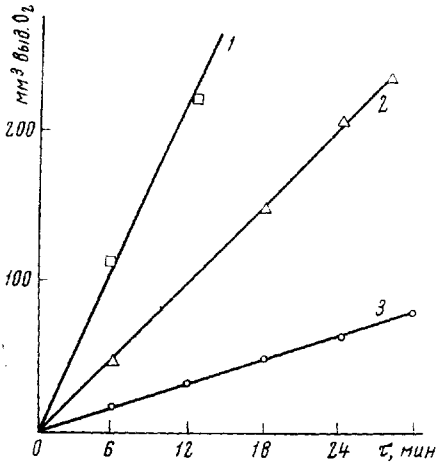


Рис. 7

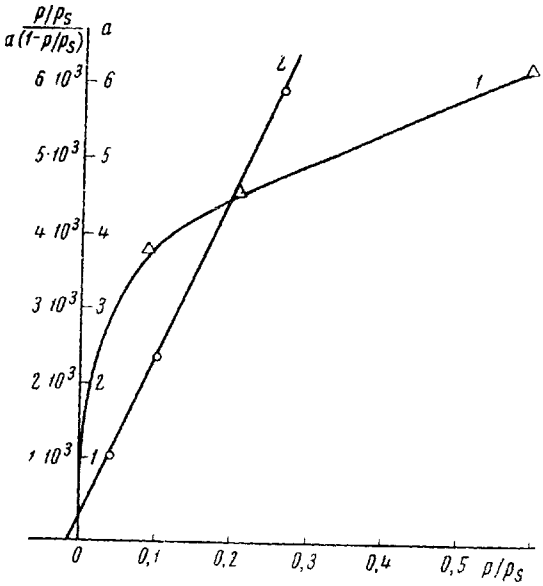


Рис. 8

Рис. 7. Кинетика разложения H_2O_2 в присутствии макромолекулярных комплексов типа (I) при различных значениях m: *1* — 6, *2* — 7, *3* — 9; содержание кобальта во всех образцах 2,2 *мг*

Рис. 8. Изотермы адсорбции азота на Mn-комплексе поли-β-кетоэфира (I) ($m = 6$):

1 — в координатах $a - p/p_s$, *2* — в координатах $\frac{p/p_s}{a(1-p/p_s)} - p/p_s$

Таким образом, несмотря на фактически незначительную долю активных центров, доступных для реакции, макромолекулярные комплексы переходных металлов оказываются все же весьма активными в катализе разложения перекиси водорода и других реакций.

Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева
Академии наук СССР
Москва

Поступила
13.V.1967

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. П. Брин, А. А. Красновский, Докл. АН СССР, 53, 443, 1946.
2. С. Л. Давыдова, Н. А. Платэ, Е. Д. Кукина, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, 169, 378, 1966.
3. С. Л. Давыдова, С. Ш. Рашидова, Н. А. Платэ, Высокомолекул. соед., 9, 150, 1967.
4. В. В. Умбрайт, Р. Х. Буррис, Дж. Ф. Штауффер, Манометрические методы изучения тканевого обмена, Изд-во иностр. лит., М., 1951.
5. В. М. Пешкова, М. М. Громова, Практическое руководство по спектроскопии и колориметрии, Изд-во Моск. ун-та, 1965.
6. В. Лангенбек. Органические катализаторы, Изд-во иностр. лит., М., 1961, стр. 80.
7. Н. П. Кейер, М. Г. Троицкая, Е. Г. Рухадзе, Кинетика и катализ, 3, 691, 1962.
8. Л. А. Николаев, Биокатализаторы и их модели. «Высшая школа», М., 1963.

9. S. L. Davydova, N. A. Plate, V. A. Kargin, Proc. of Tenth Inter. Conference on Coordination Chemistry, 255, 1967.
10. T. M. Nelson, Analyt. Chem., 30, 1387, 1958.
11. O. Grubner, J. Phys. Chem., 216, 287, 1961.

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 183, № 1

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Н. Н. ДРОЗДОВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Е. А. ОБОЛЬНИКОВА, Г. И. САМОХВАЛОВ

ОБРАТИМОЕ ФОТООКИСЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА УБИХИНОНАМИ

Широкое распространение убихинонов в фотосинтезирующих бактериях требует исследования их возможного участия в реакциях фотосинтетического переноса электрона при бактериальном фотосинтезе. Перенос электрона, вызванный светом, между хлорофиллом и различными хинонами, в том числе и убихиноном (UQ_6), обнаружили Толлин и Грин при помощи метода э.п.р. ([1]). Возможность прямого фотохимического взаимодействия убихинона UQ_0 (2,3-диметокси-5-метилбензохинон) с возбужденными молекулами хлорофилла и бактериохлорофилла путем спектральных измерений была установлена нами при исследовании фотоокисления тетрапиррольных пигментов разными хинонами, однако тогда мы не смогли наблюдать реакцию с убихиноном UQ_3 ([2, 3]). Евстигнеев с сотрудниками ([4]) описали взаимодействие хлорофилла и бактериовиридина с пластохиноном. Ке, Вернон и Шоу, применяя метод импульсной спектроскопии, показали возможность передачи электрона от возбужденного хлорофилла к молекулам убихинона (UQ_6) с образованием положительного ион-радикала хлорофилла и семихинона ([5]). В предыдущей работе мы изучали условия обратимого и необратимого окисления бактериохлорофилла орто- и парабензохинонами и показали, что обратимое фотоокисление бактериохлорофилла сопровождается образованием продукта, поглощающего при 430 мμ ([6]).

В настоящем сообщении приводятся данные, свидетельствующие о прямом фотохимическом взаимодействии возбужденной молекулы бактериохлорофилла с рядом убихинонов.

Мы использовали бактериохлорофилл, выделенный из пурпурных бактерий, с конечной хроматографией на сахарозе, и ряд убихинонов, синтезированных во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте: UQ_6 по методу ([7]), UQ_2, гексагидро- UQ_4 — ([8]) и UQ_{10} — по методу Линкса и Тола ([9]) из митохондрий бычьих сердец. Опыты проводили в вакуумных трубках Тунберга при температуре 20°. В трубку вводили требуемое количество спиртового раствора бактериохлорофилла и глицерин. Оптическая плотность в красном максимуме поглощения была около 1,0, т. е. концентрация пигмента примерно 10^{-5} *М*. Спиртовый раствор убихинонов приливали из бокового отвода трубки после откачивания воздуха и проверки того, что раствор бактериохлорофилла до прибавления убихинона не изменяется при освещении. Концентрация убихинона в опыте была 10^{-2} *М*, соотношение спирта к глицерину 3 : 2. Освещение осуществляли через темно-красный фильтр КС-19 в области главного максимума поглощения бактериохлорофилла, интенсивность света 10^5 эрг/см^2·сек. Источник света — лампа накаливания 300 вт с конденсором и водяным фильтром. Запись спектров поглощения бактериохлорофилла до и после фотохимической реакции производили на модифицированном спектрофотометре СФ-10 от 400 до 900 мμ. Из этих данных рассчитывали дифференциальные спектры промежуточных продуктов. Скорость изменения поглощения при одной длине волны измеряли на спектрофотометре СФ-4.

Изменение окислительно-восстановительного потенциала при фотореакции наблюдали в специальном вакуумном сосуде с использованием платинового электрода и потенциометра ЛПУ-01 по методике, принятой в нашей лаборатории ([10]).

Обратимую реакцию бактериохлорофилла с убихинонами удается наблюдать уже при комнатной температуре; на рис. 1*А* приведен дифференциальный спектр (свет — темнота) продуктов фотохимического взаимодействия бактериохлорофилла с гексагидроубихиноном Q_4, измеренный при 20°. Видно, что при освещении раствора происходит уменьшение поглощения в области главного максимума пигмента и появление новой полосы при 430 мμ. Реакция обратима при выключении света. С другими исследованными убихинонами UQ_0, UQ_2 и UQ_{10} получены подобные же спектры. Так как при 20° обратная реакция в темноте идет довольно быстро, то в другом опыте мы записывали спектр раствора бактериохлорофилла с убихиноном до освещения при температуре —70°, освещали систему при комнатной температуре, затем быстро замораживали раствор для замедления обратной реакции и опять записывали спектр. В этом случае (рис. 1*Б*) удается регистрировать большие изменения в поглощении; кроме того, дифференциальный спектр продукта имеет дополнительную полосу поглощения при 490 мμ, обязанную, по-видимому, лабильной окисленной форме бактериохлорофилла, которая, возможно, и обусловливает изменение окислительно-восстановительного потенциала раствора бактериохлорофилла при освещении.

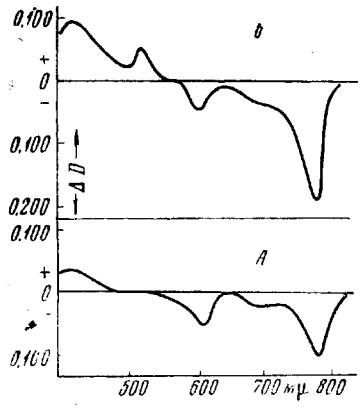


Рис. 1. Дифференциальный спектр продукта фотоокисления бактериохлорофилла гексагидро-убихиноном (UQ_4), измеренный при 20° (*А*) и при —70° (*Б*)

В контрольном опыте с 2,3-диметокси-5-метилгидрохиноном (UQ_0H_2), полученным по методу ([11]), не наблюдали изменений в спектре бактериохлорофилла при освещении.

В следующей серии опытов мы измеряли скорость изменения оптической плотности раствора бактериохлорофилла в главном максимуме поглощения и при 430 мμ на свету и в темноте при комнатной температуре. На рис. 2 приведены результаты, показывающие, что фотохимическое взаимодействие пигмента с убихинонами происходит быстро и сопровождается насыщением. Обратная реакция в темноте идет до полного возвращения исходной величины *D* при 770 мμ. Нам не удалось из-за быстрой обратной реакции измерить скорость фотореакции бактериохлорофилла с UQ_{10}; понижение температуры до —70° несколько замедляет обратную реакцию, но не настолько, чтобы можно было измерить ее во времени. Кроме того, следует отметить, что фотореакция с UQ_{10} в отличие от других исследованных убихинонов, проходит и в спирте без добавления глицерина, как при комнатной температуре, так и при —70°.

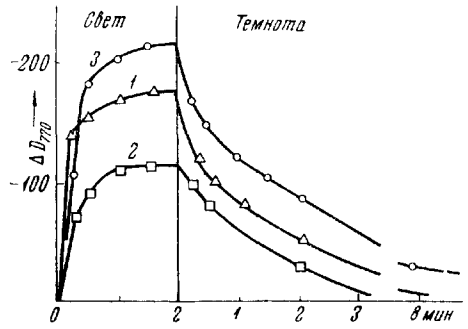


Рис. 2. Обратимое фотохимическое взаимодействие бактериохлорофилла с различными убихинонами. Изменение оптической плотности (ΔD) в красном максимуме поглощения (700 мμ) при прямой (световая) и обратной (темновая) реакциях. *1* — UQ_0, *2* — UQ_2, *3* — UQ_4

Увеличение поглощения в области 430 мμ обусловлено, по нашему мнению, образованием лабильной окисленной формы бактериохлорофилла, а не ионом семихинона. В одной из наших работ ([7]) нами было показано, что при обратимом фотоокислении хлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина *n*-бензохиноном увеличение оптической плотности при 430 мμ наблюдается только в опытах с бактериохлорофиллом; в случае хлорофилла и бактериовиридина этого не происходит. Кроме того, в предыдущей работе ([6]) мы установили, что обратимое фотоокисление бактериохлорофилла различными окислителями, в том числе и перекисью бензоила, сопровождается образованием продукта «430». Как видно из полученных дифференциальных спектров, в реакции с убихинонами происходит образование этого же продукта. На рис. 3 приведен один из опытов с гексагидро-UQ_4, где производилось одновременное измерение оптической плотности при 770 и 430 мμ. Быстрому уменьшению оптической плотности бактериохлорофилла при 770 мμ в первые секунды освещения соответствует быстрое увеличение поглощения при 430 мμ (но оно по величине примерно в 2 раза меньше). Изменение оптической плотности при обратной реакции в темноте также свидетельствует о том, что весь бактериохлорофилл, который прореагировал с убихиноном, образовал продукт «430», так как при увеличении поглощения при 770 мμ одновременно происходит уменьшение D при 430 мμ. При вычислении соотношения $\Delta D_{770} / \Delta D_{430}$ для прямой и обратной реакций получаются соответственно цифры 2,1 и 1,9; при нашей точности спектральных измерений можно сказать, что это одна и та же величина.

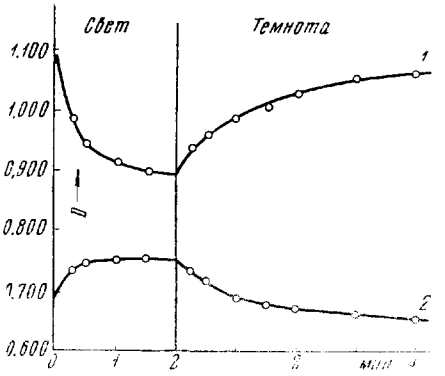


Рис. 3. Изменение оптической плотности при фотоокислении бактериохлорофилла гексагидроубихиноном (UQ_4) при 770 мμ (*1*) и 430 мμ (*2*) на свету и в темноте

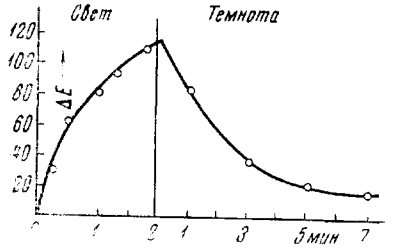


Рис. 4. Изменение фотопотенциала при взаимодействии бактериохлорофилла с убихиноном

В параллельных опытах мы измеряли изменение окислительно-восстановительного потенциала системы бактериохлорофилл — убихинон в спирто-глицериновой среде под действием света. Если первичная реакция обратимого окисления пигмента сопровождается образованием катион-радикала пигмента и анион-радикала семихинона: БХл + Хин → .БХл$^+$ + + .Хин$^-$, то потенциал инертного платинового электрода может влиять образование того или другого типа ионов, что приписывается их «электродной активности».

В наших предыдущих опытах система хлорофилл — парабензохинон в спирто-глицериновой среде при 20° давала изменение потенциала в отрицательную сторону, что могло свидетельствовать о большей электродной активности семихинона в этих условиях ([12]); однако в данной системе мы не могли наблюдать изменения оптической плотности при комнатной температуре; понижение температуры до —70° позволило увидеть спектральные эффекты фотоокисления, но не позволило измерить фотопотенциал из-за большой вязкости среды при —70°. Евстигнеев и Гаврилова наблюдали в опыте по фотоокислению хлорофилла хиноном в кислых средах изменение фотопотенциала в положительную сторону ([13]), что свидетель-

ствует, по их мнению, об электродной активности катион-радикала хлорофилла.

Мы наблюдали, что в наших условиях опыта при освещении растворов бактериохлорофилла с убихинонами при комнатной температуре также происходит изменение потенциала в положительную сторону (рис. 4). Изменение фотопотенциала при освещении растворов бактериохлорофилла со всеми исследованными убихинонами имеет одинаковый характер, что может быть интерпретировано подобным же образом. Однако явление электродной активности фотопродуктов требует более детального исследования. В частности, семихинон может быть как донором, так и акцептором электрона и в зависимости от pH среды может проявляться то или иное свойство этого промежуточного соединения при взаимодействии с электродом.

Итак, приведенные данные свидетельствуют о возможности обратимого фотохимического окисления бактериохлорофилла убихинонами; реализация такого элементарного процесса в живых бактериях недавно показана в работе Ке, Вернона и др. ([14]), обнаруживших фотоокисление реакционного центра бактериохлорофилла P890, сопряженное с фотовосстановлением убихинонов в субхроматофорных фрагментах, изолированных из хроматофоров пурпурных бактерий.

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

Всесоюзный научно-исследовательский
витаминный институт

Поступило
12 VII 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] G. Tollin, G. Green, Biochim. et biophys. acta, **60**, 524 (1964); 66, 308 (1963). [2] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **158**, 730 (1964). [3] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, **30**, 605 (1965). [4] В. Б. Евстигнеев, Н. А. Садовникова, Г. Д. Оловянникова, Молекулярная биология, **2**, 21 (1968). [5] B. Ke, L. P. Vernon, E. Shaw, Biochem. J., **4**, 137 (1965). [6] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова, ДАН, **177**, 1225 (1967). [7] Е. А. Обольникова, О. И. Волкова и др., Авт. свид. № 197598; Бюлл. изобр., № 13 (1967). [8] Е. А. Обольникова, О. И. Волкова, Г. И. Самохвалова, ЖОХ, **38**, 459 (1968). [9] J. Links, O. Tol, Biochim. et biophys. acta, **73**, 349 (1963). [10] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953). [11] F. Weygand, H. Weber, E. Maekawa, Chem. Ber., **90**, 1879 (1957). [12] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **153**, 721 (1963). [13] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **165**, 1435 (1965). [14] B. Ke, L. P. Vernon et al., Biochem. J., **7**, 311 (1968).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 2 1968 Вып. 4

УДК 577.45

ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИКОЭРИТРИНА ИЗ *CALLITHAMNION RUBOSUM*

Л. Г. ЕРОХИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР и биолого-почвенный факультет Государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва

Исследовано влияние различных воздействий на спектральные свойства фикоэритрина из *Callithamnion rubosum*. Установлено, что воздействие *n*-хлормеркурибензоата, мочевины и щелочной среды приводит к диссоциации молекулы хромопротеида и сопровождается исчезновением длинноволновых максимумов (545 и 570 *ммк*) поглощения и флуоресценции. Путем протеолитического расщепления и кислотного гидролиза выделена хромофорная группа фикоэритрина — фикоэритробилин, обладающий главным максимумом поглощения при 500 *ммк*; положение максимума поглощения в области 540—560 *ммк*, зависит от степени агрегации и ионизации хромофоров. Красная флуоресценция фикоэритробилина возможно обусловлена образованием циклических «квазипорфириновых» структур. Высказано предположение, что длинноволновые максимумы поглощения фикоэритрина обусловлены межхромофорным взаимодействием, связанным со структурой белковой части молекулы; конформационные изменения фикоэритрина при изученных воздействиях могут быть причиной наблюдаемых спектральных изменений.

Фикоэритрин (ФЭ) — пигмент красных водорослей — играет существенную роль в фотосинтезе этих организмов, обеспечивая эффективную передачу поглощенной им энергии света к хлорофиллу *a*.

ФЭ представляет собой хромопротеид, выделенный в кристаллическом виде [1]. Исследования взаимодействия хромофорных групп друг с другом и с белковой частью молекулы ФЭ связаны с проблемой молекулярной организации фотосинтетического аппарата. Распространенный метод исследования природы этих взаимодействий основан на изучении спектральных свойств пигментов. ФЭ, выделенные из различных водорослей спектрально различаются, что служит основой их классификации [2]. Наиболее изучен R-фикоэритрин, характеризующийся тремя максимумами поглощения в видимой области спектра, обусловленные присутствием хромофорных групп. Хромофоры ФЭ, выделенные впервые Лембергом и идентифицированные как аналоги желчных кислот, носят название фикоэритробилинов [3]. Химическая природа этих соединений и их свойства не установлены достаточно точно, что вносит некоторое разногласие в интерпретацию спектральных свойств ФЭ [4]. В нашей лаборатории наблюдали резкие изменения в спектре поглощения ФЭ под действием спирта денатурирующим белок [5]. Это позволяет предположить возможность влияния конформации белка на спектральные свойства ФЭ. Недавно Пекки и Фуджмори установили диссоциацию ФЭ на субъединицы при действии *n*-хлормеркурибензоата (*n*ХМБ) и вызванное этим исчезновение максимума поглощения 570 *ммк* [6; 7]. Возможно, что

указанный максимум поглощения, связанный с ассоциацией белковой молекулы ФЭ, определяет взаимодействие хромофорных группировок друг с другом.

В данной работе мы пытались систематически исследовать спектры поглощения и флуоресценции под влиянием различных денатурирующих воздействий. Предполагалось, что эти воздействия помогут выяснить природу взаимодействия хромофорных групп друг с другом и влияние состояния белковой молекулы на спектральные свойства ФЭ.

МЕТОДИКА

Одним из нас было показано, что водоросль *C. rubosum* является удобным объектом для выделения ФЭ, так как пигмент очень легко извлекается из водорослей дистиллированной водой. Для выделения и очистки растворов ФЭ приняли в основном методику, кратко описанную ранее [5]. После настаивания водорослей в воде растворы ФЭ пропускали через колонку с $Ca_3(PO_4)_2$. Адсорбированный ФЭ элюировали 0,05 *М* раствором Na_2HPO_4, pH 8,9. Затем ФЭ осаждали 40%-ным раствором насыщенного сернокислого аммония и диализовали на холоду против дистиллированной воды в течение суток. Эту операцию повторяли два раза. Дополнительно очищали растворы ФЭ фильтрацией на колонке с Сефадекс G-200, опять осаждали 40%-ным раствором сернокислого аммония и диализовали против дистиллированной воды на холоду в течение суток. Концентрированный раствор ФЭ хранили в холодильнике под тонким слоем толуола. Степень чистоты полученного препарата проверяли методом электрофореза в полиакриламидном геле. Раствор ФЭ в фосфатном буфере, pH 7,8, давал две зоны, что согласуется с литературными данными [8].

Исследования спектральных свойств проводили при одной и той же концентрации ФЭ в 0,05 *М* фосфатном буфере, pH 7,8. Исследуя влияние pH, использовали цитратно-фосфатный буфер в пределах pH 2,5—8,9 и буфер 0,05 *М* Na_2HPO_4 + 0,05 *М* NaOH для pH 9,0—12,5. При изучении температурной инактивации раствор нагревали в течение 10 мин., быстро охлаждали в воде до комнатной температуры в пределах 5 мин. и проводили измерения.

Спектры поглощения и флуоресценции измеряли после 1 часа воздействия денатурирующего агента. Для опытов использовали: мочевину (х. ч.), меркаптоэтанол, цистеин, восстановленный глютатион, додецилсульфат натрия и Тритон X100, растворители х. ч. Поглощение измеряли на спектрофотометре СФ-10 в кюветах, помещенных в сферу для уменьшения эффектов светорассеяния. Флуоресценцию измеряли на установке, описанной в работе [9]. Для сравнения влияния воздействия интенсивность исходных максимумов поглощения и флуоресценции на графиках принимали за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения и флуоресценции растворов ФЭ

Из рис. 1 видно, что спектр поглощения растворов ФЭ в воде обладает тремя максимумами поглощения: 500, 545 и 570 *ммк*, а спектр флуоресценции двумя — 580 и 630 *ммк*. Замораживание растворов ФЭ до температуры жидкого азота в водно-глицериновых смесях в отношении 2 : 3 вызывает резкое увеличение интенсивности флуоресценции без изменения положения максимумов.

Взвесь кристаллического ФЭ в 40%-ном растворе сернокислого аммония обладает слабой флуоресценцией в той же области спектра, где лежат максимумы флуоресценции растворов ФЭ; при температуре жидкого азота интенсивность этой флуоресценции также увеличивается. Спектр поглощения кристаллического ФЭ в наших условиях терял дискретность, наблюдаемую в растворе, без изменения в положении максимумов в пределах ±3 *ммк*. Вероятно, хромофорные группы, связанные с белком, защищены от дальнейшей агрегации. При замораживании растворов ФЭ до температуры —196° применяли водно-глицериновую смесь (2 : 3). 60% глицерина увеличивают оптическую плотность и флуоресценцию этой смеси на 15—20% по сравнению с водным раствором (рис. 2).

Действие pH среды. Джонес и Фуджимори [10], Еоха [11] в разбавленных кислотах наблюдали исчезновение максимумов поглощения 545

и 570 *ммк* и образование широкой полосы поглощения с максимумом в области 557 *ммк*. Черницкий и Конев [12] обнаружили значительный сдвиг максимумов поглощения и флуоресценции в 0,02 *М* растворе NaOH.

В наших опытах положение максимумов поглощения (500, 545 и 570 *ммк*) и флуоресценции (580 и 630 *ммк*) нативного ФЭ практически не менялось в широком интервале pH (3,5 — 10,2), тогда как относительная интенсивность их возрастала, достигая наибольшего значения при pH 7,8, что наблюдалось ранее в нашей лаборатории [5]. Небольшое увеличение поглощения в изоэлектрической точке при pH 4,4, описанное в работе [5], может быть вызвано увеличением светорассеяния. Об этом свидетельствует некоторое увеличение оптической плотности «вне» измеряемой области поглощения. При кислом и щелочном pH (3>pH>10) вид спектра поглощения и флуоресценции резко и необратимо изменяется (рис. 3). В кислой области (pH<3) максимумы 545 и 570 *ммк* сдвигаются и происходит образование нового максимума при 560 *ммк*, что сопровождается исчезновением флуоресценции. При pH>10 спектр поглощения и флуоресценции смещается в длинноволновую область и наблюдаются новые максимумы поглощения при 515, 560 и 596 *ммк* и максимумы флуоресценции при 612 и 668 *ммк*. Разностные спектры, вычисленные для крайних значений pH 1,95 и pH 12, свидетельствуют об образовании в обоих случаях форм пигментов с поглощением в области 515, 557—560 и 595 *ммк*. Однако необходимо отметить, что измененная форма хромофоров флуоресцирует только в щелочной среде.

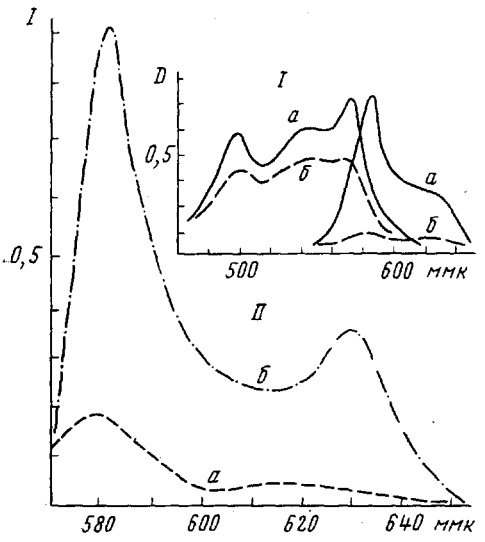


Рис. 1. Спектры поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*) растворов ФЭ

I: *а* — раствор ФЭ (фосфатный буфер, pH 6,8); *б* — кристаллический ФЭ. *II*: *а* — 20°, *б* — —196°

Как известно [13], небольшие изменения pH среды в пределах 4<pH<10 вызывают разворачивание белковой молекулы в результате электростатического взаимодействия одноименно заряженных групп. Таким образом, разворачивание молекулы хромопротеида ведет к уменьшению поглощения, значительному в области длинноволновых максимумов. В сильнокислой и в сильнощелочной средах происходит разрыв водородных связей и появление новых максимумов поглощения 515, 560 и 595 *ммк*, что, очевидно, может быть обусловлено разрывом водородных связей между хромофором и белком. Однако еще в 1928 г. Сведберг [14] наблюдал диссоциацию ФЭ в щелочной среде. Поэтому столь резкое выраженное смещение максимумов может быть либо результатом диссоциации белковой молекулы, либо нарушением связи хромофора с белком и ионизацией хромофора.

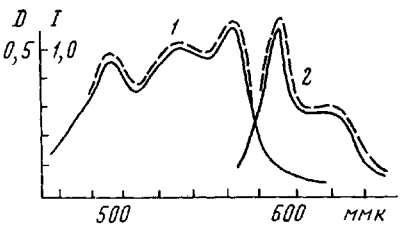
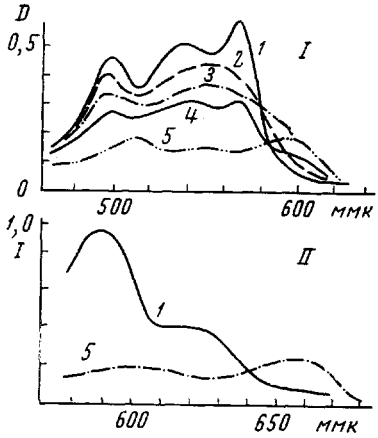


Рис. 2. Спектры поглощения (*1*) и флуоресценции (*2*) растворов ФЭ в фосфатном буфере и в растворе глицерина

Сплошная линия — фосфатчый буфер, pH 6,8; прерывистая — 60%-ный раствор глицерина

Действие мочевины. По данным Еоха [11], действие мочевины подобно действию кислых растворов; в 8 *М* растворе мочевины появляется максимум поглощения при 557 *ммк* и гасится флуоресценция. Черницкий и Конев [12] не обнаружили изменений в спектре поглощения и флуоресценции растворов ФЭ в присутствии 8 *М* мочевины.

В наших опытах мочевина в концентрации до 8 *М* вызывает постепенное уменьшение оптической плотности, наиболее заметное в длинноволновой обла-



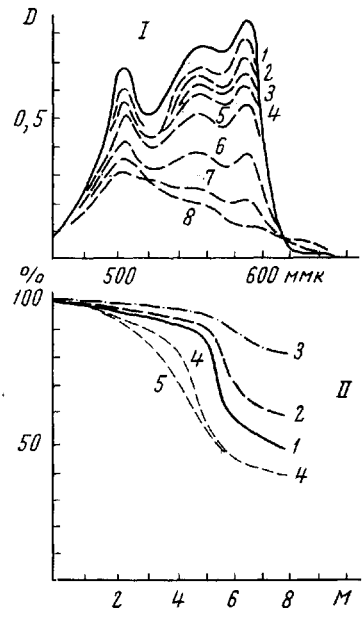


Рис. 3. Спектры поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*) растворов ФЭ при различных pH

1—pH 6,8; *2*—pH 3,0; *3*—pH 2,2; *4*—pH 10; *5*—pH 12

Рис. 4. Влияние мочевины на спектральные свойства ФЭ

I — действие мочевины на спектры поглощения растворов ФЭ. Сплошная линия — раствор ФЭ без мочевины; прерывистая — растворы ФЭ в мочевине; цифры у кривых — концентрация мочевины (*М*). *II* — зависимость интенсивности максимумов поглощения и флуоресценции от концентрации мочевины (*М*). Максимумы поглощения (*ммк*): *1* — 570; *2* — 545; *3* — 500; *4* — максимум флуоресценции 580; *5* — 630.

сти спектра, и уменьшение интенсивности флуоресценции (рис. 4). Воздействие 8 *М* растворов мочевины в течение суток приводит к необратимому исчезновению длинноволновых максимумов поглощения и флуоресценции. Разностные спектры показывают наличие максимумов при 515, 560 *ммк* и небольшого плеча при 595 *ммк* в спектре поглощения растворов ФЭ в присутствии 6—8 *М* мочевины. Следовательно, растворы 8 *М* мочевины, вызывающие разрыв водородных связей и диссоциацию белковых молекул [13; 15], приводят к эффектам, сходным с действием «крайних» pH.

Нагревание. В опытах Еоха и Фуджимори нагревание в течение 1 мин. при 100° вызывало исчезновение длинноволнового максимума поглощения и флуоресценции [10; 11]. Небольшое обесцвечивание растворов ФЭ при нагревании до 80° было отмечено Черницким и Коневым [12].

По нашим данным, оптическая плотность и флуоресценция растворов ФЭ (pH 7,8) уменьшаются уже при нагревании до 30°. К этим условиям длинноволновый максимум поглощения 570 *ммк* особенно чувствителен, и резко снижается он при нагревании до 65°, тогда как снижения максимумов 545 и 500 *ммк* наблюдается лишь при 80° (рис. 5). Резкое уменьшение интенсивности флуоресценции происходит при более низкой температуре нагревания — 60° (рис. 5). У нагретых до 40° растворов ФЭ спектральные свойства восстанавливаются полностью после суток стояния в холодильнике и лишь частично у растворов ФЭ, нагретых до 60°. Нагревание при 90° ведет к появлению в спектре поглощения максиму-

мов при 515, 560 и 595 *ммк* и к потере флуоресценции. Этот эффект необратим.

Очевидно, изменение спектральных свойств растворов ФЭ при нагревании до 30—40° происходит в результате структурных перестроек, возможно, за счет разворачивания белкового компонента. Известно, что

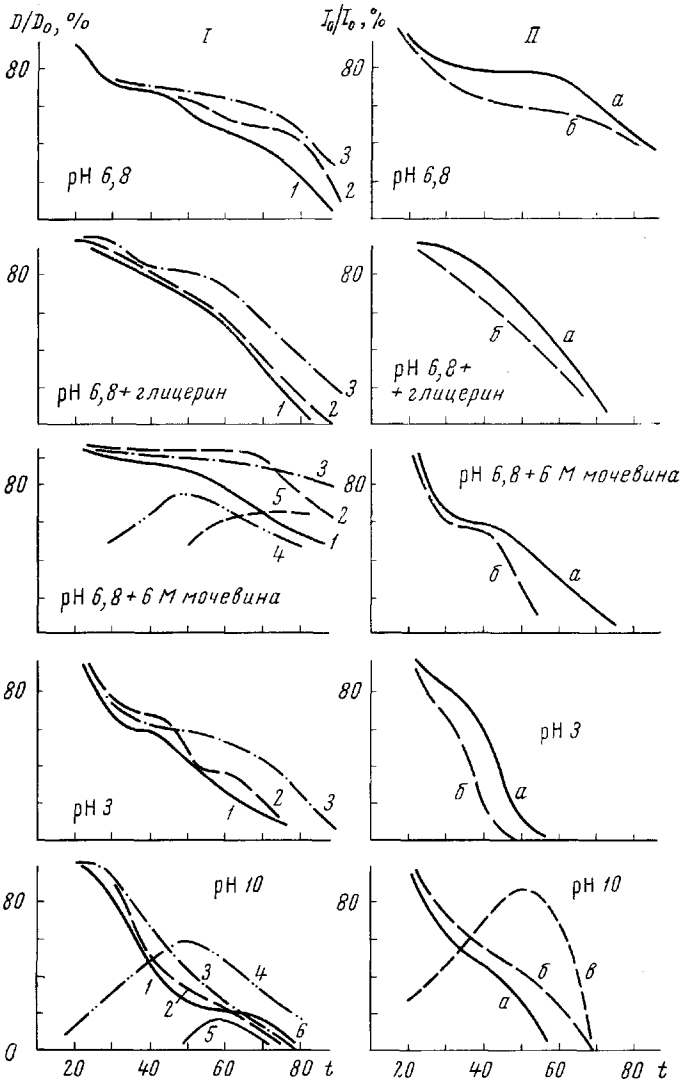


Рис. 5. Зависимость интенсивности максимумов поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*) растворов ФЭ от температуры

I (*ммк*): *1* — 570; *2* — 545; *3* — 500; *4* — 595; *5* — 515. *II* (*ммк*): *а* — 580; *б* — 630; *в* — 668

термостабильность белков может повышаться с повышением pH, а при добавлении мочевины тепловая денатурация происходит при более низких температурах [13; 15]. Опыты по нагреванию растворов ФЭ при различных pH и в присутствии мочевины свидетельствуют о влиянии структуры белка на его спектральные свойства. Как видно из рис. 5, с повышением pH снижение максимума поглощения 570 *ммк* происходит при более высоких температурах: при pH 2 30°, при pH 3 40—45°, при pH 7,8 60°. В противоположность этому, добавление 6 *М* мочевины к раствору ФЭ (pH 7,8) приводит к снижению максимума 570 *ммк* при нагревании до 50° (без мочевины — до 65°), максимума 545 и 500 *ммк* при нагрева-

нии до 65—70° (без мочевины — 80°). Смещение максимумов поглощения и исчезновение флуоресценции при 90° может быть вызвано или диссоциацией молекул хромопротеида, или разрывом водородных связей между хромофором и белком. Добавление 60% глицерина увеличивает устойчивость ФЭ к нагреванию до 50° (рис. 5). Однако при нагревании до 90° происходит более быстрое снижение поглощения и флуоресценции в присутствии глицерина.

Детергенты. Додецилсульфат натрия (0,5%) и Тритон X100 (0,2%) увеличивают оптическую плотность и интенсивность флуоресценции до 10%. Этот эффект наиболее ярко выражен в случае использования Тритон X100, который, являясь неионогенным детергентом, вероятно, изменяет полярность окружения белковой молекулы, что может быть причиной увеличения оптической плотности и флуоресценции [16]. В случае додецилсульфата натрия дополнительный эффект вносит ионная группа, взаимодействующая с противоположно заряженными группами белка и изменяющая электростатическое равновесие белковой молекулы. Этим объясняется снижение поглощения и флуоресценции при увеличении концентрации этого детергента до 2%. Увеличение концентрации Тритон X100 до 1% не влияет на поглощение.

Органические растворители. Исследовалось действие диоксана, ацетона, этиленгликоля и этанола. До 20% растворителя в буферном растворе (pH 7,8) увеличивает оптическую плотность и интенсивность флуоресценции до 10%. С увеличением диэлектрической постоянной растворителя величина этого эффекта уменьшается. Дальнейшее увеличение концентрации растворителей до 80% ведет к уменьшению поглощения, значительному в длинноволновой области спектра, и уменьшению флуоресценции без изменения положения максимумов (рис. 6). Максимум при 500 *ммк* наиболее стабилен при действии растворителей: его интенсивность снижается на 35—40% при концентрации растворителей до 80% (рис. 6). Известно [15], что замена воды частично на диоксан, этиленгликоль, этанол приводит к изменению третичной структуры молекулы белка. Это в свою очередь вызывает уменьшение оптической плотности и флуоресценции. Опыты по действию растворителей указывают на наличие очевидной связи максимумов поглощения 570 и 545 *ммк* с конформацией белкового компонента.

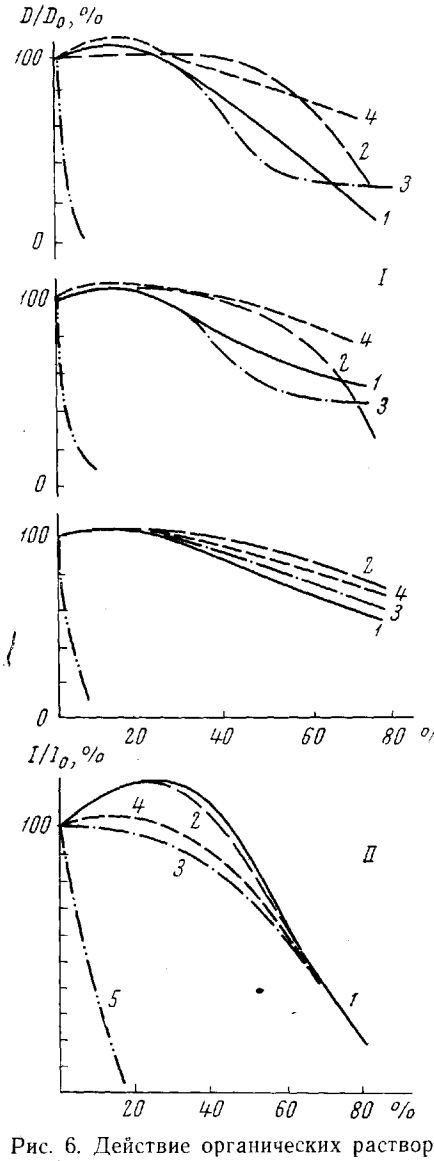


Рис. 6. Действие органических растворителей на интенсивность максимумов поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*)

1 — этанол; *2* — диоксан; *3* — ацетон; *4* — этиленгликоль; *5* — пиридин. По оси абсцисс — концентрация растворителей (%)

При действии пиридина, обладающего основными свойствами, наблюдается образование новых максимумов поглощения при 520, 560 и 595 *ммк* и флуоресценции при 612 *ммк*, т. е. действие этого растворителя приводит к тем же эффектам, что и щелочные pH.

Тиоловые реагенты. Восстановители — 0,01 *М* цистеин, 0,05 *М* глютатион — не влияют на спектральные свойства ФЭ. 0,05 *М* меркаптоэтанол несколько уменьшает оптическую плотность и интенсивность флуоресценции растворов ФЭ (pH 7,8). Действие этих реагентов в присутствии 6 *М* мочевины, а также длительные их воздействия не приводят к существенным изменениям. 0,01 *М* раствор гидросульфита натрия вызывает резкое снижение коротковолнового максимума 500 *ммк*. Добавление гидросульфита к раствору ФЭ, содержащему 6 *М* мочевину, обесцвечивает раствор.

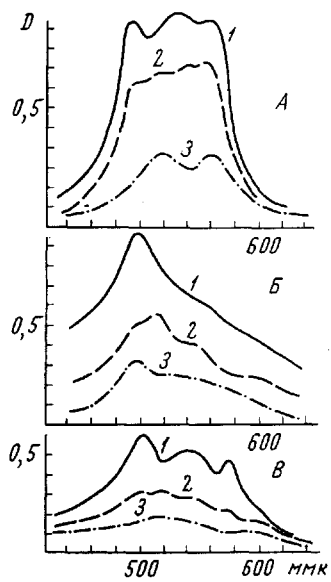


Рис. 7. Спектры поглощения фракций ФЭ, полученных при воздействии *п*ХМБ (*А*), 8 *М* мочевины (*Б*) и при pH 10 (В): *1* — исходные растворы; *2* — фракция *I*; *3* — фракция *II*

Добавление 0,01 *М* раствора *п*ХМБ к раствору ФЭ в фосфатном буфере, pH 8,9, вызывает постепенное уменьшение длинноволновых максимумов поглощения и флуоресценции, что было показано Фуджимори [17]. Одновременно в спектре поглощения растворов ФЭ в присутствии *п*ХМБ мы наблюдали появление максимумов при 515 и 560 *ммк*. Воздействие *п*ХМБ на растворы ФЭ, содержащие 30% спирта, диоксана или 6 *М* мочевину, вызывает мгновенное изменение спектра поглощения: исчезают максимумы при 570 и 545 *ммк* и появляются максимумы 515 и 560 *ммк*. Глютатион и меркаптоэтанол восстанавливают интенсивность длинноволнового максимума при 570 *ммк* после непродолжительного воздействия *п*ХМБ, тогда как длительная инкубация растворов с *п*ХМБ ведет к необратимому исчезновению поглощения 545 и 570 *ммк* и флуоресценции. В этом случае глютатион и меркаптоэтанол восстанавливают только максимум 500 *ммк* с некоторой потерей его интенсивности. Доведение растворов ФЭ до pH 10 приводит к образованию добавочного максимума поглощения при 595 *ммк*, подкисление раствора до pH 3 и добавлении 6 *М* мочевины вызывает смещение максимума 515 *ммк* до 500 *ммк*. Появление максимумов поглощения 515, 560 595 *ммк* в спектре ФЭ в присутствии *п*ХМБ связано, очевидно, с диссоциацией белкового компонента на субъединицы [6; 7].

Это подтверждается нашими опытами по фракционированию растворов ФЭ в присутствии *п*ХМБ, 8 *М* мочевины и в щелочных pH на колонках с Сефадекс G-200. При элюировании растворов в присутствии указанных агентов обнаруживаются две фракции (рис. 7). Фракция I — красного цвета, имеет максимумы поглощения и флуоресценции, сходные с нативным ФЭ. Фракция II, движущаяся намного медленнее первой, характеризуется поглощением в области 515 и 560 *ммк* в присутствии *п*ХМБ (рис. 7, *А*); 515; 560 и 595 *ммк* при диссоциации ФЭ в щелочной среде (рис. 7, *В*); 500 и 560 *ммк* в 8 *М* мочевине (рис. 7, *Б*). Очевидно, фракция II содержит диссоциированные субъединицы. Фракционирование растворов ФЭ после длительной инкубации с *п*ХМБ (6 суток) дает только одну фракцию с максимумами 515 и 560 *ммк*. Различия, наблюдаемые в спектре поглощения субъединиц, вызваны изменениями pH среды. В щелочной среде появляется максимум поглощения 595 *ммк* и

флуоресценция, в кислой среде и в 8 *М* мочевине максимум поглощения 515 *ммк* смещается до 500 *ммк*, что также доказывает влияние ионизации хромофорных групп на их спектральные свойства.

Спектральные эффекты протеолиза

Снижение оптической плотности и интенсивности флуоресценции растворов ФЭ под действием трипсина и пепсина было показано ранее в нашей лаборатории Коневым [18].

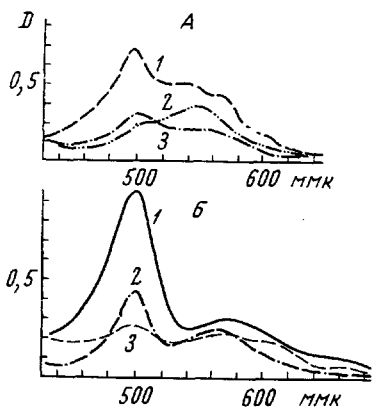


Рис. 8

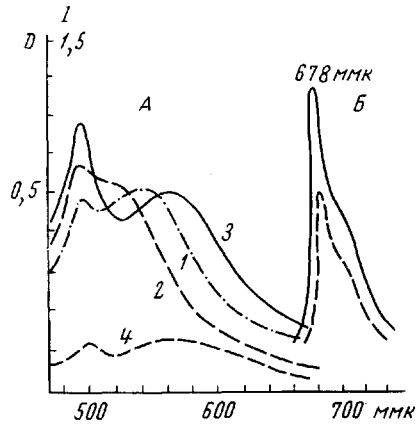


Рис. 9

Рис. 8. Спектральные эффекты протеолиза

А— ферментативный; *Б* — кислотный гидролиз. *А*: *1* — спектры поглощения растворов ФЭ, pH 5, в присутствии проназы; *2* — спектры поглощения фикоэритробилина в амиловом спирте после 6 час. гидролиза; *3* — после 12 час. гидролиза Ф Э. *Б*: *1* — спектры поглощения кислотного гидролизата ФЭ; *2* — спектры поглощения ФЭБ в амиловом спирте; *3* — в хлороформе

Рис. 9. Спектры поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) растворов и пленок ФЭБ

А : ФЭБ в амиловом спирте. *1* — гидролизат, pH 1; *2* — гидролизат, pH 5; *3* — гидролизат 6 н. HCl; *4* — пленка. *Б*: сплошная линия — растворы ФЭБ в амиловом спирте; прерывистая — пленка ФЭБ

Мы исследовали действие протеолитических ферментов и кислотного гидролиза. Для ферментативного расщепления была использована проназа из *Streptomyces griseus*, работающая в нейтральной среде (pH 7,5) при 35°. Кислотный гидролиз проводили в 10 н. HCl при комнатной температуре 30 мин. [4].

Ферментный гидролиз, проводимый в более мягких условиях, чем кислотный, в течение 6 час. вызывал снижение оптической плотности, значительное в длинноволновой области, и уменьшение интенсивности флуоресценции. Максимум 500 *ммк* смещается до 498 *ммк* при одновременном уменьшении его интенсивности (рис. 8, *А*). При более продолжительном гидролизе (12 час.) в спектре поглощения наблюдаются максимумы при 515, 560 и 595 *ммк* и резкое снижение флуоресценции. Кислотный гидролиз в течение 30 мин. приводил к исчезновению максимумов при 545 и 570 *ммк* и образованию небольших полос поглощения в области 570 и 660—670 *ммк*. Максимум 500 *ммк* наиболее стабилен (рис. 8, *Б*). Гидролизат обладает флуоресценцией с главным максимумом при 678 *ммк* и «плечом» в области 710 *ммк*.

Таким образом, спектральные исследования протеолиза указывают на то, что максимумы поглощения 545 и 570 *ммк* можно приписать взаимодействию хромофоров в нативной молекуле белка. Расщепление белковой молекулы при протеолизе на пептидные осколки ведет к разобщению хромофорных групп, что и вызывает эффекты, сходные с действием

кислых и щелочных pH, 8 *М* мочевины, нагревания и *п*ХМБ. Полученные нами данные согласуются с другими работами по протеолизу ФЭ. Так, Фудживара [19; 20] проводил расщепление кристаллического ФЭ из *Pophyra tenera* трипсином и протеиназой из *Bacilis subtilis*, а также пепсином и протеиназой из *S. griseus* с тем, чтобы выделить и изучить свойства полученных пептидов. В первом случае (трипсин+протеиназа *B. subtilis*) в спектре поглощения всех фракций наблюдаются максимумы при 498 и 566—574 *ммк*. Соотношение интенсивностей этих максимумов (498 и 566 *ммк*) зависит от величины пептидов: чем меньше пептид, тем интенсивнее максимум поглощения в области 495—498 *ммк* (самый маленький пептид содержал 10 аминокислотных остатков). При расщеплении пенсином+протеиназой *S. griseus* и при кислотном гидролизе был описан максимум поглощения гидролизата 680 *ммк*.

Спектры фикоэритробилина (ФЭБ). Впервые Лемберг [3], а затем Фудживара [20] выделили хромофор при расщеплении пепсином и провели спектры поглощения ФЭБ в петролейном эфире (pH гидролизата 1,6); ФЭБ обладает наиболее интенсивным максимумом при 498, а также максимумами при 570 и 680 *ммк*. По данным Еоха [4], ФЭБ, получаемый гидролизом ФЭ в 2 н. HCl, имеет максимум 556 *ммк* в 1 н. HCl — 505 *ммк* — в хлороформе; 576 *ммк* — в кислом хлороформе. Эти максимумы поглощения наблюдали также Евстигнеев и Бекасова [21]. Максимум поглощения при 498 *ммк* Еоха приписывает хромофорной группе иного строения — фикоуробилину (ФУБ). ФУБ — изомер ФЭБ, получаемый при более продолжительном гидролизе ФЭБ в концентрированной HCl, характеризуется максимумом 498 *ммк* и небольшим плечом в области 576 *ммк*. Описана флуоресценция ФЭБ в 2,6-лютидине в области 623 *ммк* [4].

Мы экстрагировали ФЭБ из растворов ФЭ (pH 5) амиловым спиртом после расщепления проназой. На рис. 8, *А* представлены спектры поглощения экстрактов после 6 и 12 часов гидролиза, обладающие максимумами при 500 и 540 *мм*. Более длительный гидролиз ведет к увеличению поглощения в области 500 *ммк*. После экстракции ФЭБ амиловым спиртом водный раствор ФЭ сохраняет спектральные свойства нативного ФЭ. Таким образом, фермент лишь частично гидролизует белок. При подкислении гидролизата от pH 5 до pH 1 наблюдается смещение длинноволнового максимума 540 *ммк* до 560 *ммк* (рис. 9, *А*). Была обнаружена флуоресценция ФЭБ в амиловом спирте в области 678 и 710 *ммк* (возбуждение 570—600 *ммк*, рис. 9, *Б*). Замораживание растворов до температуры жидкого азота усиливало интенсивность флуоресценции. В спектре поглощения пленок ФЭБ, полученных испарением амилового спирта в вакууме, сохраняется максимум поглощения 500 *ммк*, а максимум 540 *ммк* смещается до 565 *ммк*, вероятно, вследствие агрегации (рис. 9, *А*). Спектры флуоресценции пленок при —196° отличаются от растворов бóльшей интенсивностью свечения при 678 и 710 *ммк*. При вторичном растворении ФЭБ в эфире или ацетоне существенных изменений в спектре поглощения и флуоресценции не происходит.

В отличие от протеолитического расщепления кислотный гидролиз в 10 н. HCl практически полностью отщепляет все хромофоры от белка. Об этом свидетельствуют следующие факты: гидролизат обладает флуоресценцией при 678 и 710 *ммк*, характерной для свободного ФЭБ, и экстракция сначала хлороформом, затем амиловым спиртом приводит к практически полному обесцвечиванию гидролизата. При экстракции гидролизата в такой последовательности спектры поглощения ФЭБ в амиловом спирте и хлороформе не идентичны (рис. 8, *Б*). Оба раствора имеют острый максимум поглощения при 500 *ммк*, тогда как второй максимум в хлороформе сдвинут в длинноволновую область (580 *ммк*). Кро-

ме того, в хлороформе наблюдается поглощение в области 610—620 и 665—670 *ммк* (рис. 8, *Б*). Спектры флуоресценции обоих экстрактов сходны: основной максимум при 678 *ммк* и «плечо» при 710 *ммк*.

Сдвиг максимума поглощения ФЭБ от 540 *ммк* (при pH 5) до 585 *ммк* в 6 н. HCl можно объяснить как ионизацией, так и агрегацией хромофоров. На возможную роль агрегации указывает смещение максимума поглощения 540 до 565 *ммк* в спектре поглощения пленок, полученных из растворов в амиловом спирте.

Таким образом, ФЭБ, полученный при протеолитическом расщеплении проназой и при кислотном гидролизе, имеет максимум поглощения при 500 *ммк*, тогда как наличие максимумов в более длинноволновой области зависит от природы растворителя и может быть связано либо с агрегацией, либо с ионизацией хромофоров. Флуоресценцию в области 678 и 710 *ммк*, напоминающую флуоресценцию хлорофилла, можно связать с образованием циклических «квазипорфириновых» структур ФЭБ. Эти вопросы требуют дальнейшего исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В спектре поглощения R-ФЭ присутствуют 3 максимума в области 495—500, 540—545 и 565—570 *ммк*, природа и происхождение которых окончательно не выяснены [22]. Вероятно, положение и интенсивность этих максимумов можно связать либо с наличием различных по структуре хромофоров, либо с различными типами связи белок-хромофор, или со строением белкового компонента, влияющего на межхромофорное взаимодействие.

Лемберг [3] показал наличие в молекуле ФЭ спектрально идентичных форм эритробилинов, соединенных с белком пептидной связью. К этим же выводам пришли Черницкий и Конев при исследовании поляризационных спектров флуоресценции ФЭ [12]. Однако Еоха [4], Джонес и Фуджимори [10] предполагают, что в молекуле всех R-ФЭ имеются 2 формы хромофоров — фикоуробилин (ФУБ) и фикоэритробилин (ФЭБ), соединенные с белком помимо пептидной, также водородными связями. Эти авторы считают, что наличие именно слабых связей обусловливает положение максимумов поглощения в области 495—500 *ммк* (в случае ФУБ) и в области 540—545 и 565—570 *ммк* (в случае ФЭБ). Их доказательство основано на изменении спектральных свойств ФЭ при воздействии денатурирующих агентов, рвущих слабые, нековалентные связи между хромофором и белком [4; 10].

Однако неспецифичность воздействия таких различных по характеру агентов, как *п*ХМБ, 8 *М* мочевина и щелочных pH на спектральные свойства ФЭ позволило предположить, что изменение спектральных свойств ФЭ происходит в результате конформационных перестроек белкового компонента. Наши опыты по фракционированию растворов ФЭ в присутствии 8 *М* мочевины, *п*ХМБ и при щелочных pH свидетельствуют о влиянии диссоциации белковой молекулы, приводящей к значительному изменению спектральных свойств ФЭ. Диссоциация ФЭ приводит к разобщению хромофоров и потере межхромофорного взаимодействия, что может объяснить исчезновение максимумов поглощения 545 и 570 *ммк* и флуоресценции. Диссоциация ФЭ на отдельные субъединицы вызывает изменение в микроокружении пигментов, приводящее к смещению нативных максимумов поглощения и к образованию максимумов в области 515, 560 и 595 *ммк*. Различия в спектральных свойствах субъединиц, наблюдаемые при кислых pH и в присутствии 8 *М* мочевины,— смещение максимума поглощения при 515 до 500 *ммк* — и наличие флуоресценции при щелочных pH, связаны с изменением кислотно-основного равновесия среды, приводящему к ионизации хромофоров.

Возможное влияние межхромофорного взаимодействия и ионизации хромофоров подтверждается спектральным исследованием растворов и пленок ФЭБ, выделенных при протеолитическом и кислотном гидролизе ФЭ. ФЭБ имеет главный максимум поглощения при 500 *ммк*, тогда как положение длинноволнового максимума зависит как от агрегации (смещение максимума 540 *ммк* в растворе до 565 *ммк* в пленках), так и от кислотности гидролизата (смещение максимума 540 *ммк* до 585 *ммк* в 6 н. HCl).

Уменьшение максимумов 570 *ммк* при воздействии агентов в мягких условиях (изменение pH среды от 3 до 10, нагревание до температуры 50—60°, небольшие концентрации 1—3 *М* мочевины и растворителей) объясняется изменением белкового компонента на уровне третичной структуры и ослаблением межхромофорного взаимодействия.

Таким образом, можно предположить, что в молекуле ФЭ присутствует один тип хромофорных единиц, связанных с белком только пептидной связью. Очевидно, что максимум 500 *ммк* в спектре поглощения ФЭ принадлежит самому хромофору, а два остальных носят агрегационный характер и, вероятно, появляются вследствие расщепления полосы поглощения ФЭБ в области 560 *ммк* при агрегации [23]. Основанием для такого предположения служит то обстоятельство, что при всех взаимодействиях наблюдается параллельное снижение этих максимумов и исчезновение их при диссоциации ФЭ на субъединицы с одновременным появлением максимума поглощения 560 *ммк*, принадлежащему неагрегированному ФЭБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kylin H., Z. Phys. Chem. **69**, 169, 1910
2. O'hEocha C., in: Comparative Biochemistry of Plant Pigments, p. 181. Acad. Press, N. Y., 1960
3. Lemberg R., Legge I., Hematin Compounds and Bile Pigments. Acad. Press., N. Y., 1949
4. Carra P., O'hEocha C., Carrol D., Biochemistry **3**, 1343, 1964
5. Красновский А. А., Евстигнеев В. Б., Брин Г. П., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **82**, 947, 1952
6. Fujimori E., Pecci T., Arch. Biochem. and Biophys. **118**, 448, 1967
7. Pecci I., Fujimori E., Biochim. et biophys. acta **131**, 197, 1967
8. Hjerten S., J. Chromatograthy **11**, 66, 1963
9. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика **4**, 392, 1961
10. Jones P., Fujimori E., Phisiol. Plant. **14**, 253, 1961
11. O'hEocha C., Carra P., J. Amer. Chem. Soc. **83**, 1091, 1961
12. Черницкий Е. А., Конев С. В., Биофизика **8**, 561, 1963
13. Гауровитц Ф., Химия и функция белков, стр. 187. «Мир», М., 1965
14. Swedberg T., Lewis H., J. Amer. Chem. Soc. **50**, 525, 1928
15. Бреслер С. Е., Введение в молекулярную биологию, стр. 70. «Наука», Л., 1966
16. Конев С. В., Электронно-возбужденные состояния биополимеров, стр. 74. «Наука и жизнь», Минск, 1965
17. Fuimori E., Nature **204**, 4963, 1961
18. Конев С. В., Доклл. АН СССР **16**, 4, 1957
19. Fujiwara T., J. Biochem. **48**, 317, 1960
20. Fujiwara T., J. Biochem. **44**, 723, 1957
21. Евстигнеев В. Б., Бекасова О. Д., Биофизика **2**, 249, 1966
22. Hattori A., Fujita N., J. Biochem. **46**, 7, 1959
23. Теренин А. Н. , Фотоника молекул красителей, стр. 182. «Наука», Л., 1967

Поступила в редакцию
17.I 1968

THE EFFECT OF DENATURATION AGENTS ON THE ABSORPTION AND FLUORESCENCE SPECTRA OF PHYCOERYTHRIN ISOLATED FROM *GALLITHAMNION RUBOSUM*

L. G. EROKCHINA and A. A. KRASNOVSKII

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR und Biological Department of the State University, USSR, Moscow

The effect of various factors (pH of the medium, high temperature, treatment with urea, organic solvents, detergents, thiols and proteolytic enzymes) on the spectral properties of R-phycoerythrin (PE) isolated from *Callithamnion rubosum* was studied. All the agents caused the decrease of the long-wave absorption maxima (545 and 570 $m\mu$). Disappearance of absorption and fluorescence maxima under the action of pCMB, 8 *M* urea and alkaline pH was due to the dissociation of the protein part of the chromoprotein. The suggestion was made that the long-wave absorption and fluorescence spectra were connected with the chromophore-chromophore interactions determined by the structure of the protein part of PE. The phycoerythrobilin, which was the chromophore group of PE, was isolated after the proteolytic digestion, and acidic hydrolysis of PE and its pectral properties in films and solutions were investigated. The data obtained made it possible to conclude that the chromophore-chromophore interactions might influence the spectral properties of the chromoprotein.

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 180, № 4

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Н. В. КАРАПЕТЯН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И СВЕТОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЯХ RHODOTHECE SP.

Несмотря на наличие в клетках интактных пурпурных бактерий трех четко выраженных максимумов поглощения бактериохлорофилла в области 800—900 мμ, обнаружен лишь один максимум флуоресценции с $\lambda > 900$ мμ ([1]). Было сделано заключение, что в этих бактериях флуоресцирует самая длинноволновая форма пигмента и что энергия возбуждения, поглощенная другими формами, мигрирует к длинноволновой форме, а затем к активному центру, который претерпевает обратимые фотохимические превращения ([2, 3]).

Однако «световым» превращениям в пурпурных бактериях подвергаются, очевидно, не только молекулы бактериохлорофилла в активном центре. Об этом свидетельствуют: 1) сложный вид дифференциального спектра поглощения «свет — темнота» бактерий в близкой инфракрасной области, в котором максимумы обнаруживаемых изменений соответствуют максимумам поглощения бактериохлорофилла in vivo; 2) различный характер зависимости индуцированных светом изменений поглощения при 790—810; 850 и 890 мμ от температурной инактивации бактерий ([4]); 3) зависимость вида дифференциального спектра от интенсивности освещения ([5, 8]). Поэтому коротковолновые формы бактериохлорофилла могли бы служить не только для сбора и переноса энергии возбуждения к активному центру. Наше предположение о наличии в пурпурных бактериях Б-850 в двух состояниях определяло поиски коротковолновой флуоресценции, обусловленной Б-850.

В качестве объекта исследования были выбраны пурпурные бактерии Rhodothece sp., у которых формы Б-850 и Б-890 обладают отчетливыми неперекрывающимися максимумами поглощения. Настоящая работа посвящена исследованию спектральных свойств и световых превращений разных форм бактериохлорофилла в клетках этих бактерий.

Опыты проводили с 3—5-дневными клетками бактерий Rhodothece sp. Культура бактерий была выделена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета Московского университета и любезно предоставлена нам Е. Н. Кондратьевой. Бактерии выращивали на минеральной (с гипосульфитом) или органической (с цитратом) среде в термостате при 30° при интенсивности освещения 500 лк. Спектры поглощения бактерий измеряли на модифицированном спектрофотометре СФ-10, позволяющем проводить измерения до 920 мμ. В случае измерений при комнатной температуре кювету с суспензией бактерий помещали в сферу; в случае измерения спектров при температуре жидкого азота в сферу вносили маленький сосуд Дьюара с замороженным объектом. Для получения прозрачной среды к суспензии бактерий добавляли глицерин до 60% конечного объема и быстро замораживали. Измерения спектров флуоресценции и спектров возбуждения флуоресценции при комнатной и низкой температурах проводили на установке, собранной в нашей лаборатории Ю. Е. Ерохиным ([6]). Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» измеряли на собранной нами установке ([7]).

Спектры поглощения бактерий Rhodothece sp. отличаются от спектров других видов пурпурных бактерий: при комнатной температуре обнаруживаются максимумы при 802; 833 и 898 мμ (рис. 1). Положение и интенсивность максимума при 833 мμ зависит от условий роста бактерий. В спектрах поглощения, измеренных при температуре жидкого азота, отчетливо видны максимумы при 802; 824; 844 и 915 мμ (рис. 1). Замораживание вызывает длинноволновый сдвиг максимума при 898 до 915 мμ и выявляет структуру максимума при 833 мμ, обусловленного наложением максимумов при 824 и 844 мμ, соотношение интенсивностей которых и определяет положение общего максимума в спектре поглощения при 20°.

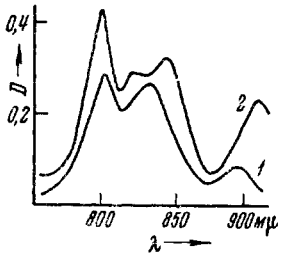


Рис. 1. Спектры поглощения суспензии бактерий Rhodothece sp., измеренные при 20° (*1*) и —196° (*2*)

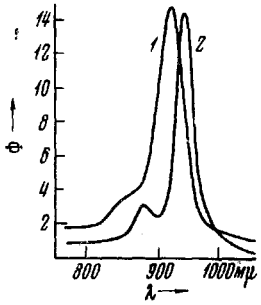


Рис. 2. Спектры флуоресценции суспензии бактерий Rhodothece sp., измеренные при 20° (*1*) и —196° (*2*)

В спектрах флуоресценции, измеренных при 20°, главная полоса с максимумов при 913 мμ имеет асимметричный характер; с коротковолновой стороны этой полосы обнаруживается «плечо» при 850—855 мμ (рис. 2). В то время как положение длинноволнового максимума флуоресценции не изменяется от условий роста, положение «плеча» зависит от этих условий и варьирует в области 845—855 мμ. В низкотемпературных спектрах главный максимум флуоресценции сдвигается до 933 мμ, а «плечо» проявляется в виде максимума при 875 мμ (рис. 2). Можно думать, что коротковолновая флуоресценция принадлежит форме Б-850, что следует из расположения максимумов поглощения при 844 мμ и флуоресценции при 875 мμ в низкотемпературных спектрах. К сожалению, слабая интенсивность этой флуоресценции и недостаточно высокая монохроматичность возбуждающего света в наших опытах пока не позволили идентифицировать максимум при 844 мμ в спектре возбуждения коротковолновой флуоресценции, измеренной при —196°. В то же время максимум при 844 мμ, наряду с максимумами при 802 и 824 мμ, обнаруживается в спектре возбуждения длинноволновой флуоресценции (рис. 3). Однако миграция энергии от Б-850 к Б-890 осуществляется не с 100% эффективностью, поскольку Б-850 способен к независимой флуоресценции.

Относительные спектры возбуждения длинноволновой и коротковолновой флуоресценций неполностью совпадают друг с другом. Так, максимум при 730 мμ более выражен в спектре возбуждения длинноволновой флуоресценции. Если в обоих спектрах возбуждения уравнять максимумы при 593 мμ, то максимумы при 800 мμ не совпадают по интенсивности. Максимум при 800 мμ более выражен в спектре возбуждения коротковолновой флуоресценции; следовательно, эта часть формы Б-800 более эффективно сенсибилизирует флуоресценцию при 875 мμ. Длинноволновая флуоресценция сенсибилизируется Б-800 с меньшей эффективностью, составляющей лишь 70% от эффективности сенсибилизации коротковолновой флуоресценции (при условии, если квантовые выходы обоих типов флуоресценции одинаковы).

Очевидно, Б-850 способен к самостоятельной флуоресценции и в других видах бактерий (Chromatium, Rhodopseudomonas sp.), однако сильное перекрывание максимумов поглощения Б-850 и Б-890 ведет к полной реабсорбции коротковолновой флуоресценции, которая начинает проявляться лишь при нарушении Б-890.

Существенно, что коротковолновая флуоресценция не связана с отмирающими или поврежденными клетками бактерий, так как она обнаруживается у молодых 2-дневных бактерий и ее положение мало изменяется с возрастом клеток. Кроме того, спектры флуоресценции бактерий, осажденных при различных скоростях центрифугирования, были идентичны спектру исходной суспензии бактерий.

При измерении дифференциальных спектров поглощения «свет — темнота» этих бактерий обнаружены два типа спектральных изменений, представленных на рис. 4. В дифференциальном спектре *3*, характерном для окислительной среды, обнаруживается увеличение

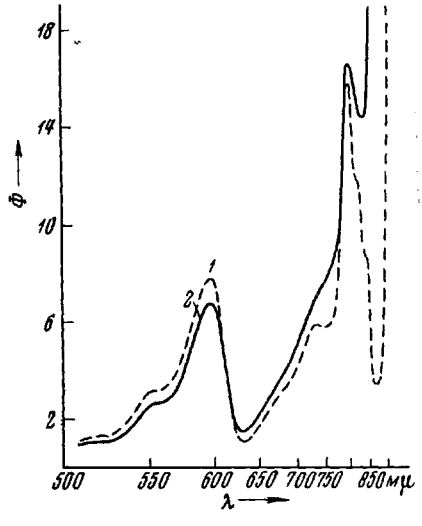


Рис. 3. Относительные спектры возбуждения длинноволновой (*1*) и коротковолновой (*2*) флуоресценций суспензии бактерий Rhodothece sp., измеренные при —196° (спектры не пересчитаны на энергию возбуждающего света). В спектре *1* соотношение интенсивностей максимумов при 802; 824 и 844 мμ изменено из-за использования стеклянного светофильтра СЗС-14 на пути возбуждающего луча с целью уменьшения рассеянного света

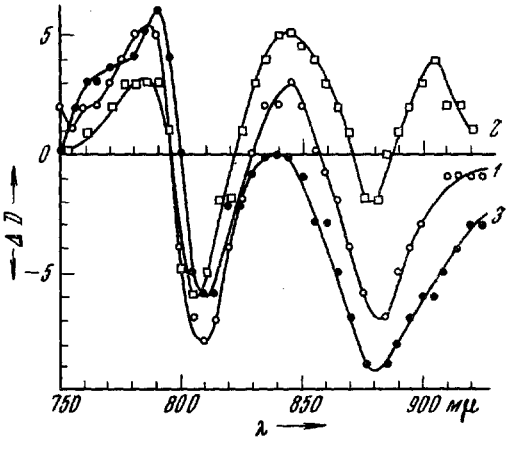


Рис. 4. Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» суспензии бактерий Rhodothece sp. *1* — исходный спектр, *2* — спектр после добавления восстановителя, *3* — спектр после добавления восстановителя и 6 *M* мочевины (сходен со спектром, регистрируемым при освещении бактерий в окислительных условиях)

поглощения при 785 мμ и уменьшение поглощения при 810 и 880 мμ. Интересно отметить, что несмотря на наличие у Rhodothece sp. формы Б-850, светового уменьшения поглощения при 850 мμ, обусловленного этой формой, не наблюдается, как это имеет место у Chromatium и Rhodopseudomonas sp. Спектр *3* приписывается фотоокислению бактериохлорофилла in vivo и наблюдается при глубоком охлаждении бактерий ([2, 3]).

Дифференциальный спектр *2*, наблюдающийся в восстановительных условиях, благоприятных для роста бактерий, характеризуется увеличением поглощения при 780 и 845 мμ (иногда и при 905—910 мμ) и уменьшением поглощения при 805 мμ (и при 880—885 мμ). Следует отметить, что положительный максимум в дифференциальном спектре при 845 мμ (и при 905 мμ) исчезает при добавлении к суспензии бактерий или хроматофоров 6*M* мочевины (конечная концентрация). Дифференциальный спектр бактерий в восстановительной среде в присутствии мочевины (через 1 час после добавления) сходен с дифференциальным спектром, наблюдаемым при освещении бактерий в окислительных условиях (рис. 4).

Спектральные изменения под действием света полностью исчезают при инкубации бактерий с мочевиной в течение 24 час. По-видимому, при кратковременной инкубации (1 час) мочевина вызывает структурные изменения, которые влияют на проявление светового увеличения поглощения при 845 мμ. Возможно, эти данные могли бы служить указанием на то, что положительный максимум при 845 мμ в дифференциальном спектре обусловлен конформационными изменениями носителя, влияющего на состояние связанного с ним пигмента.

Дифференциальные спектры типа *2* были измерены ранее при освещении бактерий низкими интенсивностями света ($2-6 \times 10^3$ эрг/см^2·сек), чтобы исключить фотоокисление активного центра ([5, 8]). В наших опытах накопление фотоокисленного П-890 предотвращалось восстановительной средой, что позволяло получать такие же дифференциальные спектры при гораздо более высоких интенсивностях освещения ($2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек).

Таким образом, способность Б-850 к независимой флуоресценции (и переносу энергии возбуждения к длинноволновой форме) и ее способность к обратимым световым превращениям указывают на существование двух типов Б-850. Кроме того, на основании измерения спектров возбуждения флуоресценции показано наличие двух типов Б-800, которые с различной эффективностью сенсибилизируют коротковолновую и длинноволновую флуоресценции и которые, по-видимому, принадлежат разным пигментным системам. Различная зависимость индуцированных светом изменений поглощения при 790—810; 850 и 890 мμ от температурной инактивации и зависимость вида дифференциального спектра от окислительно-восстановительных условий среды (или от интенсивности освещения) свидетельствуют о том, что световым превращениям подвергаются все три формы бактериохлорофилла. И все же вопрос о том, каким образом указанные превращения связаны с фотосинтезом, ждет своего разрешения. В связи с этим представляется интересным обсудить вопрос о наличии в пурпурных бактериях пигментных систем, которые, возможно, осуществляют разные фотореакции, что обусловливает высокий квантовый расход бактериального фотосинтеза, равный 9—12 ([9]). Однако пока не получено данных, указывающих на наличие эффекта Эмерсона в случае бактериального фотосинтеза.

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

Поступило
19 I 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] L. N. M. Duysens, Thesis, Uthecht, 1952. [2] W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens, Nature, **197**, 355 (1963). [3] R. K. Clayton, Photochem. Photobiol., **1**, 201 (1962). [4] Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский, ДАН, **171**, 1201 (1966). [5] R. K. Clayton, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **50**, 583 (1963). [6] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, **8**, 446 (1963). [7] Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Биофизика, **8**, 191 (1963); ДАН, **144**, 1428 (1963). [8] W. J. Vredenberg, J. Amesz, L. N. M. Duysens, Biochem. Biophys. Res. Commun., **18**, 435 (1965). [9] E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrestein, Enzymologia, **10**, 285 (1942).

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 179, № 3

УДК 541.144.8

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

НАРУШЕНИЕ РЕАКЦИИ ХИЛЛА ДЕЙСТВИЕМ НАГРЕВАНИЯ, РАСТВОРИТЕЛЕЙ И ДЕТЕРГЕНТОВ; УСЛОВИЯ РЕАКТИВАЦИИ

Способность гомогенатов и хлоропластов зеленых листьев к реакции Хилла быстро теряется при комнатной температуре; еще быстрее реакция нарушается при нагревании препаратов. В нашей лаборатории было показано, что при действии растворителей на хлоропласты наблюдается подавление реакции Хилла; наиболее сильным было действие пиридина ([1, 2]). В работах лаборатории Верпона ([3]) и Джагендорфа ([4]) было показано, что введение детергента тритона X-100 (0,007%) в суспензию хлоропластов активирует реакцию Хилла, тогда как более высокие концентрации детергента ингибируют реакцию. Эффект стимулирования реакции Хилла был связан с подавлением фотофосфорилирования.

Существенно найти условия восстановления реакции Хилла, нарушенной под влиянием различных воздействий, чтобы получить данные об условиях структурной организации, ответственной за реакцию выделения кислорода. Этому вопросу посвящено настоящее исследование.

В работе применяли водноглицериновые среды ([5]), в которых активность хлоропластов к реакции Хилла выше, чем в водных средах.

Хлоропласты были выделены из проростков гороха обычными методами ([6]). В опытах использовали хлоропласты свежевыделенные и консервированные в жидком азоте ([7]). Активность хлоропластов к реакции Хилла измеряли по скорости выделения кислорода в присутствии *n*-бензохинона как акцептора электрона, амперометрическим методом ([8]) с использованием платинового электрода, покрытого тефлоновой пленкой. Концентрация хлорофилла в суспензии хлоропластов 10^{-4} *M*, хинона $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M*.

Ячейку из плексигласа с суспензией хлоропластов (5 мл) освещали конденсированным светом киноламны 300 вт через светофильтр КС-10 и через 2-сантиметровый слой 0,5% водного раствора медного купороса (10^5 эрг/см^2·сек). Измерения спектров поглощения — на спектрофотометре СФ-5. Активность хлоропластов обычно выражали в процентах от средней скорости выделения кислорода за 10 мин. освещения водной суспензии хлоропластов при 20° (см. рис. 1 и 3).

Нагревание хлоропластов в водной среде. Суспензию хлоропластов выдерживали 3 мин. при заданной температуре (от 20 до 50°) на водяной бане. Затем при комнатной температуре добавляли свежевозогнанный хинон и измеряли кинетику выделения кислорода при освещении. На рис. 1 показана зависимость скорости выделения кислорода от предварительного нагревания суспензии. Нагревание до 25° ведет к небольшому увеличению активности, дальнейшее повышение температуры вызывает падение активности, и при 50° суспензия практически полностью теряет фотохимическую активность. Поведение свежевыделенных и консервированных в жидком азоте хлоропластов было подобным. При нагревании до 50° максимум поглощения хлорофилла в суспензии не изменяется в пределах 680 ± 2 мμ.

Нагревание хлоропластов в водно-глицериновых средах. Глицерин добавляли к суспензии хлоропластов так, чтобы концентрация хлорофилла оставалась постоянной во всех вариантах опытов. После 10 мин. стояния смеси при 20° измеряли выделение кислорода. Из рис. 2*А* видно, что в присутствии глицерина реакция Хилла выше, чем в

водной среде; максимум активности наблюдается при 40% глицерина, в этом случае активность почти в два раза выше, чем без глицерина. Введение глицерина не влияет на положение максимума поглощения хлорофилла в хлоропластах в пределах ±2 мμ. Следует отметить, что в большинстве опытов консервированные в жидком азоте хлоропласты активируются глицерином сильнее, чем свежевыделенные.

Добавление глицерина (60%) к инактивированным нагреванием хлоро-

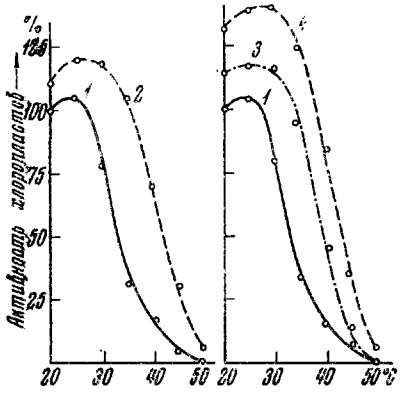


Рис. 1

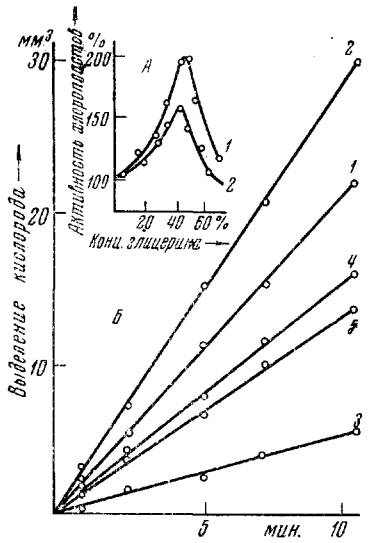


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость скорости реакции Хилла от предварительного нагревания хлоропластов. *1* — в водной среде, *2* — в водноглицериновой среде, *3* — в водной среде с 2% твином-60, *4* — с твином, добавленным после нагревания суспензии (60°)

Рис. 2. *А* — зависимость скорости реакции Хилла от концентрации глицерина: *1* — свежевыделенные хлоропласты, *2* — хлоропласты, консервированные в жидком азоте. *Б* — кинетика выделения кислорода хлоропластами: *1* — при 20° в водной среде, *2* — в водно-глицериновой среде, *3* — при 40° в водной среде, *4* — в водно-глицериновой среде, *5* — при добавлении глицерина после нагревания суспензии до 40°

пластам приводило к увеличению скорости выделения кислорода (рис. 1). Добавление глицерина к суспензии хлоропластов до нагревания (40°) ведет к несколько большему увеличению, чем при введении глицерина после нагревания (рис. 2*Б*) (этот опыт проведен с хлоропластами, которые хранились в жидком азоте). Однако в этих опытах трудно разграничить собственно реактивирующий эффект и увеличение остаточной (после нагревания) активности препаратов. В связи с этим следует упомянуть данные Джагендорфа ([9]) об активирующем влиянии полиэтиленгликоля на реакцию Хилла.

Действие детергентов. Неионный детергент твин-60 в концентрации до 2% мало изменяет скорость реакции Хилла. Однако уже 0,1% детергента сдвигает максимум поглощения хлорофилла в хлоропластах на 2 мμ в сторону коротких волн. При 2% происходит раздвоение максимума с образованием форм 672 и 678 мμ. При добавлении этого детергента к хлоропластам, активность которых подавлена нагреванием, наблюдается реактивирующее действие (рис. 1); добавленный к хлоропластам перед нагреванием (до 40°) детергент (2%) увеличивает активность на 30%, тогда как добавленный к нагретым хлоропластам детергент увеличивает активность на 70%.

Натрий-додецилсульфат до 2% полностью ингибирует реакцию Хилла; в малых концентрациях не наблюдается реактивирующего действия этого детергента на нагретые хлоропласты.

Дигитонин до 0,01% слабо активирует реакцию Хилла. Более высокие концентрации дигитонина ингибируют реакцию. Максимум поглощения хлорофилла в хлоропластах сдвигается в короткую сторону уже при 1% дигитонина. Реактивации нагретых хлоропластов не наблюдается.

Мы подтвердили результаты Джагендорфа и Вернона ([3], [4]) об активации реакции Хилла детергентом тритоном Х-100 в концентрации 0,007%. При 0,1% тритона активность полностью теряется. Максимум поглощения хлорофилла при 0,1% тритона в растворе сдвигается к 672 мμ.

Влияние мочевины. При 0,1 *М* мочевина сдвигает максимум поглощения хлорофилла в хлоропластах от 680 до 676 мμ, при 0,2 *М* наблюдается два максимума — при 672 и 678 мμ; таким образом проявляется дезагрегирующее действие мочевины, так же как и в случае детергентов. При 0,15 мол. мочевины реакция Хилла полностью подавлена. Введение в суспензию хлоропластов глицерина препятствует подавлению реакции Хилла мочевиной; так, при 0,15 мол. мочевины и 60% глицерина активность сохраняется на 30% и лишь 0,2 мол. мочевины полностью подавляет активность хлоропластов (рис. 3).

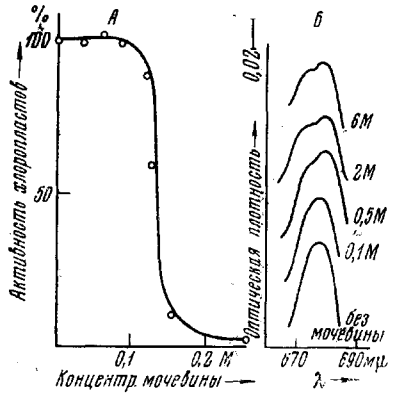


Рис. 3

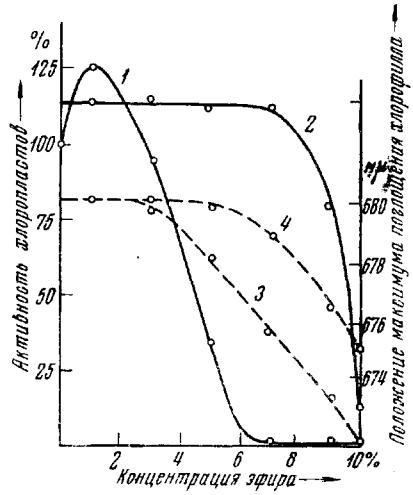


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость скорости реакции Хилла (*А*) и положения максимума поглощения хлорофилла (*Б*) от концентрации мочевины в суспензии хлоропластов

Рис. 4. Влияние этилового эфира на активность хлоропластов (скорость реакции Хилла) и на положение максимума поглощения в хлоропластах. *1* — скорость реакции Хилла в присутствии эфира, *2* — после удаления эфира, *3* — положение максимума поглощения хлоропластов с эфиром, *4* — после удаления эфира

Влияние этилового эфира. Растворимость эфира в воде при 20° составляет 7,5%. Мы добавляли к суспензии хлоропластов от 1 до 10% этилового эфира. Смесь инкубировали 5 мин. и затем измеряли скорость выделения кислорода и спектр поглощения (рис. 4). 1% эфира активирует реакцию Хилла и не сдвигает максимум поглощения хлорофилла. Дальнейшее увеличение концентрации эфира подавляет реакцию, которую уже при 6% эфира не удается наблюдать. Максимум поглощения хлорофилла в суспензии хлоропластов при введении 3% эфира остается при 680 мμ. Дальнейшее увеличение количества эфира в хлоропластах приводит к коротковолновому смещению максимума поглощения хлорофилла до 672 мμ при 10% эфира.

В отдельной серии опытов эфир удаляли из суспензии хлоропластов (после 5 мин. стояния) путем откачивания водоструйным насосом в течение 10 мин. Весьма существенно, что удаление растворенного эфира из суспензии полностью восстанавливает начальную активность хлоропластов; при этом максимум поглощения хлорофилла также возвращается к исход-

ному положению (от 672 до 680 мμ). Необратимые эффекты увеличиваются при переходе через порог растворимости эфира. Таким образом, растворенный в воде эфиловый эфир нарушает состояние хлорофилла в хлоропластах обратимо. В связи с этим следует отметить, что обратимое действие эфира на фотосинтез некоторых растений наблюдалось давно ([10]).

Можно предположить, что нарушение реакции Хилла под действием нагревания, детергентов и растворителей связано скорее с изменением структурной организации системы, чем с ее «химическим» повреждением. Глицерин, стабилизирующий белковые системы, способствует большей устойчивости хлоропластов к повреждающим воздействиям. Для нас наиболее интересны «обратимые» структурные изменения, которые наблюдаются, например, при действии эфира. Так, смещение максимума поглощения хлорофилла в хлоропластах в «коротковолновую» сторону свидетельствует о дезагрегации пигмента в белково-липоидном комплексе пластид. При этом вероятно нарушение организации липоидного компонента системы; нарушаются условия структурного сопряжения и миграции энергии между формами хлорофилла. Удаление эфира приводит к самопроизвольному возвращению системы к исходному типу молекулярной организации. Природа этого явления нуждается в дальнейшем исследовании.

В экспериментальной части работы участвовала Е. Г. Кочкина.

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

Поступило
20 XII 1967

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, **18**, 340 (1953). [2] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, **24**, 1085 (1959). [3] L. P. Vernon, E. Shaw. Plant Physiol., **40**, 1269 (1965). [4] J. Neumann, A. Jagendorf, Biochim. et biophys. acta, **109**, 382 (1965). [5] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **21**, 126 (1956). [6] Н. М. Сисакян, И. И. Филиппович, Э. Н. Светайло, ДАН, **147**, 488 (1962). [7] И. В. Верещинский, А. А. Красновский, Биохимия, **16**, 621 (1951). [8] Г. С. Гришина, Л. Н. Белл, Г. С. Букина, Физиол. раст., **13**, 737 (1966). [9] W. W. Fredricks, A. Jagendorf, Arch. Biochem. and Biophys., **104**, 39 (1964). [10] E. Rabinowitch, Photosynthesis, **1**, N. Y., 1946.

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 182, № 1

УДК 581.19

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. И. БЫСТРОВА

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

Исследования фотохимии «мономерных» форм хлорофилла и его аналогов в растворах показали, что возбужденные молекулы этих пигментов способны к восприятию электрона от молекулы-донора (обратимое фотовосстановление) или отдаче электрона молекуле-акцептору (обратимое фотоокисление) ([1]). Агрегация пигментов и различные типы межмолекулярного взаимодействия приводят к сдвигу максимумов поглощения в длинноволновую область и тушению флуоресценции за счет более эффективной безызлучательной деградации энергии возбуждения. Известно, что твердые пленки и коллоидные растворы хлорофилла и его аналогов, в отличие от истинных растворов пигментов, устойчивы к фотоокислению кислородом воздуха; эта особенность свойственна пленкам даже таких пигментов, как бактериальные хлорофиллы, которые в растворах выцветают весьма активно. Более детальное исследование фотохимических свойств агрегированных форм пигментов весьма существенно, так как эти формы доминируют в фотосинтезирующих организмах.

В данной работе изучалось изменение люминесценции и поглощения при фотоокислении кислородом воздуха хлорофилла и его аналогов в твердых пленках. Спектры люминесценции измеряли на установке, собранной на основе спектрографа ИСП-51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 и фотоумножителем ФЭУ-22. Спектральную область возбуждения выделяли при помощи светофильтра СЗС-22 (линии ртути 365; 404; 436; 546 мμ). Интенсивность возбуждающего света 10^5 эрг/см^2·сек. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-10. Пленки получали при испарении в вакууме эфирных растворов пигментов (обычно 1 мл с концентрацией 10^{-3} M) на стенках стеклянной трубки Тунберга. Откачивание производили масляным форвакуумным насосом, в некоторых опытах — диффузионным насосом с остаточным давлением 10^{-4} мм рт.ст. Такие пленки обычно обладают максимумами поглощения при 676—680 мμ (хлорофилл a) и 700 мμ (феофитин a). В поведении пленок, полученных в разных условиях откачивания, не удалось наблюдать различий ([2]).

Твердые пленки хлорофиллов a и b, протохлорофилла, бактериовиридина и соответствующих феофитинов люминесцируют при комнатной температуре с максимумами в области 740—770 мμ. В присутствии воздуха интенсивность люминесценции быстро, в течение нескольких секунд, необратимо падает под действием возбуждающего света (рис. 1 и 2.) Флуоресценция спиртового раствора хлорофилла a с максимумом около 675 мμ в тех же условиях изменяется значительно медленнее. Откачивание воздуха, а также замораживание до —196° препятствуют быстрому изменению люминесценции пленок под возбуждающим лучом. Аналогичное действие оказывает наливание в сосуд с пленкой пигмента глицерина, нарушающего, по всей вероятности, контакт пленки с кислородом воздуха.

Характерное быстрое уменьшение люминесценции при освещении наблюдается лишь у пленок магниевых комплексов — хлорофиллов a и b, протохлорофилла, бактериовиридина. Изменение свечения у безмагниевых пигментов — феофитинов в условиях фотоокисления было гораздо более медленным, что соответствует поведению этих пигментов в растворах.

Кристаллические пленки хлорофилла a с максимумом ~735 мμ, обра-

зуемые при действии паров метанола ([3]), под возбуждающим лучом обнаруживают такое же быстрое падение люминесценции в области 760 мμ, которое свойственно пленкам других магниевых комплексов в присутствии воздуха.

Можно было предполагать, что интенсивное падение люминесценции связано с выцветанием определенных форм пигментов.

Мы пытались измерить изменение спектров поглощения пленок хлорофилла а и бактериовиридина в процессе выцветания. Регистрируемые спектрофотометром СФ-10 изменения поглощения происходили значительно медленнее по

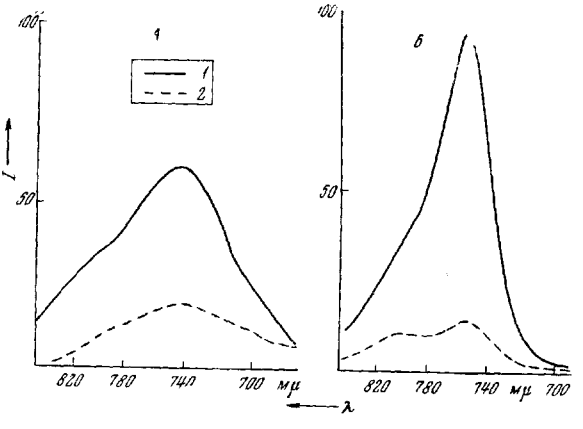


Рис. 1

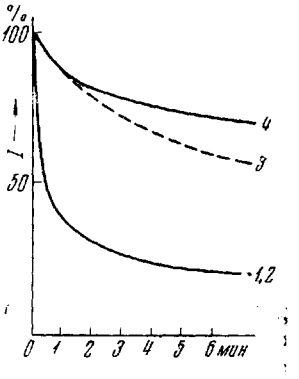


Рис. 2

Рис. 1. Спектры люминесценции пленок хлорофилла а при 20°: *А* — исходной, *Б* — обработанной парами метанола. *1* — при регистрации в вакууме, *2* — после 10-минутного освещения возбуждающим светом в присутствии воздуха

Рис. 2. Падение люминесценции пленок пигментов при освещении возбуждающим светом при 20°. *1, 2* — хлорофилл а (*1*) и бактериовиридин (*2*) в присутствии воздуха; *3* — феофитин а в присутствии воздуха; *4* — хлорофилл а в вакууме

сравнению с изменением люминесценции при освещении. За время (15—30 сек.), в течение которого интенсивность люминесценции резко падала, не удалось наблюдать изменений поглощения в пределах погрешности измерения прибора (0,01 D). При освещении пленок более интенсивным «белым», конденсированным светом лампы накаливания (10^6 эрг/см^2·сек) в течение 1—5 мин. наблюдались небольшие изменения поглощения в области 695—705 мμ в дифференциальном спектре свет — темнота (рис. 3*А*). Следует отметить, что при нагревании пленок хлорофилла а до 80—90° в дифференциальном спектре поглощения также проявляется «отрицательный» максимум при 705 мμ (рис. 3*Б*). Наиболее светочувствительные формы пигмента вместе с тем являются наименее термостойкими, что мы наблюдали ранее ([4]).

Изучение выцветания разных форм хлорофилла в хлоропластах приводит к другим результатам. В нашей лаборатории было показано, что при выцветании хлорофилла в листьях и хлоропластах наиболее лабильны коротковолновые формы, низкотемпературная люминесценция которых падает быстрее, чем у длинноволновых форм ([5]).

При освещении пленок бактериовиридина (свыше 15 мин.) наряду с постепенным уменьшением поглощения наблюдается смещение основного максимума (~760 мμ) в коротковолновую область (до 745 мμ); поглощение в области «мономерных» форм (670—680 мμ) при этом падает более медленно по сравнению с изменением поглощения агрегированных форм.

Кристаллические пленки хлорофилла а с максимумами поглощения при 735 мμ и люминесценции при 755 мμ при продолжительном освещении

также обнаруживают коротковолновый сдвиг основного максимума; при этом скорость падения оптической плотности в области поглощения «мономерных» форм (около 670 мμ) меньше скорости изменения плотности в главном максимуме. Возможно, что выцветанию предшествует дезагрегация определенных типов молекулярных упаковок.

При рассмотрении вопроса о том, какие типы агрегированных форм пигментов являются наиболее фотохимически-лабильными, прежде всего следует учитывать тот факт, что длинноволновая люминесценция пленок связана с эстафетной миграцией энергии от коротковолновых к длинноволновым формам пигмента, и высвечивание происходит по месту самой длинноволновой формы ([6, 7]); этим и определяется флуоресценция пленок в близкой и.-к. области спектра. Таким образом, выцветание любой формы пигмента могло бы препятствовать миграции энергии и тем самым уменьшать интенсивность люминесценции. Однако возможное выцветание коротковолновых, «мономерных», форм в пленках не должно значительно уменьшать свечения в области 740—770 мμ из-за возможности использования света остающимися, количественно доминирующими, длинноволновыми формами. Действительно, кристаллические пленки, обладающие самым длинноволновым поглощением (~740 мμ), выцветают так же, как и обычные пленки хлорофилла а с максимумом поглощения около 680 мμ. Наблюдаемые эффекты трудно объяснить выцветанием «мономерных» форм, малые количества которых, возможно, находятся в пленках; падение люминесценции происходит в области 740—770 мμ, тогда как «второй» максимум флуоресценции мономерного хлорофилла лежит при 725—730 мμ. Опыты показывают более быстрое выцветание определенных типов длинноволновых форм с поглощением в области 695—705 мμ, в образовании которых, по-видимому, участвуют молекулы воды ([2, 3]). Соответствует ли выцветание этих форм эффектам, наблюдаемым при кратковременном действии возбуждающего света, пока неясно. В связи с изложенным следует обратить внимание на то, что в опытах Теренина и Холмогорова появление сигнала э.п.р. при освещении твердого хлорофилла требовало наличия паров воды и кислорода ([8]).

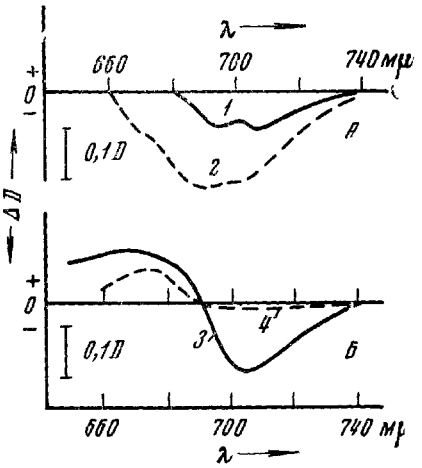


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения, наблюдаемые при освещении (*А*) и нагревании (*Б*) пленок хлорофилла а. *1*— освещение 2,5 мин.; *2* — освещение 60 мин.; *3* — нагревание до 90°; *4* — последующее охлаждение до 20°

Итак, описанные опыты указывают на фотохимическую активность определенных типов агрегированных форм хлорофилла и его аналогов. На очереди выяснение молекулярной организации таких фотохимически активных агрегатов.

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

Поступило
29 IV 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, В кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 213. [2] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 1, 362 (1967). [3] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, ДАН, 174, 480 (1967). [4] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, 92, 1201 (1953). [5] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биофизика, 12, 240 (1967). [6] Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещеков, ДАН, 175, 1175 (1967). [7] Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещеков, Биофизика, 12, 433 (1967). [8] А. Н. Теренин, В. Е. Холмогоров, В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 5.

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 183, № 2

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Л. Г. ЕРОХИНА

УСЛОВИЯ ТУШЕНИЯ И ВОЗГОРАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИКОЭРИТРИНА

Работы нашей лаборатории показали, что пигмент красных водорослей фикоэритрин фотохимически малоактивен, устойчив к фотоокислению и фотовосстановлению ([1]). В то же время энергия, поглощенная фикоэритрином, с высокой эффективностью мигрирует к фотохимически активному хлорофиллу а и используется для фотосинтеза ([2]). Высокий квантовый выход флуоресценции изолированного фикоэритрина успешно позволяет изучать возбужденное состояние этого пигмента. С. В. Конев показал, что в пределах молекулы хромопротеида между ее хромофорными группами (фикоэритробилинами) может осуществляться резонансная миграция энергии ([3]). Этим явлением было объяснено менее эффективное действие тушителей на флуоресценцию фикоэритрина по сравнению с их действием на люминесценцию хлорофилла ([4]).

Нами было установлено влияние состояния исследуемого белка на его спектральные свойства ([5]). Сложная структура белковой глобулы хромопротеида вызывает сближение хромофорных групп, влияющее на спектральные свойства фикоэритрина. Структура белка может влиять на условия миграции энергии между фикоэритробилиновыми группами. Мы наблюдали усиление флуоресценции фикоэритрина под действием растворителей и детергентов ([5]). Тушение флуоресценции хромопротеида может зависеть от доступности хромофорных групп для действия тушителей.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании условий возгорания и тушения люминесценции нативного и денатурированного фикоэритрина.

Фикоэритрин выделяли из красных водорослей Callithamnion rubosum методами, описанными ранее ([1, 5]). Флуоресценцию измеряли на установке, описанной в ([6]), при возбуждении светом лампы накаливания в области 525 мμ, выделяемой при помощи интерференционного светофильтра (полуширина 9,5 мμ). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-10. Для измерения готовили растворы фикоэритрина с оптической плотностью в максимуме поглощения 570 мμ около 1,0, что приблизительно соответствует концентрации пигмента 10^{-5} *M* ([7]).

Мы исследовали тушение флуоресценции фикоэритрина окислителями — *n*-бензохиноном и кислородом, которые энергично тушат флуоресценцию хлорофилла. Из восстановителей использовали аскорбат натрия, тиомочевину, цистеин и глютатион. Степень тушения выражали отношением начальной интенсивности флуоресценции (Φ_0) к интенсивности в присутствии тушителя (Φ).

Возгорание флуоресценции фикоэтритрина. Введение в водные растворы фикоэритрина до 20% водорастворимых органических растворителей— спирта, диоксана, ацетона, этиленгликоля и глицерина — вызывает увеличение оптической плотности на 15—20% и такое же увеличение интенсивности флуоресценции. Возгорание флуоресценции наблюдается также при добавлении детергентов — Тритона X-100 и додецилсульфата натрия, причем этот эффект в растворе неионногенного детергента Тритон X-100 сильнее, чем в случае анионного детергента (рис. 1). Известно, что в пределах концентраций фикоэритрина, соответствующих величине оптической плотности от 0,08 до 15,0, эффекта концентрационного ту-

шения не удалось наблюдать ([1]). Поэтому можно предположить, что молекулы фикоэритрина находятся в виде ассоциатов в сильно разбавленных растворах. Введение органических растворителей и детергентов в малых количествах вызывает диссоциацию, что и может быть причиной некоторого увеличения оптической плотности и возгорания флуоресценции ([8]).

Тушение флуоресценции фикоэритрина *n*-бензохиноном. На рис. 2 представлена зависимость тушения флуоресценции водных растворов фикоэритрина от концентрации *n*-бензохинона в пределах 10^{-6}—10^{-3} *M* при комнатной температуре, в вязкой среде и при температуре жидкого азота. Эффект тушения в глицерине несколько выше тушения при комнатной температуре. Замораживание водно-глицериновых растворов ведет к резкому увеличению тушения. Увеличение эффекта тушения в глицерине и при замораживании объясняется, по-видимому, стабилизацией комплекса между фикоэритрином и молекулами тушителя. Этим результатом соответствуют наблюдения, сделанные в нашей лаборатории ([9]), об увеличении эффекта тушения флуоресценции хлорофилла в хлоропластах при понижении температуры и в вязкой среде, что также объяснялось стабилизацией комплекса между пигмент-белково-липоидными соединениями и молекулами тушителя. Однако в случае растворов хлорофилла наблюдалось уменьшение эффекта тушения в вязкой среде и при низкой температуре ([9]), объясняющееся тем, что с увеличением вязкости затрудняется диффузия и уменьшается число столкновений возбужденных молекул хлорофилла с молекулами тушения.

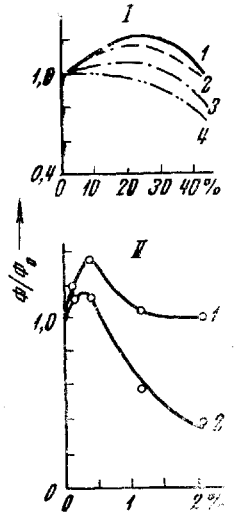


Рис. 1

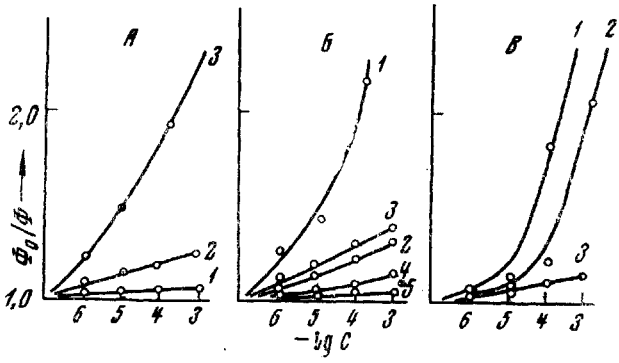


Рис. 2

Рис. 1. Действие органических растворителей и детергентов на флуоресценцию водных растворов фикоэритрина. *I* — органические растворители: *1* — этанол, *2* — диоксан, *3* — этиленгликоль, *4* — ацетон; *II* — детергенты: *1* — тритон Х-100, *2* — додецилсульфат натрия

Рис. 2. Зависимость эффекта тушения флуоресценции водных растворов фикоэритрина от различной концентрации *n*-бензохинона. *А* — влияние температуры: *1* — 20°, *2* — 60% глицерина, 20°, *3* — минус 196°. *Б* — влияние денатурина: *1* — нагревание до 70°, *2* — до 50°, *3* — 6 *M* мочевина, *4* — 0,5% раствор детергента тритон Х-100, *5* — 1 *M* мочевина. *В*: *1* — pH 10,5, *2* — 9,3, *3* — pH 3,4

Для исследования влияния состояния белка на эффект тушения были выбраны денатурирующие агенты, действие которых на спектральные свойства фикоэритрина были изучены нами ранее ([5]). Мы исследовали тушение флуоресценции растворов фикоэритрина в присутствии 1 и 6 *M* мочевины, при pH среды 3,4; 9,3; 10,5, после нагревания до 50 и 70°, а также в 0,5% растворе детергента Тритон Х-100. Из рис. 2 видно, что тушение флуоресценции фикоэритрина в 0,5% растворе детергента и в 1*M* растворе мочевины существенно не отличается от величины туше-

ния флуоресценции растворов фикоэритрина. Эффект тушения увеличивается в кислых растворах фикоэритрина (pH 3,4). Существенно то, что значительное возрастание тушения наблюдается в присутствии 6*M* мочевины и после нагревания растворов фикоэритрина до 50°. При более жестких условиях воздействия — нагревание до 70° и pH 9,3 и 10,5 — зависимость тушения от различных концентраций *n*-бензохинона имеет более сложный характер. При малых концентрациях *n*-бензохинона (до 10^{-4} *M* для pH 9,3 и до 10^{-5} *M* для pH 10,5) тушение незначительно превышает тушение нативных растворов фикоэритрина. При возрастании концентрации *n*-бензохинона до 10^{-3} *M* величина тушения увеличивается в 2 раза в случае растворов pH 9,3 и в 8 раз для pH 10,5. Подобный характер имеет зависимость тушения флуоресценции после нагревания до 70°, при этом резкое увеличение эффекта тушения наблюдается уже при концентрации *n*-бензохинона около $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ *M*. Спектры поглощения не менялись при добавлении *n*-бензохинона до 10^{-4} *M*, что свидетельствует о возможном кинетическом характере тушения. Итак, сравнительное изучение тушения флуоресценции нативного и денатурированного фикоэритрина показали, что в последнем случае фикоэритрин тушится *n*-бензохиноном легче: более жесткие условия воздействия ведут к возрастанию эффекта тушения. Выбранные нами условия денатурации не вызывают полной потери межхромофорного взаимодействия, а лишь частично ослабляют его, возможно за счет разворачивания или разрыхления белкового носителя. Тогда увеличение эффекта тушения флуоресценции фикоэритрина при денатурации можно связать, прежде всего, с увеличивающейся доступностью хромофорных групп для действия тушителей.

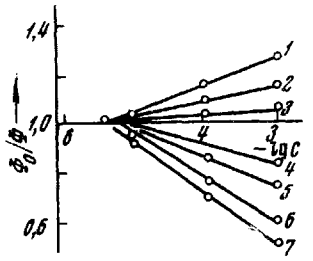


Рис. 3. Действие восстановителей на флуоресценцию водных растворов фикоэритрина. Растворы фикоэритрина в присутствии 6 *M* мочевины: *1* — аскорбат натрия, *2* — тиомочевина, *4* — цистеин, *5* — глютатион; растворы фикоэритрина после нагревания до 70°: *3* — аскорбат натрия, *6* — цистеин, *7* — глютатион

Тушение кислородом проводили по методу, принятому в нашей лаборатории ([9]). Нами было установлено, что кислород практически не тушит флуоресценции нативного и денатурированного хромопротеида. Это отличает фикоэритрин от хлорофилла и его аналогов, флуоресценция которых эффективно тушится кислородом.

Тушение восстановителями. Тиомочевина и аскорбат натрия в концентрациях от 10^{-6}—10^{-3} *M* практически не тушат флуоресценции растворов фикоэритрина (pH 7) и в 0,5% растворе детергента тритон X-100. Некоторое тушение наблюдается лишь при денатурации фикоэритрина 6 *M* мочевиной (рис. 3), причем аскорбат натрия обладает несколько более сильным действием, чем тиомочевина. Однако тушение аскорбатом натрия значительно слабее, чем *n*-бензохиноном. Изменений в спектре поглощения как исходного, так и денатурированного фикоэритрина в присутствии этих восстановителей обнаружено не было. Восстановители — цистеин и глютатион практически не влияют на флуоресценцию фикоэритрина (рис. 3). Действие этих восстановителей в присутствии 6 *M* мочевины и после нагревания растворов до 70° ведет к возгоранию люминесценции, причем в случае тепловой денатурации эффект выражен наиболее резко. Очевидно в этих опытах имеет место химическое взаимодействие цистеина с хромофорными группами, что описано в литературе ([10]). На это указывает и изменение спектров поглощения в присутствии этих восстановителей. Цистеин и глютатион «восстанавливают» спектр поглощения фикоэритрина после тепловой денатурации, что и вызывает возгорание люминесценции.

Тушение флуоресценции фикоэритробилина. В предыдущей работе ([5]) была обнаружена флуоресценция фикоэритробилина, полученного нами путем кислотного и протеолитического гидролиза главным максимумом в области 678 мμ (возбуждение в области 600 мμ). Фикоэритробилин экстрагировали амиловым спиртом из гидролизата с pH 5 и из гидролизата в 6 *N* HCl. В качестве тушителей использовали кислород, *n*-бензохинон, растворенный в амиловом спирте, в концентрации 10^{-6}—10^{-3} *M* и тиомочевину в концентрации 10^{-6}—10^{-3} *M*, также растворенную в амиловом спирте. Кислород и тиомочевина практически не тушат флуоресценции фикоэритробилина. Тушение наблюдается при добавлении *n*-бензохинона. Эффект наиболее значительный в случае фикоэритробилина, экстрагируемого из гидролизата с pH 5 (рис. 4). Ранее было установлено, что подкисление гидролизата, возможно, вызывает агрегацию фикоэритробилиновых групп, что и является, вероятнее всего, одной из причин понижения эффекта тушения флуоресценции фикоэритробилина, экстрагируемого из гидролизата в 6 *N* HCl. Полученные нами данные по тушению флуоресценции фикоэритробилина восстановителями и *n*-бензохиноном свидетельствуют о том, что молекулы окислителей сильнее тушат флуоресценцию, чем восстановители, что характерно для тушения флуоресценции хлорофилла и его аналогов в растворах ([9]).

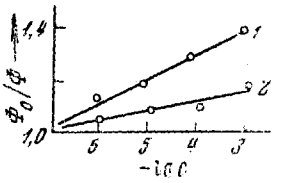


Рис. 4. Зависимость эффекта тушения флуоресценции фикоэритробилина в амиловом спирте от концентраций *n*-бензохинона. *1* — гидролизат pH 5, *2* — гидролизат в 6 *N* HCl

Сравнительно слабое взаимодействие фикоэритрина с изученными тушителями может быть объяснено как стерическими факторами — малой доступностью хромофорных групп, обусловленной особенностями структуры белка, так и наличием резонансной миграции энергии между хромофорами и связанным с этим сокращением длительности возбужденного состояния.

Таким образом, проведенные исследования показали, что явление возгорания люминесценции фикоэритрина может быть связано с его дезагрегацией; характерное для хлорофилла и его аналогов тушение кислородом отсутствует у фикоэритрина; тушение флуоресценции *n*-бензохиноном гораздо слабее, чем в случае хлорофилла. Совокупность полученных данных соответствует представлению о малой фотохимической активности фикоэритрина.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 VII 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев и др., ДАН, 82, 947 (1952). [2] L. N. M. Duysens, Nature, 168, 548 (1951). [3] Е. А. Черницкий, С. В. Конев, Биофизика, 8, 561 (1963). [4] С. В. Конев, В кн.: Проблемы фотосинтеза, Изд. АН СССР, 1959, стр. 94. [5] Л. Г. Ерохина, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 2, № 4 (1968). [6] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, 4, 392 (1961). [7] Е. Рабинович, Фотосинтез, 2, 76 (1953). [8] А. Н. Теренин, Фотоника молекул красителей, «Наука», 1967, стр. 472. [9] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 1, 395 (1967). [10] P. O. Carra, C. O. h. Eocha, D. M. Carroll, Biochemistry, 3, 1343 (1964).

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 183, № 6

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. Н. ЛУГАНСКАЯ

РОЛЬ КИСЛОРОДА ПРИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОМ ХЛОРОФИЛЛОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ МЕТИЛВИОЛОГЕНА И ДРУГИХ КРАСИТЕЛЕЙ

Хлорофилл и его производные способны сенсибилизировать к красной области спектра фотовосстановление метилвиологена с использованием в качестве доноров электрона тиомочевины, цистеина, аскорбиновой кислоты ([1], [2]). Эта реакция, которая наблюдалась в органических растворителях и в водных растворах детергентов ([2], [3]), может рассматриваться как модель первой фотохимической системы фотосинтеза с использованием метилвиологена вместо ферредоксина. В случае применения неионогенных детергентов (твин-80 и тритон X-100) наибольшая глубина восстановления метилвиологена, сенсибилизируемого пигментами, достигалась с цистеином ([2], [3]), обладающим $E_0' = -0{,}22$ в ([4]). Эти опыты проводили в анаэробных условиях, так как восстановленный метилвиологен быстро окисляется кислородом. Реакция с тиомочевиной в этих условиях протекает неглубоко.

Мы обратили внимание на то, что без откачивания воздуха в присутствии тиомочевины наблюдается весьма глубокое фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена в водном растворе тритона X-100 при pH около 10. Это явление исследовалось в настоящей работе.

Используемые в работе пигменты выделялись методами, принятыми в нашей лаборатории. Солюбилизация пигментов в водных растворах детергентов достигалась прибавлением их концентрированных растворов в этиловом спирте (обычно 0,1 мл) к 5 мл водного раствора детергента, так что конечная концентрация пигментов составляла 10^{-5} *M*, метилвиологена — обычно 10^{-4} *M*, доноров электрона — тиомочевины и цистеина — в пределах от 10^{-3} до 0,16 *M*.

Реакцию проводили в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений при комнатной температуре. В трубку помещали водный раствор детергента с солюбилизированным хлорофиллом, донор электрона и раствор метилвиологена (всего 5 мл). В опытах с откачиванием воздуха 1 мл раствора метилвиологена ($5 \cdot 10^{-4}$ *M*) приливали из головки трубки Тунберга к раствору хлорофилла с донором электрона после откачивания. Во всех опытах pH растворов доводили до 10 осторожным титрованием 0,01 *N* NaOH. Трубку освещали светом киноламповы 300 вт через конденсор и светофильтр КС-13 (10^5 эрг/см^2·сек). За ходом реакции следили по изменению максимума поглощения при 610 мμ, характерного для восстановленного метилвиологена.

Проводя реакцию без откачивания и без перемешивания раствора, т. е. в присутствии растворенного кислорода воздуха, мы наблюдали, что освещаемая зона раствора в трубке постепенно приобретала синюю окраску восстановленного метилвиологена (см. также рис. 1). При взбалтывании синяя окраска исчезала за счет окисления восстановленного метилвиологена кислородом воздуха; освещение без взбалтывания приводило к новому восстановлению метилвиологена. Этот цикл можно было повторять многократно. Те же явления наблюдались и в вязком спирто-глицериновом растворе (2 : 3); в спиртовом растворе из-за быстрой диффузии кислорода из воздуха в раствор реакция менее отчетлива и спектрофотометрическая запись затруднена.

Трудно сомневаться в том, что в зоне освещения образуется бескислородная среда за счет энергично идущего сенсибилизированного восстановления кислорода тиомочевиной с квантовым выходом, близким к единице ([5], [6]). Медленная диффузия кислорода через фазовую границу не поспевает за быстро идущей сенсибилизированной реакцией восстановления кислорода, и поэтому восстановление метилвиологена протекает в анаэробных условиях.

Однако возникал вопрос о причинах значительно большей глубины реакции без откачивания воздуха по сравнению с вакуумом.

Можно было предположить, что: 1) продукты фотохимического взаимодействия хлорофилла с тиомочевиной ([7], [8]) являются более активными сенсибилизаторами, чем молекулы хлорофилла; 2) при сенсибилизированном окислении тиомочевины кислородом воздуха образуется новый более активный донор электрона. Мы исследовали обе эти возможности.

Производные хлорофилла b, образующиеся при реакции с тиомочевиной ([8]), окисляются при действии красного света медленнее, чем продукты, образованные из хлорофилла a. Поэтому хлорофилл b более удобен для исследования восстановления метилвиологена в аэробных условиях.

После освещения раствора, в котором находились тиомочевина и хлорофилл b, пигменты были извлечены диэтиловым эфиром, отмыты водой, высушены над Na_2SO_4 и переведены в спиртовый раствор, из которого далее солюбилизировались в водном растворе тритона X-100. Мы нашли, что этот пигмент практически не отличается по своей сенсибилизирующей активности от хлорофилла. Следовательно, первое предположение исключается.

Далее были разделены стадия фотохимического взаимодействия хлорофилла с тиомочевиной в присутствии воздуха и стадия восстановления метилвиологена в вакууме. Для этого после освещения на воздухе (20 мин.) раствор солюбилизированного хлорофилла и тиомочевины был эвакуирован масляным насосом, а из головки трубки в вакууме к предварительно освещенному раствору был добавлен раствор метилвиологена. При этом наблюдалось быстрое посинение, свидетельствующее о восста-

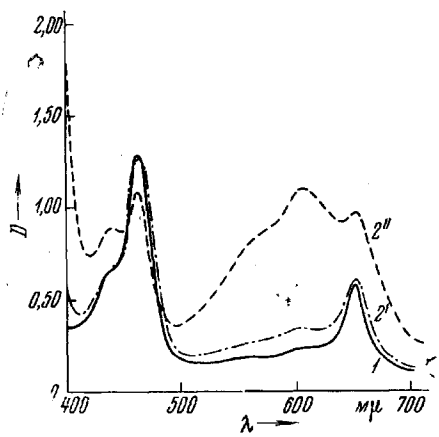


Рис. 1

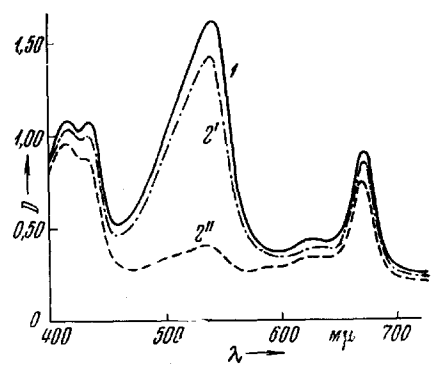


Рис. 2

Рис. 1. Фотосенсибилизированное хлорофиллом b восстановление метилвиологена тиомочевиной в вакууме (*2'*) и на воздухе (*2''*). Свет красный (фильтр КС-13, 10^3 эрг/см^2·сек), 5 мл раствора хлорофилла в 0,5% водном растворе тритона X-100, метилвиологен 10^{-4} *M*, тиомочевина 0,08 *M*. *1* — до освещения, *2* и *2''* — после 25 мин. освещения

Рис. 2. Фотосенсибилизированное хлорофиллом a восстановление сафранина тиомочевиной в вакууме (*2'*) и на воздухе (*2''*). Освещение красным светом (фильтр КС-13, 10^3 эрг/см^2·сек). *1* — до освещения, *2'* и *2''* — через 15 и 20 мин. освещения соответственно

новлении метилвиологена. Таким образом, при сенсибилизированном окислении тиомочевины образуются активные восстановители, способные «в темноте» восстанавливать метилвиологен. Эти восстановители в вакууме устойчивы много часов, но на воздухе окисляются и постепенно теряют способность к восстановлению метилвиологена.

Возникает вопрос о природе этих соединений, обладающих более сильными восстановительными свойствами, чем исходный донор электрона. Шенк и Вирт идентифицировали в качестве продуктов окисления тиомочевины сульфиновые кислоты ([9]). Эти соединения или другие промежуточные продукты могут быть активными восстановителями. Не исключена возможность, что продукты окисления тиомочевины могут быть активными донорами электрона и при сенсибилизированной реакции.

Хлорофилл а и феофитин а были столь же активны в изученных реакциях.

В качестве доноров электрона мы использовали также аллилтиомочевину и цистеин. С первым соединением на воздухе восстанавливалось до 80% метилвиологена, а в вакууме — только 8%. С цистеином глубина реакции в присутствии кислорода не отличалась от фотосенсибилизированной реакции с предварительным откачиванием воздуха. Можно было ожидать, что увеличение вязкости раствора будет способствовать реакции. Действительно, введение глицерина в водный 0,5% раствор тритона Х-100 позволило получить более глубокое восстановление метилвиологена на воздухе и с цистеином.

В качестве конечных акцепторов электрона наряду с метилвиологеном мы испытывали сафранин Т, рибофлавин, метиловый красный. Фотохимические реакции проводились в водном растворе тритона Х-100 без откачивания в присутствии тиомочевины. Все красители восстанавливались практически полностью, тогда как в случае предварительного откачивания воздуха восстанавливалось, например, не более 10% сафранина (см. рис. 2).

Существенно то, что в опытах с хлорофиллом а без акцептора электрона на воздухе восстановлению подвергается сам пигмент, отчетливо давая «красную» восстановленную форму, превращающуюся при встряхивании с воздухом в исходный пигмент (рис. 3). При этом следует отметить, что исходная тиомочевина в вакууме неспособна к фотовосстановлению хлорофилла ([8]).

Для фотохимических реакций, сенсибилизируемых хлорофиллом и его аналогами, обычно принимается

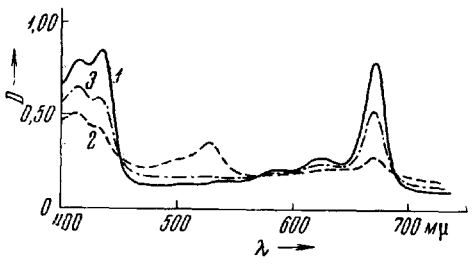


Рис. 3

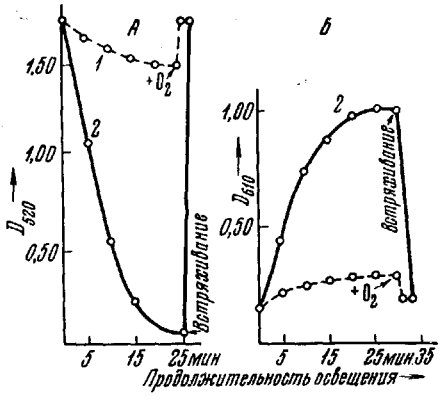


Рис. 4

Рис. 3. Образование «красной» фотовосстановленной формы хлорофилла а при фотосенсибилизированном окислении тиомочевины кислородом воздуха в тритоне Х-100. Освещение красным светом через светофильтр КС-13 (10^3 эрг/см^2·сек). *1* — до освещения, *2* — после 15 мин. освещения, *3* — после взбалтывания с воздухом

Рис. 4. Кинетика фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления красителей тиомочевиной в водном растворе тритона Х-100, *А* — сафранин, хлорофилл а. *Б* — метилвиологен, хлорофилл а. *1* — в вакууме, *2* — на воздухе

механизм, в котором работают активные промежуточные продукты окисления или восстановления пигмента — сенсибилизатора. При этом предполагается участие молекул пигмента в качестве переносчика электрона от донора к акцептору, независимо от типа первичной фотореакции возбужденной молекулы хлорофилла. Обычно считали, что кислород при этом являлся конечным акцептором электрона, преимущественно окисляя восстановленное вещество и являясь помехой при наблюдении окислительно-восстановительных реакций с участием иных акцепторов электрона. Массини и Вурн ([10]) при проведении реакций фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена в различных детергентах удаляли кислород, используя усложненную методику вакуумирования. С лучшим донором электрона — гидразином — количество восстановленного метилвиологена достигало лишь 3,5%, что не удивительно в свете наших опытов. Известно, что в суспензии хлоропластов наблюдалось полное восстановление метилвиологена ([11]). Напрашивается мысль, что и в этом случае выделяющийся кислород может использоваться для фотосенсибилизированного окисления эндогенных доноров электрона с образованием веществ, восстанавливающих метилвиологен.

Исходя из изложенного, можно предположить следующий механизм исследованных реакций. Возбужденная светом молекула хлорофилла (вероятно, в триплетном состоянии — $Хл^т$) реагирует с кислородом, образуя мольоксид ($\cdot ХлО_2 \cdot$), который далее взаимодействует с тиомочевиной (ТМ), давая продукт ее окисления ($ТМ_{ox}$). Затем в темновом акте реакции $ТМ_{ox}$ реагирует с метилвиологеном, приводя к его «темновому» восстановлению:

$$Хл \rightarrow Хл^т;$$
$$Хл^т + O_2 \rightarrow \cdot ХлО_2 \cdot;$$
$$\cdot ХлО_2 \cdot + ТМ \rightarrow Хл + ТМ_{ox};$$
$$ТМ_{ox} + МВ \rightarrow МВ^- + ТМ^+_{ox}.$$

Наряду с этими стадиями реакции может работать «обычный» механизм фотосенсибилизации (например, см. ([12])), согласно которому хлорофилл в первичной фотореакции может фотовосстанавливаться $ТМ_{ox}$ или же фотоокисляться метилвиологеном.

Таким образом, в работе показано участие в механизме фотосенсибилизации активных соединений, образованных при сенсибилизированном окислении исходных доноров электрона.

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

Поступило
9 IX 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **163**, № 3, 765 (1965). [2] Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский, ДАН, **174**, № 1, 221 (1967). [3] Г. П. Брин, Тез. докл. на IV Минском Биохимическом съезде республик Прибалтики и Белоруссии, 1968. [4] P. C. Gocelyn, European J. Biochem., **2**, 327 (1967). [5] G. Gaffron, Ber., **60**, 755 (1927). [6] O. Warburg, V. Schocken, Arch. Biochem., **21**, 363 (1949). [7] R. Livingston, K. E. Owens, J. Am. Chem. Soc., **78**, 3301 (1956). [8] А. А. Красновский, И. М. Сапожникова, ДАН, **169**, № 3, 695 (1960). [9] G. O. Schenk, H. Wirth, Naturwiss., **40**, № 4, 141 (1953). [10] P. Massini, G. Voorn, Photochem. Photobiol., **6**, 951 (1967). [11] C. C. Black, Biochim. et biophys. acta, **120**, № 3, 332 (1966). [12] А. А. Красновский, В сборн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 213.

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 183, № 3

УДК 581.132

БИОХИМИЯ

Ф. ЛАНГ, Л. М. ВОРОБЬЕВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАЗОВАНИЕ И ВЫЦВЕТАНИЕ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ МУТАНТОВ КУКУРУЗЫ

В этиолированном растении присутствуют два непосредственных предшественника хлорофилла — протохлорофиллид и протохлорофилл (1). При измерении спектров низкотемпературной флуоресценции было показано, что из накопившегося в темноте протохлорофиллида, обладающего максимумом флуоресценции 655 мμ, при освещении образуется хлорофиллид с максимумом флуоресценции при 690 мμ (2, 3). Образованный хлорофиллид путем темновой реакции присоединения фитола превращается в хлорофилл с флуоресценцией при 680 мμ. В результате дальнейшего накопления пигмента максимум хлорофилла претерпевает длинноволновый сдвиг до 686 мμ (4). Одновременно с этим в низкотемпературном спектре флуоресценции возрастает длинноволновый максимум в области 730 мμ (2–5), являющийся результатом агрегации молекул хлорофилла на структурах ламелл хлоропластов.

Что касается протохлорофилла с максимумом флуоресценции при 635 мμ, то долгое время не удавалось обнаружить его быстрого превращения в хлорофилл при освещении. Главной причиной этого является то, что в нормальных этиолированных листьях большинства растений флуоресценция при 635 мμ весьма низка. В недавней работе Годнева и сотрудников (6) было показано, что в этиолированных листьях дуба, обладающих максимумом поглощения 630 мμ, при освещении сразу возникает продукт, поглощающий при 672 мμ. В пигментном мутанте кукурузы, который вместо нормальных каротиноидов накапливает ζ-каротин, максимум флуоресценции при 635 мμ в этиолированных листьях очень высок. Поэтому интересно было использовать данный мутант для изучения процесса зеленения. Настоящая работа посвящена изучению при помощи флуоресцентной спектроскопии процессов зеленения и выцветания пигментов в листьях ζ-каротинового мутанта и нормальных растений кукурузы.

Процесс зеленения. Проростки кукурузы росли в темноте 8—10 дней. Этиолированные листья освещали при 20 и 0° светом 25 лк в течение различного времени. Низкая интенсивность освещения проростков была принята для предотвращения выцветания пигментов при зеленении и для замедления процесса трансформации пигментов. Спектры флуоресценции зеленеющих листьев измеряли при температуре жидкого азота (—196°) на регистрирующем спектрофлуорометре (2, 3, 7).

Спектры флуоресценции этиолированных и зеленеющих листьев ζ-каротинового мутанта кукурузы показаны на рис. 1. В соответствии с известными данными, полученными для листьев фасоли, в этиолированных листьях кукурузы наблюдали максимумы при 635 и 655 мμ, отвечающие, по литературным данным, протохлорофиллу и протохлорофиллиду. Помимо того в спектре виден ряд небольших максимумов в области 672; 686; 712 и 725 мμ. Различие в спектрах флуоресценции этиолированых нормальных и мутантных листьев — только в высоте максимума при 635 мμ. При освещении максимумы 635 и 655 мμ заметно падают, и одновременно возрастает флуоресценция при 674—680 и 686—690 мμ. У листьев мутанта, где пик 635 мμ высок, после освещения при 20 и 0° появляется большое «плечо» при 680 мμ, в то время как в нормальных листьях это

плечо обычно невелико. Превращение формы «635» в форму «680» в начале освещения этиолированных листьев происходит быстро, а затем замедляется.

Процесс зеленения в ζ-каротиновом мутанте протекает через те же пигментные формы, что и в нормальных листьях; различия появляются только в конце зеленения и являются следствием различной упаковки молекул хлорофилла в агрегированных структурах естественного пигментно-белкового комплекса ([8]).

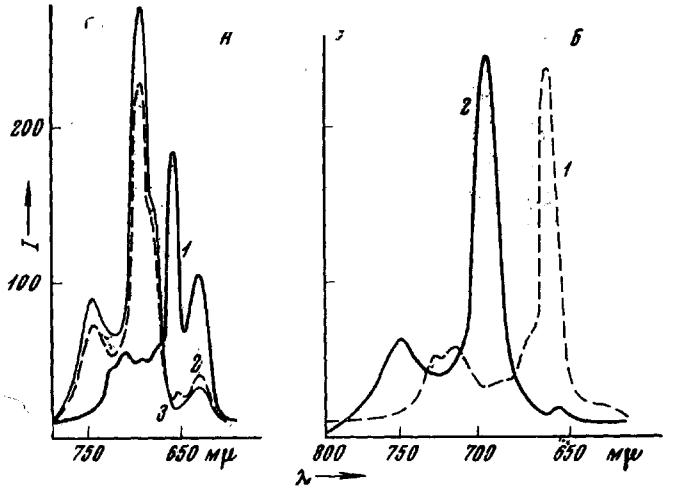


Рис. 1. Спектры флуоресценции этиолированных и зеленеющих листьев нормальных растений и ζ-каротинового мутанта кукурузы при —196°. *А*: *1* — этиолированный ζ-каротиновый лист, *2* — 5 мин. освещения при 0° (25 лк), *3* — 30 мин. освещения при 0°. *Б*: *1* — этиолированный лист нормального растения, *2* — 30 мин. освещения при 20° (25 лк)

На основе спектров флуоресценции схему зеленения этиолированных листьев можно представить следующим образом:

$$\text{«655»} \xrightarrow{h\nu} \text{«690»}$$

$$\text{«635»} \xrightarrow{h\nu} \text{«680»} \rightarrow \text{«686»} \rightarrow \text{агрегированные формы хлорофилла.}$$

Перемещение максимума «680» → «686», возможно, вызывается реабсорбцией флуоресценции, но не исключено, что это обусловлено новой формой хлорофилла, образованной в процессе зеленения.

На конечных стадиях зеленения начинается агрегация молекул хлорофилла, присутствующих в большой концентрации. В зеленых листьях хлорофилл находится в виде нескольких форм, различающихся связями с белками и липоидами, а также упаковкой молекул в агрегированных структурах ([8, 11–13]).

Фотохимические свойства пигментных форм. Формы хлорофилла различаются по спектральным свойствам и фотолабильности. Было обнаружено, что выцветание пигментов в листьях идет с большой скоростью только в присутствии кислорода, в атмосфере азота не происходит заметного уменьшения максимумов поглощения хлорофилла ([14]). Хлорофилл b выцветает медленнее, чем хлорофилл a ([15]). Коротковолновые «мономерные» формы хлорофилла в листьях и хлоропластах зеленых растений выцветают с большей скоростью, чем длинноволновые агрегированные ([16, 17]).

В литературе описано много мутантов, теряющих полностью фотосинтетические пигменты при освещении дневным светом. К этим мутантам принадлежит и изученный нами ζ-каротиновый мутант кукуру-

зы ([8], [18], [19]). Вследствие большой светочувствительности хлорофилла этот мутант является особенно интересным объектом для изучения механизма выцветания пигментов.

Проростки для опытов выращивали при 28° и интенсивности света 25 лк. Изменения флуоресценции листьев в результате освещения интенсивным светом ($5 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек) исследовали при комнатной температуре на воздухе и в вакууме. Спектры флуоресценции листьев измеряли на регистрирующем спектрофлуорометре.

Изменение интенсивности флуоресценции (20°) при освещении нормальных и мутантных листьев кукурузы на воздухе и в вакууме показано на рис. 2. В нормальных листьях под влиянием освещения на воздухе флуоресценция медленно уменьшалась. У ζ-каротинового мутанта этот процесс происходил с большей скоростью и более глубоко. Уже в первые секунды освещения листьев интенсивность флуоресценции понижалась наполовину; после 5 мин. освещения оставалось только 15% исходной флуоресценции. Большая фотолабильность пигмента ζ-каротинового мутанта кукурузы отмечалась ранее ([8]).

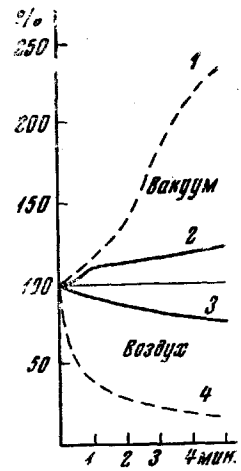


Рис. 2. Фотовыцветание и фотодезагрегация хлорофилла в нормальных и ζ-каротиновых листьях кукурузы (интенсивность максимума флуоресценции при 735 мμ) *1*, *4* — ζ-каротиновые листья, *2*, *3* — нормальные

В том случае когда листья освещали не на воздухе, а в вакууме, интенсивность флуоресценции постепенно возрастала. Величина увеличения флуоресценции в нормальных листьях обычно не превышала 20—30% исходной. У ζ-каротинового мутанта под влиянием интенсивного освещения в вакууме наблюдали особенно большое увеличение флуоресценции — вдвое от исходной. Возрастание флуоресценции было необратимым в темноте.

В отдельных опытах при помощи светофильтров мы попытались выяснить спектральную область, вызывающую увеличение интенсивности флуоресценции. Результаты опытов свидетельствуют о том, что действующими являются те области спектра, где интенсивно поглощает хлорофилл.

С целью изучения механизма выцветания мы снимали спектр флуоресценции ζ-каротинового листа при комнатной и низкой (—196°) температуре до и после освещения в вакууме при комнатной температуре. Зеленый лист ζ-каротинового мутанта разделяли пополам вдоль главной жилки, и из каждой половины брали участки (4 × 4 мм), лежащие на одном и том же уровне. Одну часть листа помещали в вакуумную трубку, и снимали спектр флуоресценции при комнатной температуре в вакууме; затем освещали светом высокой интенсивности в течение 30 мин., и после возрастания флуоресценции снова измеряли спектр при комнатной температуре, а потом, не изменяя положения объекта, при —196°. Противолежащая часть листа служила контролем — ее спектр флуоресценции снимали при 20 и при —196° без интенсивного освещения. Результаты показаны на рис. 3.

Перед освещением спектр флуоресценции при комнатной температуре был у обеих частей листа одинаковым. Под влиянием освещения в вакууме при комнатной температуре интенсивность флуоресценции сильно возрастала. В низкотемпературном спектре флуоресценции контрольной части листа видны два максимума — при 686 и 720 мμ, причем интенсивность пика 720 значительно превышает максимум 686 мμ. Низкотемпературный спектр листа, освещенного сильным светом, отличается от контроля. После освещения длинноволновый максимум при 720 мμ падает, в то время как пик при 686 мμ сильно увеличивается и становится выше пика при 720 мμ.

На основе спектров флуоресценции до и после освещения можно сделать вывод о природе выцветания пигментов в зеленых листьях. Возрастание в вакууме «мономерного» и падение «агрегированного» максимумов низкотемпературной флуоресценции следует объяснить тем, что при освещении интенсивным светом происходит необратимая фотодезагрегация длинноволновых агрегированных форм хлорофилла. Мы уже высказывали предположение о возможной фотодезагрегации хлорофилла в растениях [11] и о том, что фотодезагрегация предшествует выцветанию длинноволновых форм пигмента [16]. На возможность этого явления также указывают наблюдения, описанные в работе [8].

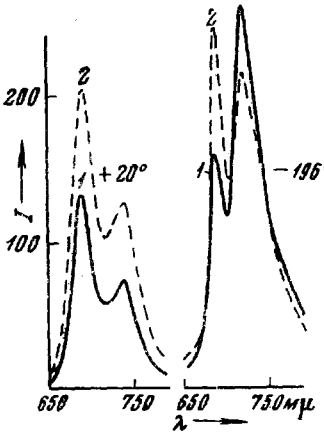


Рис. 3. Фотодезагрегация хлорофилла в листьях ζ-каротинового мутанта кукурузы; спектры флуоресценции, *1* — до освещения, *2* — после 30 мин. освещения при комнатной температуре ($5 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек)

На воздухе, по-видимому, также происходит фотодезагрегация при освещении светом высокой интенсивности, однако образованная мономерная форма хлорофилла в присутствии кислорода быстро фотоокисляется, поэтому нельзя наблюдать ее значительного накопления.

Так как в нормальных листьях увеличение флуоресценции в вакууме невелико, можно предполагать, что фотодезагрегация зависит от типа упаковки молекул хлорофилла в агрегированных структурах. У ζ-каротинового мутанта структура агрегатов молекул хлорофилла, образующая максимум при 720 мμ, распадается легче, чем агрегаты молекул, ответственные за флуоресценцию при 735 мμ в нормальных листьях.

Итак, при освещении зеленых листьев интенсивным светом в присутствии кислорода происходит два процесса — фотодезагрегация и фотоокисление образующейся мономерной формы пигмента.

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

Поступило
24 VII 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] J. E. Loeffler, Carnegie Inst. Wash. Year Book, 54, 159 (1955). [2] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, ДАН, 117, 106 (1957). [3] Ф. Ф. Литвин, Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 96. [4] Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. К. Красновский, Биофизика, 7, 578 (1962). [5] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева, ДАН, 135, 1528 (1960). [6] Т. Н. Годнев, Н. К. Акулович и др., ДАН, 179, 465 (1968). [7] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, 6, 392 (1961). [8] A. A. Shlyk, L. I. Fradkin et al., Photosynthetica, 1, 241 (1967). [9] Т. Н. Годнев, Н. К. Акулович, Э. Ф. Шабельская, Бюлл. Инст. Биол. за 1957 г., в. 3, 89 (1958). [10] J. B. Wolff, L. Price, Arch. Biochem. and Biophys., 72, 293 (1957). [11] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 91, 343 (1953). [12] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, 92, 1201 (1953). [13] Govindjee, L. Yang, J. Gen. Physiol., 49, 763 (1966). [14] C. Sironval, O. Kandler, Biochim. et biophys. acta, 29, 359 (1958). [15] K. Sauer, M. Calvin, Biochim. et biophys. acta, 64, 324 (1962). [16] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биофизика, 12, 240 (1967). [17] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биофизика, 13, 456 (1968). [18] J. H. C. Smith, L. J. Durham, C. F. Wurster, Plant Physiol., 34, 340 (1959). [19] A. Faludi-Dániel, F. Láng, L. I. Fradkin, Biochemistry of Chloroplasts, 1, London — N. Y., 1966, p. 269.

Доклады Академии наук СССР
1968. Том 181, № 6

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

Г. Т. РИХИРЕВА, Л. А. СИБЕЛЬДИНА, З. П. ГРИБОВА, В. С. МАРИНОВ,
Л. Н. КАЮШИН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИЗМЕРЕНИЕ ТРИПЛЕТНОГО ВОЗБУЖДЕННОГО СОСТОЯНИЯ В РАСТВОРАХ И ПЛЕНКАХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ, В ХЛОРОПЛАСТАХ И ЗЕЛЕНЕЮЩИХ ЛИСТЬЯХ

Идея об использовании в фотосинтезе энергии триплетного возбужденного состояния хлорофилла высказана давно ([1], [2]). Однако из-за отсутствия прямых экспериментальных доказательств вопрос об участии триплетного состояния в первичных процессах фотосинтеза до сих пор является дискуссионным.

В исследованиях триплетного возбужденного состояния хлорофилла может быть использован метод электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.), который позволяет непосредственно регистрировать триплетное возбужденное состояние красителей порфиринового класса ([3]).

Используя этот метод, мы осуществили регистрацию триплетного возбужденного состояния в замороженных и освещенных этаноловых растворах хлорофилла b ([4]). Наблюдавшаяся стационарная концентрация молекул пигмента в триплетном состоянии в условиях непрерывного освещения при концентрациях пигмента 10^{-4}—10^{-3} M очень мала. Следует отметить, что ранее нам не удавалось обнаружить э.п.р.-поглощения триплетного состояния хлорофилла a.

В настоящей работе мы продолжили изучение триплетного состояния в растворах и пленках пигментов и предприняли попытку обнаружить э.п.р.-поглощение триплетного состояния хлорофилла в препаратах хлоропластов и в зеленеющих листьях.

Были исследованы переходы с изменением магнитного квантового числа $\Delta m = \pm 2$. Регистрацию спектров э.п.р.-поглощения триплетного возбужденного состояния проводили на 3-сантиметровом радиоспектрометре отражательного типа с рабочей частотой клистрона $\nu = 9260$ Мгц. Ввиду слабой интенсивности сигналов э.п.р. использовали методику синхронного накопления сигнала при помощи 400-канального накопителя. Накопление вели до тех пор, пока отношение сигнала к шумам не достигало 5 : 1. Кварцевые трубки ($d = 3{,}5$ мм) с растворами, суспензией хлоропластов и образцами листьев освещали непосредственно в резонаторе радиоспектрометра. При измерениях трубки погружали в кварцевый сосуд Дьюара с жидким азотом, помещенный в полости резонатора. В качестве источников света использовали ксеноновую и ртутную лампы сверхвысокого давления (ДКсШ-1000 и ДРШ-1000). Опыты показали, что при использовании ДКсШ-1000 интенсивность сигналов была в два раза больше. Для фотовозбуждения систем использовали видимую область излучения источников, которую выделяли при помощи следующих фильтров: БС-8 ($\lambda > 380$ мμ), ЖС-4 ($\lambda > 400$ мμ) и КС-10 ($\lambda > 600$ мμ).

Изучали следующие системы: растворы (10^{-3} M) хлорофилла a в этаноле, пиридине и смеси пиридин — этанол (1:3); растворы (10^{-3} M) хлорофилла b в этаноле и пиридине; растворы (10^{-3} M) феофитина a + b в смеси пиридин — этанол (1 : 2); пленки хлорофилла a + b, полученные путем испарения эфирных растворов в вакууме; суспензии хлоропластов листьев гороха в буферных средах (в ряде опытов, содержащих 10—50%

пиридина): зеленеющие этиолированные листья кукурузы, предварительно освещенные различное время лампой накаливания.

В растворах пигментов при непрерывном освещении были зарегистрированы сигналы э.п.р. триплетного возбужденного состояния. Наиболее интенсивные сигналы наблюдали в растворах хлорофилла b, в растворах хлорофилла a интенсивность сигналов была в 2 раза слабее, в растворах феофитина a + b приблизительно в 10 раз. Спектры э.п.р.-поглощения

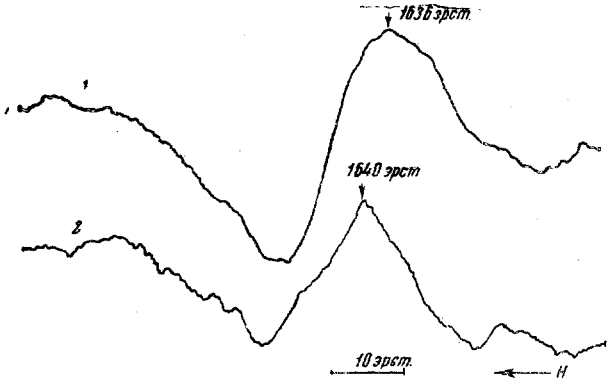


Рис. 1

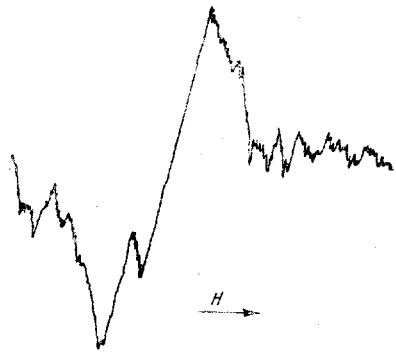


Рис. 2

Рис. 1. Сигналы э.п.р. триплетного возбужденного состояния в 10^{-3} *M* растворах хлорофилла b в этаноле (*1*) и хлорофилла a в смеси пиридин — этанол (1 : 3) (*2*). Измерения при 77° K и фотовозбуждение ДКсШ-1000 (фильтр БС-8)

Рис. 2. Спектр э.п.р. триплетного состояния в 10^{-3} *M* растворе феофитина a + b в смеси пиридин — этанол (1 : 2). Спектр, по-видимому, представляет собой сумму двух сигналов: феофитина a и феофитина b, о чем свидетельствует воспроизводимое в опытах расщепление линии

триплетного состояния пигментов представляли собой синглетные слегка асимметричные линии (см. рис. 1 и 2). Используя одновременную запись спектров триплетного состояния в этаноловых растворах хлорофиллов a, b и Mg-этиопорфирина, для которого известны параметры спектра ([5]), был проведен расчет параметров спектров триплетного э.п.р.-поглощения хлорофилла a и b (табл. 1).

Таблица 1

Параметры спектров э.п.р триплетного возбужденного состояния хлорофиллов a и b 77° K (растворитель — этанол)

Пигмент	ΔH, эрст.*	H_{min}, эрст.**	D, $см^{-1}$ ***
Mg-этиопорфирин	9,6±0,5	1637±0,5	0,036±0,001
Хлорофилл a	13±1	1640±1	0,031±0,001
Хлорофилл b	13±1	1636±1	0,037±0,001

* Значение ширины линии э.п.р.-поглощения между точками максимального наклона.
** Значение поля в точке максимального наклона линии э.п.р. в области меньших значений магнитного поля.
*** Константа нулевого расщепления триплетного уровня.

При рассмотрении данных, приведенных в таблице, обращает на себя внимание заметное увеличение константы *D* при переходе от хлорофилла a к хлорофиллу b. В проведенном недавно исследовании ([5]) ряда профиринов обнаружено, что понижение симметрии молекул порфиринов приводит к увеличению константы нулевого расщепления. В связи с этим можно

предположить, что большее значение константы нулевого расщепления в растворах хлорофилла b свидетельствует о более низкой симметрии молекул этого пигмента в растворе по сравнению с хлорофиллом a. Возможно, что это обусловлено включением альдегидной группы в цепь сопряжения в случае хлорофилла b. Кроме того, по имеющимся данным, хлорофилл b более склонен к агрегации, чем хлорофилл a ([6]), и образует более прочные соединения с молекулами воды ([7]). Можно думать, что именно этими свойствами и обусловлено наблюдаемое различие в симметрии очень близких по строению двух рассматриваемых пигментов.

При измерении спектров эвакуированных (10^{-3} мм рт.ст.) и содержащих воздух замороженных растворов не было замечено влияния кислорода воздуха на амплитуду регистрируемых сигналов э.п.р.

Следует отметить, что в пленках хлорофилла a + b сигналов триплетного состояния обнаружено не было.

Регистрацию триплетного состояния в препаратах хлоропластов и листьев осуществляли в поле э.п.р.-поглощения триплетного состояния растворов хлорофилла (при 77° K). Консервированные и нативные препараты хлоропластов были любезно предоставлены нам в Лаборатории фотобиохимии им. А. Н. Баха. Хлоропласты были выделены из 14-дневных проростков гороха. Для измерения использовали препараты в двух средах: 1) 50% глицерина, 0,125 *M* KCl, 0,02 *M* трис-HCl-буфер, pH 7,5; 2) 0,35 *M* NaCl, 0,02 *M* ЭДТА, 0,4 *M* K-фосфатный буфер pH 7,5. В зеленых листьях, а также препаратах нативных хлоропластов сигналов в области э.п.р.-поглощения триплетного состояния обнаружено не было. Фотоиндуцированные синглетные сигналы э.п.р. в триплетной области удалось наблюдать в препаратах хлоропластов, в которые за несколько часов до измерения добавляли от 10 до 50% пиридина. Рис. 3 иллюстрирует изменения поглощения в поле 1630—1640 эрст. под действием видимого света в суспензии хлоропластов, содержащей 50% пиридина. По-видимому, в пиридинсодержащих суспензиях хлоропластов регистрируется сигнал э.п.р. триплетного возбужденного состояния «мономерного» хлорофилла. Действие пиридина объясняется его дезагрегирующим влиянием на пигментный аппарат хлоропласта ([8, 9]).

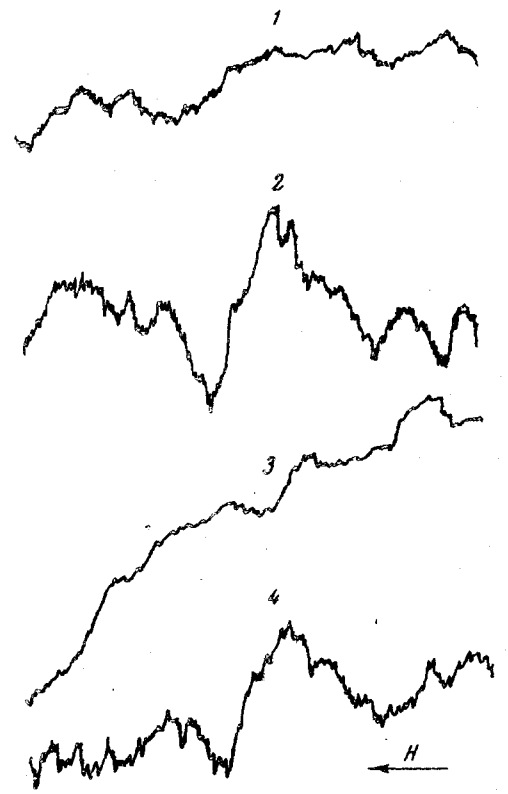


Рис. 3. Спектры э.п.р.-поглощения суспензии хлоропластов гороха, содержащей 50% пиридина, в области 1630—1640 эрст.: *1*, *3* — в темноте; *2*, *4* — на свету (ДКсШ-1000, БС-8)

Итак, в твердых пленках пигментов и хлоропластов сигнал э.п.р. триплетного состояния не наблюдается, вероятно, вследствие эффективных процессов дезактивации возбужденного триплетного состояния в агрегированных структурах. При дезагрегации пигментных структур хлоропластов пиридином создаются условия для образования стационарных концентраций триплетных молекул хлорофилла, которые доступны регистрации. В связи с этим изучены спектры э.п.р. в ходе образования хлорофилла

формирования мономерных и агрегированных компонентов пигментной системы в зеленеющих листьях. В качестве объектов исследования использовали этиолированные листья кукурузы, которые освещали от 1 до 30 час. Такие системы представляли интерес, поскольку в первые часы зеленения пигментная система листьев представлена в основном мономерными формами хлорофилла ([10]). Можно было ожидать, что на начальных стадиях зеленения, когда доминируют мономерные формы пигмента, дезактивация триплетного состояния в результате триплет-триплетного переноса энергии малоэффективна. Однако ни в одном из образцов листьев не было обнаружено поглощения в триплетной области. Такие же измерения были проведены на экстрактах пигментов из исследуемых листьев. Пигменты экстрагировали ацетоном, затем переводили в этанол. Объем окончательного экстракта соответствовал объему измеряемой навески листьев. Во всех экстрактах наблюдали отчетливые сигналы э.п.р. триплетного состояния хлорофилла (только в экстрактах из листьев, предварительно освещенных в течение 1 часа, регистрировали очень слабые сигналы на уровне шумов). Эти данные свидетельствуют о том, что в интактной структуре фотосинтетического аппарата пока не удалось найти условий для непосредственного наблюдения триплетного состояния хлорофилла из-за отсутствия регистрируемых стационарных концентраций триплетных молекул пигмента. По-видимому, уже на первых стадиях зеленения листьев процессы дезактивации триплетных молекул достаточно эффективны вследствие имеющих место фотохимических процессов переноса электрона; известно об образовании свободнорадикальных фотопродуктов в зеленеющих листьях ([11]).

Таким образом, методом э.п.р. при 77° К в условиях непрерывного освещения видимым светом обнаружено э.п.р.-поглощение триплетного возбужденного состояния в растворах хлорофилла a, b и феофитина a + b в этаноле и пиридине. В интактных препаратах листьев и хлоропластов и в твердых пленках пигментов наличие молекул хлорофилла в триплетном возбужденном состоянии не удалось регистрировать, по-видимому, вследствие малой стационарной концентрации триплетных молекул пигментов из-за эффективных процессов дезактивации (триплет-триплетного переноса энергии, фотохимических процессов переноса электрона).

Институт биологической физики
Академии наук СССР

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

Поступило
18 IV 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Теренин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 369 (1947). [2] А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 377 (1947). [3] З. П. Грибова, Р. П. Евстигнеева и др., Биофизика, 8, в. 5, 550 (1963). [4] Г. Т. Рихирева, З. П. Грибова и др., ДАН, 163, 491 (1965). [5] З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, Л. А. Сибельдина, ДАН, 181, № 5 (1968). [6] Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Минск, 1968. [7] А. В. Карякин, В. М. Кутюрин, А. К. Чибисов, ДАН, 140, 1321 (1961). [8] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 340 (1953). [9] Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский, Биофизика, 7, 578 (1962). [10] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая. ДАН, 85, 177 (1952); ДАН, 91, 343 (1953). [11] Г. Т. Рихирева, А. А Красновский, Л. П. Каюшин, ДАН, 156, 1451 (1964).

Elementary Photoprocesses in molecules. Ed. by B.S. Neporent Consultants Bureau. New York, 1968

PHOTOCHEMISTRY OF CHLOROPHYLL AND ITS ANALOGS

A. A. Krasnovskii

In the photosynthesis of plants the energy of light quanta absorbed by the pigment system is converted into potential chemical energy of the photosynthesis products, i.e., organic compounds and molecular oxygen. In the chain of reactions following the absorption of a light quantum by a chlorophyll molecule there are formed increasingly stable and long-lived compounds, which "store" the energy of the quantum. Thus, the lifetime of singlet excited states is approximately 10^{-8} sec, of triplet excited states 10^{-3} sec, of primary photoproducts 10^{-2}-10^{-3} sec, intermediate compounds participating in biochemical cycles, probably 10^{-1} sec, and long-lived products produced by the carbon cycle, 10^{2}-10^{4} sec.

The sequence of the elementary stages of the chain of reactions of photosynthesis may be represented in the following way: when chlorophyll absorbs a light quantum, its molecule changes into an excited state; migration of excitation energy occurs between the components of the pigment system and an elementary photochemical process occurs. The photoproducts participate in the chain of reactions of photosynthetic electron transfer and long-lived compounds are formed, which "store" the light energy, namely adenosine triphosphate and reduced pyridine nucleotides, which participate in the carbon cycle with the final formation of sugars and other photosynthesis products.

One of the routes leading to the elucidation of the nature of the initial photophysical and photochemical reactions of photosyntheses consists of the investigation of plant pigments in isolated systems, outside the structure of the photosynthesizing organs. A. N. Terenin wrote, in 1947 [55], "...the problem of the physical or chemical nature of the primary act is common to both photosynthesis and the photochemistry of dyes. There are no specific characteristics here which belong to the biochemical system alone." In the present article an account is given of some aspects of the investigation of the photochemical properties of chlorophyll and its analogs, which were carried out in the author's laboratory.

Chemical Properties of Excited States

The scheme of energy levels of organic molecules which is generally accepted nowadays applies to chlorophyll and its analogs (Fig. 1). In the dark the chlorophyll molecule is in the lowest singlet state S; the population of the vibration levels is not shown on the scheme. In the light of contemporary investigations, the individual bands in the absorption spectrum of the chlorophyll molecule belong to different electronic transitions; the scheme shows two transitions, corresponding to the red ($S \rightarrow S^*$) and the blue ($S \rightarrow S_1^*$) maxima of the absorption of the chlorophyll molecule. There have been detailed studies of nonradiative transitions from higher excited levels to the lower level S with the emission of a fluorescence quantum ($S^* \rightarrow S$), a nonradiative transition with the formation of a triplet state ($S^* \rightarrow T$), and the absorption of a light

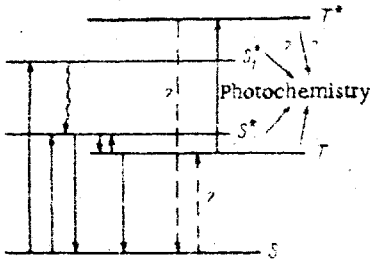


Fig. 1. Scheme of electronic levels of chlorophyll. Solid line) studied transitions; broken line) processes that have not been studied.

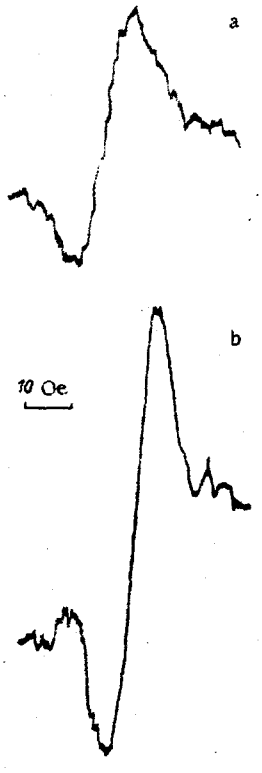


Fig. 2. EPR spectra of illuminated solutions of chlorophyll in alcohol at −196°. a) Triplet state (field of 1600 Oe); b) radical state (field of 3300 Oe).

quantum by the long-lived state T with the formation of an excited state T*, which has the energy of two light quanta.

The formation of a metastable triplet state of chlorophyll is indicated by the fluorescence of chlorophyll b in systems frozen to −196° [60, 71] and the observation of T → T* transitions, measured by means of flash spectroscopy at room temperature [89, 68, 63].

It was recently possible to measure the band of the electronic resonance of triplet states of chlorophyll b in alcohol at −196°; the formation of radical forms was observed in addition to this [51] (Fig. 2).

The improbable direct S → T transition should appear in the form of an absorption band in the near-infrared region in concentrated solutions of chlorophyll. We were able to observe such absorption bands in the region of 720-850 mμ [27], but it is more probable that they belong to aggregate forms of the pigment.

Thus, spectroscopic observations demonstrate the formation of all types of excited compounds illustrated in the scheme: S*, S_1^*, T, and T*. It is most important to obtain information on the chemical properties of the excited states, which differ fundamentally from the properties of the molecules in the lower unexcited state S. Essentially, all types of excited states are new unstable active molecular configurations, which carry a large part of the energy of the light quantum. They are capable of undergoing a chemical conversion or to donate their energy (electron) to a suitable acceptor, i.e., to participate in energy migration processes [57]. Terenin [54, 98] showed in 1943 that the role of triplet states in photochemistry is determined by their long lifetime and chemical unsaturation (properties of a biradical) due to the presence of an unpaired electron.

When a heteroatom with an unshared pair of electrons (nitrogen or oxygen) is included in the conjugation chain in the pigment molecules together with $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions in the conjugated system of bonds there is also the possibility of $p \rightarrow \pi^*$ transitions, as a result of which an electron vacancy ("hole") may be localized at the nitrogen or oxygen atom. The presence of a ligand, binding the unshared electron pair (most clearly, a proton in acid media), leads to a fall in the probability of a $p \rightarrow \pi^*$ transition [81]. It is not clear as yet which absorption bands in the chlorophyll spectrum may be assigned to the $p \rightarrow \pi$ transition. The proposal of Kasha and Becker [71], that these transitions correspond to bands which appear in nonpolar solvents, cannot be regarded as well-founded; nonpolar media are known to promote aggregation and the supposed $p \rightarrow \pi$ transitions are actually absorption bands of aggregated forms (dimers).

Table 1

Pigment	Φ_0/Φ_a	Φ_0/Φ_{ox}
Bacterioviridin	1.08	1.30
Bacteriochlorophyll	1.09	1.37
Chlorophyll a	1.08	1.30
Chlorophyll b	1.09	1.30
Protochlorophyll	1.06	1.20
Pheophytin a	1.07	1.40

Table 2

Pigment	$C_{\frac{1}{2}}$, 10 M/liter
Bacterioviridin	0.092
Chlorophyll a	0.125
Bacteriochlorophyll	0.128
Protochlorophyll	0.198
Chlorophyll b	0.182
Pheophytin a	0.210

Table 3

Carotene concentration	Φ_0/Φ_a	Φ_0/Φ_{ox}
Without carotene	1.06	1.21
$1.5 \cdot 10^{-4}$	1.00	1.12
$5 \cdot 10^{-4}$	1.00	1.05

The presence of an absorption band may be associated with the reversible transfer of an electron with the participation of a coordination-bound ligand. Thus, absorption bands of solvated ions were long ago regarded as the spectra of electron transfer by the school of Franck [79]. The spectra of light-sensitive complexes of inorganic ions with organic molecules are interpreted in this way [8].

Dain [9] regards the spectrum of the iron complex of chlorophyll as an intramolecular charge-transfer spectrum. However, up to now the possibility has not been established reliably of interpreting individual bands in the spectrum of the magnesium complex of chlorophyll, which belong to charge-transfer complexes [58]. The well-known absorption bands in the spectra of chlorophyll should be ascribed to electronic transitions from vibration sublevels [94]. The effect of foreign molecules on the mean lifetime is investigated to assess the chemical properties of excited singlet and triplet molecules. Quenching of fluorescence and phosphorescence by electron acceptors and donors may be regarded as electron exchanges, and is the first stage in the chemical process [56, 103]; the formation of more stable photoproducts then follows.

Quenching of Fluorescence

The effect of foreign molecules on the fluorescence of chlorophyll and its analogs has been studied by a number of authors [82, 77, 20, 90, 10, 11, 15].

In our laboratory we recently studied the relation between the structure of chlorophyll analogs, their photochemical properties, and the quenching of fluorescence. It seemed interesting to determine the effect of carotene on the quenching of the fluorescence of pigments by foreign molecules in connection with the blocking effect of polyene compounds on the photochemical reactions of chlorophyll [41, 73, 42].

The results of experiments on the quenching of the fluorescence of pigments in acetone by oxygen are given in Table 1. The degree of quenching is expressed as the ratio of the intensity of the initial fluorescence Φ_0 to the fluorescence in air Φ_a and on saturation of the solution with oxygen Φ_{ox} (measurement error ±0.05).

The data in Table 1 show that in a series of chlorophyll analogs there is no substantial difference in the quenching of fluorescence by oxygen.

Table 2 gives the concentrations of p-benzoquinone, corresponding to "half" quenching of the fluorescence of the pigments investigated. The quenching of pheophytin a, chlorphyll b, and protochlorophyll requires somewhat higher concentration of the quenching agent than for chlorophyll a and bacterioviridin. The results indicate that excited molecules of the more oxidized pigments interact more weakly with oxidant molecules, namely, quinone. Quenching in pyridine is always somewhat weaker and requires a higher concentration of quenching agent.

The quenching of fluorescence is difficult to assign to a change in the chlorophyll concentration as a result of an irreversible photochemical reaction with the quenching agent, since the optical density at the absorption maximum of the pigments does not change appreciably during an experiment.

We studied the capacity of various quinones to quench the fluorescence of chlorophyll *a*. We used p-benzoquinone as the strongest oxidant (E_0 = +0.7 V), 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone (E_0 = +0.42 V), and anthraquinone (E_0 = −0.2 V). In the effect of these compounds on the quenching of fluorescence we observed the same pattern as in the photoreaction of chlorophyll with the compounds studied [12]. Thus, the reversible photooxidation of chlorophyll a proceeds furthest with p-benzoquinone and hardly occurs with anthraquinone.

Effect of Carotene on the Quenching of Fluorescence. The investigations consisted of measuring the fluorescence intensity in the presence of the quenching agent and various amounts of carotene. We found previously that carotene does not quench the fluorescence of chlorophyll in pyridine with excitation in the "red" absorption band [42]. The fluorescence quenching agents in experiments with chlorophyll were p-benzoquinone and oxygen, and in experiments with pheophytin, phenylhydrazine (Table 3). The results of these experiments showed that in the presence of carotene there is a reduction in the quenching of the fluorescence of chlorophyll by all the compounds listed.

Carotene is known to inhibit the photochemical reactions of chlorophyll and its analogs, and, therefore, it seemed interesting to determine how other compounds which inhibit the photoreduction of chlorophyll affect the quenching of fluorescence. In one of these compounds we used phenazine, which is a compound that effectively blocks the photoreduction of chlorophyll. However, this compound does not affect the quenching of the fluorescence by p-benzoquinone.

The protective effect of carotene is well known in photooxidation, reversible photoreduction [42, 73], and photopheophytinization [49, 46] of chlorophyll in solutions. The elementary mechanism of the action of carotene in these reactions has not been established quite definitely up to now. Livingston and Fujimori, who used flash spectroscopy, demonstrated the possibility of quenching of the triplet excited state of chlorophyll by carotene [80]. Our experiments showed that carotene does not quench the fluorescence of chlorophyll excited by red light [43, 44], i.e., it does not react with the singlet excited state of chlorophyll.

The mechanism of the blocking effect of carotene found is not clear; the effect is observed with quenching agents of different chemical natures such as oxygen, quinone, and phenylhydrazine, and, therefore, it is difficult to explain it by the formation of complexes of carotene with the quenching agent. In the experiments of Litvin and Gulyaev, it was established that chlorophyll forms complexes with carotene in films and monolayers [48]. Therefore, it is necessary to investigate the formation of complexes of carotene with chlorophyll in solution and the deactivation (by carotene) of triplet states of the pigment, which may be formed in the act of quenching of the fluorescence.

To summarize, the data obtained may lead to the following conclusions: oxygen quenches the fluorescence of all the pigments investigated practically identically. Paradoxically, the quenching of pheophytin is strongest, and this does not correspond to the rate of the photooxidation of the pigments studied by oxygen. Here there is the possibility of a "physical" mechanism for quenching, connected with the paramagnetic properties of the oxygen molecule, in accordance with the work of Terenin [98]. Quinone quenches the most reduced pigments somewhat less and the more oxidized pigments somewhat more, but there is no correlation here with the photochemical oxidation of these pigments by quinone.

In our experiments, for example, pheophytin did not react with quinone, while the quenching of the fluorescence of pheophytin by quinone was considerable and differed little from the quenching of chlorophyll. The quenching of the fluorescence of chlorophyll by different quinones corresponds to the degree of reversible photooxidation of chlorophyll by these compounds. This agrees with the steric concept, according to which the act of quenching of the fluorescence of pigments is regarded as the result of the exchange of an electron between an excited molecule of the pigment and a molecule of the quenching agent [56, 103, 104]. According to these ideas, there is the reversible transfer of an electron in a complex of the excited pigment with the quenching agent. Under favorable conditions there is the possibility of the decomposition of the complex, leading to the formation of the primary photoproducts, which diffuse into the depth of the solvent. It is necessary to determine whether the quenching of the fluorescence of chlorophyll by oxidants is connected with the intermediate transition of the pigment into a metastable triplet state.

Quenching of Metastable (Triplet) Excited States

The fate of triplet states may be assessed by measuring the quenching of phosphorescence [62].

The phosphorescence and EPR signal of chlorophyll are observed in frozen solid systems, when a foreign molecule cannot approach the triplet molecule of the pigment, which is firmly fixed to molecules of the matrix (solvent). The appearance of the EPR signal is then independent of the presence of oxygen in the system [51]; either triplet molecules are not as reactive as was assumed previously or oxygen cannot approach the molecule in a frozen medium. The quenching of triplet molecules at room temperature may be studied by using flash spectroscopy [63].

In Livingston's laboratory [87] it was established that the lifetime of triplets falls sharply in the presence of oxidants, namely oxygen, dinitrobenzene, and quinone, and also carotene and retinene. Reducing agents, namely phenylhydrazine, allylthiourea, and ascorbic acid, have relatively little effect on the lifetime of triplets. In the experiments of Chibisov and Karyakin, triplet states also reacted more actively with oxidants and less actively with reducing agents [22, 66-68].

Thus, both known types of excited state of chlorophyll are quenched effectively by oxidants and very ineffectively by reducing agents. It is possible that the only known difference in the properties of the two types of excited state is connected with the action of carotene, which does not quench the fluorescence of chlorophyll, but effectively deactivates the triplet state. Quenching occurs in the complex of the excited pigment and the quenching agent, which precedes the "true" photochemical process, when the partners, which accept and donate an electron, separate as independently diffusing molecular formations.

Let us now examine how the photochemical process occurs in the reaction of excited pigments with electron donors and acceptors, leading to the formation of long-lived photoproducts.

Porret and Rabinowitch [92] found that chlorophyll in methanol in vacuum can undergo reversible decolorization under the action of blue light. Similar phenomena were observed in the experiments of Livingston [88]. The effects of reversible decolorization may be apparently associated with reversible oxidation or reduction of the chlorophyll.

Reversible Photochemical Reduction

The capacity of chlorophyll and its analogs and derivatives to undergo reversible photoreduction, i.e., reversible photochemical interaction with reducing agents or electron donors, was

discovered by us in 1948 [24, 29]. The photoreaction gives reduced forms of the pigments, which differ in their spectral properties and reactivity, depending on the number of electrons and protons taken up and the conditions of the acid-base equilibrium in the medium. After the light has been switched off, the reaction proceeds in the opposite direction at a different rate, depending on the nature of the medium, the properties of the electron donor, and whether or not an electron acceptor is present in the system. The electron taken up in the primary act is apparently delocalized in the system of conjugated double bonds of the pigment molecules; the localization of hydrogen atoms in reduced forms has not been definitely established and is the subject of discussion [7, 53, 83, 96].

Photoreduction in pyridine gives quite stable colored photoreduced forms, which are red from chlorophyll and bacterioviridin and green from bacteriochlorophyll. Photoreduction in alcohol usually leads to a reversible fall in the "red" absorption maximum without the formation of colored reduced forms.

Photoreduction is also observed in acid media: for example, porphyrins are reduced by ascorbic acid in an aqueous solution of sulfuric acid with the formation of a "red" photoreduced form. On illumination of porphyrins in frozen acid alcohol, a singlet EPR signal is observed [52], which should be assigned to an ion-radical, i.e., a pigment molecule reduced by alcohol. The course of the reaction depends on the properties of the medium. Thus, we observed that in dioxane the reduction of chlorophyll and other pigments by ascorbic acid also occurs in the absence of light. The use of methylviologene as a redox indicator made it possible to demonstrate the difference in the reduction potential of ascorbic acid in pyridine, depending on the amount of water in the solvent.

Ascorbic acid and other dienols, phenylhydrazine and ferrous compounds are used as electron donors in the photoreduction of pigments. It is strange that reduced pyridine nucleotides (NAD · H_2) and their analog, N-benzylnicotinamide (BNA · H) do not lead to photoreduction of chlorophyll on illumination with red light, i.e., in the region of absorption by chlorophyll, but lead to photoreduction of chlorophyll when excited by near-ultraviolet light in the region of absorption of NAD · H_2 at 340 mμ [33-35]. The "red" reduced form of chlorophyll is then formed and NAD · H_2 is oxidized irreversibly. Illumination of a pyridine solution of NAD · H_2 in vacuum by the mercury lines at 365 mμ leads to the formation of photoproducts, which are not decomposed on illumination, and are capable of reducing chlorophyll, safranine, and other compounds in the dark [35].

Mechanism of Photoreduction. Following Michaelis' scheme, we proposed that in the reaction there are formed ionic and nonionic forms of semiquinones and valence-saturated leuco forms [24].

In studying the mechanism of photoreduction, Evstigneev and Gavrilov [16] found that a two-stage reaction mechanism may be observed particularly conveniently in the case of pheophytin; by carrying out the photoreduction at −40° it is possible to observe spectroscopically the formation of the "primary" form of the pigment, which is long-lived under these conditions and is converted on heating into the more stable "red" form. In a series of experiments it was shown that this "primary" form is responsible for the appearance of the photopotential and photoconductivity in solutions of chlorophyll and its analogs [13, 14]. In the measurements of Chibisov [66] using flash spectroscopy it was shown that in the system pheophytin–ascorbic acid at −40° there is produced the "primary" form with absorption at 460-470 mμ and a lifetime of several milliseconds. This indicates that the longer-lived "primary" form of pheophytin studied by Evstigneev is formed from the primary ion-radical.

The initiation of chain polymerization and measurement of the EPR were methods used for the direct determination of free radicals formed in the reaction. Thus, the system

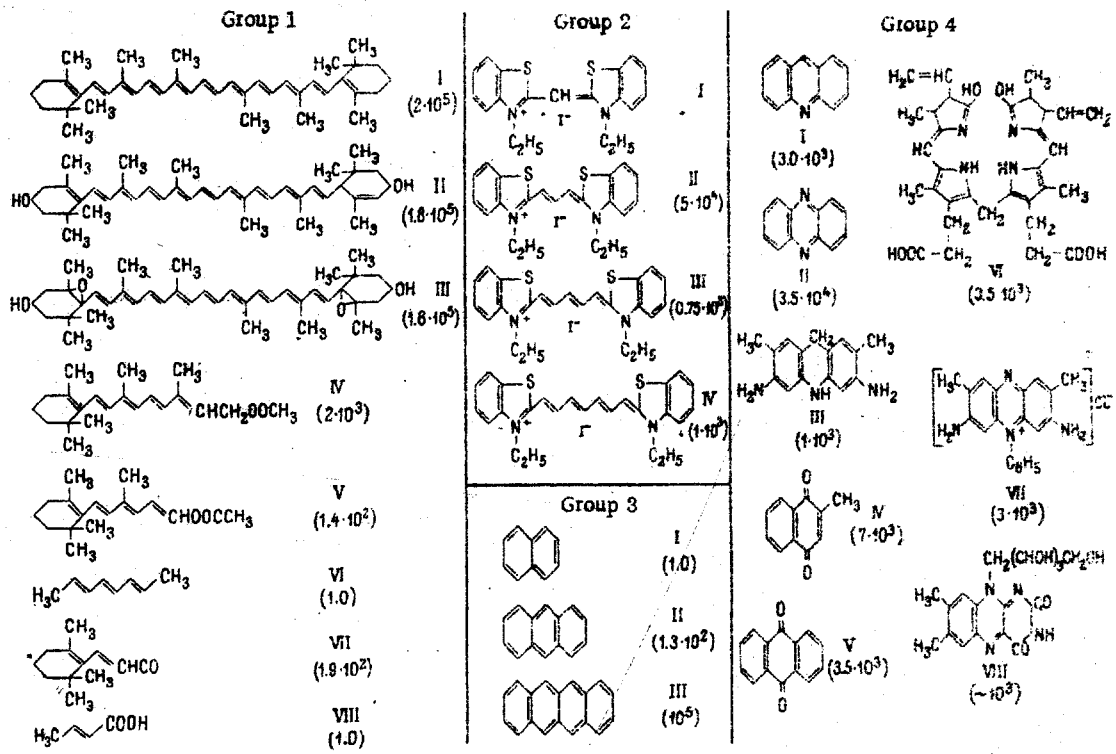


Fig. 3. Structure of various compounds used as electron acceptors. The efficiency of the inhibiting effect of the compounds investigated (figures in brackets) is characterized by the arbitrary ratio k/k_1c, where k is the rate of photoreduction in a control experiment, expressed as the ratio $\Delta D/\Delta t$ on a linear section of the curve (normally the first 3-6 min); k_1 is the rate of photoreduction in the presence of the substances investigated, and c is the concentration in M/liter of the substance investigated (inhibitor). The higher the absolute value of k/k_1c, the higher the efficiency of the inhibitor. Unity means there is no inhibiting effect.

chlorophyll–electron donor vigorously photosensitizes the polymerization of methyl methacrylate, and, therefore, the reaction is accompanied by the formation of free radicals; illumination of the system in the resonator of an EPR spectrometer led to the appearance of a signal [40].

Linschitz and Weissman [85] found that the "red" reduced form does not give an EPR signal, and, therefore, it is not a free radical.

By means of the EPR method it was possible to find the signal of monodeuteroascorbic acid formed in the reaction [4]. By illuminating frozen systems containing pigment and solvent, it was possible to measure the singlet signal, which is apparently due to the transfer of an electron from a molecule of the matrix-solvent to the excited pigment molecule [52].

Photoreduced forms of chlorophyll and its analogs react with a wide range of compounds, namely, pyridine nucleotides and N-benzylnicotinamide, ferric compounds, various dyes (safranine T, riboflavin, Methyl Red, etc.), quinones, and oxygen.

In the photoreaction in the ternary system electron donor–pigment–acceptor there is sensitized reduction of acceptor molecules and blocking of the photoreduction reaction.

The observed marked inhibition of the photoreduction of chlorophyll by carotene [12, 45] did not fit into the scheme we described, as we were unable to detect products of the photo-

sensitized reduction of carotene. These experiments led to a systematic study of the effect of polyenes and cyclic compounds with various structures on the photoreduction of chlorophyll. We studied the effect of compounds of the following classes: carotinoids and their analogs with different lengths of conjugated double bonds, molecules of polymethine dyes in which the polyene chain is coupled with a heterocycle, polycyclic hydrocarbons (naphthalene, anthracene, and tetracene), and heterocyclic compounds containing nitrogen and oxygen atoms in the conjugation chain (these compounds form the basis of the structure of reversibly reducible dyes).

Effect of Polyenes [42]. An investigation was made of the effect of carotenoids and some polyenes with different numbers of conjugated double bonds. For this purpose we used the following substances (the number of the formula in the table, Group 1, is given in brackets): carotene (I) – 11 conjugated double bonds, lutein (II) – 10, violaxanthin (III) – 9, vitamin A acetate (IV) – 5, methyl ester of 1,1,3-trimethylcyclohexanyl-3-methyl-1,3,5-heptatriene acid (V) – 4, alloocimene (VI) – 3, β-ionone (VII) – 2, and crotonic acid (VIII) – 1 (Fig. 3).

A decrease in the number of conjugated double bonds in the molecule of the substance leads to a reduction in the effect. Thus, carotene, lutein, and violaxanthin, which have 11, 10, and 9 conjugated double bonds, respectively, substantially inhibit the photoreaction of chlorophyll by ascorbic acid at a concentration of 10^{-5} M/liter, compounds with a shorter polyene chain have a lower inhibiting effect, which appears only at a concentration of 10^{-3} M/liter, while alloocimene, which has three conjugated double bonds in the molecule, has no appreciable effect even at a concentration of 10^{-1} M/liter.

The slight inhibiting effect in the experiment with β-ionone which has two conjugated double bonds, is apparently explained by the presence of a keto group in the molecule. An analogous relation of the protective effect of carotinoids with different numbers of conjugated double bonds on the photooxidation of chlorophyll was observed in the work of Claes and Nakayama [72, 73].

Photoreduction of chlorophyll by ascorbic acid may also be followed by measuring the potential of an inert metal electrode, immersed in the reacting solution. Experiments were carried out to elucidate the effect of carotene and tetracene on the photopotential of the system chlorophyll–ascorbic acid, using the method adopted in our laboratory [15]. Carotene and tetracene completely inhibit the appearance of the photopotential, corresponding to their effect on photoreduction.

Polymethine Dyes. These compounds have a combination of a heterocycle and a polyene chain in the molecule. Derivatives of diethylthiocyanine iodide, differing from each other in the length of the polyene chain, were studied (Fig. 3, Group 2).

Compound II inhibits the photoreduction of chlorophyll by ascorbic acid at a concentration of 10^{-4} M/liter, while compound I at the same concentration accelerates this process somewhat.

Compounds III and IV, which have longer polyene chains, have a strong inhibiting effect. Their effect appears even at a concentration of $2.5 \cdot 10^{-5}$ M/liter. Consequently, in the case of polymethine dyes also the inhibiting effect increases with an increase in the number of conjugated double bonds in the molecule of the dye.

In all experiments there was chlorophyll sensitized photoreduction of the compounds listed, as indicated by a sharp fall in the optical density at the absorption maxima of the substances investigated and the presence of an induction period on curves showing the photoreduction of chlorophyll. The accumulation of the photoreduced "red" form of chlorophyll occurred only after complete reduction of the dye molecules, which in this case are electron acceptors.

Polycyclic Hydrocarbons. We tested naphthalene I, anthracene II, and tetracene III (Fig. 3, Group 3). Tetracene substantially retards the photoreduction of chlorophyll at a concentration of 10^{-5} M/liter; anthracene has a much smaller inhibiting effect. Under the same conditions its effect appears only at a concentration of 10^{-2} M/liter. When naphthalene is present at a concentration of 10^{-2} M/liter, the photoreduction proceeds at the same rate as in a control experiment without the acceptor. Thus, in this case also, the presence of a large number of conjugated double bonds in the hydrocarbon molecule leads to an increase in inhibiting effect.

The results we obtained on the effect of aromatic hydrocarbons on photoreduction correspond to the data of Szwarc [97], who investigated the relative reactivities of aromatic compounds toward a methyl radical. In Szwarc's experiments, tetracene was extremely active, anthracene was much less active, and naphthalene had a very low activity, corresponding to the effect of these compounds on the photoreduction of chlorophyll. This comparison indicates that tetracene may act as a compound which reacts with the ion-radical of photoreduced chlorophyll.

Heterocyclic Compounds. From this group of compounds we studied (Fig. 3, Group 4): acridine I, phenazine II, acridine yellow III, menadione IV, anthraquinone V, bilirubin VI, safranine VII, and riboflavin VIII. These compounds are characterized by the presence in the molecule of conjugated double bonds and nitrogen and oxygen atoms in the conjugation chain. All the compounds listed inhibit the photoreduction of chlorophyll by ascorbic acid to some extent. Compounds containing a larger number of heteroatoms in their molecule usually have a stronger inhibiting effect. For example, phenazine inhibits the photoreduction of chlorophyll more strongly than acridine.

The following mechanisms are possible for blocking of the reaction by the compounds listed:

1. Deactivation of singlet and triplet compounds of chlorophyll; however, among the compounds studied only polyenes deactivate triplets and the bulk of the compounds studied do not quench the fluorescence of chlorophyll;

2. Reversible photooxidation of excited chlorophyll by acceptor molecules, competing with the photoreduction; however, many of the compounds do not quench the fluorescence of chlorophyll (see above).

3. Reaction with photoreduced forms of chlorophyll.

It may be surmised that carotene and tetracene reversibly take up an electron of photoreduced chlorophyll, without being able to "hold" the excess electron in the molecule for long with the formation of more stable valence-saturated compounds, while in the case of cyclic compounds with a heteroatom (nitrogen, oxygen, and sulfur) in the conjugation chain, the acceptance of an electron by the system of conjugated double bonds would lead to the formation of more stable reduction products (finally, valence-saturated products) by subsequent bonding of a proton by the vacant electron pair of the heteroatom with subsequent dismutation of the semiquinones formed. An example illustrating this mechanism is provided by the behavior of polymethine dyes, in which the polyene chain is connected to a heterocycle. In contrast to carotinoids, here there is sensitized reduction of the dye; the electron taken up from chlorophyll is stabilized in the dye molecule because of the bonding of a proton by nitrogen atoms of the heterocycle. As a result of the peculiarities of the structure of the acceptor molecules and the presence in the conjugation chain of nitrogen and oxygen atoms, which are capable of taking up a proton with subsequent dismutation, the photochemically mobilized electron is trapped.

Thus, a combination of a polyene chain with a heterocycle is an effective electron "trap." These experiments make it possible to understand the peculiarities of the structure of the com-

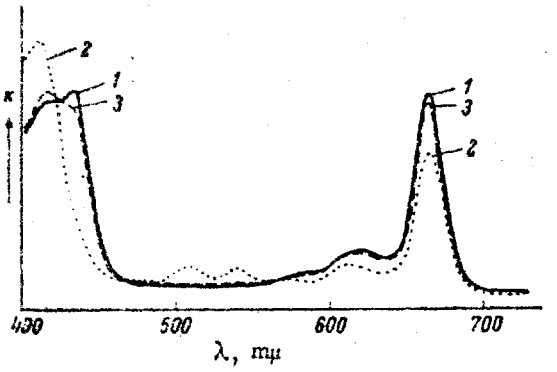


Fig. 4. Pheophytinization of chlorophyll *a* in absolute alcohol in the presence of hydroquinone. 1) Starting alcohol; 2) after illumination for 17 min with light at 10^5 erg per $cm^2 \cdot sec$; 3) control experiment after 30 min in the dark.

Table 4

Pigments	Half-conversion time, min	
	dark	light
Bacterioviridin*	60	14
Chlorophyll a	180	12
Protochlorophyll	600	10
Chlorophyll b	1400	9

*In the experiment with bacterioviridin, $0.4 \cdot 10^{-2}$ M/liter oxalic acid.

pounds which determine their effective action as "traps" of a photochemically mobilized electron. Such compounds are pyridine and flavin nucleotides, phenazine derivatives, naphthaquinone derivatives (vitamin K), and also compounds in which a polyene chain is combined with quinone derivatives (co-enzyme Q). They all not only take up an electron, but may form stable and long-lived reduced compounds, which act as a "reservoir" of reducing power and are used in the enzymatic stages of the photosynthesis. Compounds which have only a chain of conjugated bonds and take up an electron effectively, cannot hold it for long enough so that they are intermediate carriers of an electron. Such compounds are carotinoids and unsaturated lipoids in the structures of mitochondria and the granules of chloroplasts.

Photopheophytinization

The pheophytinization reaction consists of the replacement of the central magnesium atom in a pigment molecule by two hydrogen atoms, which is usually observed in acid media:

$$\text{chlorophyll} + 2H^+ \rightarrow \text{pheophytin} + Mg^{2+}.$$

The rate of formation of pheophytins from the corresponding magnesium complexes (chlorophyll analogs) falls in the following series: bacterioviridin–chlorophyll a –protochlorophyll–bacteriochlorophyll–chlorophyll b [46, 49].

Differences in the degree of reduction of the semi-isolated double bond in the pigment molecule have no effect on the reaction; the strengthening of the bond of magnesium should be ascribed to the presence of electronegative substituents (the aldehyde group in chlorophyll b).

In his monograph [94], Rabinowitch reported unpublished observations of the accelerating effect of light on the pheophytinization of chlorophyll. We observed the formation of pheophytin, accompanying the reversible photoreduction of chlorophyll by ascorbic acid [24]. The more water and ascorbic acid in the pyridine, the greater was the amount of pheophytin accumulated after the reaction.

Evstigneev and Gavrilov [15] showed that chlorophyll, photoreduced with phenylhydrazine in toluene solution by the slow back reaction, undergoes pheophytinization. Bannister made a detailed investigation of the formation of pheophytin in the photoreduction of chlorophyll [70].

In our laboratory it was shown [46, 49] that pheophytin is formed during the illumination of systems where it is not possible to observe the formation of photoreduction products spectroscopically, such as the systems chlorophyll–pyridine–hydrochloric acid, pyridine–oxalic acid, alcohol–oxalic acid (Fig. 4), etc. Table 4 gives the time of half-conversion of pigments into pheophytin. (Solvent – pyridine + 10% water in the absence of air. Oxalic acid $2 \cdot 10^{-2}$ M/liter. Red light at 10^5 ergs/$cm^2 \cdot sec$; +20°C).

Photopheophytinization, like photoreduction, is blocked by electron acceptors such as Methyl Red, riboflavin, safranine, and also β-carotene and tetracene. The effect of these compounds is probably based on a reversible reaction with the intermediate reduced form of the pigment or competition for the excited pigment molecule by reversible transfer of an electron in a complex. It may be surmised that the reaction studied is based on reversible photoreduction of chlorophyll by solvent molecules (pyridine and alcohol), which act as an electron donor with more rapid pheophytinization of intermediate photoreduced forms of the pigment.

Reversible Photochemical Oxidation

Rabinowitch and Weiss [95] established that the reaction of chlorophyll with ferric compounds is a reversible oxidation. The study of this reaction in the laboratory of Dain [1,5] showed that under some conditions there is the replacement of magnesium by iron and under other conditions there is the photoreduction of chlorophyll by ferrous ions, formed by a photochemical reaction [5].

It has long been known that with intensive illumination of chlorophyll solutions in air there is destructive photoxidation. We found that together with products of irreversible oxidation, there are formed intermediate labile products, from which the pigment is partly regenerated by the addition of reducing agents. These processes proceed most clearly in alcohol solutions [24a]. Reversibility appears most markedly in experiments with bacteriochlorophyll [38]. These data were confirmed in the investigations of Goedheer [76].

Evstigneev and Terenin found that the sign of the potential of solid films of chlorophyll and its analogs is related to the oxidation–reduction properties of the medium surrounding the film [21]. In measurements of the photopotentials of pigment films deposited on a metal electrode and immersed in an electrolyte solution containing an oxidant or a reducing agent, a reversible change in potential was observed on illumination, and this indicates the capacity of pigments to donate or accept an electron [16].

Kachan and Dain [23], who illuminated chlorophyll with ultraviolet light in "rigid" media at −190°, found a change in the absorption of chlorophyll, which they explained by elementary photooxidation. Linschitz and Rennert [84] established that when chlorophyll is illuminated with red light at liquid nitrogen temperature (−190°) in a mixture of ether, isopentane, and alcohol there is decolorization, which is intensified in the presence of quinone and is explained by photooxidation. The process is reversible when the solution is thawed. Tollin and Green [99] observed that when the system chlorophyll–quinone in the same "rigid" medium is illuminated there appears an EPR signal with the spectrum of a semiquinone, which indicates simultaneous one-electron photooxidation of chlorophyll. These results may also be interpreted as chlorophyll-sensitized reduction of quinone with components of the solvent used as an electron donor. We found that in a viscous alcohol–glycerol medium at −70° there is reversible photooxidation of chlorophyll a and its analogs by p-benzoquinone [43, 44]. Quenching of the fluorescence of chlorophyll by oxidants may be regarded as reversible one-electron oxidation of an excited chlorophyll molecule by molecules of the oxidant in a complex.

Table 5

Pigments	In light reaction (C-T)	In dark back reaction (T-C)	Degeneration of pigment, %
Bacteriochlorophyll	−170	+140	82
Bacterioviridin	−140	+110	82
Chlorophyll a	−120	+110	90
Chlorophyll b	− 50	+ 30	60
Protochlorophyll	− 30	+ 20	33
Pheophytin a	0	0	0

We selected a medium which promotes photooxidation, namely, a mixture of alcohol and glycerol [6]. At −70° this system is immobile and forms a highly viscous system. Chlorophyll and its analogs form solutions in these media. We also found that chlorophyll dissolves in orthophosphoric acid to form pheophytin with retention of the characteristic red fluorescence.

Reaction with Oxygen. We investigated the photochemical oxidation of chlorophyll a and b, bacteriochlorophyll, bacterioviridin, protochlorophyll, and pheophytin by atmospheric oxygen in alcohol−glycerol solutions. Clear reversibility was observed only after a certain amount of ascorbic acid had been added to the experimental mixture or when ascorbic acid was added to the medium before the beginning of the illumination.

Lowering the temperature to −70° leads to acceleration of the reaction in experiments with chlorophyll a and insignificant retardation in experiments with bacteriochlorophyll and bacterioviridin. It is possible that at low temperatures chlorophyll a tends to participate in a dark interaction with oxygen with the formation of a labile molecular complex, within which there is the transfer of an electron on absorption of a light quantum.

Observations of chemiluminescence after illumination of chlorophyll solutions containing oxygen leads to the conclusion that labile photooxidized forms of chlorophyll exist [47].

The experiments of Terenin and Kholmogorov [65] showed that the illumination of solid chlorophyll in the presence of oxygen and water leads to the appearance of an EPR signal, which may be connected with the transfer of an electron in a complex with the formation of "oxidized" chlorophyll. Similar results were obtained in the work of Umrikhina et al. [64].

Reaction with Quinones [43, 45, 12]. Observations were made of the reversible decolorization of the pigments investigated in the presence of p-benzoquinone in an alcohol−glycerol medium at temperatures of +20° and −70°. At room temperature we were unable to see changes in the absorption maximum of the pigment (in all cases the measurements were made 10-15 sec after illumination), but by carrying out the experiments at −70°, we were able to detect reversible effects. These effects were a reversible change in the optical density ΔD in the "red" absorption maximum on oxidation of the pigments by p-benzoquinone (ΔD ± 0.01), namely, a fall in intensity (−) after 2 min in light C and an increase (+) after 2 min in the dark T (Table 5).

The pigments are in the following order with respect to the rate of reaction with p-benzoquinone: bacteriochlorophyll, bacterioviridin, chlorophyll a, chlorophyll b. No reaction was observed with pheophytin a. These results agree with data obtained in a study of the rate of photochemical oxidation of these pigments by molecular oxygen.

We checked the possibility of the interaction of various quinones with chlorophyll a. The experiments were carried out by the same method at −70°. A reversible photoreaction was observed with p-benzoquinone and 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinone. The reaction proceeded sluggishly with 2,3-methyl-1,4-naphthoquinone and no reaction could be detected with anthraquinone and co-enzyme Q_3.

Under the given conditions a reaction is apparently observed with oxidants with E_0^1 from +0.2 to +0.8 V.

Under the action of red light there is a reversible photochemical interaction of the pigment with the quinone and the formation of a semiquinone, supposedly according to the reaction

$$X^* + Quin \rightleftarrows X^+ + Quin^-.$$

Action of Red and White Light. It is important to note that the reversible effect in this reaction is observed only with red light. We were unable to observe reversible

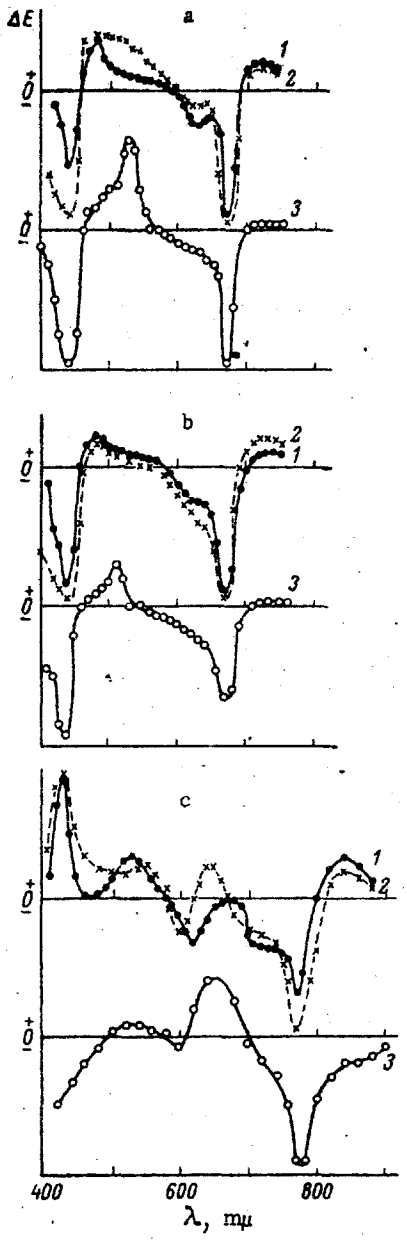


Fig. 5. Differential absorption spectra in the photochemical oxidation and reduction of chlorophyll a (a), bacterioviridin (b), and bacteriochlorophyll (c). 1) Oxidation by p-benzoquinone; 2) oxidation by oxygen; 3) reduction by ascorbic acid (sodium sulfide was used in the reduction of bacteriochlorophyll).

effects in the white light of an incandescent lamp. This phenomenon may be explained by the fact that the product from the oxidation of chlorophyll by p-benzoquinone has an absorption maximum at about 480 mμ and the action of white light produces rapid irreversible conversions of this product.

Differential Spectra of Oxidized and Reduced Forms. In connection with the development of the technique of differential spectroscopy, there has been a lively discussion in the literature of the presence of photochemically modified forms of chlorophyll and its analogs in living photosynthesizing organisms. A knowledge of the differential absorption spectra of the products from the photochemical interaction of the pigments with oxidizing and reducing agents may help in these searches. These measurements were carried out in a viscous alcohol–glycerol medium for the reaction of the pigments with quinone and oxygen and in a pyridine–glycerol medium for the reaction with ascorbic acid (Fig. 5).

Let us examine the form of the spectra of the intermediate forms of chlorophyll a. Both reactions (oxidation and reduction) are characterized by a fall in the "red" and "blue" maxima and the appearance of absorption in the middle region of the visible spectrum with a maximum at 480 mμ in oxidation and at 525 mμ in reduction. In oxidation there appears an absorption band at about 740 mμ; in reduction, absorption is observed in the near-infrared region only with more prolonged illumination and under special conditions. The spectra of bacterioviridin are similar to those of chlorophyll a: the maximum of the oxidized product lies at 480 mμ and that of the reduced product at 510 mμ. In the case of bacteriochlorophyll the differences in the oxidized and reduced forms are more marked. The oxidized forms are characterized by maxima at 430, 530, and 840 mμ and, in addition, in oxidation by oxygen there is an increase in absorption at 650 mμ; the reduced forms are characterized by an increase in absorption in the red region with a maximum at 650 mμ. In all cases attention is attracted by the similarity in the differential absorption spectra in the reversible oxidation of pigments by quinone and in the predominantly irreversible oxidation by oxygen.

The great similarity in the spectra of the oxidized and reduced forms indicates that in both cases there is disruption of the system of double bonds conjugated around the ring in the pigment molecule.

Photosensitization

The photosensitizing effect of chlorophyll in solutions has been known for a long time. Even in the twenties a series of cases of chlorophyll sensitization of oxidation–reduction reactions was studied in the laboratory of Emil Bayer. Phenylhydrazine and organic amines were used as electron donors and various dyes, mainly azo compounds, as electron acceptors.

About 40 years ago, Gaffron [74, 75] found that chlorophyll sensitized photooxidation of allylthiourea by oxygen proceeds with a quantum yield equal to unity. Warburg [102] used chlorophyll sensitized oxidation of thiourea as a chemical actinometer because of the constancy of the quantum yield under different conditions.

In our laboratory we studied various oxidation–reduction reactions sensitized by chlorophyll and its analogs in organic solvents and in water. A brief summary of the experimental material is given below.

Pigments – Sensitizers. In our laboratory it was established that a photosensitizing effect is shown by phthalocyanines, chlorophylls a and b, bacteriochlorophyll, bacterioviridin, pheophytins, protochlorophyll, porphin, various porphyrins, and other analogs and derivatives of chlorophyll containing magnesium, hydrogen, or zinc atoms at the center of the molecule.

Electron Donors. Ascorbic acid was found to be a universal electron donor, which acts over a wide range of conditions. Together with it we used other dienols, phenylhydrazine, cystein, sodium sulfide, and other compounds. Reduced pyridine nucleotides and N-benzylnicotinamide, which were used as electron donors, are a peculiar group of compounds [33-35]. In a series of reactions we used ferrous compounds, including cytochrome C [28, 39].

Electron Acceptors. In our laboratory we used a wide range of different compounds as electron acceptors, but unfortunately they are less specific than donor compounds. We used oxygen, Methyl Red and other azo dyes, safranine, various quinones, riboflavin, di- and triphosphopyridine nucleotides, N-benzylnicotinamide, and methylviologen. As electron acceptors it is possible to use systems with the very widest range of redox potentials, namely, from an oxygen electrode to a hydrogen electrode (methylviologen). The use of methylviologen is particularly interesting as this compound has a reduction potential equal to the potential of ferredoxine, which is the most reduced component in the chain of the photosynthetic transfer of an electron. In our experiments with G. P. Brin, we observed the chlorophyll photosensitized reduction of methylviologen in alcohol and pyridine [36] (Fig. 6). When cystein or thiourea was used as the electron donor, up to 40% of the methylviologen underwent photoreduction.

Nature of Medium. The molecules of the medium (solvent) interact with molecules participating in the reaction and result in a change in their electron–donor and electron–acceptor properties. Thus, basic media (pyridine) lead to an increase in the electron–donor properties of ascorbic acid, thus facilitating the photosensitized reduction. The use of aqueous acid media made it possible to use ferrous compounds (together with ascorbic acid) as electron donors in the sensitized reduction of Methyl Red (see review [29]).

Chlorophyll and its analogs are insoluble in water. Therefore, photosensitization by pigments in an aqueous medium was studied in heterogeneous systems, namely, colloidal solutions, suspensions of pigment crystals, and adsorbates. Twelve years ago the author and Brin [30] established that phthalocyanine crystals have a photosensitizing effect on the oxidation of aqueous solutions of ascorbic acid. The same authors showed that aqueous colloidal solutions of chlorophyll, obtained by means of detergents, have a high activity [31]. This phenomenon was studied in detail for colloidal solutions obtained with various detergents and at various pH values, using different electron donors [2]. Chlorophyll is apparently in a "monomeric" form in the detergent micelle and this explains its high activity.

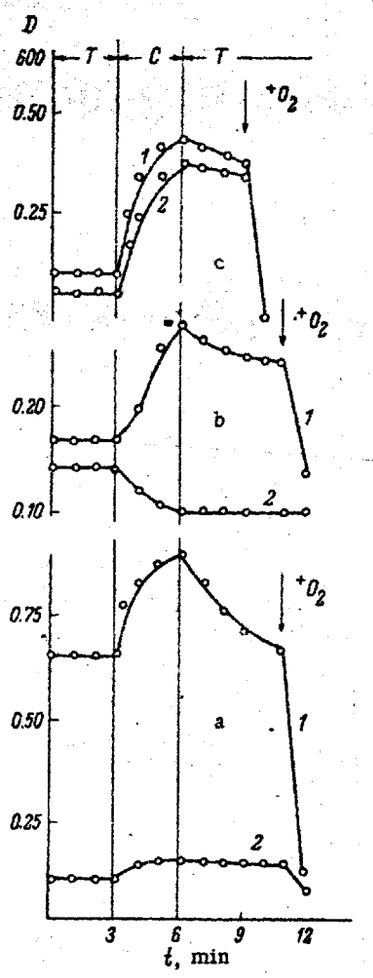


Fig. 6. Chlorophyll-sensitized reduction of methylviologen. a) System chlorophyll a (10^{-5} M/liter)—ascorbic acid ($5 \cdot 10^{-3}$ M/liter)—methylviologen ($2 \cdot 10^{-4}$ M/liter) in pyridine (10% water): 1) at 20°C; 2) without ascorbic acid. b) System chlorophyll a — ascorbic acid — methylviologen in alcohol (20% water): 1) at −60°C; 2) without ascorbic acid. c) System chlorophyll a — phenylhydrazine — methylviologen in alcohol: 1) at 20°C; 2) at −60°C.

It was found that chlorophyll absorbed on protein of cytochrome C or in an aqueous colloidal solution [25, 39] has a photosensitizing effect in an aqueous medium on oxidation and reduction reactions of cytochrome. Vorob'eva [6] demonstrated the possibility of photosensitized reduction of Methyl Red by ascorbic acid in aqueous acid in aqueous colloidal solutions of chlorophyll and homogenizates of leaves. Evstigneev and Gavrilova [17] studied the photosensitized reduction of Methyl Red by coagulated colloids of chlorophyll and in subsequent work, the activity of chlorophyll in this reaction in an adsorbed state on inorganic and organic adsorbents and in coacervates [18]. In a recent series of studies [69, 100, 101], Vernon and his coworkers investigated the photosensitizing effect of chlorophyll in aqueous solutions containing enzyme preparations. They were able to demonstrate the possibility of photosensitized reduction of pyridine nucleotides in aqueous solutions by reactions of the type that we studied previously in pyridine solutions [3, 32].

From all this work it may be concluded that chlorophyll in various forms under homogeneous and heterogeneous conditions has a photosensitizing effect on oxidation—reduction reactions.

The quantum yield of the reactions was not measured in work in our laboratory; the efficiency of the process was usually estimated from the reaction rate with a given optical density of the solution of the pigment-sensitizer and comparable concentrations of the electron acceptor and donor.

Reactions in organic solvents, where the pigments are in "monomeric" forms, are usually more effective than reactions in which aggregated (colloidal) forms of the pigment participate.

The close interaction between pigment molecules in aggregated forms (in crystals, solid films, and colloidal particles) leads to a close interaction of the π-electron shells and possible distortion of the geometry of the molecules when they are packed into the aggregated structure. Intermolecular interaction results in the reduction or complete quenching of the fluorescence of pigments at room temperature and normally in a shift in the absorption maxima toward the longwave region of the spectrum. Absorption and luminescence spectra of aggregated forms of chlorophyll and its analogs have been studied in detail in our laboratory. However, these investigations are beyond the scope of the present article.

Effect of the Viscosity of the Medium [44]. Hydrogen transfer reactions photosensitized by chlorophyll were investigated in viscous media of different types. For this

purpose we used the system ascorbic acid–chlorophyll–electron acceptor. We studied the sensitized reduction of electron acceptors (mainly Methyl Red) in various media at temperatures from +20 to −70°. In the system alcohol–glycerol the sensitized reduction of Methyl Red became less efficient with the increase in viscosity as the temperature was lowered. The reaction at −10° proceeded more slowly than at +20°, while at −40° it was no longer possible to observe a sensitized reaction in this system. In ethanol it is possible to observe a fast sensitized reaction even at −70°. Thus, the effect is not connected with the fall in temperature, but with the increase in the viscosity of the system as the temperature is reduced. Sensitized photoreduction of Methyl Red by ascorbic acid in the system pyridine–glycerol gives the same picture. In phosphoric acid and in a mixture of phosphoric acid and glycerol there is effective sensitization at room temperature, while at −20° (in a supercooled viscous system) the process stops completely. Sensitized reduction of safranine and riboflavin shows the same relations.

Thus, photosensitization in solutions requires the diffusion of active products, and, therefore, it may be represented as a form of alternation of elementary stages, requiring collisions between intermediate compounds with the probable formation of long-lived prereaction complexes.

Mechanism of Elementary Stages. Schemes for the transfer of energy from an excited pigment molecule to molecules of substances which are converted in the sensitized reaction are well known. In addition there are the widespread ideas that the reaction proceeds as a result of reversible photochemical conversions of excited molecules of the pigment-sensitizers (for example [78, 93, 94]).

Let us examine the possible mechanisms of the reactions.

Transfer of energy from an excited pigment molecule to acceptor molecules, undergoing photochemical conversions. The probability of the transfer of energy from excited singlet and triplet molecules is related to the lifetime of the excited state, which is several orders higher for a triplet molecule. The transfer of energy is promoted by prolonged contact between the excited energy donor molecules (S*, T) and the energy acceptor molecule A, which results from the formation of a complex of the type SA, S*A, or TA. In the case of chlorophyll and other pigments in solution, cases are known of energy transfer by the Vavilov–Perrin mechanism [57]; the essential condition is that the acceptor molecule should have an electron level below S*. In chlorophyll-sensitized reactions this condition is not fulfilled as the electron donor (for example, ascorbate) and a wide range of the acceptors studied have absorption bands in a shorter wave region than the electron level of chlorophyll, corresponding to the red absorption band. The transfer of energy from the shortwave electron level of chlorophyll S_1^* (blue absorption band) has not been observed up to now because of the short lifetime of this excited state and effective intramolecular degradation of the energy to the S* and S levels. Murty and Rabinowitch [91] recently described quenching of the fluorescence of chlorophyll by carotene with excitation at the blue maximum of chlorophyll. It is probable that under conditions where long-lived complexes SA are formed we can expect to observe such transitions. However, in the cases we studied the reaction was excited at the "red" maximum of chlorophyll and the possibility of energy transfer described is eliminated.

The condition for energy transfer to a triplet level by the Terenin–Ermolaev mechanism [61] is also a lower lying T level of the energy acceptor molecule. The lower triplet levels have not been studied adequately for the partners in sensitized reactions which may be energy acceptors. For most of these compounds it has not been possible to find fluorescence lying in a longer wave region than the fluorescence of chlorophyll (about 850 mμ).

The quenching of the triplet states in experiments using flash spectroscopy may be the result of the acceptance of energy by the quenching molecule or a chemical interaction of the triplet molecule with the quenching agent. Then there is the possibility of migration of energy

between "like" molecules at the triplet level [59]. Effective quenching of the triplet state by oxidant molecules (quinones and nitro compounds) should be ascribed to a chemical reaction as the triplet levels of these molecules lie higher than in chlorophyll.

Thus, as yet we do not have reliable experimental data, which indicate the role of energy transfer processes in chlorophyll-sensitized oxidation–reduction reactions.

Elementary reactions of electron transfer in photosensitization. The result of an interaction of an excited sensitizer molecule with an electron donor or acceptor may be elementary photoreduction or photooxidation. Which of these processes occur in sensitized reactions?

The photoreduction of chlorophyll and its analogs in pyridine occurs with the formation of long-lived intermediate products, whose conversion may be observed by normal spectral methods. This facilitates the study of the mechanism of a reaction in such media. The author of the article demonstrated [26-29] the following:

1. Sensitized hydrogen transfer from a donor to an acceptor is observed with donors which are capable of photoreducing chlorophyll (ascorbic acid, phenylhydrazine, cysteine, etc.), but is not observed with donors with which the photoreduction is not observed (pyruvic, malic, oxalic acid, etc.);

2. the introduction into the system of an electron acceptor (safranine, riboflavin, or Methyl Red) blocks the photoreduction, which may be observed by spectroscopic measurements, and by measurement of the photopotential and the photoconductivity;

3. in the dark act of the reaction it is possible to observe a reversible interaction of the photoreduced forms of chlorophyll and pheophytin with electron acceptors.

The observed phenomena indicate that sensitization in basic media is determined by reversible photoreduction of the pigment-sensitizer in the types of reaction studied.

It is more difficult to establish the reaction mechanism in cases where it is not possible to observe the formation of long-lived intermediate products with a well-expressed absorption spectrum. We have pointed out the probability of mechanisms connected with photoreduction of the pigment in basic media and with photooxidation in alcohol media [37]. After analyzing the kinetics of chlorophyll-sensitized reduction of Methyl Red in alcohol solution, Livingston and his co-workers [86] proposed that the elementary mechanism of the reaction is based on electron transfer in the Methyl Red–chlorophyll complex with subsequent reaction of the charge-transfer complex formed with a hydrogen donor, namely, phenylhydrazine. According to this scheme, Methyl Red accepts an electron from an excited chlorophyll molecule. Livingston and Ke Chun-lin [90] showed that Methyl Red vigorously quenches the fluorescence of chlorophyll together with the strong oxidants quinone, nitro compounds, etc. These observations indicate the possibility of an oxidative mechanism of sensitization in the given system. In other papers, Livingston examines a reductive mechanism, according to which the reaction of chlorophyll with phenylhydrazine is the primary reaction.

A study of the photogalvanic effect in solid films of magnesium phthalocyanine and chlorophyll made it possible for Evstigneev and Terenin [21] to establish that the sign of the photopotential depends on the composition of the medium surrounding the electrode. A systematic study of the photopotential at the boundary of a solid film of pigment and a solution made it possible for Evstigneev [14] to determine the conditions favoring the acceptance and donation of an electron when the film is illuminated.

Thus, for example, in these experiments it was shown that oxygen and Methyl Red promote the appearance of a positive photopotential of pigment films most clearly in acid media, i.e., they act as electron acceptors; in contrast to this, ascorbate and phenylhydrazine promote the

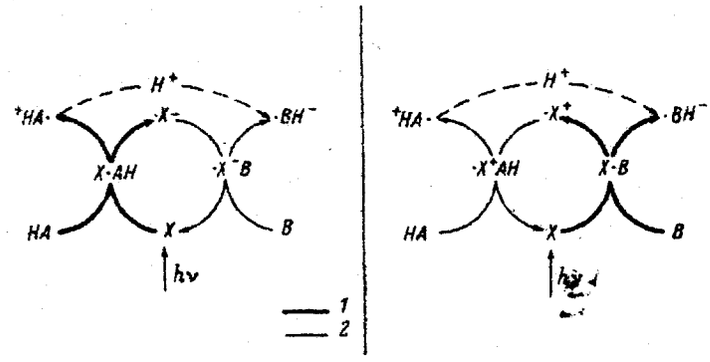


Fig. 7. Scheme of photosensitization mechanism. 1) Light stage; 2) dark stage. X) Chlorophyll; AN) electron donor; B) electron acceptor.

appearance of a negative photopotential of the film. Putseiko [50] showed that under these conditions the photo emf shows a maximum in the green region of the spectrum, corresponding to the absorption of photoreduced chlorophyll.

In a study of pheophytin photosensitized reduction of Methyl Red, Evstigneev and his coworkers [19] found an increase in the efficiency of sensitization in neutral and acid media, which supposedly corresponded to elementary photoreduction or photooxidation of the pigment.

In the experiments of Chibisov and Karyakin [66-68], in which flash spectroscopy was used, it was possible to observe the primary reaction of the triplet form of chlorophyll and the primary ion-radicals of the pigment formed with electron donors and acceptors. Thus, a study was made of the reaction of the primary ion-radical of chlorophyll with a polymethine dye, which acts as the final electron acceptor [67].

The available experimental material indicates the possibility of sensitization mechanisms, connected with primary photoreduction or photooxidation of pigments and the probable intermediate formation of a complex of the excited pigment molecule with the electron donor or acceptor. These possibilities are shown in Fig. 7. Neither mechanism excludes the other, and they may operate simultaneously with different efficiencies (see the present collection, V. B. Evstigneev's article).

Investigations of the photochemistry of chlorophyll and its analogs and derivatives have made it possible to obtain the information required for understanding the nature of the elementary processes of photosynthesis. The main conclusion is that chlorophyll and its analogs excited by light participate in electron transfer processes from donor molecules to acceptors by reversible acceptance or donation of an electron. It may be surmised that this is the way in which the different forms of chlorophyll participate in each of the photochemical stages of the photosynthetic chain of electron transfer. Further investigations should show the nature of the elementary photoconversions of the individual forms of chlorophyll and its analogs directly in living photosynthesizing organisms.

In the operating chain of photosynthetic electron transfer acts of electron acceptance or donation by chlorophyll follow rapidly, and this makes it difficult to observe the changed forms of the pigment. The products of the photochemical conversion of chlorophyll may accumulate in measurable amounts only when the normal system of electron transfer is disrupted.

In examining the nature of the primary conversion of chlorophyll we should point out the analogy with the work of cytochromes in the chain of electron transfer in mitochondria. In the operating cyclic or open system there is no point to the question of which is the primary, oxidation, or reduction of the cytochrome. In spectroscopic observation, the accumulation of reduced or oxidized cytochrome depends on the metabolic conditions, namely, the presence of electron donor substrates and the degree of aeration. Equally, the observation of the accumulation of modified forms of chlorophyll will depend on the experimental conditions. The operation of the chain of photosynthetic electron transfer does not depend on the order of alternation of the elementary processes.

According to contemporary ideas, in the chain of electron transfer in photosynthesis there are branches which operate in oxidizing and reducing regions and to which there correspond two types of photoreaction. In the two branches of electron transfer we may look for both types of elementary reactions of chlorophyll, namely, reversible reduction and reversible oxidation.

Literature Cited

1. Ashkinazi, M. S., G. S. Glikman, and B. Ya. Dain, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 73:743 (1950).
2. Brin, B. P., and A. A. Krasnovskii, Biokhimiya, 22:776 (1957).
3. Brin, G. P., and A. A. Krasnovskii, Biokhimiya, 24:1085 (1959).
4. Bubnov, N. N., A. A. Krasnovskii, A. V. Umrikhina, V. F. Tsepalov, and V. Ya. Shlyapintokh, Biofizika, 5:121 (1960).
5. Butsko, S. S., and B. Ya. Dain, Ukr. Khim. Zh., 27:314 (1961).
6. Vorob'eva, L. M., and A. A. Krasnovskii, Biokhimiya, 21:126 (1956); 23:760 (1958).
7. Gurinovich, G. P., Collection: Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis. Izd. Nauka, Moscow (1965), p. 83.
8. Dain, B. Ya., Usp. Khim., 15:539 (1946).
9. Dain, B. Ya., and M. S. Ashkinazi, in collection: Problems in Photosynthesis. Izd. AN SSSR, Moscow (1959), p. 57.
10. Dilung, I. I., and I. N. Chernyuk, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 140:162 (1961).
11. Dilung, I. I., and I. N. Chernyuk, Zh. Fiz. Khim., 37:1100 (1963).
12. Drozdova, N. N., and A. A. Krasnovskii, Biokhimiya, 30:605 (1965).
13. Evstigneev, V. B., Zh. Fiz. Khim., 32:969 (1958).
14. Evstigneev, V. B., Biofizika, 8:664 (1963).
15. Evstigneev, V. B., and V. A. Gavrilova, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 91:899 (1953).
16. Evstigneev, V. B., and V. A. Gavrilova, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 95:841 (1954).
17. Evstigneev, V. B., and V. A. Gavrilova, Biofizika, 4:641 (1959).
18. Evstigneev, V. B., and V. A. Gavrilova, Biofizika, 5:599 (1960).
19. Evstigneev, V. B., V. A. Gavrilova, and I. G. Savkina, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 151:227 (1963).
20. Evstigneev, V. B., and A. A. Krasnovskii, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 60:623 (1948).
21. Evstigneev, V. B., and A. N. Terenin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 81:223 (1951).
22. Karyakin, A. V., and A. K. Chibisov, present collection, p. 222.
23. Kachan, A. A., and B. Ya. Dain, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 80:619 (1951).
24. Krasnovskii, A. A., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 60:421 (1948).
24a. Krasnovskii, A. A., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 83:617, 835 (1947).
25. Krasnovskii, A. A., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 103:283 (1955).
26. Krasnovskii, A. A., Problems in Chemical Kinetics. Izd. AN SSSR, Moscow (1955), p. 92.
27. Krasnovskii, A. A., Zh. Fiz. Khim., 30:968 (1956).
28. Krasnovskii, A. A., Collection: Problems in Photosynthesis. Izd. AN SSSR, Moscow (1959), p. 30.

29. Krasnovskii, A. A., Usp. Khim., 29: 736 (1960).
30. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 53: 447 (1946).
31. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 63: 163 (1948).
32. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 67: 325 (1949).
33. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 153: 212 (1963).
34. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, in collection: Problems in Evolution and Technical Biochemistry. Izd. AN SSSR, Moscow (1964).
35. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 158: 225 (1964).
36. Krasnovskii, A. A., and G. P. Brin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 163: 761 (1965).
37. Krasnovskii, A. A., G. P. Brin, and K. K. Voinovskaya, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 59: 393 (1949).
38. Krasnovskii, A. A., and K. K. Voinovskaya, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 81: 879 (1951).
39. Krasnovskii, A. A., and K. K. Voinovskaya, Biofizika, 1: 120 (1956).
40. Krasnovskii, A. A., and A. V. Umrikhina, Biofizika, 3: 547 (1958).
41. Krasnovskii, A. A., N. N. Drozdova, and E. V. Pakshina, Biokhimiya, 25: 288 (1960).
42. Krasnovskii, A. A., and N. N. Drozdova, Biokhimiya, 26: 859 (1961).
43. Krasnovskii, A. A., and N. N. Drozdova, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 150: 1378 (1963).
44. Krasnovskii, A. A., and N. N. Drozdova, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 153: 721 (1963).
45. Krasnovskii, A. A., and N. N. Drozdova, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 158: 730 (1964).
46. Krasnovskii, A. A., and E. V. Pakshina, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 148: 935 (1963).
47. Litvin, F. F., Yu. A. Vladimirov, and A. A. Krasnovskii, Usp. Fiz. Nauk, 71: 149 (1960).
48. Litvin, F. F., and B. A. Gulyaev, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 162: 1184 (1965).
49. Pakshina, E. V., and A. A. Krasnovskii, Biokhimiya, 29: 1132 (1964).
50. Putseiko, E. K., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 150: 343 (1963).
51. Rikhireva, G. T., Z. P. Gribova, L. P. Kayushin, A. V. Umrikhina, and A. A. Krasnovskii, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 159: 196 (1964).
52. Rikhireva, G. T., A. V. Umrikhina, L. P. Kayushin, and A. A. Krasnovskii, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 163: 491 (1965).
53. Sidorov, A. N., and A. N. Terenin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 145: 1093 (1962).
54. Terenin, A. N., Zh. Fiz. Khim., 18: 1 (1944).
55. Terenin, A. N., Izv. Akad. Nauk SSSR, ser. biol., 3: 369 (1947).
56. Terenin, A. N., Photochemistry of Dyes. Izd. AN SSSR, Moscow-Leningrad (1947).
57. Terenin, A. N., Usp. Fiz. Nauk, 43: 347 (1951).
58. Terenin, A. N., Usp. Khim., 24: 121 (1955).
59. Terenin, A. N., Radiotekhnika i Elektronika, 1: 1127 (1956).
60. Terenin, A. N., Collection: Problems in Photosynthesis. Izd. AN SSSR, Moscow (1959), p. 9.
61. Terenin, A. N., and V. L. Ermolaev, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 85: 547 (1952).
62. Terenin, A. N., and V. L. Ermolaev, Izv. Akad. Nauk SSSR, 26: 21 (1962).
63. Terenin, A. N., A. V. Karyakin, E. B. Lyubomudrov, P. S. Sushchinskii, and O. D. Dmitrievskii, Opt. i Spektr., 1: 456 (1956).
64. Umrikhina, A. V., I. N. Golubev, L. P. Kayushin, and A. A. Krasnovskii, Biofizika, 9: 423 (1964).
65. Kholmogorov, V. E., and A. N. Terenin, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 137: 199 (1961).
66. Chibisov, A. K., Investigation of the Photoreactions of Pigments by Flash Photolysis and Kinetic Spectroscopy. Candidate's Dissertation, GOKhI, Moscow (1964).
67. Chibisov, A. K., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 160: 1417 (1965).
68. Chibisov, A. K., A. V. Karyakin, and M. E. Zubrilina, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 161: 483 (1965).
69. Ash, O. K., W. S. Zeugg, and L. P. Vernon, Acta Chem. Scand., 15: 1629 (1961).
70. Bannister, T. T., Plant. Physiol., 34: 249 (1959).

УДК 581.132

ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА ФЕОФИТИНИЗАЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

Е. В. ПАКШИНА, М. И. БЫСТРОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Вопрос о действии света на реакцию замещения центрального атома магния в молекулах хлорофилла и его аналогов на водород нуждается в исследовании в связи с проблемой фотохимических окислительно-восстановительных превращений пигментов и выяснением природы образующихся фотопродуктов.

Один из нас [1] наблюдал побочное образование феофитина при реакции обратимого фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой в водном пиридине. Евстигнеев и Гаврилова [2] показали, что хлорофилл, восстановленный в толуоловом растворе фенилгидразином, при обратной реакции подвергается феофитинизации. Баннистер [3; 4], исследуя кинетику обратимого фотовосстановления хлорофилла в водном пиридине аскорбиновой кислотой, пришел к заключению, что восстановленный хлорофилл либо быстро окисляется в исходный пигмент под действием окислителя, либо, реагируя с ионами водорода, образует восстановленный феофитин, который медленно регенерирует в феофитин. В указанных работах описано образование феофитина из относительно устойчивых фотопродуктов, которые удается наблюдать путем измерения спектров поглощения.

О непосредственном действии света на реакцию феофитинизации в литературе имеются разноречивые указания. Иоргенсен и Кид [5], экспонируя коллоидные растворы хлорофилла на свету в присутствии двуокиси углерода, отмечали быстрое изменение окраски пигмента в желто-зеленый или коричнево-зеленый цвет, что связано, по их мнению, с более быстрым образованием феофитина на свету, чем в темноте. Рабинович в своей монографии [6] указал на неопубликованные опыты, в которых наблюдалось ускоряющее действие света на феофитинизацию хлорофилла в растворе при значениях pH>3. По данным Аронова и Маккинея [7], фотоокисление не стимулирует феофитинизацию. В работе Ламорта [8] имеется указание на то, что свет не ускоряет феофитинизацию в водно-бутаноловых растворах хлорофилла. Нами ранее [9; 10] исследовалось действие света на феофитинизацию хлорофилла и его аналогов в пиридиновых растворах, содержащих кислоту. Было установлено ускоряющее действие света на феофитинизацию хлорофиллов *a* и *b* и протохлорофилла. Названные пигменты феофитинизировались при освещении с одинаковой скоростью и сильно отличались друг от друга по скорости темновой феофитинизации. Было показано, что соединения, ингибирующие фотовосстановление хлорофилла (каротин, нафтацен, метиловый красный, сафранин, рибофлавин), ингибировали и фотофеофитинизацию. На основании перечисленных фактов было высказано предположение, что фотофеофитинизация следует механизму, отличному от темновой феофитинизации и связана с промежуточным фотовосстановлением хлорофилла.

В данной работе систематически изучалось действие света на реакцию феофитинизации растворов хлорофилла и его аналогов в пиридине и этиловом спирте; предполагалось выяснить связь исследуемой реакции с обратимым фотоокислением и фотовосстановлением хлорофилла.

МЕТОДИКА

Мы исследовали превращения пигментов — хлорофиллов *a* и *b*, протохлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина, получение и хроматографическая очистка которых описаны ранее [10]. За скоростью феофитинизации следили путем измерения спектров поглощения на регистрирующем спектрофотометре СФ-10. В случае, когда запись спектров обнаруживала четкое постоянство изобестических точек, можно было судить об отсутствии побочных, отличных от феофитинизации процессов. Требуемая кислотность спиртовых растворов пигментов создавалась добавлением соляной кислоты. Значения pH опытных растворов измеряли на потенциометре ЛП-58 со стеклянным электродом.

Во избежание побочного фотоокисления пигментов кислородом воздуха, действие света на феофитинизацию изучали в вакууме в трубках Тунберга со специальным отводом, из которого в реакционную смесь перед началом освещения вводили нужное количество соляной или щавелевой кислоты. Откачивание воздуха из трубки производили вакуумным масляным насосом при охлаждении реакционной смеси до —70°. Растворы освещались кинолампой 300 *вт* с конденсором (освещенность $\sim 10^5$ *эрг/*$/см^2 \cdot сек$) при температуре 22°.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Феофитинизация в растворах хлорофилла, содержащих аскорбиновую кислоту. Как уже указывалось выше, «красная» восстановленная форма хлорофилла *a*, образующаяся при освещении в системе пиридин — аскорбиновая кислота, легче феофитинизируется, чем исходный пигмент. Мы изучали влияние различного количества воды в пиридине на образование феофитина из «красной» восстановленной формы хлорофилла *a*. Количество аскорбиновой кислоты во всех опытах составляло 10^{-2} *M*.

Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что при содержании в пиридине меньше 1% воды из «красной» формы хлорофилла *a* регенерирует исходный пигмент [1] и практически не образуется феофитин. В случае 2—5% воды в пиридине в обратной реакции образуется феофитин в количестве, зависимом от содержания воды (*II*—*III*). При 10% воды в пиридине «красная» восстановленная форма хлорофилла практически полностью превращается в феофитин (*IV*). Можно думать, что стимулирующее действие воды на образование феофитина в указанных опытах связано с увеличением кислотности среды за счет возрастающей степени диссоциации аскорбиновой кислоты (10^{-2} *M*) в водно-пиридиновом растворе.

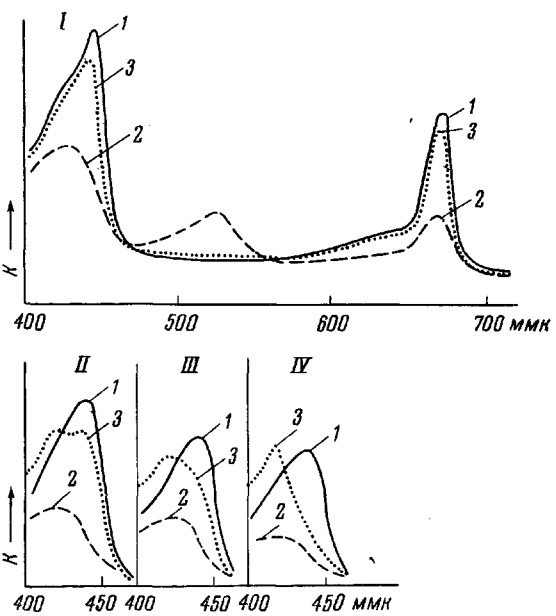


Рис. 1. Образование феофитина из хлорофилла *a* в пиридине с аскорбиновой кислотой (10^{-2} *M*) в присутствии 1% H_2O (*I*); 2% H_2O (*II*); 5% H_2O (*III*) и 10% H_2O (*IV*)

Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2* — после 1,5 мин. освещения красным светом (КС-11) в вакууме; *3* — после последующего стояния в темноте (1 час) в присутствии кислорода воздуха

Хлорофилл *b*, восстановленный в тех же условиях (пиридин-аскорбиновая кислота, 10^{-2} *M*) при обратной реакции также подвергается феофитинизации, при этом из восстановленной формы регенерирует только феофитин даже в случае минимального (меньше 1%) содержания воды в пиридине.

Мы наблюдали образование феофитина в системе хлорофилл — спирт — аскорбиновая кислота после освещения в анаэробных условиях

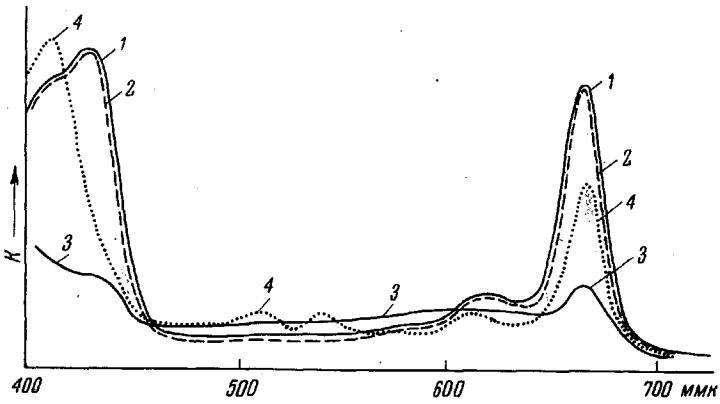


Рис. 2. Феофитинизация хлорофилла *a* в 90%-м спирте с аскорбиновой кислотой (10^{-2} *M*)

1 — исходный раствор; *2* — после 2,5 час. стояния в темноте; *3* — после 10 мин. освещения; *4* — после последующего стояния в темноте (4,5 часа) в присутствии кислорода воздуха

и последующего выдерживания в темноте в присутствии кислорода воздуха (рис. 2). За время, необходимое для образования феофитина со стоявшим в темноте (контрольным) раствором хлорофилла *a* в спирте с аскорбиновой кислотой, спектральных изменений не происходило (см. рис. 2). Фотопродукты, образующиеся в данных условиях под действием света, не имеют каких-либо характерных максимумов поглощения в видимой области спектра. Можно думать, что здесь мы имеем дело с фотохимическим образованием более глубоко восстановленной формы (лейкоформы) хлорофилла *a*, которая при обратной реакции образует феофитин, по всей вероятности, через промежуточное образование восстановленной формы этого пигмента. При добавлении в систему воды (10%) образование указанной формы и ее регенерация в феофитин протекают быстрее, чем в безводной системе.

В ацетоновом растворе хлорофилла *a* в аналогичных условиях так же, как и в спирте, происходит образование феофитина из неокрашенных продуктов фотовосстановления пигмента.

Таким образом, удалось установить, что в спиртовых и ацетоновых растворах хлорофилла *a*, содержащих аскорбиновую кислоту, при освещении в анаэробных условиях происходит накопление восстановленных форм пигмента, образующих феофитин при обратной реакции. Эти промежуточные соединения, так же как и «красная» восстановленная форма хлорофилла *a*, образующаяся в пиридине [1; 11], являются относительно устойчивыми, по всей вероятности, «протонизированными» восстановленными формами пигмента.

В связи с тем, что стабильные восстановленные формы феофитинизируются легче, чем исходный пигмент, можно считать, что изменения в молекуле хлорофилла, связанные с фотовосстановлением и конечным образованием названных форм, приводят к ослаблению связи центрального атома магния с азотом пиррольных колец.

Установив действие света на феофитинизацию, связанное с более быстрым образованием феофитина из стабильных «протонизированных»

фотовосстановленных форм хлорофилла, мы предприняли исследование систем, в которых до сих пор не удавалось обнаружить спектрально сколько-нибудь устойчивых продуктов фотовосстановления и где, как мы полагаем, феофитин образуется из лабильных промежуточных фотопродуктов.

Действие света на феофитинизацию хлорофилла и его аналогов в кислом спирте в присутствии гидрохинона и других доноров электрона. В предыдущей работе [9] мы наблюдали отчетливое действие света на образование феофитина в водно-пиридиновых растворах пигментов в присутствии соляной (1%) и щавелевой кислоты ($2 \cdot 10^{-2}$ *М*). Было показано, что хлорофиллы *а* и *b* и протохлорофилл при освещении в этих условиях менее, чем за 10 мин. наполовину превращаются в соответствующие феофитины, время же их темновой феофитинизации измеряется часами.

В пиридиновом растворе роль донора электрона в процессе фотофеофитинизации могла осуществлять молекула растворителя (пиридина). Так, например, по данным Арван и Глебовского [12], пиридин может восстанавливать при освещении в вакууме тиазиновые красители. В отличие от пиридиновых растворов в спиртовых и ацетоновых растворах пигментов, подкисленных соляной или щавелевой кислотой, скорость феофитинизации при освещении не отличалась от скорости феофитинизации в темноте.

Мы нашли условия, когда в этиловом спирте наблюдалось не менее отчетливое, чем в пиридине, ускоряющее действие света на процесс образования феофитина (таблица).

Время полупревращения пигментов в феофитин при освещении (*С*) и в темноте (*Т*) в спиртовых и пиридиновых растворах

Условия опытов	Кислота, *М*	Пигмент	Время в мин	
			Т	*С*
Пиридин + 10% H_2O + щавелевая кислота	$6 \cdot 10^{-3}$	Бактериовиридин	>60	13
	$2 \cdot 10^{-2}$	Хлорофилл *а*	180	12
	$2 \cdot 10^{-2}$	Протохлорофилл	600	10
	$2 \cdot 10^{-2}$	Хлорофилл *b*	1440	9
96%-й этиловый спирт + $+4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* гидрохинон + соляная кислота	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	Хлорофилл *а*	>120	18
	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$	Хлорофилл *b*	>240	70

Для обнаружения явления фотофеофитинизации в спиртовых растворах требовалось добавление экзогенного донора электрона. Мы использовали в этих опытах гидрохинон и пирокатехин. В присутствии же резорцина фотофенитинизация не наблюдалась. На рис. 3, *А* представлен процесс фотофеофитинизации хлорофилла *а* в этиловом спирте (pH 3,6) в присутствии $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* гидрохинона. На рис. 3, *Б* представлен процесс фотофеофитинизации хлорофилла *b* в этиловом спирте (pH 2,7) в присутствии $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* гидрохинона.

Обращает на себя внимание тот факт, что фотофеофитинизация хлорофилла в спирте с гидрохиноном происходит лишь в определенном интервале значений pH. В системе хлорофилл *а* — спирт — гидрохинон без кислоты фотофеофитинизации не происходит. При значениях pH 3,0—3,6 наблюдается фотофеофитинизация хлорофилла *а*. При значении pH 2,5 процесс феофитинизации хлорофилла *а* идет с одинаковой скорость в темноте и на свету (рис. 4).

На основании полученных результатов можно думать, что в спирте, как и в пиридине, при определенных значениях pH происходит образование феофитина из лабильных, короткоживущих, не обнаруживаемых спектрально фотопродуктов наряду с темновой феофитинизацией, проте-

кающей независимо от действия света. В условиях большой концентрации водородных ионов скорость образования феофитина по обычному, «темновому» механизму превышает скорость фотофеофитинизации, поэтому и ускоряющее действие света не удается наблюдать.

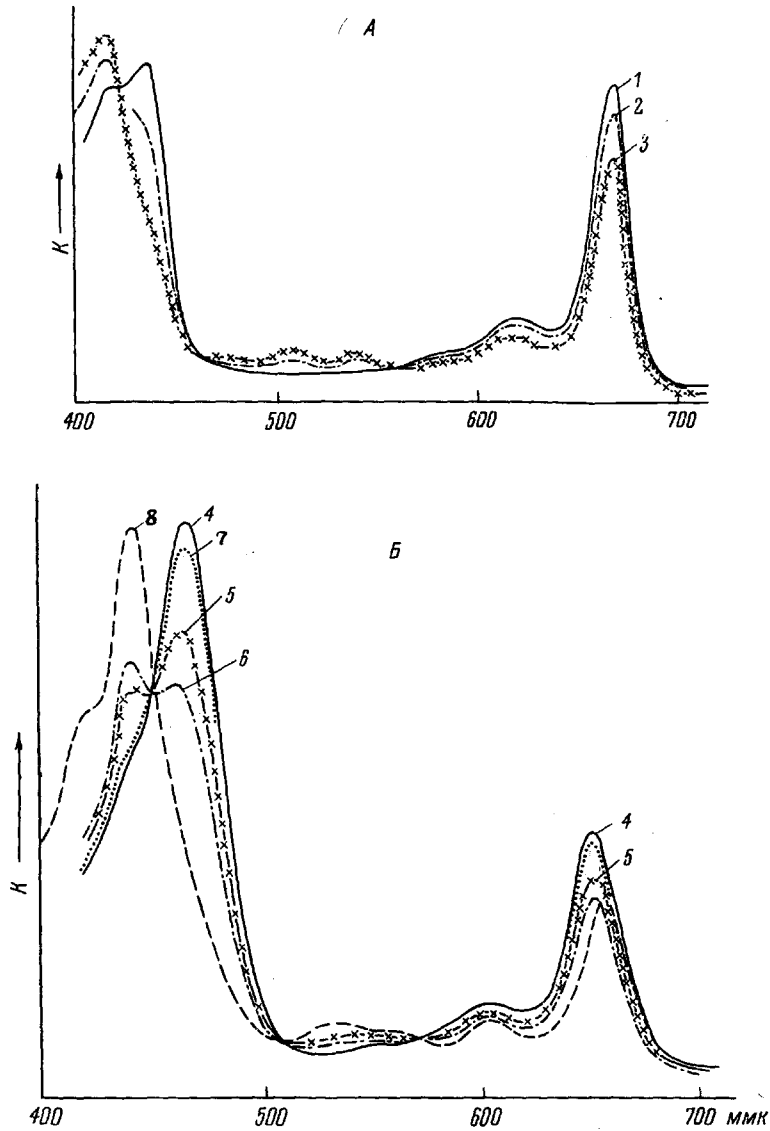


Рис. 3. Действие света на феофитинизацию хлорофилла *a* в 96%-м этиловом спирте, pH 3,6 (*А*) и хлорофилла *b*, pH 2,7 (*Б*) в присутствии $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* гидрохинона

1 — спектр поглощения исходного пигмента и после 45 мин. темноты; *2* — после 15 мин. освещения; *3* — после 30 мин. освещения; *4* — спектр поглощения исходного пигмента; *5* — после 50 мин. освещения; *6* — после 90 мин. освещения; *7* — после 1,5 час. стояния в темноте; *8* — спектр поглощения феофитина *в*

В отличие от хлорофилла, освещение спиртовых растворов бактериохлорофилла и бактериовиридина в присутствии гидрохинона при разных значениях pH не приводило к заметному ускорению процесса феофитинизации. Очевидно, в данных условиях гидрохинон не является для этих пигментов подходящим донором электрона. Это согласуется с данными нашей лаборатории о различии фотосенсибилизации хлорофиллом и

бактериохлорофиллом окислительно-восстановительных реакций [13] и о фотосенсибилизированных превращениях пигментных пар [14], позволивших установить более низкий восстановительный потенциал у первичной восстановленной формы бактериохлорофилла и бактериовиридина по сравнению с хлорофиллом.

В случае протохлорофилла как в присутствии гидрохинона (рис. 5), так и в кислом спирте без добавок экзогенных доноров электрона при освещении наблюдалась не вполне ясная картина спектральных изменений пигмента. В красной части спектра изменения соответствуют феофитинизации пигмента; в синей — наблюдается падение поглощения и при 438 *ммк* (максимум поглощения протохлорофилла), и при 424 *ммк* (максимум поглощения протофеофитина), причем соотношение этих двух максимумов изменяется в пользу протофеофитина. Если бы на свету из протохлорофилла образовывался только протофеофитин, то пропорционально падению поглощения при 438 *ммк* наблюдалось бы увеличение поглощения при 424 *ммк*, что и имело место в системе протохлорофилл — пиридин — щавелевая кислота [10]. Можно думать, что в спиртовом растворе фотофеофитинизация протохлорофилла, в отличие от хлорофилла, идущая и без гидрохинона, сопровождается иными деструктивными изменениями пигмента.

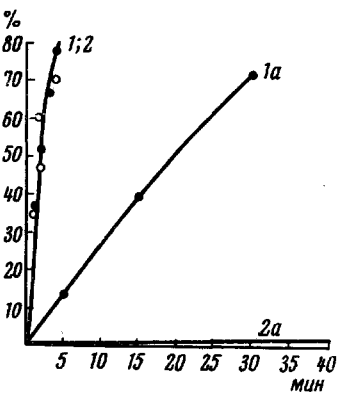


Рис. 4. Скорость феофитинизации хлорофилла *а* в 96%-м этиловом спирте в присутствии $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* гидрохинона при разных значениях pH

pH 2,5: *1* — при освещении; *2* — в темноте. pH 3,6: *1а* — при освещении; *2а* — в темноте

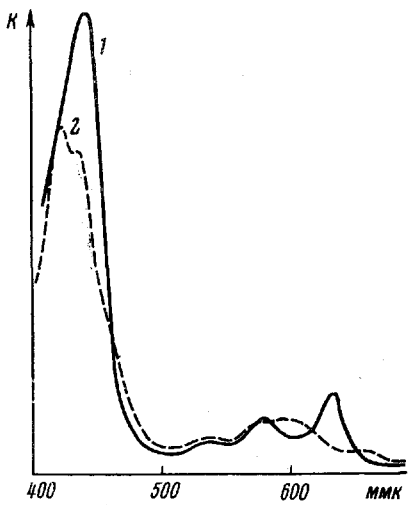


Рис. 5. Изменение спектра поглощения раствора протохлорофилла в 96%-м этиловом спирте в присутствии $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* гидрохинона, pH 3,6

1 — исходный и после 30 мин. стояния в темноте; *2* — после 30 мин. освещения

Ингибирующее действие метилового красного на фотофеофитинизацию хлорофилла в спирте. Ранее [10] было показано, что вещества, ингибирующие фотовосстановление (β-каротин, тетрацен, метиловый красный, сафранин, рибофлавин), ингибируют и фотофеофитинизацию в пиридине, содержащем кислоту. Это рассматривалось как подтверждение предположения о том, что фотофеофитинизация в указанных системах связана с образованием лабильных промежуточных продуктов восстановления и их превращением в феофитин. Предполагая тождественность механизмов фотофеофитинизации в спирте и пиридине, мы испытали действие метилового красного на световую феофитинизацию хлорофилла *а* в спиртовом растворе. Так как этот краситель поглощает в синей области спектра, то введение его в систему исключало возможность измерения скорости процесса по поглощению в «синем» максимуме хлорофилла. Поэтому в данном случае измерения проводились по «красному» максимуму. Для измерения поглощения в синей области спектра мы после экспозиции переводили пигмент из спирта в серный эфир, вымывая водой метиловый красный. Аналогичная процедура проводилась с контрольным раствором, где хло-

рофилл феофитинизировался в отсутствие ингибитора. Из рис. 6 видно, что метиловый красный в концентрации 10^{-4} *M* ингибирует фотофеотинизацию хлорофилла *a* в спирте. В специальных опытах было показано, что метиловый красный совершенно не влияет на скорость темновой феофитинизации хлорофилла *a* в тех же условиях.

О механизме ингибирования можно высказать следующее предположение: либо метиловый красный, реагируя с фотовосстановленными формами, препятствует их накоплению, либо происходит конкурентное взаимодействие метилового красного с возбужденным хлорофиллом [15], ведущее к обратимому окислению, и тем самым препятствующее включению возбужденного пигмента в процесс фотовосстановления, приводящий к феофитинизации.

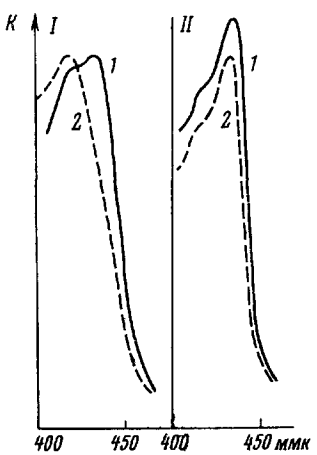


Рис 6 Действие метилового красного на фотофеофитинизацию хлорофилла *a* в 96%-м этиловом спирте, pH 3,6 в присутствии $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *M* гидрохинона

I — контроль, без метилового красного. Спектры поглощения *1* — исходного пигмента, *2* — после 45 мин освещения *II* — в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ *M* метилового красного Спектры поглощения эфирных элюатов *1* — после 45 мин темноты, *2* — после 45 мин освещения

О связи феофитинизации и фотоокисления пигментов. Как уже указывалось выше, опыты по выяснению действия света на феофитинизацию мы проводили в отсутствие воздуха, чтобы избежать окислительного разрушения пигментов. Вместе с тем следовало выяснить, действует ли необратимое окислительное разрушение пигментов на прочность связи магния с азотом в молекуле пигмента и не является ли феофитин одним из продуктов такого разрушения.

Мы исследовали этот вопрос на двух пигментах: хлорофилле *b* — наиболее устойчивом к окислению из всех исследуемых пигментов и бактериовиридине — самом неустойчивом. Водноацетоновые растворы хлорофилла *b* освещали в присутствии воздуха; по мере фотоокисления измеряли спектры поглощения; затем пигмент переводили в серный эфир и хроматографировали на бумаге. В спектре продукта окисления в ацетоновом растворе обнаруживается подъем поглощения в области 500—560 *ммк*, но без характерных для феофитина максимумов при 505 и 535 *ммк*. Выцветают основные максимумы поглощения («красный» и «синий»), «плечо» при 440 *ммк* по мере окисления становится более выраженным. Если реакция фотоокисления проходила до конца, то на хроматограмме обнаруживалась одна зона фиолетового цвета в месте нанесения пигмента; если не полностью,— то наблюдалась также вторая зона, расположенная выше непрореагировавшего хлорофилла *b*. Феофитин при этом не обнаруживался. Аналогичную картину наблюдали и при фотоокислении водноацетонового раствора хлорофилла *b* в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ *M* щавелевой кислоты. В темновом контроле за время опыта не происходило никаких спектральных изменений. При освещении в присутствии щавелевой кислоты и без нее отмечаются одни и те же спектральные изменения. При длительном стоянии в темноте (>12 час.) полностью феофитинизировались как неосвещенный, так и оставшийся после фотоокисления хлорофилл. Очевидно, взятое количество щавелевой кислоты вполне достаточно для полной феофитинизации хлорофилла *b*, и фотоокисление не ускоряет этого процесса.

Феофитин не был обнаружен и в продуктах фотоокисления бактериовиридина при освещении его в водноацетоновом растворе с последующей хроматографией на бумаге. Было отмечено, что продукт фотоокисления бактериовиридина в серном эфире имеет отчетливый максимум

поглощения при 855 *ммк*. Таким образом, ни при фотоокислении хлорофилла *в*, ни при фотоокислении бактериовиридина не отмечалось образования феофитина. Это согласуется с данными Маккинея и Аронова [7], по наблюдению которых феофитинизация зависит лишь от наличия кислоты и не зависит от освещения и присутствия воздуха.

Если феофитин при освещении образуется только из лабильных продуктов фотовосстановления, и фотофеофитинизация является как бы

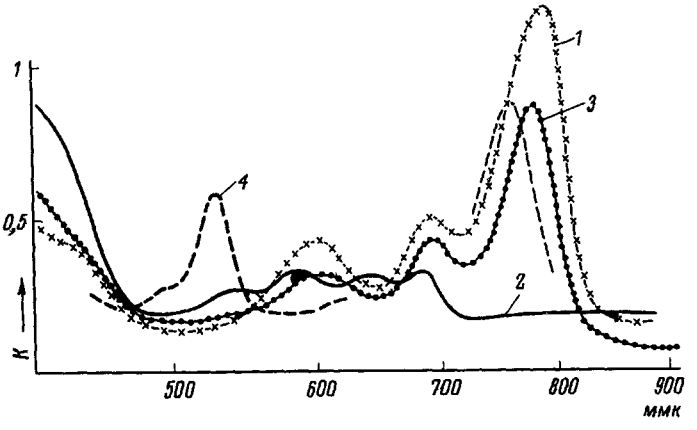


Рис. 7. Спектральные изменения бактериохлорофилла при реакции обратимого фотоокисления в 96%-м этиловом спирте, pH 3,6

Спектры поглощения: *1* — исходного пигмента; *2* — после 45 сек. освещения в присутствии кислорода воздуха; *3* — после прибавления 20 *мг* аскорбиновой кислоты и 15 мин. стояния в темноте; *4* — спектр поглощения бактериофеофитина

индикатором обратимых восстановительных превращений, то возникает вопрос, не теряют ли так же легко магний и продукты обратимого фотоокисления хлорофилла? Мы исследовали возможность образования феофитина из продуктов описанного ранее [16; 17] обратимого фотоокисления хлорофилла *а* в кислом спирте (pH 3,6) с хиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ *M* при —70°). Существенно то, что спектр пигмента, регенерировавшего из продукта окисления, идентичен спектру исходного раствора и не обнаруживает появления феофитина.

Известно, что раствор бактериохлорофилла в спирте при освещении в присутствии воздуха быстро выцветает. Добавление в качестве восстановителя аскорбиновой кислоты вызывает регенерацию исходного пигмента [18]. Мы изучали эту реакцию в спирте при различных значениях pH: 7; 3,6; 2,5. Во всех случаях наблюдались спектральные изменения, представленные на рис. 7, т. е. при добавлении аскорбиновой кислоты к продуктам окисления бактериохлорофилла регенерирует исходный пигмент и совсем не образуется бактериофеофитин. Таким образом, в реакциях обратимого окисления хлорофилла и бактериохлорофилла нам не удалось наблюдать феофитинизации окисленных форм, тогда как продукты фотовосстановления и стабильные, и промежуточные, легко теряют магний.

Действие света на феофитинизацию хлорофилла и его аналогов в пленках и адсорбатах. В пленках или адсорбатах пигментов на бумаге, погруженных в водный раствор кислоты, трудно было ожидать образования лабильных фотопродуктов пигмента, что, по нашему мнению, имело место в пиридиновых растворах в результате взаимодействия возбужденных молекул пигмента с молекулами растворителя. В связи с этим в данных моделях можно было исследовать действие света на реакцию замещения магния на водород, когда эта реакция не связана

с другими, отличными от феофитинизации превращениями пигментов. Пигменты адсорбировали на кругах фильтровальной бумаги, погружая их в концентрированные растворы пигмента в эфире. Равномерно окрашенные круги разрезали на равные секторы. Последние опускали в трубку Тунберга с кислотой. В одних опытах реакция феофитинизации проводилась в темноте, в других — при освещении красным светом. По истечении времени экспозиции сектор фильтровальной бумаги с адсорбированным на нем пигментом вынимали, промывали водой, пигмент элюировали определенным объемом ацетона и измеряли спектр поглощения на спектрофотометре СФ-10. Данная серия опытов показала, что свет не ускоряет феофитинизацию адсорбированных на бумаге пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, бактериовиридин). В случае протохлорофилла было отмечено, что после освещения в элюате обнаруживается протофеофитина меньше, чем в темновом контроле. Специальные опыты показали, что это объясняется фотохимическим разрушением образующегося безмагниевого пигмента. Подобного эффекта не было замечено с другими пигментами. Это явление представляет самостоятельный интерес в плане сравнительного исследования фотохимических свойств хлорофилла и его аналогов в различных состояниях. Мы также не обнаружили ускоряющего действия света на феофитинизацию бактериовиридина в пленках, погруженных в водный раствор кислоты.

Итак, изучение действия света на процесс образования феофитина позволило получить две основные группы результатов.

1. Образование феофитина из долгоживущих продуктов фотовосстановления. Указанный процесс происходит в системах хлорофилл — пиридин — аскорбиновая кислота [1; 3; 4]; хлорофилл — спирт — аскорбиновая кислота; хлорофилл — ацетон — аскорбиновая кислота после освещения и последующего выдерживания в темноте в присутствии кислорода воздуха. Роль донора электрона (водорода) при фотореакциях в таких системах играет аскорбиновая кислота. Продукты фотовосстановления хлорофилла в спирте и ацетоне отличаются от образующейся в пиридине «красной» восстановленной формы пигмента отсутствием каких-либо характерных максимумов поглощения в видимой области спектра, и, возможно, являются продуктами более глубокого восстановления пигмента. В обратной реакции указанные продукты регенерируют в феофитин. «Красная» восстановленная форма хлорофилла в пиридине в отсутствие воды полностью превращается в исходный пигмент при обратной реакции. В присутствии воды, способствующей диссоциации аскорбиновой кислоты и созданию определенной концентрации водородных ионов, «красная» восстановленная форма частично регенерирует в феофитин. Увеличение количества воды в системе приводит к полному превращению «красной» восстановленной формы в феофитин за счет возрастания концентрации водородных ионов.

2. Образование феофитина из лабильных, промежуточных фотопродуктов происходит при освещении пиридиновых растворов пигмента в присутствии соляной кислоты. Можно предположить, что при фотореакции в таких системах роль электронных доноров играют сами молекулы пиридина. В спиртовом растворе фотофеофитинизация проходит лишь в присутствии гидрохинона, который, очевидно, является донором электрона. В этой связи заслуживает упоминания работа [19], в которой методом электронного парамагнитного резонанса показано наличие обратимых фотореакций переноса электронов между хлорофиллом и гидрохиноном в спиртовом растворе, где хлорофилл в возбужденном состоянии играл роль окисляющего агента, а гидрохинон — восстановителя. Следует считать, что в исследуемой нами системе феофитин накапливался при освещении, образуясь из лабильных продуктов фотовосстановления хлорофилла, имеющих природу свободных радикалов.

Можно предположить, что наличие «лишнего» электрона в молекуле первичного продукта фотовосстановления ($\cdot X^-$) приводит к лабилизации связи магния в молекуле пигмента, тогда как наличие электронной вакансии в системе сопряженных связей первичных продуктов фотоокисления ($\cdot X^+$) не приводит к этому эффекту.

ВЫВОДЫ

В растворах хлорофилла и его аналогов в присутствии доноров электрона наблюдается фотофеофитинизация, связанная с промежуточным фотовосстановлением молекул пигмента.

В растворах хлорофилла и его аналогов в присутствии акцепторов электрона в условиях, благоприятствующих обратимому фотоокислению, не удается наблюдать фотофеофитинизацию. Высказывается предположение, что в промежуточных продуктах фотовосстановления хлорофилла, в отличие от продуктов фотоокисления, лабилизируется связь центрального атома магния с атомами азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Докл. АН СССР **60**, 421, 1948
2. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **91**, 899, 1953
3. Bannister T. T., Plant Physiol. **34**, 246, 1959
4. Bannister T. T., Photochemistry in the Liquid and Solid State, J. Wiley a. Sons, N. Y.—L., 1960
5. Jorgensen J., Kidd F., Proc. Roy. Soc. B89, 342, 1916
6. Рабинович Е., Фотосинтез, т. 1, стр. 498 ИЛ, М., 1951
7. Aronoff S., Mackinney G., J. Amer. Chem. Soc **65**, 956, 1943
8. Lamort C., Rev. ferment. et inds aliment. **2**, 34, 1956
9. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **148**, 935, 1963
10. Пакшина Е. В., Красновский А. А., Биохимия **29**, 1132, 1964
11. Красновский А. А., Успехи химии **29**, 736, 1960
12. Арван Х. Л., Глебовский Д. Н., Ж. физ. хим. **35**, 12, 1961
13. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР **87**, 109, 1952
14. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **141**, 477, 1961
15. Евстигнеев В. Б., Биофизика 8, 664, 1963
16. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР **150**, 1378, 1963; **153**, 721, 1963
17. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **165**, 1435, 1965
18. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл АН СССР **81**, 879, 1951
19. Banerjee, Tollin G., Photochem. and Photobiol. **5**, 315, 1966

Поступила в редакцию
26.VIII 1966

THE INFLUENCE OF LIGHT ON PHEOPHYTINIZATION OF CHLOROPHYLL AND ITS ANALOGS

E. V. PAKSHINA, M. I. BYSTROVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

In solutions of chlorophyll and analogs when electron donors are present the photopheophytinization is observed due to transient photoreduction of pigment molecules. In chlorophyll solutions when electron acceptors are present in conditions favorable to reversible photooxydation no photopheophytinization proceeds. It is proposed that in photoreduced chlorophyll intermediates the bond between magnesium and nitrogen atoms is labilized; the phenomenon is not seen in the case of photooxydized chlorophyll intermediates.

Доклады Академии наук СССР
1969. Том 189, № 2

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Л. М. ВОРОБЬЕВА, член-корреспондент АН СССР, А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЗАГРЕГАЦИЯ ДЛИННОВОЛНОВЫХ ФОРМ ФЕОФИТИНА

Представление о наличии в листьях форм хлорофилла, различающихся степенью агрегации молекул пигмента, предполагает подвижное равновесие между этими формами в зависимости от условий ([1,2]). Результаты ряда работ указывают на возможность дезагрегации длинноволновых форм хлорофилла при освещении ([3–5]). В нашей лаборатории методом измерения спектров флуоресценции была обнаружена необратимая фотодезагрегация хлорофилла в зеленых листьях в результате освещения их в вакууме ([6]). Описана дезагрегация хлорофилла при нагревании хлоропластов, целых листьев, а также твердых пленок пигмента ([7–10]). Данная работа посвящена изучению дезагрегации длинноволновых форм феофитина a и b в водных растворителях под действием света и нагревания.

Феофитины a и b получали по Фишеру с последующей хроматографией. Ацетон (Reanal) перегоняли, диоксан очищали от перекисей ([4]). Водно-ацетоновые или диоскановые растворы получали смешением раствора феофитина в растворителе с дистиллированной водой в соотношении 3 : 2. Откачивание воздуха производили вакуумным масляным насосом при охлаждении до —40° и взбалтывании. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-10, флуоресценцию на спектрофлуорометре. Освещение — киноламповой 750 вт с конденсором без светофильтра ($3{,}5 \cdot 10^6$ эрг/см^2 · сек) или через светофильтры КС-11 и КС-19, выделяющие соответственно области спектра длиннее 600 мμ ($2{,}5 \cdot 10^6$ эрг/см^2 · сек) и длиннее 700 мμ ($2 \cdot 10^6$ эрг/см^2 · сек). При освещении образец помещали в термостатируемый сосуд, перед которым находился водяной фильтр толщиной 5 см. Освещение — при температуре на 1,5° ниже, чем при измерении. Все измерения на спектральных приборах осуществляли в стеклянном сосуде Дьюара, содержащем воду постоянной температуры. Пигменты из растворов до и после освещения переводили в серный эфир и разделяли при помощи тонкослойной хроматографии на целлюлозе.

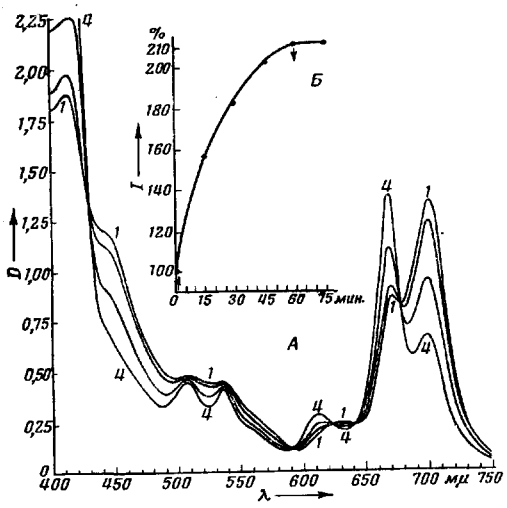


Рис. 1. Фотодезагрегация феофитина a в 65% ацетоне в присутствии воздуха под влиянием света $\lambda > 700$ мμ. *А* — изменения в спектре поглощения: *1* — исходный раствор, *2* — 1 мин., *3* — 15 мин., *4* — 1 час освещения при 18°; *Б* — изменение интенсивности флуоресценции в главном красном максимуме в результате освещения при 20° (↓ — выключение света)

В спектрах поглощения растворов феофитина a и b в 60—65% ацетоне и диоксане наблюдаются мономерная и агрегированная формы пигмента; главные максимумы мономера феофитина a — при 415 и 667—670 мμ, агрегированной формы — при 445 и 698—700 мμ ([11]). В случае феофитина b эти максимумы расположены

соответственно при 438; 656 и 480; 680 мμ. Положение максимумов было одинаковым в случае применения ацетона и диоксана. Так как в водно-ацетоновых растворах при комнатной температуре флуоресцирует только мономер феофитина ([11]), добавление к раствору пигмента в ацетоне 40% воды сопровождалось ослаблением флуоресценции без изменения положения максимума, расположенного для феофитина a около 674 мμ.

Освещение растворов феофитина a или b, содержащих около 60% диоксана или ацетона, при 20° в присутствии воздуха вызывало изменения в спектре поглощения, свидетельствующие о дезагрегации длинноволновых форм (рис. 1). При действии света $\lambda > 700$ мμ наблюдалось понижение в области главных максимумов агрегированной формы и возрастание поглощения мономера, сопровождающееся сдвигом «красного» максимума на 2—3 мμ в коротковолновую сторону по сравнению с исходным. В зеленой части спектра и в области 590—650 мμ также происходили изменения, свидетельствующие о дезагрегации пигмента. Наблюдаемые изменения оптической плотности обладали характерными изобестическими точками, свидетельствующими о прямом переходе одной формы пигмента в другую. Изменения в спектрах поглощения, вызываемые светом, были необратимыми в темноте. Фотоокислительное разрушение пигмента на свету не превышало 6—8% за час освещения. Реакцию можно было наблюдать при освещении белым светом; в этом случае скорость процесса была намного выше. Освещение водно-ацетоновых растворов феофитина a вызывало постепенное возрастание флуоресценции, необратимое в темноте (рис. 1).

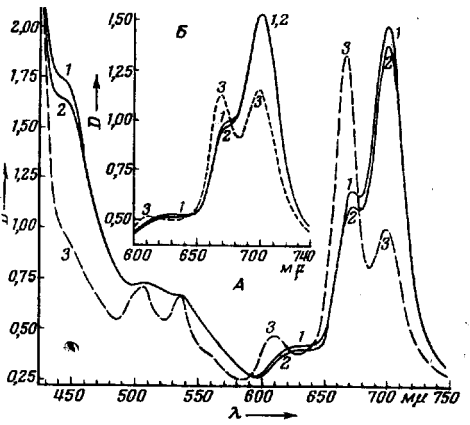


Рис. 2. Фотодезагрегация феофитина a в 65% ацетоне в результате освещения при низкой температуре в присутствии воздуха (*А*) и при 18° в отсутствие воздуха (*Б*) светом $\lambda > 700$ мμ. *А*: *1* — исходный раствор при 20°; *2* — после 15 мин. при —40°, 15 мин. при 20°; *3* — после 10 мин. при —40°, 30 мин. освещения при —40° и 15 мин. темноты при 20°. *Б*: *1* — исходный раствор без воздуха; *2* — после 30 мин. освещения и после пуска воздуха; *3* — после 30 мин. освещения с воздухом

В том случае, когда измерения производили при 20°, а освещение раствора при —40°, величина происходящей фотодезагрегации не отличалась существенно от эффекта при 20° (рис. 2). Неожиданным оказалось то, что освещение растворов феофитина a или b в отсутствие воздуха не вызывало заметных спектральных изменений, тогда как после пуска воздуха и последующего освещения происходила фотодезагрегация (рис. 2).

Восстановители — гидрохинон, аскорбиновая кислота и аскорбинат натрия — не блокировали фотодезагрегации в том случае, если освещение производили в присутствии воздуха светом $\lambda > 700$ мμ, поглощаемым агрегированной формой феофитина. При освещении на воздухе в присутствии аскорбиновой кислоты светом, поглощаемым обеими формами пигмента, наблюдалась не фотодезагрегация, а быстрое падение поглощения агрегированной и мономерной форм и небольшое возрастание поглощения в средней части спектра, без ясно выраженного максимума. Наблюдаемые спектральные изменения, по-видимому, объясняются фотовосстановлением феофитина. Можно предполагать, что в этих опытах происходит фотодезагрегация длинноволновой формы феофитина, но мономер немедленно вступает в реакцию с аскорбиновой кислотой, так как при последовательном освещении вначале светом $\lambda > 700$ мμ, а затем коротковолновым красным или белым, мы наблюдали последовательно фотодезагрегацию, а затем быстрое фотовосстановление мономера. В темноте наблюдалась обратная ре-

акция: мономерный максимум возрастал, поглощение в средней части спектра понижалось, однако обратимого образования агрегированной формы 700 мμ не происходило.

Освещение водно-ацетоновых растворов феофитина а в присутствии аскорбиновой кислоты в вакууме светом $\lambda > 700$ мμ вызывало частичное понижение поглощения в обоих максимумах, 667 и 700 мμ. После выключения света в присутствии кислорода наблюдалась обратная реакция, в результате которой происходило увеличение оптической плотности в максимумах мономерной и агрегированной форм.

При освещении в вакууме феофитина а в безводном ацетоне в присутствии аскорбиновой кислоты светом $\lambda > 600$ мμ наблюдали неглубокое (до 10% за 5 мин.) обратимое фотовосстановление. Освещение на воздухе вызывало быстрое падение красного максимума поглощения (на 35% за 5 мин.), причем обратимость реакции в темноте была невелика. Наблюдаемые быстрые изменения поглощения, по-видимому, следует приписать фотовосстановлению, так как они не наблюдались в отсутствие аскорбиновой кислоты.

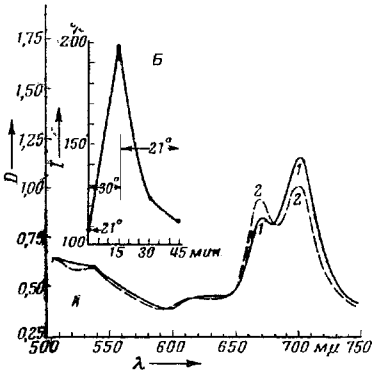


Рис. 3. Дезагрегация феофитина а в 65% ацетоне при нагревании. *А* — изменения в спектре поглощения: *1* — исходный раствор при 23° и после 15 мин. охлаждения до 23°, *2* — после 15 мин. нагревания до 30°; *Б* — изменение интенсивности флуоресценции в главном красном максимуме

При нагревании от 20 до 35° растворов феофитина, содержащих около 60% ацетона, наблюдали дезагрегацию длинноволновых форм пигмента, выражающуюся в возрастании мономерного и падении агрегированного максимумов поглощения ([11]). При понижении температуры до исходной величины процесс был полностью обратимым ([10]). Тепловая дезагрегация пигмента сопровождалась возрастанием флуоресценции, полностью обратимым при возвращении к исходной температуре (рис. 3).

Мы исследовали идентичность феофитина, образованного при световой дезагрегации, исходному пигменту. При хроматографировании пигмента из раствора до освещения была обнаружена только одна флуоресцирующая зона. После фотодезагрегации, помимо небольшой флуоресценции в месте нанесения испытуемого раствора, обусловленной, по-видимому, продуктами распада, обнаружено две флуоресцирующие зоны, одна из которых совпадала по положению с флуоресценцией исходного пигмента. Величина и интенсивность флуоресценции этой зоны заметно уменьшались после длительного освещения, в то время как флуоресценция второй зоны по мере освещения возрастала. При фотодезагрегации феофитина а светом $\lambda > 700$ мμ в присутствии аскорбиновой кислоты также обнаруживались две флуоресцирующие зоны пигмента, по положению совпадающие с зонами, наблюдаемыми в отсутствие аскорбиновой кислоты.

Освещение феофитина а в безводном ацетоне и серном эфире не приводит к значительной фотодеструкции. Однако при хроматографировании пигментов из этих растворов после 30 мин. освещения светом $\lambda > 600$ мμ часть пигмента была обнаружена в зоне измененного пигмента, по положению совпадающей с зоной продукта фотодезагрегации феофитина а в водно-ацетоновых растворах. Спектры поглощения продукта измененного феофитина в ацетоне и серном эфире не отличались от исходного пигмента.

Описанная фотодезагрегация длинноволновых форм феофитина не является тривиальным фотоокислением пигмента, так как протекает в восстановительной среде, и не сопровождается значительной деструкцией пигмента. Следует отвергнуть также предположение о локальном нагревании частиц агрегированного феофитина при освещении, так как в отсут-

ствие кислорода свет не действовал. Нагревание образца приводило к дезагрегации длинноволновых форм, полностью обратимой при охлаждении раствора, тогда как фотодезагрегация происходила при —40 и +20° приблизительно с одинаковой скоростью.

Освещение в присутствии воздуха приводит к изменению состояния молекул феофитина, в результате которого они не могут обратимо агрегировать в «темноте». Так как процесс идет без воздуха, можно предполагать образование на свету мономерных молекул феофитина, связанных с кислородом. Обнаружение измененного продукта в результате освещения феофитина в водном и безводном ацетоне, а также серном эфире подтверждает это предположение. По-видимому, свет вызывает достаточно прочное присоединение кислорода к молекуле феофитина, не приводящее к существенному изменению спектра поглощения и фотодеструкции, но изменяющее фотохимические возможности молекулы пигмента. Пока не ясно место присоединения кислорода, им могут быть атомы азота пиррольных колец, циклопентаноновое кольцо и система сопряженных двойных связей.

Исследованное явление может рассматриваться в качестве модели обнаруженной ранее необратимой фотодезагрегации хлорофилла в листьях ([6]). Вследствие быстрого фотоокисления мономера хлорофилла пока не удается обнаружить промежуточной стадии фотодезагрегации в модельных системах; устойчивость феофитина к деструктивному фотоокислению определила возможность изучения фотодезагрегации в описанной системе.

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

Поступило
25 VII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 91, 343 (1953). [2] А. А. Красновский, Проблемы фотосинтеза, М., 1959, стр. 30. [3] J. S. Brown, C. S. French, Plant Physiol., 34, 305 (1959). [4] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биофизика, 12, 240 (1967). [5] A. A. Shlyk, L. I. Fradkin et al., Photosyntetica, 1, 241 (1967). [6] Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, 183, 711 (1968). [7] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 340 (1953). [8] Т. Н. Годнев, Н. К. Акулович, ДАН, 120, 1307 (1958). [9] Т. Н. Годнев, Я. П. Ляхнович, Физиолого-биохимическое исследование растений, Минск, 1968, стр. 15. [10] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 1, 362 (1967). [11] Г. П. Гуринович, Т. И. Стрелкова, Биофизика, 8, 172 (1963).

Доклады Академии наук СССР
1969. Том 189, № 4

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
М. И. БЫСТРОВА, И. Н. МАЛЬГОШЕВА

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИОВИРИДИНА ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ В ИНФРАКРАСНОЙ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ

Пигмент зеленых серных бактерий — бактериовиридин в фотосинтезирующих клетках обладает характерной полосой поглощения в крайней красной области спектра ([1], [2]); в водных коллоидных растворах и твердых пленках бактериовиридин образует агрегированные формы, близкие по спектрам поглощения и люминесценции к агрегированным формам в зеленых серных бактериях ([3-8]). Агрегация бактериовиридина наблюдалась также в неполярных растворителях ([9]).

С целью получения данных о молекулярной организации агрегированных форм бактериовиридина и его безмагниевого аналога мы изучали структуру спектров поглощения пигментов в видимой и и.-к. области под влиянием различных воздействий.

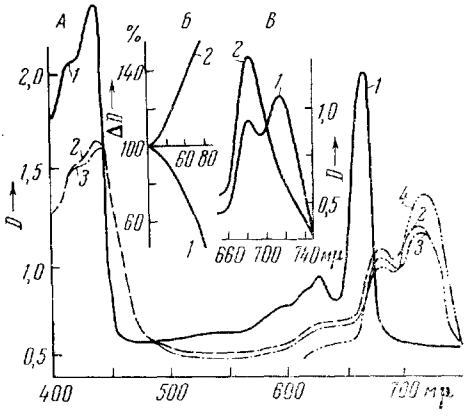


Рис. 1

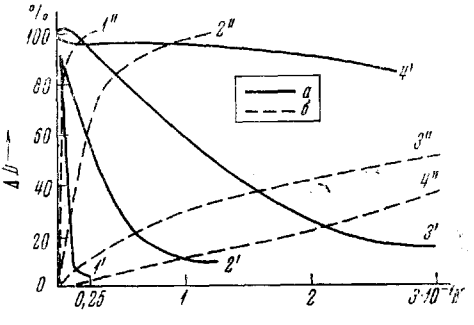


Рис. 2

Рис. 1. Агрегация и дезагрегация бактериовиридина в четыреххлористом углероде. *А* — спектры поглощения: *1* — $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М* раствор в серном эфире, *2* — $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М* раствор в CCl_4, *3* — то же после откачивания воздуха, *4* — 10^{-3} *М* раствор в CCl_4 без откачивания; *Б* — влияние нагревания: *1* — 712, *2* — 680 мμ; *В* — раствор в CCl_4: *1* — 20°, *2* — 75°

Рис. 2. Изменения оптической плотности при 712 мμ (*а*) и 670 мμ (*б*) растворов бактериовиридина в CCl_4 в присутствии возрастающих количеств растворителей: пиридина (*1*), метанола (*2*), ацетона (*3*) и серного эфира (*4*)

Бактериовиридин выделяли из осажденных центрифугированием клеток Chloropseudomonas ethylica путем экстрагирования ацетоном, перевода пигментов в серный эфир, последующего испарения эфира и промывания сухого пигментного остатка петролейным эфиром до полного удаления каротиноидов и феофитина (см. рис. 1 *А*, *1*). Феофитин получали обработкой эфирного раствора бактериовиридина 0,2 *N* HCl с последующим промыванием водой. В опытах использовали свежеперегнанный CCl_4; при перегонке отбрасывали начальные фракции, которые могли содержать примесь воды. Видимые и и.-к. спектры измеряли на регистрирующих спектрофотометрах СФ-10 и UR-10.

Спектры поглощения в видимой области. Раствор бактериовиридина в CCl_4 ($1{,}5 \cdot 10^{-5}$ *M*) имеет характерный спектр поглощения (рис. 1 *A*, *2*) с максимумами в красной области около 680 и 710—715 мμ в соответствии с измерениями в толуоле ([9]). Эти максимумы могут быть приписаны димерам (П-680) и агрегатам с большей степенью полимеризации, возможно микрокристаллам пигмента (П-712), по аналогии с трактовкой спектров агрегированных форм хлорофилла а ([10]). Увеличение концентрации бактериовиридина до 10^{-3} *M* ведет к увеличению длинноволнового максимума, сдвигая его в дальнюю красную область спектра (рис. 1 *A*, *4*). Откачивание воздуха из раствора в CCl_4 не изменяет существенно спектров поглощения бактериовиридина (рис. 1 *A*, *3*), в отличие от хлорофилла а в толуоле ([9]). Введение паров воды при 20° также не вызывает значительных изменений. Только длительное встряхивание раствора с жидкой водой приводит к частичной дезагрегации П-712, сопровождающейся появлением коротковолнового максимума 670 мμ. Таким образом, связь между молекулами бактериовиридина в агрегате сильнее, чем у хлорофилла а.

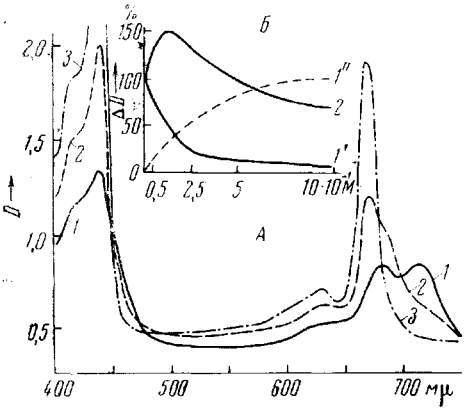


Рис. 3. Действие ацетона на агрегацию бактериовиридина в CCl_4. *А* — спектры поглощения исходного (*1*) раствора в присутствии 0,1 *M* (*2*) и 1 *M* (*3*) ацетона; *Б* — изменения оптической плотности при 712 (*1'*), 670 (*1''*), 680 мμ (*2*) в присутствии возрастающих количеств ацетона

Действие температуры. Нагревание от 20 до 75° приводит к постепенному уменьшению длинноволнового максимума, сопровождающемуся возрастанием поглощения при 680 мμ (рис. 1 *Б*, *В*). Это свидетельствует о диссоциации П-712 в CCl_4 с образованием более термостойких димеров. Действие нагревания обратимо; охлаждение до +20° после нагревания приводит к возвращению исходного вида спектра. Димеры хлорофилла а в CCl_4 также устойчивы к нагреванию. Существенно то, что высокоагрегированные, кристаллические формы бактериовиридина (730—750 мμ) в твердых пленках, в отличие от агрегатов в CCl_4 (710—715 мμ), не изменяются при нагревании.

Действие полярных растворителей. Пиридин в концентрации меньше 10^{-4} *M* не оказывает действия. Увеличение концентрации до $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ *M* приводит к уменьшению длинноволнового и возрастанию «мономерного» максимума при 670 мμ (рис. 2, *1*). Всегда наблюдается небольшой подъем в начале кривой изменения оптической плотности при 712 мμ. Это отмечается также при действии других растворителей и может быть связано с изменением ориентации молекул пигмента на начальных стадиях действия полярных соединений. Полная диссоциация агрегированных форм под действием пиридина происходит при молярном соотношении пигмента и пиридина 1 : 1000, судя по области насыщения (см. рис. 2). П-712 более чувствительна к дезагрегирующему действию пиридина по сравнению с П-680. Так, в растворе с концентрацией бактериовиридина 10^{-3} *M*, где агрегированная форма («720 мμ») является доминирующей (рис. 1 *A*, *4*), агрегаты диссоциируют при соотношении пигмента и пиридина 1 : 500. При 10^{-2} *M* пигмента, когда еще более повышается степень агрегации, для диссоциации длинноволновых форм достаточно 50 молекул пиридина на молекулу бактериовиридина.

Метиловый спирт также вызывает диссоциацию агрегированных форм

на мономеры. Из рис. 2, *2* видно, что возрастание «мономерного» максимума опережает уменьшение оптической плотности у П-712. Дезагрегирующее действие метанола проявляется при концентрациях на порядок выше, чем у пиридина.

Ацетон и серный эфир (рис. 2, *3*, *4*) действуют более слабо, чем метанол. В присутствии ацетона, помимо диссоциации формы П-712, наблюдается образование П-680, особенно заметное при 0,1 *М* растворителя (рис. 3). Поэтому увеличение «мономерного» максимума при добавлении возрастающих количеств ацетона заметно отстает от «скорости» уменьшения длинноволнового поглощения (рис. 3 *Б*, *1*). Отмеченное явление можно объяснить тем, что ацетон, обладающий карбонильным кислородом, способствует образованию димеров бактериовиридина, по-видимому, играя роль «мостика» между двумя взаимодействующими молекулами в результате образования координационных связей с атомом магния. Полная диссоциация агрегированных форм в присутствии ацетона и эфира имеет место лишь при молярных соотношениях пигмента и растворителя соответственно 1 : 75 000 и 1 : 100 000 (см. рис. 2 и 3). Столь высокая устойчивость агрегатов (димеров) бактериовиридина к дезагрегирующим воздействиям может быть связана с тем, что при их образовании вступает в действие более одной «точки сцепления» между взаимодействующими молекулами.

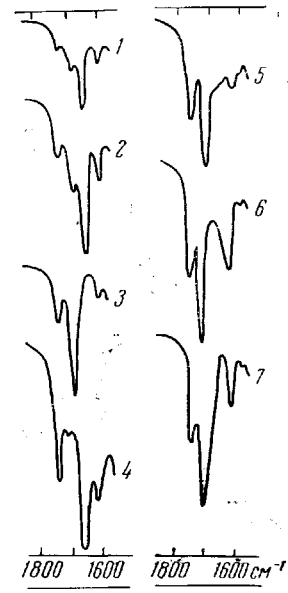


Рис. 4. Инфракрасные спектры поглощения. *1*—бактериовиридин $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* в CCl_4, *2* — то же, $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М*; *3* — то же в присутствии 4% пиридина; *4* — твердая пленка бактериовиридина, полученная при испарении серного эфира; *5* — бактериовиридин $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* в серном эфире; *6* — феофитин бактериовиридина $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* в серном эфире; *7* — феофитин бактериовиридина $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* в CCl_4

Инфракрасные спектры поглощения. По нашим измерениям (рис. 4), бактериовиридин в CCl_4 обнаруживает четыре полосы в области колебаний двойных связей: 1738; 1690; 1655 и 1605 $см^{-1}$, что близко соответствует данным для хлорофилла а в неполярных растворителях ([11–13]). На основании цитированных работ следует считать, что полоса 1738 $см^{-1}$ проявляется за счет вибраций сложноэфирных группировок в составе пропионовокислого остатка и карбометоксильной группы у 7-го и 10-го атомов углерода; максимум 1690 $см^{-1}$ характеризует поглощение свободной кетогруппы у 9-го атома С циклопентанонового кольца; максимум 1655 $см^{-1}$ характерен для агрегированных форм, являясь результатом координационного взаимодействия карбонильного кислорода этой группы с центральным атомом магния; наконец, полоса 1605 $см^{-1}$ принадлежит связям C=C и C=N молекулярного скелета. Обращает на себя внимание, что у бактериовиридина последняя полоса несколько сдвинута в низкочастотную сторону по сравнению с соответствующей полосой хлорофилла а в CCl_4 (1610 $см^{-1}$). «Агрегационный» максимум (1655 $см^{-1}$), сдвинутый по сравнению с поглощением свободной кетогруппы на 45 $см^{-1}$, является основным в спектре и отчетливо обнаруживается уже при концентрации бактериовиридина $0{,}25 \cdot 10^{-2}$ *М*. Его величина заметно возрастает с увеличением концентрации пигмента до $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М*, в то время как максимум 1690 $см^{-1}$ падает (рис. 4, *1*, *2*). У хлорофилла а в и.-к. спектре раствора в CCl_4 даже при гораздо большей концентрации пигмента (10^{-1} *М*) максимум свободных кетогрупп (1700 $см^{-1}$) соизмерим с «агрегационным» максимумом. Около половины кетогрупп молекул хлорофилла а остается в этих условиях в несвязанном состоянии.

Добавление 4% пиридина к раствору бактериовиридина в CCl_4, вызывая дезагрегацию, приводит к полному исчезновению максимума 1655 $см^{-1}$ и значительному возрастанию полосы свободной кетогруппы при 1690 $см^{-1}$ (рис. 4, *3*).

Инфракрасные спектры безмагниевого производного бактериовиридина в CCl_4, как и в случае феофитина а, не имеют «агрегационного» максимума и практически не изменяются при добавлении пиридина. В спектре отчетливо проявляются три полосы: при 1744; 1708 и 1620 $см^{-1}$ (рис. 4, *7*). Максимум свободной кетогруппы циклопентанонового кольца 1708 $см^{-1}$ — основной в спектре; положения полос с точностью до 3—4 $см^{-1}$ совпадают с и.-к. спектрами феофитина а ([11–13]). Таким образом, феофитин бактериовиридина, подобно феофитину а, не обнаруживает способности к межмолекулярному взаимодействию с участием кетогруппы циклопентанонового кольца. Четкого «агрегационного» пика мы не смогли наблюдать и у пленок феофитина на пластинках из NaCl. Твердые пленки бактериовиридина с максимумом поглощения при 730—750 мμ в и.-к. спектре обладают «агрегационной» полосой при 1656 $см^{-1}$, которая доминирует в спектре при отсутствии полосы свободной кетогруппы (рис. 4, *4*). Наряду с этим пленки бактериовиридина всегда обнаруживают полосу поглощения около 3200 $см^{-1}$, которую можно приписать связанному при агрегации гидроксилу гидроксиалкильной группировки I пиррольного кольца ([14]). У твердых пленок хлорофилла а наряду с «агрегационной» полосой ($\sim$1650 $см^{-1}$) наблюдается полоса свободной кетогруппы ($\sim$1700 $см^{-1}$), которая исчезает при обработке парами воды ([15, 16]). Обработка пленок бактериовиридина парами воды и других полярных соединений не приводит к изменениям в видимой и и.-к. областях спектра. Твердая пленка бактериовиридина, полученная при испарении серного эфира, обладает максимумом поглощения около 750 мμ; в отличие от хлорофилла а, нагревание и откачивание в вакууме не вызывают дезагрегации. Однако возможное включение воды в процессе приготовления агрегированных форм бактериовиридина нуждается в дополнительном исследовании.

Таким образом, можно предположить, что бактериовиридин без введения экзогенной воды образует более прочные, чем хлорофилл а, длинноволновые агрегаты за счет связей C=O...Mg при возможном участии OH-групп I пиррольного кольца молекулы пигмента.

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

Поступило
4 VIII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] E. Katz, E. C. Wassink, Enzymologia, **7**, 108 (1939). [2] H. Larsen, Kgl. norske vid. Selskabs. skr., 26, № 1 (1954). [3] А. А. Красновский, Е. В Пакшина, ДАН, **127**, 913 (1959). [4] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, И. Б. Федорович, ДАН, **134**, 1232 (1960). [5] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хуи Юй цюнь, ДАН, **143**, 456 (1962). [6] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Б. А. Гуляев, ДАН, **152**, 1231 (1963). [7] Ф. Ф. Литвин, В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 96. [8] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, **1**, 362 (1967). [9] В. Б. Евстигнеев, О. Д. Бекасова, Изв. АН СССР, сер. физ., **29**, 1399 (1965). [10] Б. А. Гуляев, Ф. Ф. Литвин, Биофизика, **12**, 845 (1967). [11] A. S. Holt, E. E. Jacobs, Plant Physiol., **30**, 553 (1955). [12] J. J. Katz, G. L. Closs et al., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3801 (1963). [13] A. F. H. Anderson, M. Calvin, Arch. Biochem. and Biophys., **107**, 251 (1964). [14] A. S. Holt, D. W. Hughes et al., Plant Cell Physiol., 4, 49 (1963). [15] H. Ballschmiter, J. J. Katz, Nature, **220**, 1231 (1968). [16] А. В. Карякин, В. М. Кутюрин, А. К. Чибисов, ДАН, **140**, 1321 (1961).

Доклады Академии наук СССР
1969. Том 188, № 6

УДК 541.14+547.979.4

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Н. Н. ДРОЗДОВА

ДЕЙСТВИЕ СИНЕГО И КРАСНОГО СВЕТА НА РЕАКЦИЮ ОБРАТИМОГО ОКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ХЛОРОФИЛЛА ХИНОНАМИ; ФОТОАКТИВАЦИЯ ОКИСЛЕННЫХ ФОРМ ПИГМЕНТОВ

Изучая обратимое окисление хлорофилла в прозрачных вязких спирто-глицериновых средах при низкой температуре, мы обратили внимание на то, что при возбуждении красным светом удается отчетливо наблюдать обратимые эффекты, тогда как при действии «белого» света происходит лишь необратимое падение оптической плотности хлорофилла ([1], [2]). Применяя светофильтры с различным положением длинноволновой границы пропускания, мы нашли, что необратимый эффект стимулируется синим светом; мы высказали предположение, что это явление объясняется ускорением обратной реакции продукта фотоокисления, обладающего поглощением в синей области спектра. Однако оставалась возможность световой активации *n*-бензохинона и промежуточного семихинона, «хвосты» поглощения которых могли простираться в синюю область спектра. Впоследствии мы обнаружили обратимое фотоокисление бактериохлорофилла убихинонами, которое наблюдается при комнатной температуре ([3]). Поглощение убихинона лежит в у.-ф. области, и это соединение практически не поглощает в синей части спектра, где доминирует поглощение фотоокисленной формы бактериохлорофилла (максимум 430 мμ).

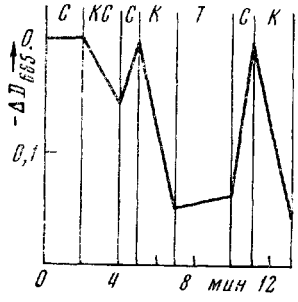


Рис. 1. Действие красного и синего света на фотоокисление хлорофилла а *n*-бензохиноном в спирто-глицериновой смеси при —70°. Хлорофилл а 10^{-5} *M*, *n*-бензохинон 10^{-3} *M*, pH 6,1. *K* — красный свет (10^5 эрг/см²·сек), *C* — синий свет (10^5 эрг/см²·сек), *KC* — красный + синий свет, *T* — темнота

В настоящей работе изучено действие красного ($\lambda > 630$ мμ), синего света (ртутные линии 405 и 435 мμ) и их комбинации на фотоокисление бактериохлорофилла и хлорофилла а.

Техника эксперимента заключалась в освещении трубки Тунберга с реакционной смесью двумя источниками света — лампой накаливания 300 вт с конденсором через красный светофильтр (КС-19 в опытах с бактериохлорофиллом и КС-13 в опытах с хлорофиллом а), 10^5 эрг/см²·сек, и ртутно-кварцевой лампой СВД-120 (осветитель ОИ-18) со светофильтрами ФС-1 и БС-8, линии ртути 405 и 435 мμ, 10^5 эрг/см²·сек. Интенсивность синего света изменяли при помощи нейтральных светофильтров. Измеряли кинетику изменения оптической плотности в максимуме поглощения (на спектрофотометре СФ-4) через определенные периоды освещения. Опыты велись при +20 и —70°; условия опытов описаны в наших предыдущих работах ([1–3]).

Фотоокисление хлорофилла а *n*-бензохиноном. В спирто-глицериновой среде при —70° под действием красного света происходит уменьшение оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла с медленной регенерацией пигмента после включения света (из-за высокой вязкости среды) ([1], [2]). При действии одного синего света 10^5 эрг/см²·сек не

удается наблюдать обратимых эффектов, что можно объяснить ускорением обратной реакции продуктов фотоокисления, поглощающих в синей области спектра. При одновременном действии красного и синего света глубина обратимой реакции уменьшается (рис. 1). Изучение влияния интенсивности синего света на эффект от красного света (10^5 эрг/см^2·сек) показало, что ингибирование синим светом удается наблюдать уже при его интенсивности, в 100 раз меньшей, чем у возбуждающего реакцию красного света, что следовало объяснить эффективным активированием обратной реакции синим светом. Действительно, освещение синим светом после действия красного ведет к чрезвычайному ускорению обратной реакции продукта фотоокисления с регенерацией хлорофилла (см. рис. 1).

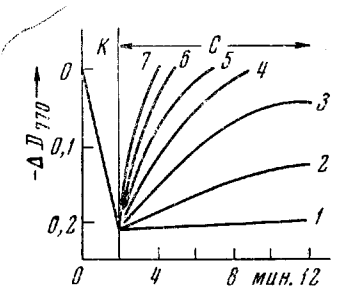


Рис. 2

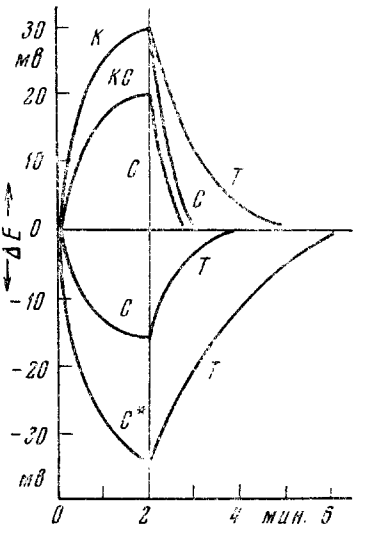


Рис. 3

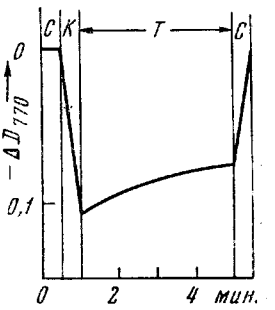


Рис. 4

Рис. 2. Действие синего света разной интенсивности на кинетику обратной реакции после фотоокисления бактериохлорофилла *n*-бензохиноном «в красном свете». Бактериохлорофилл 10^{-5} *M*, *n*-бензохинон 10^{-3} *M*, pH 6,1. *1* — обратная реакция в темноте при —70°, *2*—*7* — обратная реакция под действием синего света разной интенсивности (эрг/см^2·сек): *2* — 1,7·10^3, *3* — 1,0·10^4, *4* — 1,7·10^4, *5* — 4,3·10^4, *6* — 6,8·10^4, *7* — 1,0·10^5. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Изменение фотопотенциала в системе бактериохлорофилл-*n*-бензохинон при действии красного и синего света. Обозначения те же, что на рис. 1. Звездочкой отмечена система с *n*-бензохиноном без пигмента

Рис. 4. Действие синего света на обратную реакцию после фотоокисления бактериохлорофилла убихиноном (UQ) в красном свете. Бактериохлорофилл 10^{-5} *M*, убихинон 10^{-3} *M*; обозначения те же, что на рис. 1

Измерения фотопотенциала в вязкой системе при —70° не удается осуществить из-за черзвычайного замедления диффузии. Измерения при +20° показывают ускорение обратимого изменения фотопотенциала под действием синего света (после красного).

Фотоокисление бактериохлорофилла *n*-бензохиноном. Эти опыты проводились при —70°. При действии красного света наблюдалось обратимое фотоокисление, описанное нами ранее ([1], [2]). При одновременном действии красного и синего света глубина измеряемой фотореакции уменьшалась в зависимости от интенсивности синего света, ослабленной рядом нейтральных светофильтров. При 10^5 эрг/см^2·сек синего света обратимая реакция не наблюдалась; при 10^3 эрг/см^2·сек обратная реакция была ослаблена приблизительно вдвое; после действия синего света, как показала проверка, активность реакции в красном свете полностью сохранилась. Предполагается, что это ингибирование обратной реакции синим светом связано со световой активацией продукта фотоокисления бактериохлорофилла. Для выяснения этого были поставлены опыты, в которых изу-

чалась кинетика обратной реакции под действием синего света разной интенсивности при —70°. В этих опытах «прямая» реакция фотоокисления возбуждалась красным светом. Из опыта отчетливо видно, что синий свет чрезвычайно ускоряет обратную реакцию продукта фотоокисления бактериохлорофилла *n*-бензохиноном с регенерацией исходного пигмента (рис. 2).

Изменение фотопотенциала в системе бактериохлорофилл-*n*-бензохинон. Как мы указывали раньше, при —70° эти измерения провести не удается, поэтому приводятся результаты, полученные при комнатной температуре (рис. 3). Существенно, что в контрольном опыте, при освещении синим светом *n*-бензохинона без пигмента в спиртоглицериновой среде в вакууме, наблюдается изменение фотопотенциала в «отрицательную» сторону до 40 мв. Этот эффект следует объяснить прямым фотовосстановлением хинона растворителем, и фотопотенциал определяется образованием семихинона. В системе, содержащей бактериохлорофилл, под действием синего света наблюдается меньшее изменение фотопотенциала в «отрицательную» сторону. Это явление можно объяснить конкурентным действием на электрод семихинона и фотоокисленного бактериохлорофилла. При действии красного света, который поглощается только бактериохлорофиллом, наблюдается изменение фотопотенциала в «положительную» сторону на 30 мв, что, вероятно, объясняется электродной активностью продуктов фотоокисления пигмента ([3], [4]). При одновременном действии красного и синего света наблюдается изменение фотопотенциала также в «положительную» сторону, но на меньшую величину по сравнению с одним красным светом, по-видимому за счет ускорения обратной реакции. Действительно, освещение синим светом после действия красного света приводит к достижению первоначальной величины потенциала более быстро, чем в темноте (рис. 3), что соответствует спектрофотометрическим измерениям.

Система бактериохлорофилл-убихинон. В этих опытах, проводимых при 20°, использовались некоторые убихиноны, синтезированные во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте и любезно предоставленные нам Г. И. Самохваловым и Е. А. Обольниковой. Освещение красным светом этой системы ведет к фотоокислению бактериохлорофилла, в темноте идет обратная реакция, которая ускоряется синим светом (рис. 4). Подобным образом одновременное действие красного и синего света ведет к уменьшению глубины фотоокисления по сравнению с одним красным светом. Так, за 30 сек. при освещении красным светом окисляется около 20% пигмента, при одновременном освещении синим и красным — лишь около 10% пигмента. Это явление в случае применения убихинона выражено менее отчетливо, чем в опытах с *n*-бензохиноном, чему можно предложить следующее объяснение: либо прямая реакция бактериохлорофилла с убихиноном более эффективна, чем при использовании *n*-бензохинона, либо в случае *n*-хинона в обратной реакции участвует также семихинон, образующийся при прямом фотовосстановлении хинона растворителем, что не имеет места в опытах с убихиноном, обладающим меньшей величиной окислительно-восстановительного потенциала ($E_0' = 0{,}1$ в против 0,3 в у *n*-хинона).

Итак, представленный экспериментальный материал свидетельствует о световой активации фотоокисленных форм бактериохлорофилла и хлорофилла а. Возможное значение этого явления при реализации фотобиологических процессов в клетках растений и бактерий нуждается в исследовании.

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

Поступило
15 VII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1378 (1963); **158**, 722 (1963). [2] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, **30**, 605 (1965). [3] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский и др., ДАН, **183**, 221 (1968). [4] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **165**, 1435 (1965).

Доклады Академии наук СССР
1969. Том 186, № 4

УДК 581.19

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Л. Г. ЕРОХИНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХЛОРОФИЛЛА С ФИКОЭРИТРИНОМ И ФИКОЦИАНИНОМ

Согласно принятым представлениям, энергия света, поглощенного фикоэритрином и фикоцианином в красных и синезеленых водорослях, мигрирует к хлорофиллу, непосредственно участвующему в процессах фотосинтетического переноса электрона. Эти представления согласуются с данными нашей лаборатории о малой фотохимической активности фикобилинов [1]. Желательно изучить взаимодействие хлорофилла и фикобилинов в более простой системе, чем интактные клетки водорослей. Моделирование таких систем встречает ряд трудностей, так как фикобилины — водорастворимые белки, а хлорофилл растворяется в органических растворителях. Францковиак с оотрудниками исследовала еще более простую систему хлорофилл а — билирубин и получила данные, указывающие на образование комплекса между хлорофиллом и билирубином [2]. При исследовании спектральных свойств фикоэритрина мы нашли, что органические растворители — спирт, ацетон, диоксан (до 20% в водном растворе) — детергенты не влияют существенно на структуру хромопротеида [3]. Это определило условия получения модельных систем (фикобилиновые пигменты — хлорофилл), спектральные свойства которых описаны ниже.

Фикоэритрин выделяли из красных водорослей Callithamnion rubosum [1, 3]. Растворы фикоэритрина после хроматографии тщательно освобождали от липидов серным эфиром, после чего очищали гель-фильтрацией на Сефадексе Г-100. Фикоцианин выделяли из синезеленых водорослей Anacystis nidulans. После разрушения водорослей ультразвуком и центрифугирования в течение 40 мин. при 20 000 *g* фикоцианин очищали гель-фильтрацией на Сефадексе Г-100 [4]. К растворам хромопротеидов (10^{-5} *M*) в фосфатном буфере добавляли концентрированные растворы хлорофилла а в водорастворимых органических растворителях в минимальных объемах, необходимых для достижения заданной концентрации пигмента. В другом варианте опытов растворы фикобилинов в 0,5% водном растворе Тритон Х-100 смешивали с водными растворами хлорофилла с тем же детергентом. Флуоресценция возбуждалась через интерференционные светофильтры с пропусканием 525 мμ (возбуждение фикоэритрина), 575 мμ (возбуждение фикоцианина) и 436 мμ (преимущественное возбуждение хлорофилла). Источник света — ксеноновая лампа 1000 вт. Флуоресценцию измеряли при комнатной температуре в вязкой среде (водно-глицериновые смеси в отношении 2 : 3) и при —196° на установке, описанной ранее [5]. Спектры поглощения снимали на приборе СФ-10.

Взаимодействие фикоэритрина с хлорофиллом. В водные растворы фикоэритрина (0,05 *M* фосфатный буфер pH 6) вводили спиртовые растворы хлорофилла; конечная концентрация спирта в пределах от 1 до 20%. В контрольных опытах спиртовые растворы хлорофилла вливали в водный буферный раствор; при этом главный максимум поглощения хлорофилла сдвигается в длинноволновую область. Эти эффекты описаны и связаны с образованием агрегированных форм пигмента [6–9]. В присутствии фикоэритрина максимум поглощения хлорофилла лежит при 671—673 мμ (рис. 1*A*). Однако поглощение при 740 мμ иногда

наблюдается в растворе фикоэритрина: по-видимому, избыток несвязанного фикоэритрином хлорофилла может образовывать «квазикристаллические» агрегаты. При стоянии водных коллоидных растворов хлорофилла (5% этанола) появляются максимумы в области 700—702 и 735—740 мμ, свидетельствующие о дальнейшей агрегации с образованием «квазикристаллических» форм. В присутствии фикоэритрина эти эффекты менее отчетливы (рис. 1*Б*). При фильтрации на Сефадексе Г-200 наблюдается одна зона, содержащая фикоэритрин и хлорофилл. Это указывает на то, что по крайней мере часть хлорофилла связывается фикоэритрином. В спектре флуоресценции водных коллоидных растворов хлорофилла с 1 и 20% спирта наблюдаются максимумы агрегированных форм при 700—750 мμ; при 40% спирта, в условиях, способствующих дезагрегации, отмечаются коротковолновые максимумы при 690—693 мμ. В присутствии фикоэритрина в системе, содержащей 1 и 20% спирта, наблюдается флуоресценция дезагрегированных форм хлорофилла (табл. 1). При возбуждении 525 мμ флуоресценция хлорофилла в водных растворах не обнаружена, а в системе фикоэритрин — хлорофилл появляется максимум в области 690—693 мμ, лежащий на длинноволновом спаде кривой флуоресценции фикоэритрина. Интенсивность этого максимума уменьшается в вязкой среде и при замораживании до температуры жидкого азота (рис. 2). Таким образом, свет, поглощенный фикоэритрином, используется для возбуждения хлорофилла. Нами была предпринята попытка выделения нативного комплекса фикоэритрин — хлорофилл из водорослей Callithamnion rubosum. При гельфильтрации водного экстракта на Сефадексе Г-200 удается наблюдать зону комплекса, идущую ниже зоны фикоэритрина. Спектральные свойства этого комплекса близки к описанной модельной системе. Модельный и искусственный комплексы фикоэритрина с хлорофиллом

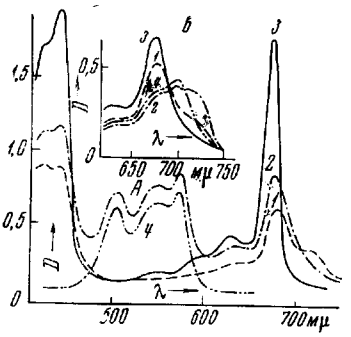


Рис. 1. Спектры поглощения системы фикоэритрин — хлорофилл. *А* — фосфатный буферный раствор 0,05 *М* pH 6 (*1* — хлорофилл, 20% спирта; *2* — хлорофилл+фикоэритрин, 20% спирта; *3* — хлорофилл в 96% спирте; *4* — фикоэритрин в фосфатном буфере); *Б* — 5% этанола в водном буферном растворе (*1* — хлорофилл; *2* — то же после стояния 24 часа; *3* — хлорофилл + фикоэритрин; *4* — то же после стояния 24 часа)

Таблица 1

Положение максимумов флуоресценции хлорофилла (мμ) в системе фикоэритрин — хлорофилл *

	1% спирта		20% спирта		40% спирта	
	20°	—196°	20°	—196°	20°	—196°
Водные коллоидные растворы хлорофилла	750	750 пл 800	750	700—750	690—693	690—693
Система фикоэритрин — хлорофилл	пл 700 730	690—693 730	690—693 730	690—693 730	690—693 730	690—693 730

* Возбуждение 436 мμ; пл — скрытый максимум в виде плеча.

обладают несколько большей активностью в реакции фотосенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты, чем изолированные фикобилины (1). Это соответствует данным Фуджита и Цужи (10) об активности комплекса, выделенного из синезеленых водорослей.

Дезагрегирующее воздействие на коллоидные растворы хлорофилла характерно и для фикоцианина (рис. 3). Однако трудно измерить флуо-

ресценцию дезагрегированного хлорофилла в присутствии фикоцианина, обладающего сильной красной флуоресценцией при 655 и 710 мμ.

Тушение флуоресценции фикоэритрина (10^{-5} *M*) хлорофиллом исследовали в пределах концентраций последнего от 10^{-6} до 10^{-4} *M* в 0,5% водном растворе Тритона X-100 и в системах, содержащих 1; 20 и 40% спирта. Величина эффекта выражалась отношением интенсивности максимума флуоресценции фикоэритрина при 580 мμ без хлорофилла (Φ_0) к интенсивности в присутствии хлорофилла (Φ). Отношение Φ_0 / Φ во всех опытах всегда больше единицы (1,1—1,4), что свидетельствует о тушении флуоресценции фикоэритрина хлорофиллом. Тушение в присутствии 5% ацетона практически не отличается от эффекта с 5% этанола. Тушение растет с увеличением количества растворителя, достигая максимума при 20% спирта и в водном 0,5% растворе Тритона X-100. Это, вероятно, связано с дезагрегацией фикоэритрина, наблюдаемой в этих условиях ([11]), что способствует передаче энергии возбуждения от фикоэритрина к хлорофиллу. Тушение уменьшается в вязкой среде и при замораживании до —196°. Можно было думать, что наблюдаемый эффект тушения вызван экранированием поглощения фикоэритрина в области возбуждения (525 мμ) хлорофиллом, все же поглощающим в этой области спектра. При 525 мμ и одинаковой концентрации фикоэритрина и хлорофилла соотношение $D_{фэ} / D_{хл}$ составляет около 10, т. е. при 10^{-5} *M* хлорофилла можно было бы ожидать лишь до 10% тушения флуоресценции фикоэритрина, тогда как в действительности эта величина достигает 30—40%. Таким образом, наблюдаемое тушение вызвано не экранирующим действием хлорофилла, а, вероятно, более эффективным процессом переноса энергии возбуждения. Уменьшение эффекта в вязкой среде и при —196° может служить указанием на то, что условием передачи энергии является особый тип «контакта», возможно связанный с определенными конформационными изменениями белковой молекулы, некоторые конфигурации которой могут быть наиболее выгодными для проявления эффекта миграции энергии. В случае фикоцианина тушение его флуоресценции хлорофиллом в 0,5% растворе Тритон X-100 несколько выше: при 10^{-6} *M* хлорофилла Φ_0 / Φ равно 1,2 (в случае фикоэритрина 1,0), а при 10^{-5} *M* хлорофилла 1,4 (в случае фикоэритрина 1,3). Возможно, что это обусловлено большей близостью спектров поглощения и флуоресценции хлорофилла и фикоцианина.

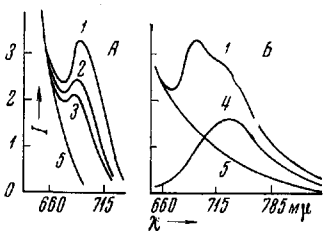


Рис. 2

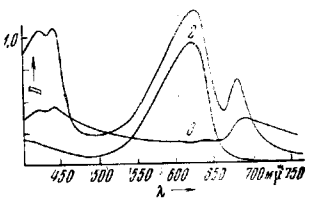


Рис. 3

Рис. 2. Спектры флуоресценции системы фикоэритрин — хлорофилл при возбуждении в области 525 мμ (*А*) и 436 мμ (*Б*). *1* — фикоэритрин + хлорофилл, фосфатный буфер 0,05 *M*, pH 6, 20% спирта, 20°; *2* — фикоэритрин + хлорофилл в смеси глицерина и воды (2 : 3), 20°; *3* — то же при —196°; *4* — хлорофилл в фосфатном буфере, 20% спирта, 20°; *5* — фикоэритрин в фосфатном буфере, 20% спирта, 20°

Рис. 3. Спектры поглощения системы фикоцианин — хлорофилл (фосфатный буфер 0,1 *M*, pH 6,0; 10% спирта). *1* — фикоцианин + хлорофилл после стояния 24 часа; *2* — фикоцианин; *3* — хлорофилл после стояния 24 часа

Сенсибилизированная флуоресценция. Мы измеряли интенсивность «второй полосы» люминесценции хлорофилла при 730 мμ (не подвергающейся реабсорбции) и максимума флуоресценции фикоэритрина при 580 мμ в системе фикоэритрин — хлорофилл в 0,5% водном растворе Тритон X-100 при возбуждении 525 мμ. Для сравнения измеряли интенсивность флуоресценции одного хлорофилла при 730 мμ и одного фикоэритрина при 580 мμ при тех же условиях. Из табл. 2 видно, что от-

ношение интенсивности флуоресценции одного хлорофилла при 730 мμ (Φ_x) к интенсивности этого максимума с фикоэритрином (Φ) меньше единицы, что свидетельствует о возгорании флуоресценции хлорофилла. В то же время отношение интенсивности флуоресценции одного фикоэритрина при 580 мμ ($\Phi_э$) к интенсивности этого максимума в системе с хлорофиллом (Φ') больше единицы, что указывает на тушение флуоресценции фикоэритрина. При 525 мμ поглощение хлорофилла вообще невелико и, кроме того, экранируется доминирующим поглощением фикоэритрина; тем не менее при возбуждении в этой области спектра флуоресценция хлорофилла более интенсивна, чем в случае одного хлорофилла.

Таблица 2

Флуоресценция хлорофилла и фикоэритрина в 0,5% водном растворе детергента Тритон X-100 *

	Без глицерина, 20°	60% глицерина	
		20°	−196°
Φ_x/Φ (при 730 мμ)	0,75	0,9	1,0
$\Phi_э/\Phi'$ (при 580 мμ)	1,3	1,1	1,0

* Концентрация пигментов 10^{-5} *М*. Возбуждение 525 мμ.

Таким образом, свет, поглощенный фикоэритрином, используется для возбуждения хлорофилла. Механизм миграции энергии в этой системе требует дальнейшего изучения и, вероятно, не ограничивается тривиальной реабсорбцией собственной флуоресценции фикоэритрина молекулами хлорофилла.

Итак, свойства искусственных комплексов хлорофилла с фикобилинами сходны со свойствами нативных комплексов этих пигментов.

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

Поступило
7 II 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев и др., ДАН, **82**, 947 (1952). [2] D. Frackowiak, S. Surma, Photosynthetica, **22**, 75 (1968). [3] Л. Г. Ерохина, А. А. Красновский, Молекулярная биология, **2**, 4, 550 (1968). [4] E. Scott, D. Berns, Biochemistry, **4**, 2597 (1965). [5] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, **4**, 392 (1961). [6] А. А. Красновский, В кн. Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 26. [7] Ф. Ф. Литвин, В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 96. [8] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биохимия, **31**, 3, 573 (1968). [9] Г. П. Гуринович, Т. И. Стрелкова, Биофизика, **13**, 5 (1968). [10] Y. Fujita, T. Tzuji, Nature, **219**, 5160, 1270 (1968). [11] А. А. Красновский, Л. Г. Ерохина, ДАН, **183**, № 2, 240 (1968).

Доклады Академии наук СССР
1969. Том 185, № 4

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЦИТОХРОМА С, ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ДЕТЕРГЕНТОВ

Многочисленные исследования превращений цитохромов в фотосинтезирующих организмах требовали создания более простой модели, в которой можно было бы изучать превращения цитохромов под действием света, поглощенного хлорофиллом. Такая модель была предложена в наших работах еще в 1955 г. ([1, 2]). Хлорофилл или бактериохлорофилл, осажденные в водном растворе цитохрома, при освещении красным светом в анаэробных условиях вызывали фотовосстановление, а в присутствии воздуха — окисление цитохрома С. Однако эти реакции шли сравнительно медленно, и глубина превращения цитохрома была невелика.

В нашей лаборатории было найдено, что в водных растворах различных детергентов весьма эффективно идут фотосенсибилизированные хлорофиллом окислительно-восстановительные реакции, в частности окисление восстановленного цитохрома ([3, 4]). Впоследствии Вернон и Шоу ([5]) описали фотовосстановление цитохрома гидрохиноном в присутствии хлорофилла, солюбилизированного тритоном Х-100. В настоящей работе исследовано фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление и окисление цитохрома в водных растворах детергентов.

Опыты проводили в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для измерения на спектрофотометре СФ-10 и СФ-4а. Опыты ставили следующим образом. В трубку вводили раствор 1 мг цитохрома С (90—100% BDH Lab. Chem. Div.) в 4 мл 0,01 *М* фосфатного буфера, обычно pH 7,4. В головку трубки вносили 0,2 мл раствора хлорофилла в этиловом спирте с концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ *М* и 1 мл водного раствора детергента. Воздух откачивали масляным насосом, взбалтывая содержимое, и сливали раствор из головки в трубку. В процессе опыта измеряли спектры поглощения. Раствор выдерживали 15 мин. в темноте, затем освещали 12 мин. конденсированным светом лампы накаливания 300 вт через красный светофильтр КС-13 (10^5 эрг/см^2·сек) при 20°. После этого пускали воздух, взбалтывали, оставляли в темноте на 6 мин. и снова освещали 12 мин. При освещении раствора в вакууме происходило восстановление цитохрома, а на воздухе — фотоокисление, наблюдаемое по характерным изменениям оптической плотности в максимуме поглощения восстановленного цитохрома при 550 мμ.

Испытывалось влияние хлорофилла, введенного из разных растворителей (пиридина, спирта и ацетона). Скорость реакции была выше при использовании пиридиновых растворов хлорофилла. Однако в дальнейших опытах мы применяли спиртовые растворы хлорофилла, из-за опасности образования гемохромогенов в присутствии пиридина. В присутствии детергентов тритона Х-100, дезоксихолата натрия, твина 40 и 60 наблюдалось более активное фотовосстановление и фотоокисление. Наибольший эффект получен с тритоном Х-100. Обычно с увеличением концентрации детергента до 1% скорость реакции увеличивалась. В дальнейшем опыты ставили только с этой концентрацией детергента. Для того чтобы иметь возможность вести опыты при низкой температуре, мы применяли водно-глицериновые среды. Введение 50% глицерина без детергента при-

водило к некоторой активации реакции по сравнению с контрольным опытом без глицерина.

Максимум поглощения хлорофилла a, осажденного на цитохроме, лежит при 670 мμ, а хлорофилла b при 655 мμ, что указывает на дезагрегирующее действие цитохрома при осаждении хлорофилла. Для выяснения возможности образования устойчивых комплексов хлорофилла с цитохромом в водных растворах тритона X-100 мы пропускали эту систему,

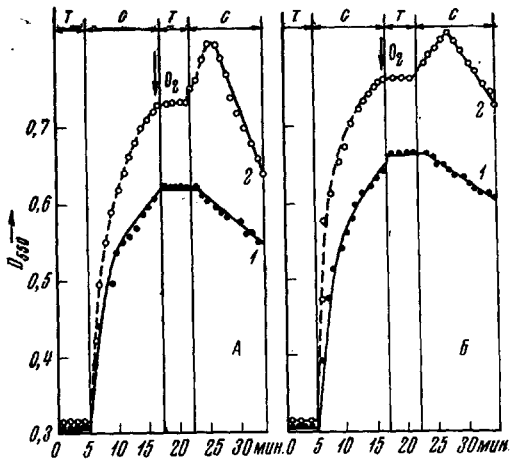


Рис. 1. Фотовосстановление и фотоокисление цитохрома С, сенсибилизированные хлорофиллом a (*А*) и b (*Б*). Кинетика изменения в максимуме поглощения восстановленного цитохрома при 550 мμ. *1* — в водной среде 1% тритона X-100, *2* — 1% тритона и 50% глицерина. *т* — темнота, *с* — свет, $\downarrow O_2$ — пуск воздуха

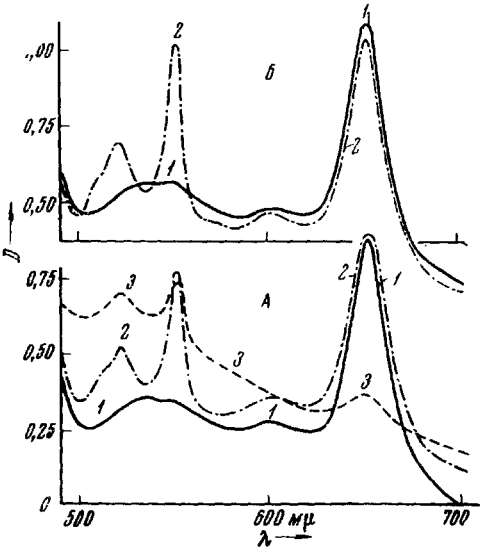


Рис. 2. Спектральные изменения цитохрома С и хлорофилла b в процессе фотореакции. *А* — в водной среде 1% тритона pH 7,4; *Б* — 1% тритона и 50% глицерина. *1* — исходный спектр, *2* — после 12 мин. освещения в вакууме, *3* — после 12 мин. освещения на воздухе

а также водные растворы хлорофилла и цитохрома С в присутствии 1% тритона через колонки с Сефадексом Г-75. При гельфильтрации цитохрома С и хлорофилла наблюдается одна размытая зона. При гельфильтрации растворов, содержащих тритон, хлорофилл и цитохром, наблюдалось разделение последних компонентов. Таким образом, в этих условиях не образуется устойчивого комплекса хлорофилла с цитохромом; по-видимому, оба компонента солюбилизированы мицеллами детергента.

На рис. 1 показана кинетика изменения оптической плотности при 550 мμ, характеризующая восстановление цитохрома под действием красного света, поглощаемого хлорофиллом. Наблюдается весьма быстрое фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление цитохрома. Введение 50% глицерина в раствор с детергентом приводит к значительному ускорению фотовосстановления цитохрома. После пуска воздуха происходит фотосенсибилизированное окисление цитохрома, которое также идет быстрее в присутствии глицерина.

Измерение спектров поглощения показывает, что в присутствии воздуха идет энергичное деструктивное фотоокисление хлорофилла, в присутствии глицерина — более медленное. В контрольных опытах в водных растворах хлорофилла с 1% тритоном наблюдается столь же быстрое фотоокисление хлорофилла. Анализируя скорость реакции фотосенсибилизированного окисления, следует учитывать уменьшение концентрации пигмента-сенсибилизатора в течение опыта. Характерные изменения в

максимумах восстановленного цитохрома при 550 мμ и хлорофилла при 670 и 655 мμ после реакции видны на рис. 2 и 3.

При рассмотрении кинетики реакции после пуска воздуха в опытах с глицерином (см. рис. 1) обращает на себя внимание «индукционный эффект» — продолжающееся и в присутствии воздуха фотовосстановление цитохрома; окисление наступает лишь через несколько минут после начала освещения. Этот эффект можно объяснить образованием активных восстановителей при сенсибилизированном фотоокислении присутствующих доноров электрона: эти соединения восстанавливают цитохром. Подобное явление — фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена и других акцепторов в присутствии кислорода — описано в предыдущей работе нашей лаборатории ([6]). То что индукционный «всплеск» восстановления наблюдается лишь в присутствии глицерина, можно объяснить более высокой вязкостью этой системы, замедляющей диффузию кислорода из воздуха.

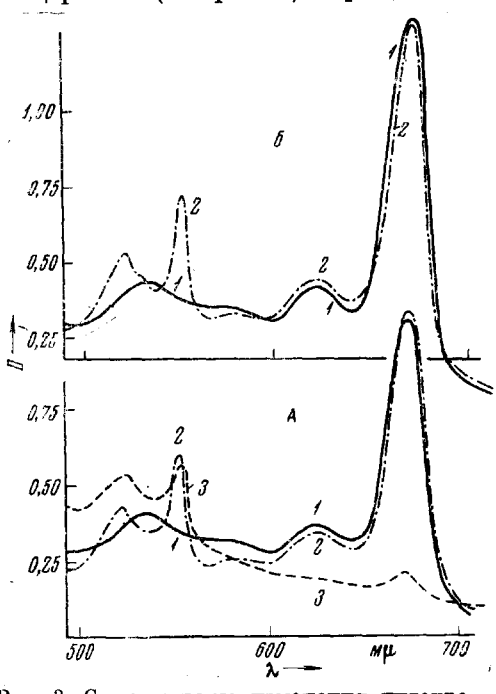


Рис. 3. Спектральные изменения цитохрома С и хлорофилла а в процессе фотореакции. Обозначения те же, что на рис. 2

Мы испытывали зависимость реакции от pH раствора. Скорость реакции фотовосстановления и фотоокисления цитохрома в среде с тритоном X-100 оказалась следующей (изменение оптической плотности при 550 мμ за 3 мин., где знак плюс восстановление, а знак минус — окисление):

pH	8,04	7,4	6,2	5,3
Восстановление	+0,220	+0,220	+0,173	+0,110
Окисление	—0,050	—0,090	—0,100	—0,140

Таким образом, сенсибилизированному фотовосстановлению благоприятствует щелочная среда, а фотоокислению — более кислая.

В прозрачной при замораживании среде, содержащей 75% глицерина, 1% тритона и 20% водного буферного раствора с pH 7,4, ставились опыты при —70°. Измерения велись на приборе СФ-14 в сосуде Дьюара в смеси спирта с углекислотой. Скорость фотосенсибилизированных реакций в этих условиях чрезвычайно замедлялась. В данных условиях эксперимента пока не удалось измерить малые изменения ΔD цитохрома.

В нашей лаборатории было найдено, что каротин блокирует фотовосстановление, фотоокисление и фотосенсибилизацию хлорофилла в истинных, но не в коллоидных растворах ([7–9]). Мы вводили в исследуемую систему β-каротин, солюбилизированный в 1% растворе тритона X-100, в концентрации до $0{,}4 \cdot 10^{-3}$ *М*. Существенно, что нам не удалось наблюдать ингибирующего действия каротина на фотовосстановление и фотоокисление цитохрома. По-видимому, в этих условиях не было контакта между мицеллами детергента с каротином и хлорофиллом, что соответствует данным о необходимости нахождения хлорофилла и каротина в одной фазе для реализации ингибирующего эффекта.

Следует рассмотреть природу донора электрона, за счет которого происходит фотовосстановление цитохрома. В среде, где идет реакция, кроме

цитохрома присутствует вода, глицерин, спирт, тритон X-100 и хлорофилл. Во время фотовосстановления цитохрома спектр хлорофилла практически не изменяется. Глицерин и тритон могли быть донорами электрона, но вообще реакция идет и в отсутствие этих соединений, хотя и с более низким выходом. Следует полагать, что в качестве донора электрона могли бы использоваться молекулы спирта, некоторые концевые аминокислоты (гистидин) в молекуле цитохрома или OH^- ионы молекулы воды.

Мы попытались вводить в систему некоторые доноры электрона. Аскорбиновая кислота и цистеин вызывали темновое восстановление цитохрома. Гистидин и триптофан не восстанавливали цитохром в темноте и не ускоряли фотовосстановления. Природа донора электрона в исследованных реакциях остается пока неясной и нуждается в дальнейшем исследовании.

Реакция идет в мицелле детергента, где солюбилизированы хлорофилл и цитохром; при этом нельзя исключить возможности того, что часть хлорофилла адсорбирована на цитохроме. Перенос электрона между хлорофиллом и цитохромом может происходить в неустойчивом комплексе ([10]), который, как мы указывали выше, не удается изолировать. В такой системе весьма трудно разделить элементарные реакции, как это было сделано при сенсибилизации в растворах хлорофилла. Поэтому можно лишь предположить возможность следующего чередования элементарных процессов (Хл — возбужденный светом хлорофилл, D — донор электрона, D_{ox} — окисленный донор). При фотовосстановлении цитохрома:

$$Хл + цит\ Fe^{3+} \rightleftarrows Хл^+ + цит\ Fe^{2+};$$
$$Хл^+ + D \rightarrow Хл + D_{ox};$$
$$Хл + D \rightarrow Хл^- + D_{ox};$$
$$Хл^- + цит.\ Fe^{3+} \rightleftarrows Хл + цит\ Fe^{2+}.$$

При фотоокислении цитохрома

$$Хл + цит\ Fe^{2+} \rightarrow Хл^- + цит\ Fe^{3+};\quad Хл^- + O_2 \rightarrow Хл + O_2^-$$ и т. д.

или

$$Хл + O_2 \rightarrow ХлO_2$$ (мольоксид); $$ХлO_2 + цит\ Fe^{2+} \rightarrow цит\ Fe^{3+} + ХлO_2^-$$ и т. д.

Раздельное изучение элементарных процессов переноса электрона между хлорофиллом и цитохромом является задачей дальнейшего исследования.

Итак, в данной работе описана эффективно работающая модельная система, в которой хлорофилл фотосенсибилизирует восстановление и окисление цитохрома С.

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

Поступило
26 XII 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский. ДАН, 103, 288 (1955). [2] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, 1, 120 (1956). [3] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, 22, 776 (1957). [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 63, 163 (1948). [5] L. P. Vernon, E. R. Shaw, Biochemistry, 4, 132 (1965). [6] А. А. Красновский, А. Н. Луганская, ДАН, 183, № 6 (1968). [7] А. А. Красновский, Биофизика, 4, 5 (1959). [8] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. В. Пакшина, Биохимия, 25, 288 (1960). [9] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Биохимия, 26, 859 (1961). [10] M. D. Kamen, Primary Processes in Photosynthesis, 1963, p. 170.

УДК 581.19

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗЕЛЕНЕНИЯ ЭТИОЛИРОВАННЫХ МУТАНТОВ КУКУРУЗЫ

Ф. ЛАНГ, Л. М. ВОРОБЬЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Методом измерения спектров флуоресценции при —196° исследовали зеленение этиолированных листьев нормальных и мутантных растений кукурузы, содержащих каротиноиды в виде ликопина либо ζ-каротина. Спектральная картина смены форм пигментов на начальных стадиях зеленения мутантов соответствовала процессу, описанному для нормальных листьев. Различия, приводящие к изменению спектров флуоресценции мутантов при —196° по сравнению с нормальными листьями, происходят в конце процесса зеленения и являются следствием различной упаковки молекул хлорофилла в агрегированных структурах пигментно-белкового комплекса. Обнаружено быстрое фотопревращение пигментной формы протохлорофилла 635→680 при освещении этиолированных листьев ζ-каротинового мутанта. Смена флуоресцирующих форм пигментов в процессе зеленения соответствует схеме:

635 *ммк*→680 *ммк*→686 *ммк*→агрегированные формы хлорофилла

↑

655 *ммк*→690 *ммк*

Спектральные различия на начальных стадиях зеленения зависят от соотношения протохлорофилловых форм 635 и 655 в этиолированных листьях.

При исследовании пигментно-белкового комплекса зеленеющих листьев фасоли было обнаружено, что из протохлорофилла с максимумом поглощения около 630 *ммк* по мере накопления пигмента образуется вначале мономерная, а затем агрегированные формы хлорофилла обладающие поглощением при 670 и 678 *ммк* [1, 2].

Ряд работ посвящены детальному исследованию превращения пигментов в листьях и изолированном белковом комплексе и выяснению зависимости этого процесса от температуры, длины волны используемого света, участию первично образованного хлорофилла в реакциях фотосинтеза [3—8]. Анализ пигментов показал, что в листьях этиолированных растений присутствует два непосредственных предшественника хлорофилла — протохлорофиллид и протохлорофилл,— различающихся только содержанием фитола [9]. Измерение спектров низкотемпературной флуоресценции [10] и спектров поглощения этиолированных и зеленеющих листьев [11, 12] позволило выяснить более детально смену форм пигментов в начале процесса зеленения. Было показано, что из накопившегося в темноте протохлорофиллида (флуоресценция при 655 *ммк*) образуется хлорофиллид с максимумом флуоресценции при 690 *ммк*, который затем путем темновой реакции присоединения фитола превращается в хлорофилл с флуоресценцией при 680 *ммк* [13].

В результате дальнейшего накопления пигмента максимум хлорофилла претерпевает длинноволновый сдвиг к 686 *ммк*. Одновременно с этим в низкотемпературном спектре флуоресценции возрастает длинно-

волновый максимум в области 730 *ммк*, являющийся результатом агрегации молекул хлорофилла на структурах ламелл хлоропластов [14, 15].

Что касается протохлорофилла с максимумами флуоресценции при 635 *ммк* и поглощения около 630 *ммк*, то долгое время не удавалось обнаружить его заметного быстрого превращения в хлорофилл, хотя в течение длительного времени зеленения и наблюдалось постепенное понижение этих максимумов. В недавней работе Годнева и сотр. [16] было показано, что в этиолированных листьях дуба, обладающих максимумом поглощения при 630 *ммк*, при освещении сразу возникает продукт, поглощающий при 672 *ммк*.

Одновременно с перемещением максимумов хлорофилла при освещении изменяется его состояние на ламеллах хлоропластов, о чем говорит различная фотоустойчивость пигмента на разных стадиях зеленения [1].

В некоторых случаях структурную организацию хлоропластов и синтез пигментов блокируют генетические факторы [17, 18]. Известны мутанты, в которых синтезируется протохлорофилл, превращающийся на свету в хлорофилл, однако вновь образованный хлорофилл быстро разрушается при обычной интенсивности света [19, 20]. Было найдено, что спектр флуоресценции мутантов кукурузы отличается от нормальных типов [20, 21].

В настоящей работе изучено образование хлорофилла в этиолированных листьях мутантов кукурузы методом измерения спектров флуоресценции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для опытов использовали этиолированные и зеленеющие листья нормальных, ζ-каротиновых и ликопиновых мутантов кукурузы, различающиеся по содержанию пигментов [22]. Нормальные листья кукурузы, выращенной при 25 *лк*, содержат хлорофилл *а* и *б*, в соотношении 4 : 1; каротиноиды-α- и β-каротин и ряд ксантофиллов. Листья ζ-каротинового мутанта, выращенного при 25 *лк*, содержат каротиноиды только в виде ζ-каротина. Общее количество хлорофилла в листьях этого мутанта примерно в пять раз ниже, чем в нормальных листьях, соотношение хлорофиллов *а* и *б* 25 : 1. В листьях ликопинового мутанта, выращенного при 25 *лк*, обнаружены хлорофиллы *а* и *б* в соотношении 5 : 1, а каротиноиды представлены только ликопином. Пигменты в обоих мутантах быстро разрушаются при освещении светом, интенсивность которого превышает 25 *лк*.

Растения кукурузы выращивали в темноте при 28°. Для опытов использовали 8—10-дневные проростки. Этиолированные листья освещали при 20° светом лампы накаливания около 25 *лк* в течение различных интервалов времени. Такая низкая интенсивность освещения проростков была принята для предотвращения выцветания пигментов при зеленении и для замедления процесса трансформации пигментов.

Для торможения дальнейшего процесса образования пигментов листья после освещения фиксировали: зажимали между двумя пластинками из плексигласа и помещали в жидкий азот. Спектр флуоресценции измеряли на регистрирующем спектрофлуорометре при — 196° [23]. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутно-кварцевую лампу ДРШ-250 со светофильтрами ЗС-3 и ФС-6, выделяющими линии ртути 366 и 404 *ммк*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нормальный лист (рис. 1). Аналогично с данными, полученными для листьев фасоли [10], в этиолированных листьях нормальных проростков кукурузы наблюдали максимумы при 635 и 655 *ммк*, соответствующие по литературным данным [13] протохлорофиллу и протохлорофиллиду. Помимо этого, в спектре виден ряд небольших максимумов в области 672, 686, 712 и 725 *ммк*.

После кратковременного освещения (5—10 *сек*) наблюдали понижение флуоресценции при 655 *ммк* и одновременное возрастание флуоресценции при 672 и 686 *ммк*. При 30 *сек* освещения происходило значительное возрастание флуоресценции в области 675—685 *ммк*, и в этой области спектра образовывался высокий максимум, объединяющий

флуоресценцию пигментных форм 674 и 686 *ммк*. Положение максимума зависело от соотношения этих форм. В нормальных листьях чаще всего наблюдали максимумы флуоресценции 683—687 и 675 *ммк* в виде плеча.

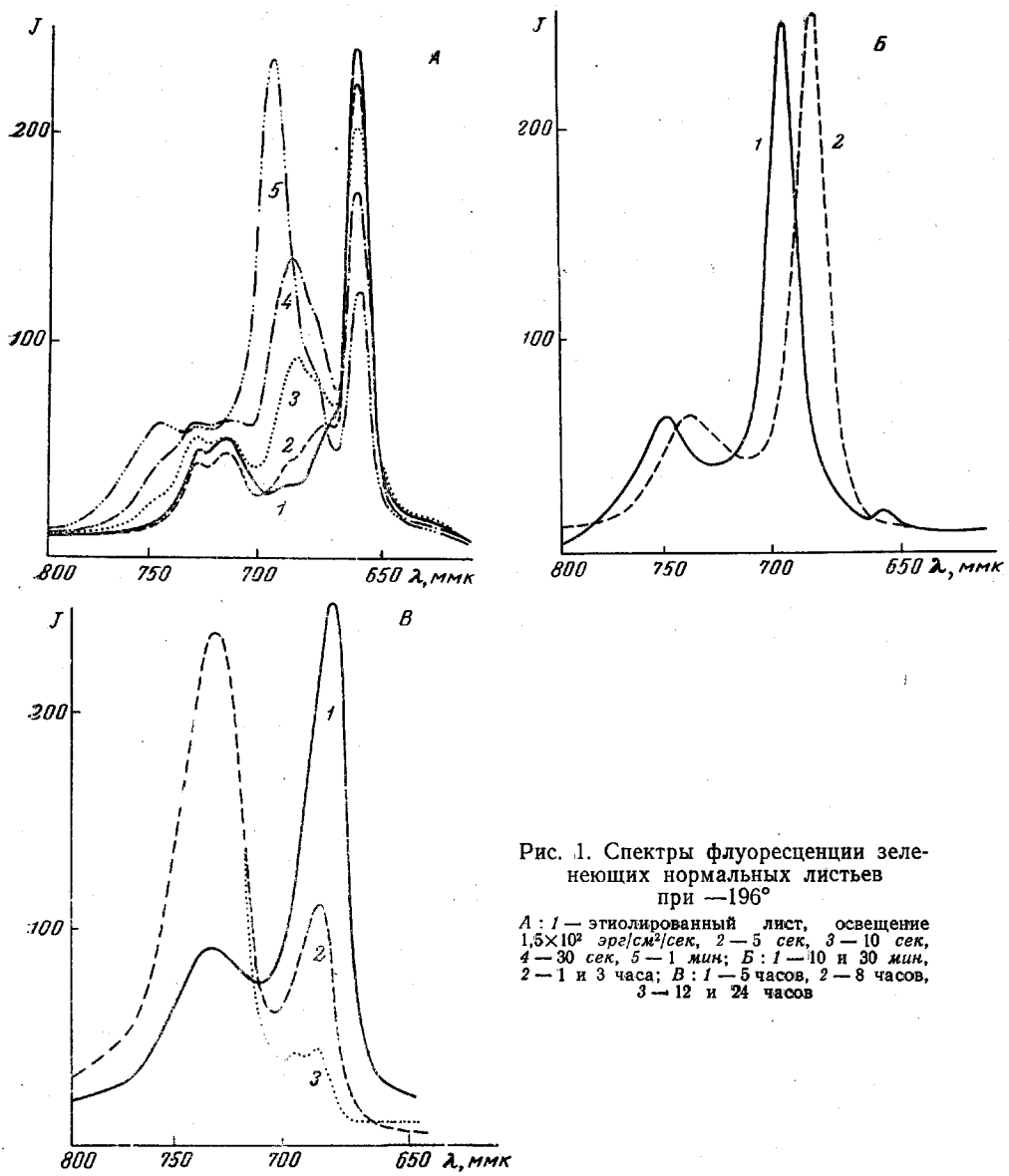


Рис. 1. Спектры флуоресценции зеленеющих нормальных листьев при —196°

А : *1* — этиолированный лист, освещение $1{,}5\times10^2$ *эрг/см²/сек*, *2* — 5 *сек*, *3* — 10 *сек*, *4* — 30 *сек*, *5* — 1 *мин*; *Б* : *1* — 10 и 30 *мин*, *2* — 1 и 3 часа; *В* : *1* — 5 часов, *2* — 8 часов, *3* — 12 и 24 часов

За минуту освещения нормальных листьев главный максимум постепенно смещался до 692 *ммк*. На этой стадии зеленения еще обнаруживался максимум в области 655 *ммк*. При дальнейшем освещении (10—30 *мин*) наблюдался максимум при 692 *ммк*, а после 1—3 часов освещения главный максимум смещался от 692 к 680 *ммк*.

Длительное освещение (5—24 часов) вызывало образование известной структуры максимумов флуоресценции [10, 14]. При этом флуоресценция в коротковольновой области постепенно понижалась и максимум перемещался от 680 до 686 *ммк* в то же время длинноволновый максимум при 735 *ммк* постепенно увеличивался. В конечном счете в нормальных листьях обнаруживались максимумы при 686, 694 *ммк* и высокий при 735 *ммк*.

Липопиновый лист (рис. 2). Спектры флуоресценции этиолированных листьев липопинового мутанта отличались от соответствующих спектров нормальных листьев только более высоким максимумом при 635 *ммк*. После 5 *сек* освещения возрастают, как в нормальных листьях, максимумы при 672 и 686 *ммк*, а после 10—30 *сек* образуется широкий максимум флуоресценции около 674—676 *ммк*.

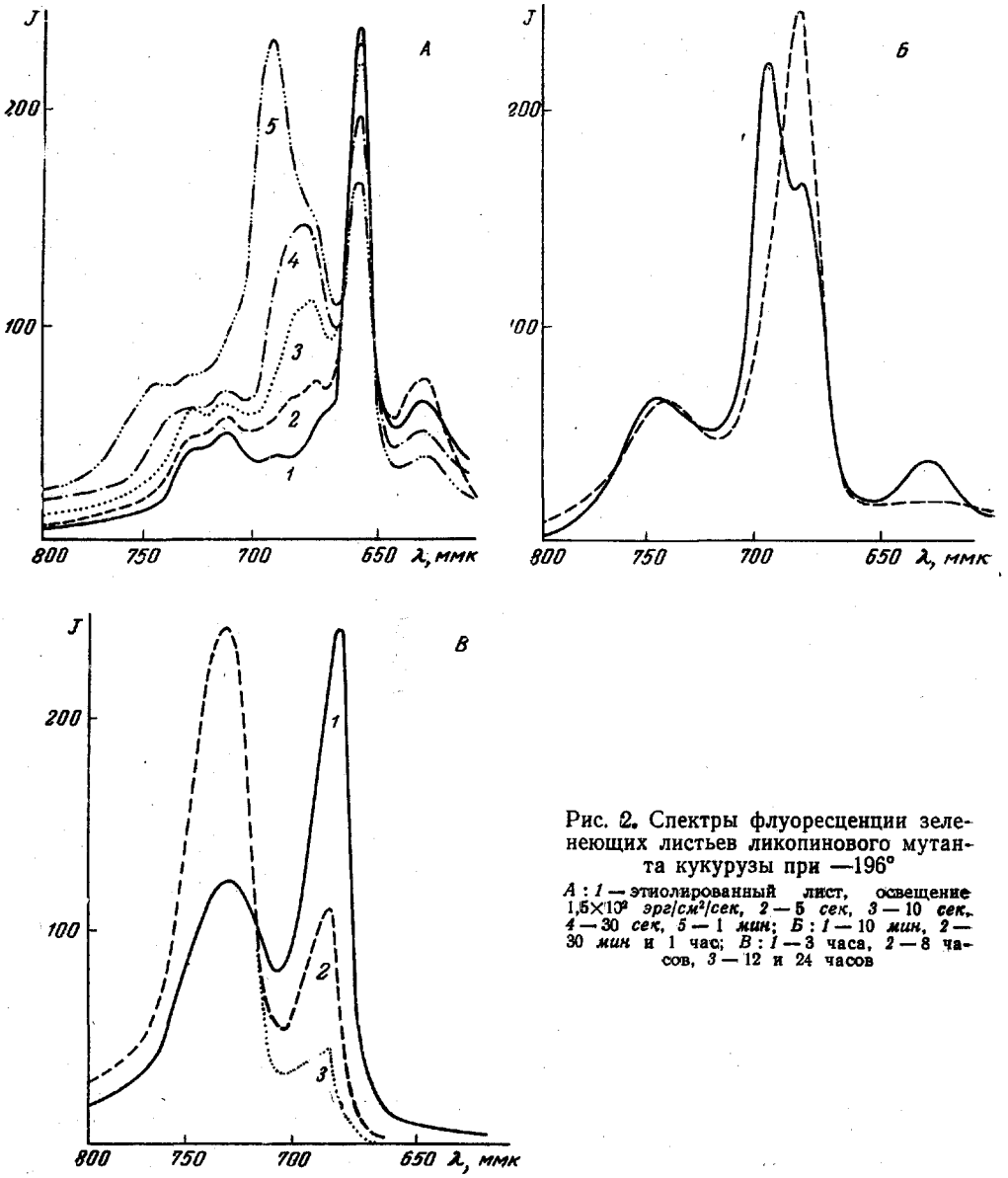


Рис. 2. Спектры флуоресценции зеленеющих листьев липопинового мутанта кукурузы при —196°

А: *1* — этиолированный лист, освещение $1{,}5 \times 10^3$ *эрг/см²/сек*, *2* — 5 *сек*, *3* — 10 *сек*, *4* — 30 *сек*, *5* — 1 *мин*; *Б*: *1* — 10 *мин*, *2* — 30 *мин* и 1 час; *В*: *1* — 3 часа, *2* — 8 часов, *3* — 12 и 24 часов

За минуту освещения липопиновых листьев максимум смещался до 687 *ммк*, а при 675 *ммк* наблюдалось большое плечо. После 10 *мин* положение главного максимума флуоресценции — 690 *ммк*, однако большое плечо видно при 680 *ммк*. Такое большое плечо в нормальных листьях не наблюдается.

При дальнейшем освещении в течение 30 *мин* и 1 часа главный максимум перемещается к 680 *ммк*, и видно расширение этого максимума

при 690 *ммк*, после 3 часов максимум при 680 *ммк* становится симметричным. В результате длительного освещения (5—24 часов) интенсивность флуоресценции при 680 *ммк* относительно уменьшается, как и в нормальных листьях. Спектр флуоресценции зеленых ликопиновых листьев очень похож на спектр флуоресценции нормальных листьев, за исключением того, что длинноволновый максимум расположен не при 735 *ммк*, а при 732 *ммк*.

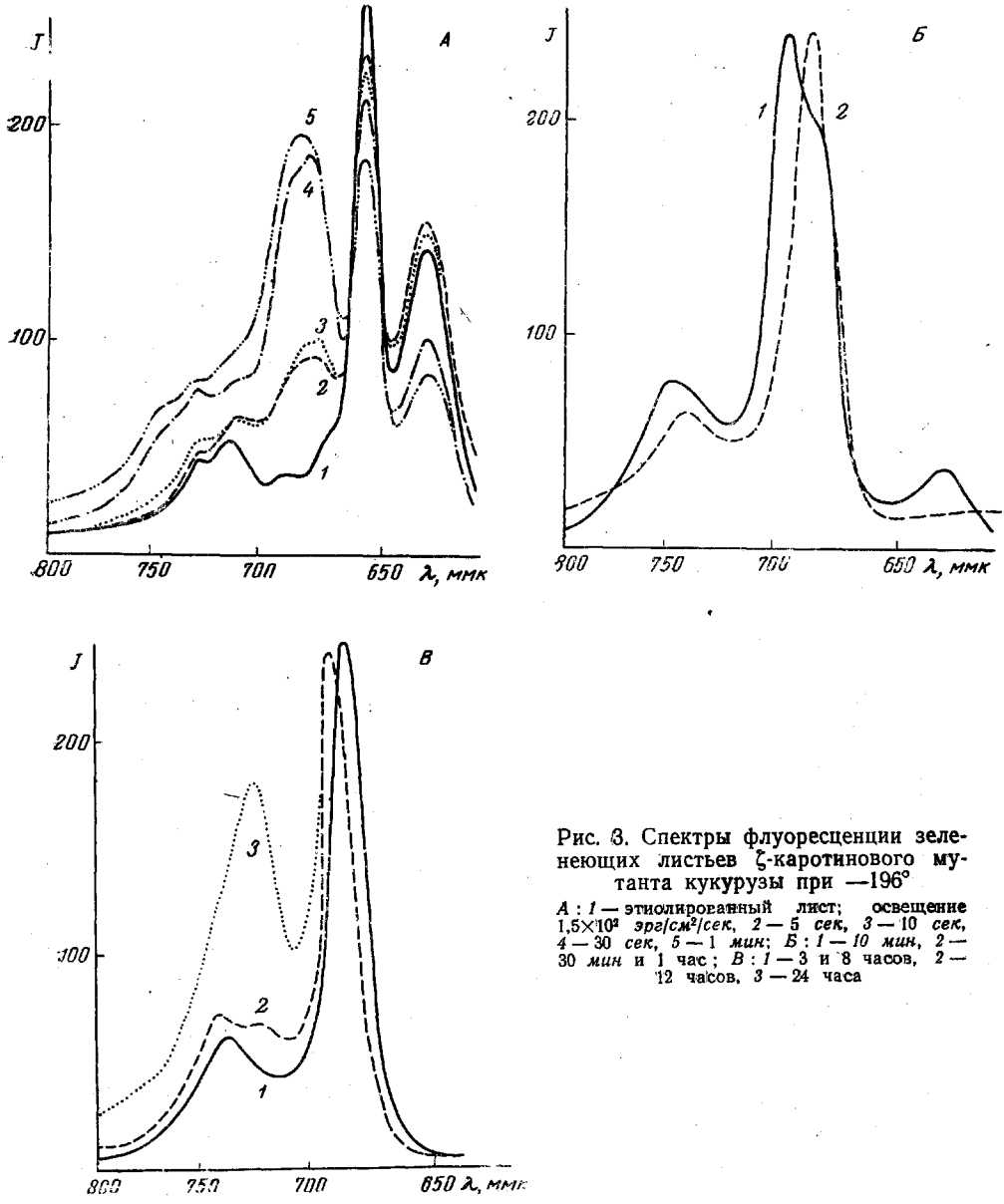


Рис. 3. Спектры флуоресценции зеленеющих листьев ζ-каротинового мутанта кукурузы при —196°

А: *1* — этиолированный лист; освещение $1{,}5\times10^2$ *эрг/см²/сек*, *2* — 5 *сек*, *3* — 10 *сек*, *4* — 30 *сек*, *5* — 1 *мин*; *Б*: *1* — *10 мин*, *2* — 30 *мин* и 1 час; *В*: *1* — 3 и 8 часов, *2* — 12 часов, *3* — 24 часа

ζ-Каротиновый лист (рис. 3). Первые этапы позеленения происходят так, как и в двух предыдущих случаях, но наблюдаемые максимумы флуоресценции обычно очень широкие, поэтому трудно определить их точное положение. После 1 *мин* освещения положение максимума флуоресценции образованного пигмента около 687 *ммк*.

Через 10 *мин* освещения главный максимум лежит при 690 *ммк*, а при 680 *ммк* наблюдали плечо такое же, как и в ликопиновых листьях. Следует отметить, что интенсивность флуоресценции при 635 *ммк* у этиолированного листа этого мутанта чрезвычайно высока и за 3 часа зеленения большой пик при 635 *ммк* полностью исчезает. Длинноволновый максимум низкотемпературной флуоресценции наблюдали при 720 *ммк*, и его образование происходит позднее, чем у ликопинового и нормального листьев.

После 12 часов освещения при 720 *ммк* виден только небольшой максимум, в то время как коротковолновый максимум расположен уже при 686 *ммк*. Интенсивность коротковолнового максимума при 686 *ммк* не уменьшается на последних стадиях зеленения, как это бывает в случае нормальных и ликопиновых листьев. В зеленых ζ-каротиновых листьях обнаруживаются примерно равные по величине максимумы при 686 и 720 *ммк*. Этот спектр заметно отличается от флуоресценции нормального листа.

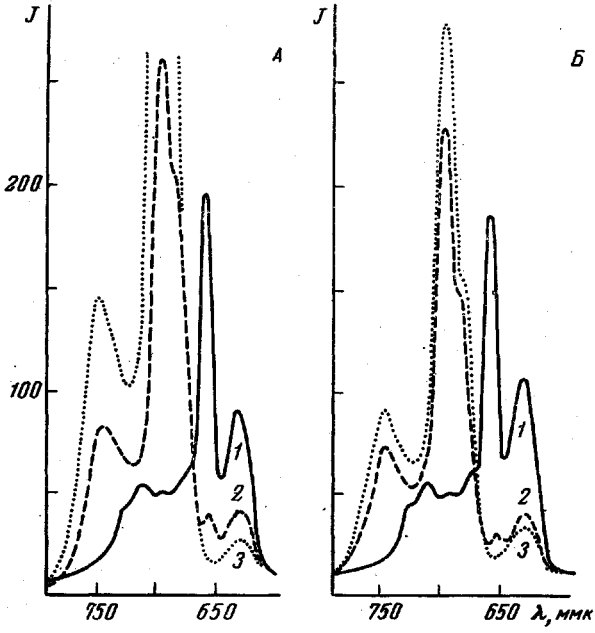


Рис. 4. Превращение формы 635 под влиянием освещения в этиолированных листьях ζ-каротинового мутанта. Спектры флуоресценции при —196°

1 — этиолированный лист, освещение $1{,}5\times10^2$ *эрг/см²/сек*, *2* — 5 *мин*, *3* — 30 *мин*; *А* — при 20° и *Б* — при 0°

У ζ-каротинового мутанта, выросшего в темноте, наблюдается особенно высокий максимум флуоресценции при 635 *ммк*. Интересно было проследить его изменения при перенесении этиолированного растения на свет. Для этого этиолированный лист ζ-каротинового мутанта делили пополам вдоль главной жилки и высекали по 2 участка (4×4 *мм*) из обеих половин на одинаковой высоте. Пробу, полученную из одной половины листа, освещали при 20 или 0° (25 *лк*), в то время как противолежащую пробу использовали как контроль. Спектры этиолированных проб получились одинаковыми. На рис. 4 видно, что и при 0 и 20° пик флуоресценции при 635 *ммк* сильно уменьшается после 5 *мин* освещения. Одновременно с уменьшением пика протохлорофилла образуется большое плечо при 680 *ммк* (и при 20°, и при 0°). При удлинении освещения до 30 *мин* процесс продолжался, однако значительно медленнее.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опыты показали, что последовательность спектральных форм пигментов на начальных стадиях зеленения мутантных листьев кукурузы не отличается от этого процесса в нормальных листьях.

В спектрах флуоресценции этиолированных листьев нормальных и мутантных растений помимо пиков при 635 и 655 *ммк* виден небольшой максимум около 686 *ммк* и плечо при 672 *ммк*. Сходную картину в листьях фасоли наблюдал ранее Литвин [15]. На основании того, что

при освещении оба эти максимума флуоресценции (686 и 672 *ммк*) возрастают, можно предположить, что в темноте эти продукты уже присутствовали в небольшом количестве. Годнев и сотр. [26], а также Реббелен [27] показали, что в темноте этиолированные листья образуют хлорофилл в ничтожном количестве. Возможно, что пики 686 и 672 *ммк* у этиолированных листьев всех видов растений обусловлены следами хлорофильных пигментов, образующихся в темноте.

При более длительном освещении оба упомянутые максимума перемещаются в длинноволновую сторону спектра (686—690 и 672—680 *ммк*). Причина перемещения пока точно не установлена. Литвин выдвинул два предположения [15]. Согласно одному из них эти сдвиги являются результатом образования промежуточных продуктов фотопревращения пигментов. Другое предположение состоит в том, что спектральные изменения связаны с конформационными изменениями пигментно-белкового комплекса.

В наших опытах превращение пигментов при зеленении нормальных и мутантных листьев кукурузы всегда шло через форму с максимумом флуоресценции 690 *ммк*. При наших условиях освещения в зеленеющих проростках фасоли также всегда присутствовала форма с максимумом при 690 *ммк*. Отсутствие этой формы, наблюдающееся в ряде случаев [15], можно объяснить тем, что вследствие весьма низкой интенсивности света при зеленении все немногочисленные образующиеся молекулы пигмента успевают превратиться в форму с максимумом флуоресценции 675—680 *ммк*, которая после 30—60 *мин* зеленения, безусловно, представляет собой хлорофилл.

Сдвиг максимума флуоресценции от 690 до 680 *ммк* связан с фитолизацией хлорофиллида. Это подтверждается тем, что в случае ингибирования фитолизации этот переход не происходит [24]. С увеличением концентрации хлорофилла максимум при 680 *ммк* перемещается к 686 *ммк*. Возможно, что это явление вызывается реабсорбцией, однако, может быть, имеется и другая причина, например появление новых форм хлорофилла [28].

На последней стадии зеленения количество молекул хлорофилла на ламеллах хлоропластов настолько велико, что начинается их агрегация [14]. В нормальных листьях в результате агрегации образуется максимум флуоресценции (при —196°) в области 735 *ммк*. В ликопиновом мутанте, как это следует из спектров флуоресценции, степень агрегации хлорофилла только незначительно отличается от нормы. В ζ-каротиновом мутанте степень агрегации ниже, чем в нормальном или ликопиновом листе. В спектрах зеленых ζ-каротиновых листьев кроме максимума при 720 *ммк* видно расширение или плечо при 735 *ммк*. Это можно объяснить тем, что и в этом мутанте образуются агрегаты, сходные со структурами в нормальных листьях, однако их меньше. Форма 694 *ммк* в ζ-каротиновом мутанте отсутствует.

Хотя процесс зеленения этиолированных листьев уже был исследован многими авторами, вопрос о фотопревращении формы 635 до сих пор полностью не решен. Главной причиной этого является то, что в нормальных этиолированных листьях большинства растений флуоресценция при 635 *ммк* весьма низка. В этиолированных листьях ζ-каротинового мутанта кукурузы этот максимум относительно высок, что позволило изучить свойства этой формы и показать быстрое понижение максимума 635 *ммк* при освещении с одновременным возрастанием флуоресценции при 680 *ммк*.

На основе полученных результатов схему процесса зеленения этиолированных листьев можно представить следующим образом:

$$\begin{array}{l} 655 \xrightarrow{h\nu} 690 \\ \qquad\quad \downarrow \\ 635 \xrightarrow{h\nu} 680 \rightarrow 686 \rightarrow \text{агрегированные формы хлорофилла} \end{array}$$

Спектральные различия, которые появляются в начале процесса зеленения, возникают от разного соотношения форм пигментов с максимумом флуоресценции 635 и 655 *ммк* в этиолированных нормальных и мутантных листьях. Поэтому в нормальных листьях, где пик при 655 *ммк* очень высок, а при 635 *ммк* небольшой, при освещении образуется форма 690 *ммк*, в то время как в мутантах, где интенсивность флуоресценции при 635 *ммк* гораздо выше, чем у нормальных листьев, помимо пика при 690 *ммк* очень большое плечо (иногда даже максимум) появляется при 680 *ммк*.

Исходя из результатов, можно считать, что процесс зеленения в обоих мутантах не отличается от этого процесса в нормальных растениях, а различия в состоянии пигментов проявляются лишь в конце, когда происходит агрегации молекул хлорофилла. В ликопиновом и особенно в ζ-каротиновом мутанте степень агрегации меньше, чем в нормальных листьях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **85**, 177, 1952
2. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия, **25**, 168, 1960
3. Boardman N. K., Biochim. et biophys. acta, **64**, 279, 1962
4. Koski V. M., French C. S., Smith J. H. C., Arch. Biochem. and Biophys., **31**, 1, 1951
5. Smith J. H. C., Benitez A., Plant Physiol., **29**, 135, 1954
6. Smith J. H. C., Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems, Ed. M. B. Allen., p. 257, Acad. Press, N. Y. and London, 1960
7. Virgin H. I., Physiol. Plantarum, **11**, 347, 1958
8. Доман Н. Г., Красновский А. А., Романова А. К., Воробьева Л. М., Пашкина Е. В., Терентьева З. А., Физиол. растений, **8**, 3, 1961
9. Loeffler J. E., Carnegie Inst. Wash. Yearbook, **54**, 159, 1955
10. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **117**, 106, 1957
11. Shibata K., J. Biochem. (Japan), **44**, 147, 1957
12. Meister A., Photosynthetica, **1**, 149, 1967
13. Красновский А. А., Быстрова М. И., Сорокина А. Д., Докл. АН СССР, **136**, 1227, 1961
14. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР, **135**, 1528, 1960
15. Литвин Ф. Ф., Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 96, «Наука», М., 1965
16. Годнев Т. Н., Акулович Н. К., Орловская К. И., Раскин В. И., Докл. АН СССР, **179**, 465, 1968
17. Granick S., The Cell, Ed. J. Brachet and A. E. Mirsky. v. 2. p. 489, Acad. Press. N. Y. and London, 1961
18. Faludi-Dániel Á., Fridvalszky L., Gyurján I., Planta, **78**, 184, 1968
19. Smith J. H. C., Durham L. J., Wurster C. F., Plant. Physiol., **34**, 340, 1959
20. Shlyk A. A., Fradkin L. I., Savchenko G. E., Faludi-Dániel Á., Photosynthetica, **1**, 241, 1967
21. Faludi-Dániel Á., Láng F., Fradkin L. I., Biochemistry of Chloroplasts, Ed. T. W. Goodwin, v. 1, p. 269. Acad. Press, N. Y., 1966
22. Faludi-Dániel A., H. Nagy A., Nagy A., Acta bot. Acad. scient. Hung., **14**, 17, 1968
23. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика, № 6, 392, 1961
24. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А., Биохимия, **28**, 524, 1963
25. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Физиол. растений, **13**, 929, 1966
26. Годнев Т. Н., Ротфарб Р. М., Бюл. Ин-та биологии АН БССР за 1957 г., вып. 3, стр. 85, Минск, 1958
27. Röbbelen G., Planta, **47**, 532, 1956
28. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР, **169**, 1187, 1966

Поступила в редакцию
5.VI.1968

STUDY OF THE GREENING OF ETIOLATED MUTANTS OF MAIZE

F. LANG, L. M. VOROB'EVA and A. A. KRASNOVSKII

Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The method of measuring fluorescence spectra at —196° was used to investigate greening of etiolated leaves of normal and mutant maize plants which contain carotenoids like lycopene or ζ-carotene. The spectral pattern of succession of the pigment forms at the initial steps of greening in mutants corresponded to the process described for the normal leaves. In contrast to normal leaves, changes which lead to the changes in fluorescence spectra of the mutants at —196° occur toward the end of greening and depend on different packing of chlorophyll molecules in the aggregated structures of protein-pigment complex. The authors demonstrated rapid phototransformation of the pigment form with maximum at 635 *m*μ into the form with maximum at 680 *m*μ during exposure of etiolated leaves of ζ-carotenis mutant .The succession of the fluorescent forms during greening corresponds to the scheme:

$$635\ m\mu \xrightarrow{h\nu} 680\ m\mu \rightarrow 686\ m\mu \rightarrow \text{aggregated forms of chlorophyl}$$

$$655\ m\mu \xrightarrow{h\nu} 690\ m\mu$$

Spectral differences at the initial steps of greening depend on the ratio of the forms «635» and «655» in etiolated leaves.

БИОФИЗИКА

Том XIV, вып. 2 1969

ИЗМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ МУТАНТНЫХ И НОРМАЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Ф. ЛАНГ, Л. М. ВОРОБЬЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В работе установлено, что освещение при —196° этиолированных и зеленеющих листьев нормальных и мутантных растений кукурузы приводит к быстрому выцветанию пигментных форм с максимумами низкотемпературной флуоресценции 655 и 690 *ммк*, формы 635 и 680 *ммк* относительно более стабильны. Наибольшей устойчивостью к освещению обладают агрегированные формы хлорофилла с максимумом низкотемпературной флуоресценции 735 *ммк* в нормальных и «ликопиновых» листьях и при 720 *ммк* в листьях ζ-каротинового мутанта. Освещение зеленых листьев нормальных и мутантных растений в присутствии воздуха при комнатной температуре приводит к деструкции хлорофилла путем фотоокисления, сопровождающегося падением интенсивности флуоресценции, измеряемой при 20°. Скорость выцветания пигментов соответствует ряду: листья ζ-каротинового мутанта — листья ликопинового мутанта — листья нормальных растений (соответственно 60, 30, 12% понижения интенсивности флуоресценции в максимуме 686 *ммк* за 1 *мин* освещения). В результате освещения зеленых листьев нормальных и мутантных растений в отсутствие воздуха при комнатной температуре происходит необратимое возрастание интенсивности флуоресценции, измеряемой при 20°; в спектре низкотемпературной флуоресценции наблюдается возрастание коротковолнового «мономерного» максимума с одновременным падением длинноволнового «агрегированного». Наблюдаемые спектральные изменения могут быть объяснены необратимой фотодезагрегацией длинноволновых форм хлорофилла. Фотодезагрегация зависит от типа связей молекул пигмента в агрегированных структурах. У ζ-каротинового мутанта наблюдается до 100% возрастания интенсивности флуоресценции в результате освещения листьев в вакууме при комнатной температуре, у ликопинового мутанта до 40—50%, у нормальных листьев до 20—30% исходной величины. Фотодезагрегация хлорофилла в результате освещения листьев в присутствии воздуха при комнатной температуре сопровождается фотоокислением образующегося мономера.

Хлорофилл на ламеллах хлоропластов находится в различных состояниях агрегации и связи с белками и липоидами. Формы хлорофилла отличаются друг от друга по своим спектральным, фотохимическим свойствам и участию в фотосинтезе [1—6]. Фотостабильность нативного хлорофилла гораздо выше, чем молекул пигмента в органических растворителях. Однако при освещении интенсивным светом зеленых листьев, хлоропластов или гомогенатов часть нативного хлорофилла тоже разрушается. Свежеобразованный в этиолированных листьях пигмент по фотохимическим свойствам приближается к растворам хлорофилла в органических растворителях и при освещении выцветает полностью; по мере накопления хлорофилла в процессе зеленения его фотоустойчивость быстро возрастает [1, 2].

При освещении клеток хлореллы сильным светом наблюдалось, что форма хлорофилла *a* с поглощением при 683 *ммк* чувствительнее к свету, чем формы 673 и 695 *ммк* [7]. Хлорофилл *b* всегда медленнее выцветает, чем хлорофилл *a* [7, 8]. В начале освещения был обнаружен индукционный период, когда разрушение пигментов происходит медленно.

Выцветание идет с большой скоростью только в присутствии кислорода, в атмосфере азота значительного уменьшения поглощения хлорофилла не происходило [9]. Во время выцветания было замечено изменение спектра поглощения хлорофилла in vivo — обычно главный максимум перемещается в коротковолновую область.

Коротковолновые «мономерные» формы в хлоропластах и листьях зеленых растений выцветают скорее, чем длинноволновые агрегированные [10, 11].

В литературе описано много мутантов, теряющих полностью фотосинтетические пигменты при освещении нормальным светом [12—14]. Эти мутанты, вследствие большой светочувствительности хлорофилла, являются особенно интересными объектами для изучения процесса и механизма выцветания пигментов.

В настоящей работе мы систематически исследовали фоточувствительность разных форм хлорофилла, образующихся в процессе зеленения в нормальных и мутантных листьях кукурузы методом измерения спектров флуоресценции при —196° С и комнатной температуре.

Методика и материал

Для опытов использовали этиолированные и зеленеющие листья нормальных и пигментных мутантов кукурузы [15, 16]. В изученных пигментных мутантах состав каротиноидов сильно отличается от нормы. Один из них содержит только ζ-каротин, а другой только ликопин. Мутантные растения очень чувствительны к свету, при обычной интенсивности света пигменты в них быстро выцветают, особенно в ζ-каротиновом мутанте.

Этиолированные растения выращивали в темноте при 28°. 8—10-дневные проростки освещали лампой накаливания (25 *лк* = $1{,}5 \cdot 10^2$ *эрг/см²/сек*) различные интервалы времени. После освещения этиолированные листья зажимали между двумя пластинками из плексигласа и помещали в стеклянный сосуд Дьюара с жидким азотом.

Спектры флуоресценции листьев измеряли на регистрирующем спектрофлуорометре [17]. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутно-кварцевую лампу ДРШ-250 со светофильтрами ЗС-3 и ФС-6, пропускающими линии ртути 366 и 404 *ммк*.

Светочувствительность различных форм хлорофилла, образующихся в процессе зеленения, изучали путем освещения проростков светом высокой интенсивности ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек*) в жидком азоте. Замороженные листья после измерения спектра флуоресценции, не изменяя их положения, освещали ртутно-кварцевой лампой ДРШ-250 без светофильтра различные интервалы времени, после каждого периода освещения записывали спектр флуоресценции.

Изменения в спектрах флуоресценции в результате освещения интенсивным светом зеленых листьев нормальных и мутантных растений, выращенных при 25 *лк*, исследовали при комнатной температуре на воздухе и в вакууме. Процесс выцветания пигментов в зеленых листьях при комнатной температуре в присутствии воздуха наблюдали по уменьшению флуоресценции и поглощения. Спектр поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-10, помещая кювету с листьями в интегрирующую сферу. В случае измерения выцветания по поглощению интенсивность света была меньше ($\sim 5 \cdot 10^5$ *эрг/см²/сек*). При опытах в вакууме листья помещали в вакуумную трубку и в присутствии небольшого количества воды для предотвращения высыхания листа удаляли воздух с помощью масляного вакуумного насоса в течение 15 *мин*. Удаление воздуха в опытах с измерением поглощения достигали намазыванием на поверхность листа перед помещением в кювету слоя глицерина. Условия освещения листьев в вакууме были такие же, как в предыдущих опытах ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек*).

Результаты исследований

Выцветание зеленеющих листьев в жидком азоте (—196°). Кинетика выцветания пигментов в нормальных листьях в процессе зеленения видна на рис. 1.

В этиолированных листьях пик при 655 *ммк* под влиянием интенсивного освещения, несмотря на низкую температуру (—196°), быстро выцветал. После 5 *мин* освещения в жидком азоте интенсивность флуоресценции при 655 *ммк* уменьшалась на 35% от исходной величины, в то время как интенсивность флуоресценции при 635 *ммк* изменялась только в ничтожной мере. За 1 *мин* зеленения этиолированных листьев при 25 *лк* образуется пигмент, обладающий максимумом при 692 *ммк*. Этот пигмент выцветал так же быстро, как «форма» 655 *ммк*.

После 30 *мин* зеленения при 25 *лк* появлялось два максимума — при 680 и 692 *ммк*. Максимум при 680 *ммк* под влиянием интенсивного освещения постепенно уменьшался. Интересно отметить, что скорость его выцветания больше, чем пика при 635 *ммк*. Максимум при 690 *ммк* в этом случае выцветал медленнее, чем обычно, вероятно, вследствие того, что в данном случае флуоресценция при 690 *ммк* в значительной степени определялась формой 680 *ммк*. После 24 *час* зеленения листья были уже зелеными, в спектре флуоресценции появлялись максимумы при 686, 694, 735 *ммк*. Хотя все эти максимумы принадлежат хлорофиллу, они отличались друг от друга по светочувствительности. Пики при 686 и 694 *ммк* гораздо быстрее выцветали, чем пик при 735 *ммк*.

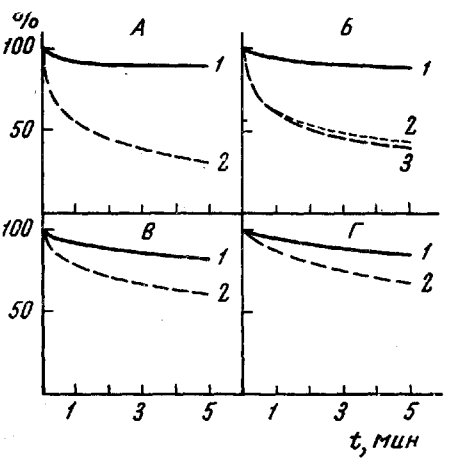


Рис. 1. Понижение интенсивности максимумов низкотемпературной флуоресценции пигментов зеленеющих листьев нормальных и мутантных растений кукурузы в результате выцветания при —196° ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²сек*)

А — этиолированный лист: *1* — 635; *2* — 655 *ммк*; *Б* — 1 *мин* зеленения: *1* — 635; *2* — 690; *3* — 655 *ммк*; *В* — 30 *мин* зеленения: *1* — 680; *2* — 690 *ммк*; *Г* — 24 *час* зеленения: *1* — 735; *2* — 686 *ммк*

В мутантных листьях светочувствительность различных форм хлорофилла не отличалась от нормальных листьев при освещении в жидком азоте.

Спектральные изменения зеленеющих листьев под влиянием интенсивного освещения в жидком азоте видны на рис. 2. По спектрам хорошо видно, что формы 655 и 690—692 *ммк* быстрее выцветают, чем формы 635, 680 *ммк* в зеленеющих и формы 686, 694 и 735 *ммк* в зеленых листьях. Более быстрое выцветание форм 655 и 690 *ммк* в жидком азоте наблюдали также в опытах с зеленеющими листьями фасоли.

Освещение зеленых листьев нормальных и мутантных растений интенсивным светом при комнатной температуре. Изменения в спектрах поглощения (рис. 3). Главный красный максимум поглощения хлорофилла *а* в нормальных листьях расположен при 678 *ммк*, при 652 *ммк* наблюдается плечо, соответствующее поглощению хлорофилла *b*. В коротковолновой области спектра максимумы 420, 440 и 485 *ммк* обусловлены каротином, ксантофиллом и хлорофиллами. Освещение интенсивным светом ($5 \cdot 10^5$ *эрг/см²/сек*) в присутствии воздуха вызывало небольшое уменьшение во всех максимумах поглощения нормальных листьев (рис. 3).

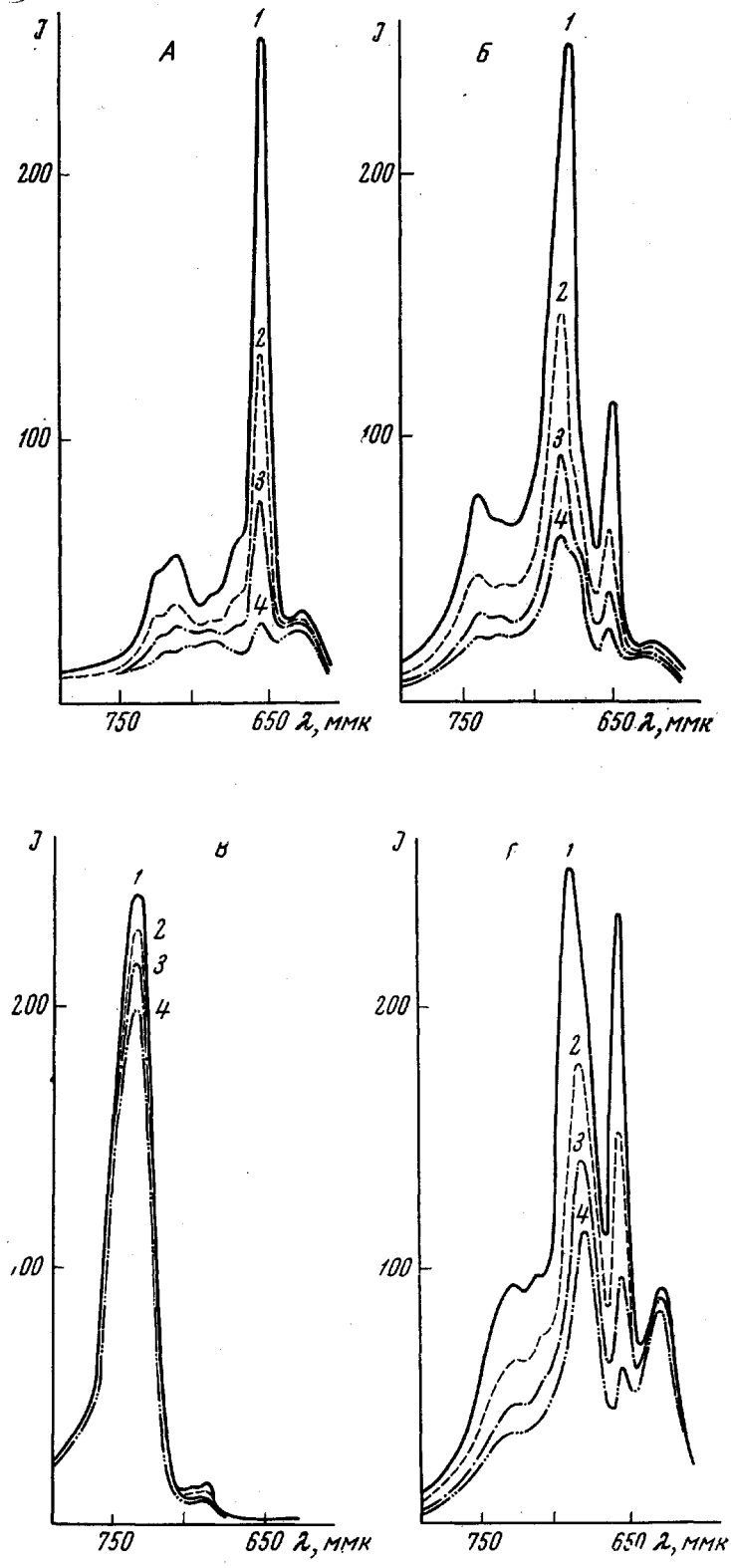

J
А
1
200
100
2
3
4
750
650 λ, ммк
J
Б
1
200
2
3
4
100
750
650 λ, ммк
J
В
1
2
3
4
200
100
750
650 λ, ммк
J
Г
1
200
2
3
4
100
750
650 λ, ммк

Рис. 2 (*А—Г*)

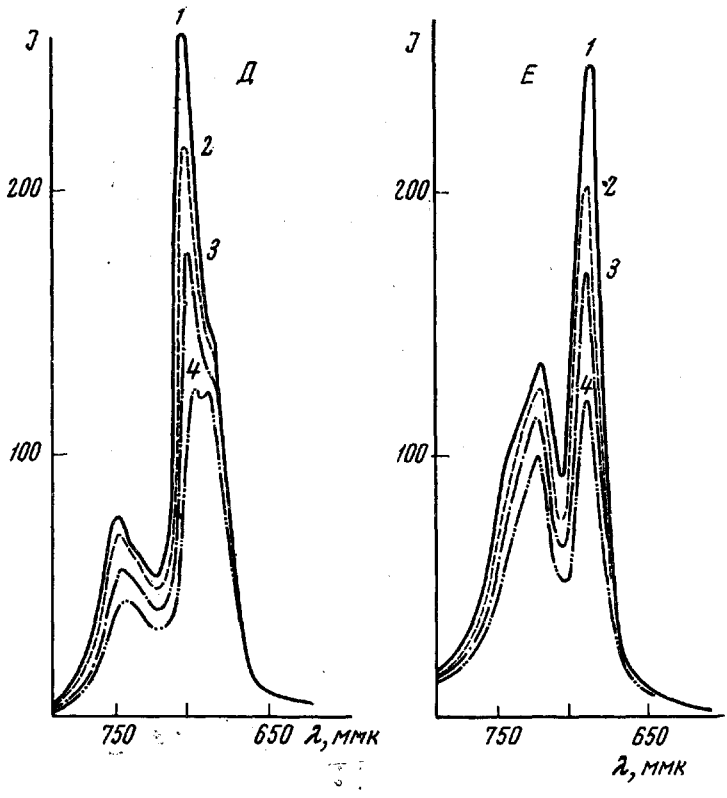


Рис. 2. Изменение спектров низкотемпературной флуоресценции при освещении нормальных и мутантных листьев кукурузы при —196° ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²сек*)

А, Б, В — нормальные растения: *А* — этиолированный лист; *Б* — 1 *мин* зеленения; *В* — 24 *час* зеленения; *Г, Д, Е* — ζ-каротиновый мутант: *Г* — 1 *мин* зеленения; *Д* — 30 *мин* зеленения; *Е* — 24 *час* зеленения; *1*— исходный спектр; *2*— 1 *мин*, *3*— 5 *мин*, *4*— 30 *мин* освещения

Главный максимум хлорофилла *а* в ζ-каротиновых листьях расположен также при 678 *ммк*, однако, вследствие того, что в ζ-каротиновых листьях отношение хлорофилла *b* к *а* в 6 раз меньше, чем в нормальных, в спектре поглощения отсутствует плечо при 652 *ммк*. Вид спектра поглощения ζ-каротинового листа в коротковолновой области определяется наличием ζ-каротина и сильно отличается от нормального. В спектре наблюдали два максимума поглощения при 410 и 440 *ммк* и плечо при 470 *ммк*.

При освещении ζ-каротиновых листьев в присутствии воздуха интенсивным светом ($5 \cdot 10^5$ *эрг/см²/сек*) происходило быстрое разрушение пигментов, поглощение резко падало по всему спектру и после 30 *мин* освещения оставалось только 10% от исходного поглощения в красном максимуме,— лист обесцвечивался. По мере выцветания наблюдалось постепенное перемещение длинноволнового максимума 678 *ммк* в коротковолновую сторону до 674 *ммк* за 10 *мин*. Освещение в отсутствие воздуха вызывало небольшое уменьшение поглощения.

Уменьшение поглощения при освещении в отсутствие воздуха происходило, по-видимому, за счет небольшого количества имеющегося в листьях кислорода, так как опыты с измерением поглощения проводили без удаления воздуха с листьями, покрытыми слоем глицерина, затрудняющим новое поступление воздуха.

Изменения в спектрах флуоресценции при выцветании пигментов в присутствии воздуха. Изменение интенсивности флуоресценции при выцветании на воздухе видно на рис. 4.

При освещении нормальных листьев интенсивным светом флуоресценция медленно уменьшалась. В ликопиновых листьях флуоресценция быстро падала в начале освещения, но после 2 *мин* процесс замедлялся. Особенно быстро выцветает ζ-каротиновый мутант. Уже в первые секунды освещения листьев интенсивность их флуоресценции понижалась наполовину. После 5 *мин* освещения оставалось только 15% исходной флуоресценции. Спектральные изменения во время выцветания на воздухе видны на рис. 5.

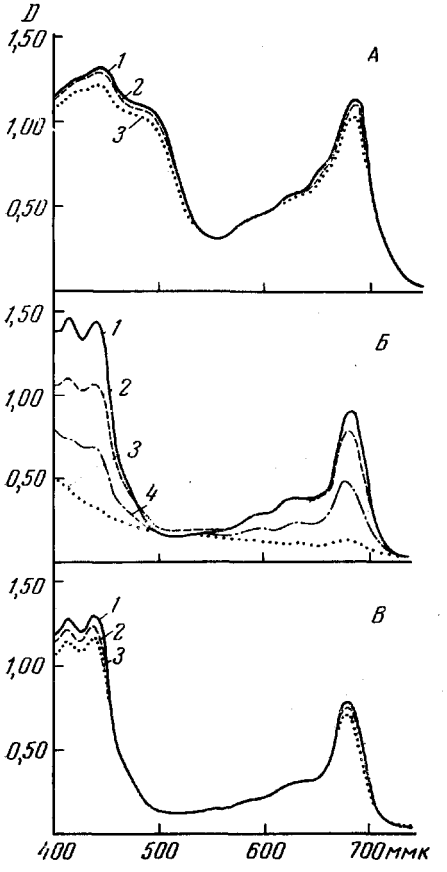


Рис. 3. Изменения спектров поглощения зеленых листьев нормальных и мутантных растений кукурузы в результате выцветания при 20° С ($5 \cdot 10^5$ *эрг/см²сек*)

А — нормальный лист в присутствии воздуха: *1* — исходный спектр; *2* — 5 *мин* освещения; *3*—30 *мин* освещения; *Б* — лист ζ-каротинового мутанта в присутствии воздуха; *1*— исходный спектр; *2*— 5 *мин*; *3* — 30 *мин*; *4* — 10 *мин* освещения; *В* — лист ζ-каротинового мутанта в отсутствие воздуха: *1* — исходный спектр, *2* — 5 *мин*, *3*— 30 *мин* освещения

При комнатной температуре зеленые листья кукурузы имеют два пика флуоресценции — при 686 и 735 *ммк*. Положение максимумов в нормальных и ликопиновых листьях не изменяется во время выцветания, в то время как в ζ-каротиновом мутанте при освещении интенсивным светом максимум сразу перемещается от 686 до 680 *ммк*. Ранее сходное явление наблюдалось при выцветании пигментов в зеленеющих листьях фасоли и объяснялось уменьшением реабсорбции [11].

Дезагрегация хлорофилла при освещении зеленых листьев в вакууме. При освещении зеленых листьев светом высокой интенсивности в вакууме интенсивность флуоресценции постепенно и необратимо увеличивалась (рис. 4). У нормальных листьев заметное увеличение происходило уже после 1—2 *мин* освещения, после этого возрастание флуоресценции замедлялось. Величина увеличения флуоресценции в нормальных листьях обычно не больше, чем 20—30%. При освещении в вакууме коротковолновый максимум, расположенный при 686 *ммк*, увеличивался интенсивнее, чем длинноволновый при 735 *ммк*. То же явление было видно у ликопинового мутанта, где увеличение флуоресценции достигало 40—50% исходной интенсивности. В начале освещения (до 1—1,5 *мин*) увеличение флуоресценции ликопинового листа происходило очень медленно, после 2 *мин* процесс шел интенсивнее.

У ζ-каротиновых листьев под влиянием интенсивного освещения в вакууме наблюдали особенно большое увеличение флуоресценции. В этом случае флуоресценция после освещения в течение 10—20 *мин* была в два раза выше, чем перед освещением. Интересно, что длинноволновый максимум у ζ-каротиновых листьев увеличивался интенсивнее, чем коротковолновый. Возможно, это является следствием реабсорбции коротковолнового максимума флуоресценции.

С целью изучения механизма выцветания измеряли спектр флуоресценции ζ-каротинового листа при комнатной и низкой температуре до и

после освещения сильным светом при комнатной температуре в вакууме. Зеленые листья ζ-каротинового мутанта разделяли пополам вдоль главной жилки и из каждой половины брали куски (4·4 *мм*), лежащие на

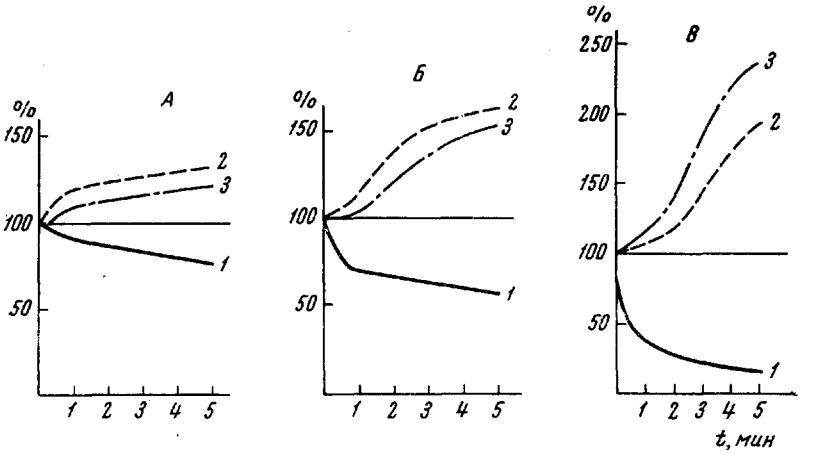


Рис. 4. Изменение интенсивности максимумов флуоресценции (20°С) при освещении зеленых листьев нормальных и мутантных растений при комнатной температуре в присутствии воздуха (*1*) и в вакууме (*2,3*)
А — нормальный лист; *Б* — лист ликопинового мутанта; *В* — лист ζ-каротинового мутанта.
1 — 686, *2* — 686, *3* — 735 *ммк*

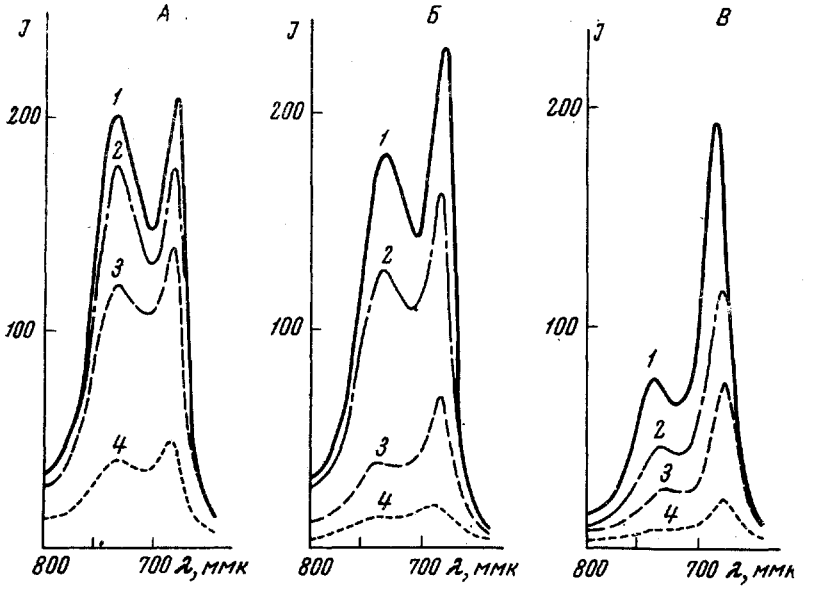


Рис. 5. Изменение спектров флуоресценции (20°С) при освещении нормальных и мутантных листьев в присутствии воздуха ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²сек*)
А — нормальный лист; *Б* — ликопиновый лист: *1* — исходный спектр, *2* — 1, *3* — 10, *4* — 30 *мин* освещения; *В* — ζ-каротиновый лист: *1* — исходный спектр, *2* — 15 *сек*, *3* — 1 *мин*, *4* — 5 *мин* освещения

одном и том же уровне. Один кусок помещали в вакуумную трубку и измеряли спектр флуоресценции при комнатной температуре в отсутствие воздуха, освещали светом высокой интенсивности в течение 30 *мин* и после возрастания флуоресценции снова измеряли спектр при комнатной температуре, а затем, не изменяя положения объекта, при —196°. Противолежащий кусок листа использовали как контроль, измеряли его

спектр флуоресценции при комнатной и низкой температуре без интенсивного освещения. Результаты показаны на рис. 6.

Как видно на рис. 6, перед освещением спектр флуоресценции при комнатной температуре в обоих кусках листа был одинаковым. Под влиянием освещения при комнатной температуре ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек*) интенсивность флуоресценции сильно возрастала. В низкотемпературных

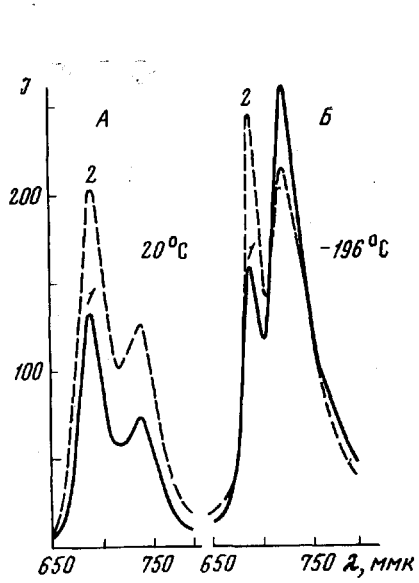


Рис. 6

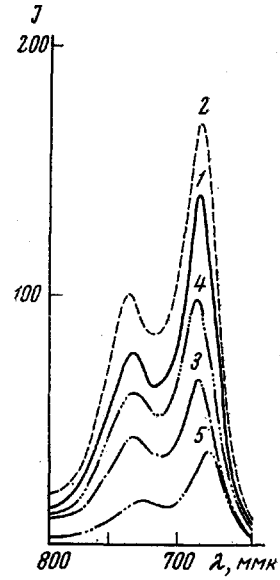


Рис. 7

Рис. 6. Фотодезагрегация хлорофилла при освещении листьев ζ-каротинового мутанта в вакууме при комнатной температуре ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²сек*)

Спектр флуоресценции при 20° (*А*) и при —196°С (*Б*): *1* — неосвещенный лист в вакууме, *2* — 30 *мин* освещения

Рис. 7. Фотодезагрегация и выцветание хлорофилла в листьях ζ-каротинового мутанта кукурузы при чередовании освещения ($5 \cdot 10^6$ *эрг/см²сек*) в вакууме и на воздухе

1 — исходный спектр флуоресценции (20°С); *2* — 2 *мин* освещения в вакууме; *3* — 30 *сек* освещения в присутствии воздуха; *4* — 3 *мин* освещения в вакууме; *5* — 3 *мин* освещения на воздухе

спектрах флуоресценции ζ-каротиновых листьев после освещения при комнатной температуре происходили изменения, характерные для дезагрегации хлорофилла. В спектре контрольного куска листа (без освещения) при —196° видны два максимума, при 686 и 720 *ммк*. Интенсивность пика флуоресценции при 720 *ммк* сильно превышала максимум 686 *ммк*. Низкотемпературный спектр флуоресценции листьев, освещенных при комнатной температуре в вакууме, сильно отличался от контроля. После освещения длинноволновый максимум при 720 *ммк* падал, в то время, как пик при 686 *ммк* сильно увеличивался и становился выше пика 720 *ммк*. Дезагрегированный хлорофилл быстро выцветал на свету при пуске воздуха, однако последующее освещение в вакууме вновь приводило к повторному возрастанию флуоресценции (рис. 7).

В отдельных опытах с помощью светофильтров мы попытались выяснить спектральную область, вызывающую увеличение интенсивности флуоресценции. Результаты проведенных опытов свидетельствуют о том, что действующими являются области спектра, где интенсивно поглощает хлорофилл. ИК-свет длиннее 720 *ммк* и УФ-свет короче 400 *ммк* не вызывали возрастания флуоресценции при освещении зеленых листьев в вакууме при комнатной температуре.

Обсуждение результатов

Большая светочувствительность пигментов на начальных стадиях образования хлорофилла ранее наблюдалась при освещении листьев и гомогенатов фасоли на разных стадиях зеленения [1—3, 11]. В данной работе при освещении зеленеющих листьев кукурузы и фасоли интенсивным светом при —196° наблюдалось более быстрое понижение максимумов флуоресценции 655 и 690 *ммк*. С точки зрения принятых в настоящее время в литературе представлений эти результаты можно объяснить тем, что бесфитольные формы пигментов фотохимически более лабильны при освещении, чем обладающие фитольным остатком. Необходима проверка посредством хроматографического разделения пигментов на ранних стадиях зеленения этиолированных растений, обладающих различным соотношением протохлорофиллида и протохлорофилла. В настоящее время мы можем только утверждать, что в зеленеющих листьях есть два типа спектральных форм, различающихся ориентацией и связями молекул пигмента в нативном комплексе: 655—690 и 635—680 *ммк*. Формы 655 и 690 *ммк* отличаются высокой фотолабильностью, формы 635 и 680 *ммк* относительно более стабильны. Есть предположение, что формы 655 и 690 *ммк* являются агрегированными в отличие от мономерных 635 и 680 *ммк* [19], однако, обычно агрегированные формы характеризуются устойчивостью к действию света.

На последних этапах зеленения этиолированных проростков происходит агрегация молекул пигмента. Агрегированная форма хлорофилла при —196° обладает максимумами флуоресценции при 735 *ммк* в нормальных, 732 *ммк* в ликопиновых и 720 *ммк* в ζ-каротиновых листьях. При освещении листьев в жидком азоте интенсивность длинноволновых пиков понижалась гораздо меньше, чем мономерного максимума при 686 *ммк*. Это еще раз свидетельствует в пользу того, что агрегация защищает хлорофилл in vivo от фотодеструкции. Ранее особая лабильность коротковолнового максимума 686 *ммк* была обнаружена при выцветании пигментов зеленых листьев при —196° [20] и в условиях комнатной температуры с последующим измерением флуоресценции при —196° [10].

Освещение зеленых листьев нормальных и мутантных растений в присутствии воздуха при комнатной температуре приводило к деструкции хлорофилла путем фотоокисления, сопровождающегося падением интенсивности флуоресценции, измеренной при 20°. При выцветании нормальных и мутантных листьев при комнатной температуре на воздухе не наблюдали индукционного периода, описанного для хлореллы [9]. Вероятно этот период сокращался из-за очень большой интенсивности света. У ζ-каротиновых листьев после первых секунд освещения максимум флуоресценции при 686 *ммк* перемещался до 680 *ммк*. Возможно, это является следствием уменьшения реабсорбции флуоресценции. Ранее это явление отмечалось при выцветании пигментов в листьях фасоли на ранних стадиях зеленения [11].

Природа выцветания хлорофилла в листьях делается более понятной из результатов опытов в отсутствие воздуха. При освещении листьев в вакууме при комнатной температуре происходили изменения в спектре поглощения, характерные для фотодезагрегации хлорофилла. В результате освещения наблюдалось возрастание интенсивности флуоресценции, измеряемой при 20°; в спектре низкотемпературной флуоресценции при этом наблюдалось возрастание коротковолнового «мономерного» максимума и падение длинноволнового «агрегированного».

Самые большие и отчетливые изменения происходили в спектрах флуоресценции ζ-каротиновых листьев (до 100% возрастания флуоресценции при 20°). В ликопиновых листьях эффект был вдвое, а в нор-

мальных примерно в пять раз меньшим. Это говорит о том, что фотодезагрегация зависит от типа связей молекул пигмента в агрегированных структурах. У ζ-каротинового мутанта структура агрегатов хлорофилла, имеющих максимум флуоресценции при 720 *ммк*, распадается легче, чем агрегаты молекул, ответственные за флуоресценцию при 735 *ммк* в нормальных и ликопиновых листьях.

На воздухе, по-видимому, тоже происходит фотодезагрегация, однако образованная мономерная форма хлорофилла в присутствии кислорода быстро фотоокисляется, поэтому нельзя наблюдать ее значительного накопления. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что чем интенсивнее идет фотодезагрегация, тем больше выцветает пигмента в присутствии кислорода. Нежизнеспособность ликопинового и особенно ζ-каротинового мутантов определяется, по-видимому, быстрой фотодеструкцией пигментов, идущей через дезагрегацию хлорофилла при нормальной интенсивности света, и последующим необратимым выцветанием образующегося мономера. Ранее предполагали такой порядок выцветания пигмента в листьях и коллоидных растворах через дезагрегацию [10], данная работа показала полную достоверность этого механизма.

Мы не смогли получить обратимого понижения флуоресценции в темноте после ее возрастания в освещенных вакуумированных листьях. По-видимому, наблюдаемое нами увеличение флуоресценции происходит вследствие повреждающего действия света на фотосинтетический аппарат. Возможным повреждающим фактором может быть нарушение структуры пигмент-белкового комплекса и, вследствие этого, размыкание цепи переноса энергии в комплексе, в результате чего поглощенная энергия света не может транспортироваться к активному центру для передачи в цепь ферментных реакций и высвечивается в виде флуоресценции.

Наблюдаемая нами фотодезагрегация хлорофилла отличается от индукции флуоресценции [21], так как возрастание флуоресценции в наших опытах происходит медленно и необратимо в темноте. Однако нельзя отрицать того, что, наряду с дезагрегацией, при освещении зеленых листьев интенсивным светом в вакууме могут происходить и другие фотохимические процессы, в том числе связанные с уменьшением концентрации продукта, являющегося тушителем флуоресценции хлорофилла in vivo.

Наблюдаемое нами возрастание флуоресценции в результате освещения листьев в вакууме не может объясняться термодезагрегацией хлорофилла, так как инфракрасный свет длинее 720 *ммк* не был активным в этом процессе.

В качестве причины фотолабильности пигментных мутантов часто указывают на защитную роль нормальных каротиноидов [22, 23]. Как известно, каротиноиды замедляют фотоокисление хлорофилла [24]. Отсутствие нормального набора каротиноидов в изученных нами мутантах может влиять на повышенную чувствительность хлорофилла к освещению путем нарушения правильной упаковки его молекул в агрегированных структурах вследствие отсутствия этих каротиноидов в нативном комплексе хлоропластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **85**, 1177, 1952.
2. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Докл. АН СССР, **91**, 343, 1953.
3. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т., Докл. АН СССР, **135**, 1528, 1960.
4. Доман Н. Г., Красновский А. А., Романова А. К., Воробьева Л. М., Пакшина Е. В., Терентьева З. А., Физиол. раст., **8**, 3, 1961.
5. Govindjee, Yang L., J. Gen. Physiol., **9**, 763, 1966.
6. Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф., Биофизика, **12**, 845, 1967.

7. Brown J. S., French C. S., Plant Physiol., **34**, 305, 1959.
8. Sauer K., Calvin M., Biochim. et biophys. acta, **64**, 324, 1962.
9. Sironval C., Kandler O., Biochim. et biophys. acta, **29**, 359, 1958.
10. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика, **12**, 240, 1967.
11. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика, **13**, 456, 1968.
12. Smith J. H. C., Durham L. J., Wurster C. F., Plant Physiol., **34**, 340, 1959.
13. Shlyk A. A., Fradkin L. I., Savchenko G. E., Faludi-Daniel A., Photosyntetica, **1**, 241, 1967.
14. Koski V. M., Smith J. H. C., Arch. Biochem. and Biophys., **34**, 189, 1951.
15. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биохимия, **34**, 2, 1969.
16. Faludi-Daniel A., Nagy A., Acta Botanica Acad., Sci. Hung., **14**, 17, 1968.
17. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика, **6**, 392, 1961.
18. Годнев Т. Н., Акулович Н. К., Шабельская Э. Ф., Бюлл. Ин-та биол. АН БССР за 1957, вып. 3, Минск, 1958, стр. 89.
19. Butler W. L., Briggs W. R., Biochim. et biophys. acta, **112**, 45, 1966.
20. Литвин Ф. Ф., Рихирева Г. Т., Красновский А. А., Биофизика, **7**, 578, 1962.
21. Kautsky H., Eberlein E., Biochem. Z., **302**, 137, 1939.
22. Griffiths M., Sistrom W. R., Cohen-Bazire G., Stanier R. I., Nature, **176**, 1211, 1955.
23. Anderson I. C., Robertson D. S., Plant Physiol., **35**, 531, 1960.
24. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Биохимия, **26**, 859, 1961.

Поступила в редакцию
5.VI.1968

LIGHT-INDUCED CHANGES OF DIFFERENT PIGMENT FORMS IN LEAVES OF MUTANT AND NORMAL PLANTS

F. LÁNG, L. M. VOROBYEVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Acad. Sci. USSR, Moscow

By measuring fluorescence spectra at —196° and 20° there was investigated the photosensitivity of various chlorophyll forms in greening and green normal and mutant maize leaves which contain lycopene or ζ-carotene. In etiolated and greening normal and mutant leaves the pigment forms with low temperature fluorescence at 655 and 690 mμ, are most photolabile at —196°, the forms 635 and 680 mμ bleach slower, the aggregated longwave forms 735 and 720 mμ turn to be the most light-resistant ones.

Illumination of the greening leaves of normal and mutant plants in vacuum at 20° resulted in irreversible desaggregation of chlorophyll. The fluorescence intensity increased at 20°, that of the aggregated forms decreased simultaneously with the increase of the shortwave maximum. Photodesaggregation of chlorophyll due to the illumination of greening leaves in the air at 20° was accompanied by the photooxidation of the monomer formed. The rate of pigment bleaching in the air at 20° was correlated to the photodesaggregation value and corresponded to the sequence ζ-carotenice mutant — lycopenic mutant — normal leaves.

УДК 547.963.4

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ АНАЛОГОВ ХЛОРОФИЛЛА ТРИПТОФАНОМ

А. В. УМРИХИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

При фотохимическом взаимодействии в кислой среде (вода и этанол, содержащие HCl) все исследованные порфирины: гематопорфирин, протопорфирин, протофеофитин, феофитин восстанавливаются триптофаном. Фотовосстановление порфиринов происходит и в присутствии индола, что свидетельствует о связи электроно-донорных свойств триптофана с индольным кольцом его молекулы. Действие света на раствор хлорофилла *а* в пиридине в присутствии триптофана в вакууме приводит к сдвигу максимумов поглощения в коротковолновую сторону на 10 *ммк*.

Со времени открытия реакции обратимого фотохимического восстановления хлорофилла в 1948 г. [1] накопился большой экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что к этой реакции способны все тетрапиррольные пигменты. Реакция протекает в широком диапазоне условий: в органических растворителях и в водных растворах, причем она может идти как в основной среде (пиридин), так и в кислой (водные и спиртовые растворы кислоты). В качестве доноров электрона используются различные соединения [2—5].

Так как хлорофилловые пигменты находятся в организмах в виде белковых комплексов, представляется существенным изучить фотохимическое взаимодействие пигментов с аминокислотами.

Фотохимия и люминесценция ароматических аминокислот в свободном состоянии и входящих в состав белка подробно рассмотрены в монографии Владимирова [6]. Им было показано, что ароматические аминокислоты способны к двум фотохимическим реакциям, идущим под действием ультрафиолетового облучения, причем первичной стадией процесса является отрыв электрона (фотодиссоциация).

Окисление остатков триптофана и, возможно, цистеина определяют фотоинактивацию некоторых ферментов при ультрафиолетовом облучении [7]. Кроме того, фотоинактивация фермента (энолазы) может происходить за счет сенсибилизированного метиленовым синим фотоокисления триптофана и гистидина [8].

Вейл и сотр. [9, 10] указывают на способность ароматических аминокислот: гистидина, тирозина, триптофана, а также метионина к сенсибилизированному метиленовым синим фотохимическому окислению, причем триптофан окислялся значительно быстрее других аминокислот. Авторы предполагают, что на первом этапе реакции происходит окисление аминокислоты с одновременным восстановлением красителя. По-видимому, аминокислота служила донором электрона в этой реакции.

Некоторые аминокислоты, например триптофан и другие производные индола, могут образовывать комплексы переноса заряда с различными акцепторами электрона. Значительный интерес представляют данные по образованию таких комплексов между ароматическими аминокис-

лотами и производными рибофлавина [11], а также между производными индола и пиридиннуклеотида [12—14], рибофлавином [15] и флавинмононуклеотидом [16]. В этих комплексах аминокислота служила донором электрона. Образование их регистрировали по изменению окраски комплекса (по сравнению с окраской исходных компонентов), спектрофотометрически (по появлению новой специфической полосы поглощения) [12—15] или методом ЭПР [16].

Таким образом, имеющийся экспериментальный материал указывает на то, что некоторые аминокислоты будут способны осуществить фотохимическое восстановление пигментов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы исследовали фотохимическое взаимодействие порфиринов с триптофаном, тирозином, фенилаланином, гистидином, цистеином и метионином путем спектрофотометрических измерений.

В нашей предыдущей работе [17] было показано, что все пигменты хорошо восстанавливаются в кислых средах — воде и этаноле. Поэтому и настоящие опыты мы проводили в аналогичных условиях, так как многие аминокислоты плохо растворимы в органических растворителях. Для опытов использовали растворы соляной кислоты (2,5%) в воде и в этаноле. Аминокислоты — химически чистые. Пигменты получали принятыми в лаборатории методами. Освещение 500 *вт* лампой накаливания (освещенность 10^5 *эрг/см²/сек*) при комнатной температуре (20°) без светофильтра в вакууме.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты, проведенные с гематопорфирином в водной кислой среде с различными аминокислотами, показали, что фотохимическая реакция протекала наиболее активно с триптофаном и в незначительной степени с метионином. Результаты этих опытов подтвердили данные о том, что из всех аминокислот триптофан является наиболее активным донором электрона [18]. Поэтому мы более детально исследовали взаимодействие триптофана с рядом пигментов: гематопорфирином, протопорфирином, протофеофитином, феофитином и хлорофиллом.

Из опытов по фотохимическому взаимодействию гематопорфирина с триптофаном в водном растворе HCl следует, что освещение приводит к возникновению новых полос поглощения при 495 и 625 *ммк*, а также увеличению поглощения в области 440 *ммк*, т. е. положение максимумов фотовосстановленных форм совпадает с положением максимумов поглощения гематопорфирина, восстановленного аскорбиновой кислотой в кислой водной среде. Реакция идет медленно (часы), хотя максимумы соответствующих восстановленных форм появляются уже в первые минуты освещения. Проведение опыта с гематопорфирином и триптофаном в этаноле, содержащем соляную кислоту (2,5% и меньше), показало, что в этих условиях реакция идет значительно быстрее. Спектрофотометрические измерения позволяют хорошо видеть образование трех форм (рис. 1): I — с максимумами поглощения при 440 и 720 *ммк* (сокращенно будем обозначать ее как форму 440/720), II — 500 и III — 640 *ммк*. Все три формы появляются в той же последовательности, как и при взаимодействии гематопорфирина с аскорбиновой кислотой. Наименее устойчива форма I (440/720 *ммк*), она быстро исчезала в ходе освещения, тогда как поглощение в максимумах 500 и 640 *ммк* продолжало увеличиваться. Обе последние формы очень устойчивы при стоянии в темноте как в вакууме, так и в присутствии воздуха. Однако при длительном стоянии растворов восстановленного порфирина — в вакууме или в присутствии воздуха — появляются некоторые различия в их спектрах. В ряде опытов нам удалось наблюдать, что при длительном освещении раствора после образования максимального количества формы 640 *ммк* поглощение в этой области спектра начинает уменьшаться. После пуска воздуха происходит быстрая регенерация формы 640 *ммк*. Можно было

предположить, что эта форма, которая, по-видимому, является хлорином [17], подвергается дальнейшим обратимым восстановительным превращениям. Фотореакция гематопорфирина с триптофаном значительно замедляется при понижении температуры, и при температуре ниже —10° реакцию наблюдать не удавалось.

Протопорфирин, аналогично гематопорфирину, восстанавливается триптофаном с образованием трех форм: 440/720; 500 и 625 *ммк*. При проведении фотореакции с триптофаном в слабой кислоте (0,1%) в ва-

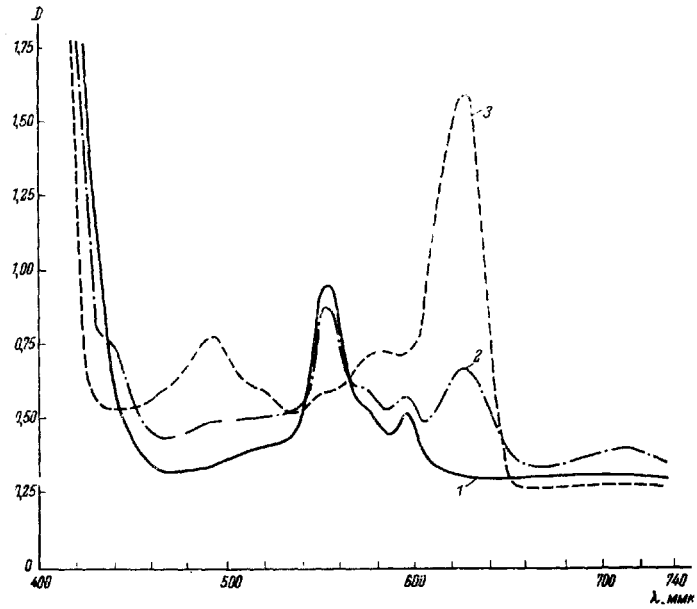


Рис. 1. Спектральные изменения гематопорфирина в растворе 2,5%-ной HCl в этаноле в присутствии 10 *мг* L-триптофана в вакууме

1 — спектр исходного раствора; *2* — после освещения в течение 20 *мин*; *3* — после 2 часов освещения

кууме преимущественно образуются формы 440/720 и 500 *ммк*, тогда как образование формы 640 *ммк* почти не происходит (в отличие от восстановления гематопорфирина в 2,5%-ной HCl в этаноле). Кроме того, в этих условиях реакция обратима. После окончания реакции и пуска воздуха поглощение в максимумах восстановленных форм 440/720 и 500 *ммк* быстро падает и увеличивается поглощение в максимуме исходного порфирина, причем свет значительно ускоряет регенерацию форм I и II. Поглощение формы 625 *ммк* оставалось без изменения.

Протофеофитин хорошо восстанавливается L-триптофаном в этаноле с 2,5% HCl с образованием двух форм: 470/725 и 510 *ммк*. Образования формы III (хлорофиллоподобной), имеющей поглощение в красной области спектра, не удалось наблюдать при восстановлении этого пигмента триптофаном. После пуска воздуха в раствор восстановленного протофеофитина форма 470/725 *ммк* регенерирует до исходного состояния пигмента, а форма 510 *ммк* сохраняется, но положение максимума сдвигается к 490 *ммк*. Таким образом, хотя протофеофитин и восстанавливается различными восстановителями (аскорбиновая кислота, L-триптофан), но образования всех трех форм, которые мы наблюдали при восстановлении других порфиринов, имеющих две «полуизолированные» двойные связи, т. е. сходных по уровню восстановления с гематопорфирином и протопорфирином, наблюдать не удалось. По-видимому, это связано с наличием в молекуле протофеофитина циклопентаноново-

го кольца, фитола и другими структурными особенностями пигментов группы хлорофилла, которые оказывают стерические препятствия фотопревращению этих порфиринов в хлорин в модельных системах, хотя в этиолированных листьях этот процесс идет с высоким квантовым выходом. Можно также предположить, что протохлорофилл листьев отличается по своей структуре от протохлорофилла семян тыквенных.

Феофитин, являющийся представителем хлоринов (одна «полуизолированная» двойная связь), восстанавливается в кислом этаноле L-трип-

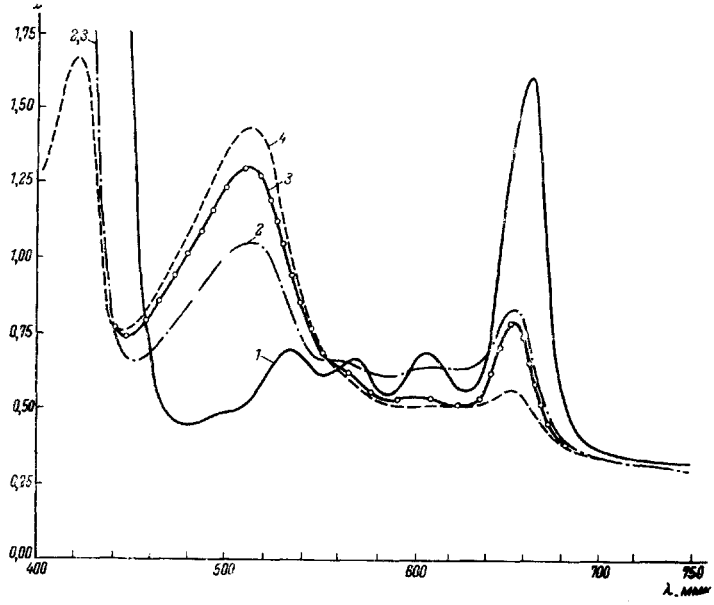


Рис. 2. Спектральные изменения феофитина в растворе 5%-ной HCl в этаноле с 10 *мг* L-триптофана в вакууме

1 — спектр исходного раствора; *2* — после освещения в течение 1 часа через КС-13; *3* — после стояния раствора в течение 2 часов в вакууме; *4* — после 2 часов освещения

тофаном с образованием формы, имеющей максимум при 525 *ммк* (рис. 2). Так же как и в опытах с аскорбиновой кислотой, при восстановлении феофитина растет поглощение в области 620—630 *ммк*. Если раствор феофитина с триптофаном после освещения в течение нескольких минут оставить в вакууме в темноте на некоторое время, то в результате повторного измерения спектра можно видеть, что поглощение в максимуме 525 *ммк* возросло. В то же время поглощение в области 620—630 *ммк* уменьшилось, а в исходном максимуме осталось без изменения. Эти опыты подтверждают, что форма 525 *ммк* есть результат темнового превращения продукта, образующегося в фотохимической реакции и переживающего период освещения. Хотя наблюдается параллелизм между увеличением поглощения в области 525 *ммк* и уменьшением поглощения в области 620—630 *ммк*, маловероятно, что продукт, поглощающий в этой области, является предшественником формы 525 *ммк*. Пуск воздуха в раствор восстановленного феофитина приводит к падению поглощения, а затем полному исчезновению продукта с максимумом при 525 *ммк*. При этом увеличивается поглощение в исходном максимуме порфирина, но незначительно. Таким образом, восстановление феофитина в кислой среде L-триптофаном приводит к образованию формы 525 *ммк*, окисляющейся в присутствии кислорода воздуха с образованием бесцветных продуктов и лишь в малой степени регенерирующей в исходной феофитин. Природа продукта, имеющего поглощение в области 620—630 *ммк*, не известна.

Итак, все исследованные нами пигменты восстанавливаются триптофаном в кислой среде с образованием форм, сходных по виду спектра поглощения с обнаруженными ранее [17].

Кроме экспериментов в кислых средах, были проведены опыты и в основной среде (пиридине). Оказалось, что при освещении раствора хлорофилла *а* с L-триптофаном в пиридине, где триптофан практически не растворим, восстановления хлорофилла *а* (образования формы 520 *ммк*) не происходит. Однако в этих условиях наблюдается сдвиг в положении обоих максимумов хлорофилла под действием света на 10 *ммк* в коротковолновую сторону: 674→664, 446→436; при этом возрастает поглощение в синем максимуме (рис. 3). Эти изменения в спектре хлорофилла *а* длительное время сохраняются в вакууме после прекращения освещения. Пуск воздуха в раствор приводит к частичному сдвигу максимумов поглощения в длинноволновую сторону (на 3—5 *ммк*), но полностью исходный спектр не восстанавливается. Таким образом, в пиридине не удалось наблюдать восстановления хлорофилла *а* триптофаном. Наблюдаемый сдвиг максимумов поглощения в коротковолновую сторону, возможно, объясняется следующим. Растворенный в пиридине хлорофилл находится в виде комплекса с молекулами растворителя, причем эта связь осуществляется с участием атома магния молекулы хлорофилла и атома азота пиридинового кольца. На взаимодействие молекулы пигмента с молекулами пиридина указывает более длинноволновое положение максимумов поглощения хлорофилла в пиридине по сравнению с положением максимумов в других растворителях. В присутствии триптофана под действием света на раствор хлорофилла в пиридине происходит распад комплекса и, как следствие этого, сдвиг спектральных максимумов в коротковолновую сторону.

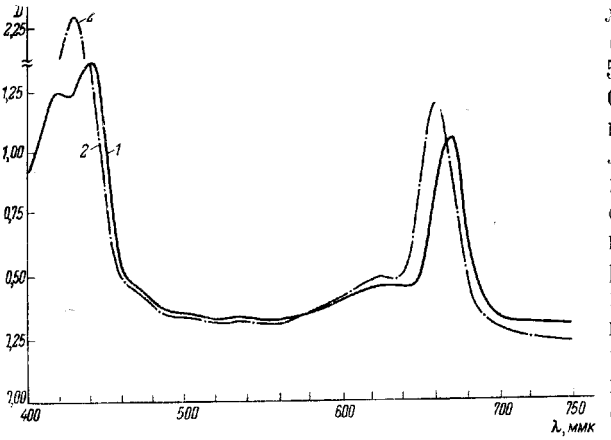


Рис. 3. Действие света на раствор хлорофилла *а* в пиридине в присутствии 10 *мг* L-триптофана (во взвеси)

1 — спектр исходного раствора; *2* — после 15 *мин* освещения через КС-13 в вакууме

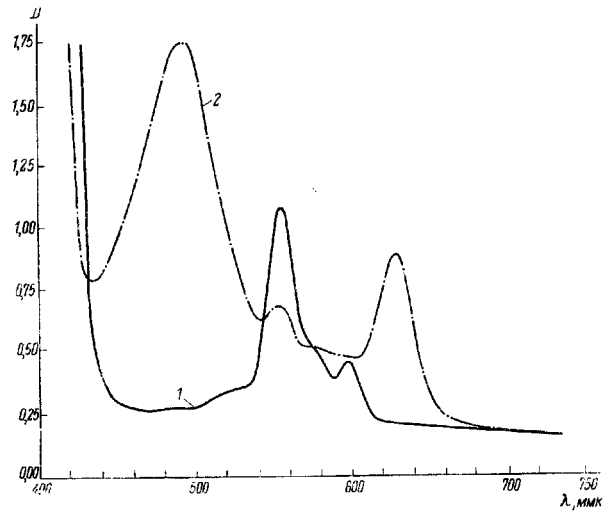


Рис. 4. Фотохимическое взаимодействие гематопорфирина с индолом (10 *мг*) в растворе 2,5%-ной HCl в этаноле

1 — спектр исходного раствора; *2* — после освещения раствора в вакууме в течение 1 часа

Были проведены также опыты по восстановлению гематопорфирина триптофаном в пиридине, в этаноле, содержащем KOH, и водном ще-

лочном растворе. Результаты показали, что во всех трех вариантах опытов не наблюдалось восстановления гематопорфирина — происходило незначительное увеличение поглощения в красной области спектра с максимумом при 645 *ммк*. Положение этого максимума совпадает с положением максимума восстановленного аскорбиновой кислотой гематопорфирина в пиридине.

Согласно имеющимся данным [18], индольное кольцо триптофана обладает электронно-донорными свойствами. Для подтверждения этого мы провели опыты по восстановлению гематопорфирина и протофеофитина индолом в кислом этаноле. Действительно оказалось, что, как и триптофан, индол хорошо восстанавливал эти соединения, причем преимущественно образовывалась форма 500 *ммк* (рис. 5). Имеются предположения, что возможным местом реакции в индольном кольце является пиррольный азот [12], а по другим данным [19], электроно-донорные свойства индола определяются высокой электронной плотностью у 2-го и 3-го углеродных атомов.

Таким образом, полученный экспериментальный материал позволяет прийти к заключению, что триптофан является донором электрона (водорода) при фотовосстановлении аналогов хлорофилла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Докл. АН СССР, **61**, 91, 1948
2. Красновский А. А., Успехи химии, **29**, 736, 1960
3. Евстигнеев В. Б. Ж. физ. хим., **32**, 968, 1958
4. Гуринович Г. П., Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 83, «Наука», М., 1965
5. Сидоров А. Н., в кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах, стр. 267, «Наука», М., 1966
6. Владимиров Ю. А., Фотохимия и люминесценция белков, «Наука», М., 1965
7. McLaren A. D., Luse R. A., Science, **134**, 836, 1961.
8. Brake J. M., Wold F., Biochim. et biophys. acta, **40**, 171, 1960
9. Weil L. Arch. Biochem. and Biophys., 110, 57, 1965
10. Weil L., Gordon W. G., and Buchert A. R., Arch. Biochem. and Biophys., 33, 90, 1951
11. Harbury H. A., Foley K. A., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **44**, 662, 1958
12. Alivisatos S. G., Mourkides G. A., Jibril A., Nature, **186**, 718, 1960
13. Cilento G., Giusti P., J. Amer. Chem. Soc., **81**, 3801, 1959
14. Cilento G., Tedeschi P., J. Biol. Chem., **236**, 907, 1961
15. Isenberg I., Scent-Gyorgyi A., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **44**, 857, 1958
16. Isenberg I., Scent-Gyorgyi A., Baird S. L., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **46**, 1307, 1960
17. Умрихина А. В., Юсупова Г. А., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **175**, 1401, 1967
18. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, стр. 259, «Мир», М., 1965
19. Scent-Gyorgyi A., Isenberg I., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **46**, 1334, 1960

Поступила в редакцию
29.IV.1968

PHOTOCHEMICAL REDUCTION OF CHLOROPHYLL ANALOGS BY TRYPTOPHAN

A. V. UMRIKHINA and A. A. KRASNOVSKII

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Photochemical interaction in acid medium (water and ethanol containing HCl) resulted in reduction of all porphyrins investigated (hematoporphyrin, protoporphyrin, protopheophytin, pheophytin) by tryptophan. Photoreduction of porphyrins occured also in the presence of indole, which indicates that electron-donating properties of tryptophan are associated with indole ring. The action of the light on the solution of chlorophyll a in pyridine in the presence of tryprophan under vacuum shifted the absorption maxima of chlorophyll to the short wavelengths by 10 *mμ*.

НАУЧНЫЕ ДОКЛАДЫ ВЫСШЕЙ ШКОЛЫ
БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ ● №8 ● 1969

УДК 576.851.12

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

ПРОТОХЛОРОФИЛЛЬНЫЕ МУТАНТЫ RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS

Е. П. Феденко, Е. Н. Кондратьева, А. А. Красновский

Под действием этилметансульфоната и N-нитрозометилмочевины получено пять пигментных мутантов Rhodopseudomonas palustris. Зеленые мутанты № 1 и № 2 не образуют бактериохлорофилла. Желтый мутант образует бактериохлорофилл только при росте в анаэробных условиях на свету. Зеленый мутант № 3 образует бактериохлорофилл в анаэробных условиях и при слабой аэрации. Эти мутанты, судя по спектрам поглощения целых клеток и положению основного максимума ацетоновых экстрактов, образуют пигмент протохлорофилльной природы, который в клетках находится в разных формах с максимумами поглощения от 630 до 652 нм. Пятый желто-розовый мутант, кроме бактериохлорофилла, образует пигмент с максимумом поглощения в клетках при 667—669 нм, а в водно-ацетоновом экстракте — при 655 нм. При увеличении аэрации и интенсивности света в процессе выращивания зеленого мутанта № 1 образование им протохлорофиллного пигмента снижается, но под действием света слабой интенсивности (200—1000 эрг/см^2·сек), возрастает по сравнению с образованием пигмента в темноте. По спектру поглощения, хроматографическим свойствам и растворимости пигмент зеленого мутанта № 1 близок к протохлорофиллиду бактериохлорофилла *a*.

Пигментные мутанты фотосинтезирующих организмов представляют большой интерес в связи с исследованием путей биосинтеза различных пигментов (хлорофиллов, каротиноидов, фикобилинов), их роли в процессе фотосинтеза и формирования структуры фотосинтезирующего аппарата. Кроме того, некоторые из пигментных мутантов удобны для выяснения природы отдельных компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

К настоящему времени получен ряд пигментных мутантов высших растений, водорослей и двух пурпурных бактерий — Rhodospirillum rubrum (L. Feldman a. E. Lindstrom, 1964; G. Drews u. J. Schick, 1966) и Rhodopseudomonas spheroides (M. Griffiths et al., 1955; W. Sistrom et al., 1956; M. Griffiths a. R. Stanier, 1956; M. Griffiths, 1962; J. Lascelles, 1966). Мы попытались получить пигментные мутанты еще одного представителя несерных пурпурных бактерий — Rhodopseudomonas palustris.

Исходный штамм Rh. palustris был получен от проф. Накамура (Япония). Организмы представляют собой короткие подвижные палочки, содержат бактериохлорофилл *a* и ряд ациклических каротиноидов, из которых главными являются ликопин, ангидродовибрин, спириллоксантин, родопин, родовибрин и монодеметилированный спирилл-

оксантин (Е. Н. Кондратьева и И. В. Малофеева, 1964). Фотосинтезирующий аппарат представлен пластинчатыми структурами, располагающимися по периферии клеток.

Рост культур возможен в анаэробных условиях на свету и в аэробных условиях в темноте. Последнее важно при получении мутантов, не способных к фотосинтезу. Rh. palustris растет на средах с различными органическими соединениями, лучше других использует некоторые органические кислоты. Показана также способность Rh. palustris окислять тиосульфат (C. van Niel, 1944; R. James a. E. Lindstrom, 1967). Во всех случаях бактерии нуждаются в наличии пара-аминобензойной или фолиевой кислот (В. Э. Успенская и Е. Н. Кондратьева, 1962).

Для культивирования исходного штамма и мутантов Rh. palustris мы применяли среду с яблочной кислотой и дрожжевым автолизатом (M. Griffiths a. K. Stanier, 1956). Культуры выращивали в анаэробных условиях в склянках с притертыми пробками в люменостате (интенсивность света около 10000 эрг/см^2 · сек, температура 30° С) и в аэробных условиях в колбах объемом 750 мл, в которые наливали 100 и 200 мл среды. Культивирование вели в стационарных условиях или на качалке (200 об/мин.).

В качестве мутагенных факторов использовали ультрафиолетовые (УФ) лучи, этилметансульфонат (ЭМС) и N-нитрозометилмочевину (НММ). Для получения мутантов под действием УФ-лучей по 0,05 мл культуры Rh. palustris высевали на чашки Петри с агаризованной средой и облучали в течение 50—300 сек лампой БУФ, 30 в, на расстоянии 40 см. После этого чашки закрывали и инкубировали 6—8 дней в аэробных условиях в темноте. ЭМС использовали в концентрации 0,02 и 0,04% в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,8. Время инкубации составляло 1,5 и 2 ч (W. Sistrom, 1966). Действию НММ подвергали не исходный штамм, а палевый мутант, полученный в результате облучения бактерий УФ-светом. Клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с раствором НММ в цитратном буфере (pH 2,0) при конечной концентрации НММ 0,01 г/мл (0,1 М). Действие мутагена прекращали добавлением нескольких капель 10%-ного раствора КОН (F. Zimmerman et al., 1965).

Урожай клеток исходного штамма и мутантов определяли нефелометрически (на фотоэлектроколориметре ФЭК-56, светофильтр № 6) и пересчитывали на число клеток. Спектры поглощения целых клеток определяли на спектрофотометре СФ-10 с расширенной шкалой (400—900 нм) в Институте биохимии АН СССР. Для этого 200—400 мл четырех-пятидневной культуры центрифугировали и ресуспендировали в 2 мл свежей среды.

Экстракцию пигментов из клеток проводили 80%-ным водным ацетоном, смесью ацетона с метанолом или последовательно ацетоном, метанолом и серным эфиром (S. Granick, 1950). Фитольные и безфитольные формы пигментов разделяли путем промывания ацетоновой фракции 40—70°-ным петролейным эфиром (Л. М. Воробьева и др., 1963; Л. М. Воробьева и А. А. Красновский, 1966), а также хроматографически в смеси Годнева (бензин 90—100° — петролейный эфир 4—70° — ацетон — изопропанол в соотношении 17 : 5 : 7 : 0,8) на ленинградской быстрой бумаге (А. А. Красновский и др., 1961; Т. Н. Годнев, 1963). Перед хроматографированием пигмент переводили из ацетона в серный эфир. Спектры исходных экстрактов и хроматографически очищенных пигментов снимали на СФ-4 и СФ-10 с расширенной шкалой. Флуоресценцию целых клеток определяли на установке, собранной Ф. Ф. Литвиным и О. И. Беляевой на кафедре биофизики МГУ. Перед определением интенсивности флуоресценции суспензии клеток центрифугировали и приводили к одинаковой оптической плотности.

Протохлорофилл получали из оболочек семян тыквы. Для этого семена тыквы, очищенные от кожуры, экстрагировали ацетоном.

Исходный штамм Rh. palustris имеет розово-красную окраску, интенсивность которой меняется в зависимости от условий роста культур. В спектре поглощения бактерий в области 800—900 нм отмечено два хорошо выраженных максимума, обусловленных бактериохлорофиллом а. В области поглощения каротиноидов имеется ряд максимумов, в том числе при 512 нм. Положение длинноволнового максимума поглощения бактериохлорофилла меняется от 876 до 888 нм в зависимости от условий выращивания бактерий (рис. 1, *А*, табл. 1); положение максимума при 812 нм остается постоянным. Это, видимо, связано с наличием двух длинноволновых форм бактериохлорофилла, соотношение которых меняется с изменением условий культивирования бактерий.

В результате облучения клеток УФ-светом удалось получить лишь один мутант, который по окраске колоний и жидких культур несколько отличался от исходного штамма. Судя по спектрам поглощения, этот мутант (названный палевым) по сравнению с исходным штаммом содержит меньше каротиноидов и бактериохлорофилла, а его длинноволновый максимум в клетках слегка смещен в коротковолновую область — от 876 до 873 нм (при выращивании обеих культур в аэробных условиях на свету).

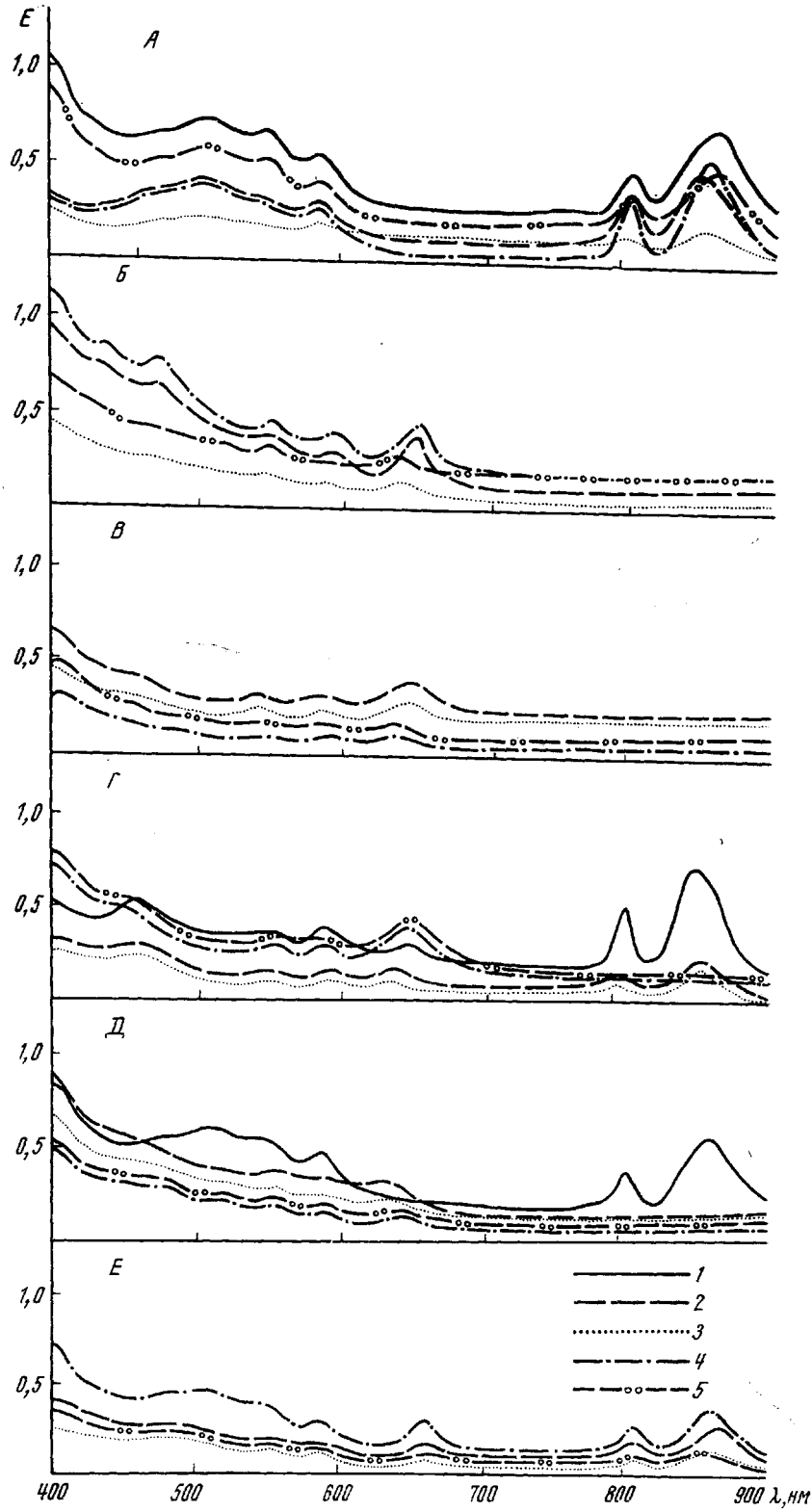


Рис. 1. Спектры поглощения целых клеток исходного штамма и мутантов Rhodopseudomonas palustris, выращенных в разных условиях. *А* — исходный штамм; *Б* — зеленый мутант № 1; *В* — зеленый мутант № 2; *Г* — зеленый мутант № 3; *Д* — желтый мутант; *Е* — желто-розовый мутант: *1* — анаэробно на свету, *2* — аэробно на свету — стационарные условия, *3* — аэробно в темноте — стационарные условия, *4* — аэробно на свету — на качалке, *5* — аэробно в темноте — на качалке

Таблица 1

Максимумы поглощения (нм) целых клеток исходного штамма и мутантов Rhodopseudomonas palustris при выращивании культур в разных условиях

Штамм	Условия выращивания	Основные максимумы поглощения в области 600—900 нм		
Исходный	Анаэробно на свету . . .	Нет	812	881
	Аэробно на свету в стационарных условиях . . .	»	812	876
	Аэробно в темноте	»	812	881
	Аэробно на свету на качалке	»	812	886
	Аэробно в темноте на качалке	»	812	888
Зеленый мутант № 1	Анаэробно на свету . . .	Нет	Нет	Нет
	Аэробно на свету в стационарных условиях	650	»	»
	Аэробно в темноте	634—652	»	»
	Аэробно на свету на качалке	652	»	»
	Аэробно в темноте на качалке	632	»	»
Зеленый мутант № 2	Анаэробно на свету . . .	Нет	Нет	Нет
	Аэробно на свету в стационарных условиях	647	»	»
	Аэробно в темноте	647	»	»
	Аэробно на свету на качалке	640	»	»
	Аэробно в темноте на качалке	632	»	»
Зеленый мутант № 3	Анаэробно на свету	648—655	812	876—881
	Аэробно на свету в стационарных условиях . . .	630	812	888
	Аэробно в темноте	630	812	884
	Аэробно на свету на качалке	646	Нет	Нет
	Аэробно в темноте на качалке	646	»	»
Желтый мутант	Анаэробно на свету . . .	Нет	812	886
	Аэробно на свету в стационарных условиях . . .	628	Нет	Нет
	Аэробно в темноте . . .	630	»	»
	Аэробно на свету на качалке	634	»	»
	Аэробно в темноте на качалке	634	»	»
Желто-розовый мутант	Анаэробно на свету . . .	Нет	814	882
	Аэробно на свету в стационарных условиях . . .	669	812	888
	Аэробно в темноте . . .	669	812	886
	Аэробно на свету на качалке	667	811	876
	Аэробно в темноте на качалке	669	812	880

Палевый мутант был использован для получения вторичных мутантов под действием НММ. Таким способом удалось выделить желто-розовый мутант, зеленый мутант № 2 и одну колонию с неравномерной окраской (секторную). При рассеве из нее получили колонии трех цветов — пурпурные, зеленые и желтые. Мутанты были названы соответственно зеленый № 3 и желтый. Под действием ЭМС (0,02%, 2 ч) был получен зеленый мутант № 1. По отношению к свету и аэрации полученные мутанты отличаются друг от друга и от исходного штамма. Зеленые мутанты № 1 и № 2 не способны к росту в анаэробных условиях на свету. Они развиваются только в аэробных условиях на свету

и в темноте. Наибольший урожай зеленого мутанта № 1 получен при выращивании его в условиях аэрации на качалке. Зеленый мутант № 3, желтый и желто-розовый мутанты способны к фотосинтезу, но рост их на свету в анаэробных и в аэробных условиях значительно слабее, чем рост исходного штамма.

По спектрам поглощения все полученные мутанты как в длинноволновой области, так и в области поглощения каротиноидов отличаются от исходного штамма.

В спектре поглощения целых клеток зеленых мутантов № 1 и № 2, а также желтого мутанта, выращенных в аэробных условиях на свету, в области 600—900 нм отмечен только один максимум — соответственно при 650, 647 и около 628—630 нм. В спектре поглощения целых клеток зеленого мутанта № 3, выращенного в аэробных условиях на свету, есть максимум при 630 нм и максимум при 812 и 888 нм, соответствующие бактериохлорофиллу. В спектре желто-розового мутанта, выращенного в тех же условиях, максимумы поглощения находятся при 669, 812 и 888 нм (рис. 1, *Е*, табл. 1).

В зависимости от условий выращивания максимумы в спектрах поглощения целых клеток мутантов в области 630—655 нм несколько меняют свое положение. Видимо, это связано с тем, что мутанты способны образовывать набор нативных форм пигмента, поглощающего в данной области, причем в определенных условиях роста культур преобладает одна из них, которая и определяет положение максимума в спектре поглощения.

У зеленых мутантов № 1 и № 2 во всех условиях выращивания отсутствуют максимумы поглощения в области более 700 нм и исчезает флуоресценция целых клеток в области 900 нм, характерная для бактериохлорофилла. В ацетоновых экстрактах клеток также нет ни поглощения, ни флуоресценции в области, типичной для бактериохлорофилла. Неспособностью синтезировать бактериохлорофилл можно, очевидно, объяснить отсутствие роста этих мутантов в анаэробных условиях на свету.

Судя по спектру поглощения целых клеток, зеленый мутант № 3 способен образовывать бактериохлорофилл при выращивании в анаэробных условиях на свету и при слабой аэрации (в стационарных условиях) на свету и в темноте. При выращивании культуры в условиях сильной аэрации на качалке бактериохлорофилл не образуется. Во всех условиях выращивания в клетках сохраняется максимум поглощения в области 630—655 нм (рис. 1, *Г*, табл. 1), которого нет у исходного штамма.

В спектре поглощения целых клеток желтого мутанта положение максимума в области 630—650 нм почти не меняется в зависимости от условий выращивания. Данный мутант образует бактериохлорофилл только в анаэробных условиях на свету; при этом он утрачивает максимум поглощения в области 630—650 нм (рис. 1, *Д*, табл. 1).

Спектр поглощения желто-розового мутанта свидетельствует о том, что этот штамм образует бактериохлорофилл во всех условиях выращивания, но наряду с бактериохлорофиллом имеет пигмент с максимумом поглощения в целых клетках при 667—669 нм (рис. 1, *Е*, табл. 1).

Следует отметить, что при рассеве на твердую среду культур желтого мутанта и зеленого мутанта № 3, выращенных в анаэробных условиях на свету, на чашках в темноте образуются соответственно только желтые или зеленые колонии. Таким образом, речь идет не о реверсии к исходному штамму, а о способности этих мутантов синтезировать бактериохлорофилл. При этом желтый мутант синтезирует бактериохлорофилл только в анаэробных условиях на свету, а зеленый мутант № 3 и в анаэробных условиях на свету, и при слабой аэрации на свету и в темноте. Известно, что у бактерий синтез бактериохлорофилла зависит

от степени аэрации культур (J. Lascelles, 1960). Видимо, у желтого мутанта этот процесс угнетается кислородом даже в очень малых концентрациях.

Спектры водно-ацетоновых экстрактов из клеток показали, что зеленые мутанты № 1, № 2 и № 3 и желтый мутант образуют пигмент с максимумом поглощения около 630 нм. Пигмент желто-розового мутанта в ацетоне имеет максимум поглощения при 655 нм.

Таким образом, спектры поглощения целых клеток и растворов экстрактов пигментов трех зеленых и желтого мутантов говорят о том, что все они образуют пигмент протохлорофилльной природы, который in vivo находится, видимо, в разных формах.

Следовательно, цепь синтеза бактериохлорофилла у этих мутантов нарушена на одном уровне. Однако, поскольку способность синтезировать бактериохлорофилл у зеленых мутантов № 1 и № 2 утрачена полностью, а у зеленого № 3 и желтого мутантов она проявляется только в определенных условиях, можно предположить, что нарушения в синтезе бактериохлорофилла у разных мутантов имеют несколько различный характер. Различная способность отдельных мутантов образовывать ту или иную форму протохлорофилла в клетках, вероятно, связана с каким-то дополнительным блоком в формировании тонкой структуры их фотосинтезирующего аппарата.

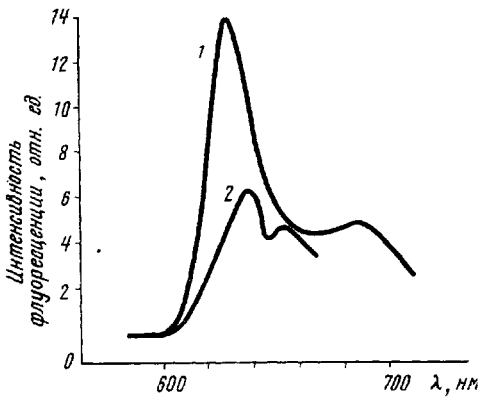


Рис. 2. Спектры флуоресценции пигмента зеленого мутанта № 1:
1 — в серном эфире, *2* — в целых клетках

Пигмент желто-розового мутанта по спектру поглощения близок к пигменту $П_{658}$, который выделяют в среду отмытые клетки Rh. spheroides в присутствии α-кетоглутарата, меди и 8-оксихинолина. По мнению Джонса (O. Jones, 1964, 1967), этот пигмент по уровню окисленности соответствует хлорофиллу а и представляет собой 2-оксиэтилфеофорбид.

Более подробно были исследованы свойства пигмента, образуемого зеленым мутантом № 1, который не синтезирует бактериохлорофилла. В растворе этот пигмент имеет светло-зеленый цвет и обнаруживает максимумы флуоресценции, характерные для протохлорофилльных пигментов, — при 631 и 685 нм (рис. 2). По спектру поглощения пигмент близок к тем соединениям, которые выделили из культуральной жидкости Джонс (O. Jones, 1963), выращивавший эти бактерии в присутствии 8-оксихинолина, и Ласцеллс (J. Lascelles, 1966), изучавшая бесхлорофилльный мутант данного организма. Оба автора идентифицировали выделенный пигмент как монометиловый эфир магний-2,4-дивинилфеопорфирина a_5, т. е. как бесфитольное производное бактериального протохлорофилла (бактериальный протохлорофиллид). От протохлорофиллида растений этот пигмент отличается только наличием 2-й винильной группы в четвертом положении. По спектру поглощения пигмент идентичен протохлорофиллу, который содержится в оболочках семян тыквы (O. Jones, 1965).

Спектры поглощения протохлорофилльных пигментов, выделенных нами из клеток зеленого мутанта № 1 и из оболочек семян тыквы, также оказались чрезвычайно сходными (рис. 3). Максимумы поглощения их находятся соответственно при 434—438, 526, 572, 626 нм и 438, 528, 574, 624—626 нм.

Поскольку спектры протохлорофилла и протохлорофиллида практически одинаковы, наличие фитола у пигмента зеленого мутанта № 1 проверяли хроматографическим анализом и по его растворимости. Сравнение проводили с протохлорофиллом, выделенным из оболочек семян тыквы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основная масса пигмента, выделенного из клеток зеленого мутанта № 1, представляет собой бактериальный протохлорофиллид.

Отсутствие фитола в молекуле пигмента зеленого мутанта № 1, по-видимому, не является результатом его ферментативного разрушения в процессе выделения из клеток, так как извлечение пигмента безводным ацетоном после охлаждения клеток до температуры жидкого азота (что предотвращает действие хлорофиллазы) не отразилось на его хроматографических свойствах. Растирание клеток мутанта, из которого предварительно при комнатной температуре пигменты были из-

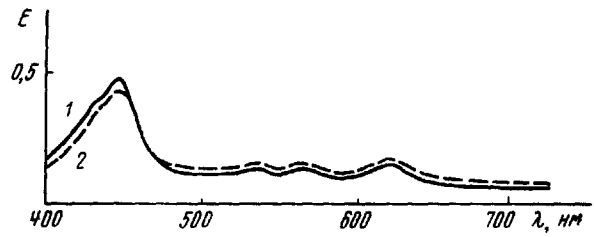


Рис. 3. Спектры поглощения в ацетоне протохлорофилльных пигментов из клеток зеленого мутанта № 1 и оболочек семян тыквы:

1 — пигмент зеленого мутанта № 1, *2* — пигмент из оболочек семян тыквы

влечены 80%-ным ацетоном, с раствором протохлорофилла из оболочек семян тыквы не привело к отщеплению фитола от этого пигмента.

Судя по спектрам поглощения и флуоресценции в клетках бактерий, этот пигмент находится в двух основных формах с максимумами поглощения при 632 и 650 нм и соответствующими максимумами флуоресценции при 638 и 656 нм (рис. 2). В листьях высших растений протохлорофилл также находится в двух формах с максимумами поглощения при 630 и 650 нм и максимумами флуоресценции при 635 и 655 нм (А. А. Красновский и др., 1961).

Таблица 2

Зависимость урожая клеток и образования пигмента у зеленого мутанта № 1 от степени аэрации при росте в темноте

Условия выращивания	200 мл среды		100 мл среды	
	количество клеток, млн/мл	интенсивность флуоресценции при 638 нм, отн. ед.	количество клеток, млн/мл	интенсивность флуоресценции при 638 нм, отн. ед.
Стационарные . . .	54	124	81	91
На качалке	268	55	206	41

Известно, что наличие света не является необходимым условием для образования бактериохлорофилла несерными пурпурными бактериями. Синтез бактериохлорофилла у них зависит прежде всего от концентрации кислорода, однако при освещении бактериохлорофилла образуется больше, чем в темноте. Насколько нам известно, данных о влия-

нии света на синтез протохлорофиллльных пигментов у бактерий в литературе нет.

Оказалось, что у зеленого мутанта № 1 синтез протохлорофиллльного пигмента и урожай таким же образом зависят от условий аэрации и интенсивности света, как образование бактериохлорофилла и урожай у исходного штамма Rh. palustris. В то время как в темноте урожай клеток зеленого мутанта № 1 с повышением степени аэрации культуры

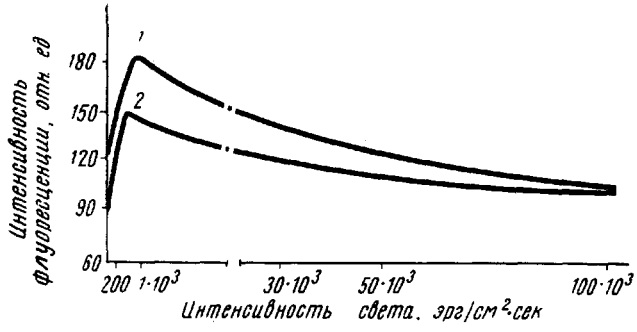


Рис. 4. Зависимость образования протохлорофиллльного пигмента зеленым мутантом № 1 от интенсивности света при выращивании культур в аэробных стационарных условиях:

1 — 200 мл среды в колбе объемом 750 мл, *2* — 100 мл среды в колбе объемом 750 мл

увеличивается, количество протохлорофиллльного пигмента снижается (табл. 2).

Белый свет слабой интенсивности (от 200 до 1000 эрг/см²·сек) значительно увеличивает образование протохлорофиллльного пигмента зеленым мутантом № 1 по сравнению с его образованием в темноте, но

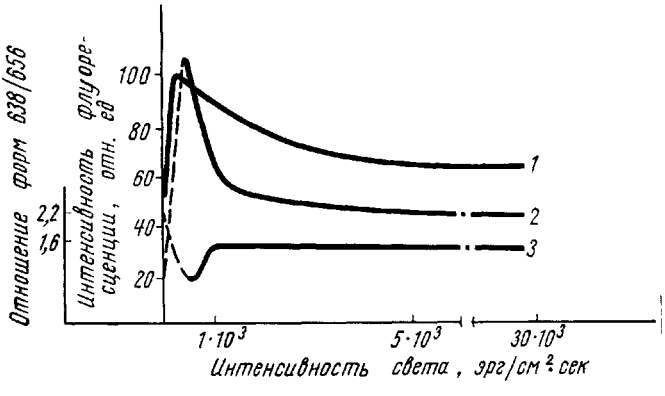


Рис. 5. Изменение соотношения форм протохлорофиллльного пигмента у зеленого мутанта № 1 в зависимости от интенсивности света:

1 — форма 638 нм, *2* — форма 656 нм, *3* — отношение формы 638 нм к форме 656 нм

не оказывает существенного влияния на урожай клеток. С увеличением интенсивности света его стимулирующее действие уменьшается, и количество пигмента с максимумом флуоресценции при 638 нм изменяется мало (рис. 4).

Количество пигмента с максимумом флуоресценции при 656 нм (форма 656 нм) с увеличением интенсивности света меняется в том же направлении, что и количество пигмента с максимумом флуоресценции

при 638 нм (форма 638 нм). Однако соотношение этих форм в клетках, выросших при разных интенсивностях света, не остается постоянным. Свет слабой интенсивности стимулирует образование формы 656 нм в большей степени, чем формы 638 нм. При выращивании бактерий в темноте величина отношения форм пигментов 638/656 была максимальной и, следовательно, содержание формы 656 нм наименьшим (рис. 5).

Выводы об изменении соотношения форм протохлорофиллного пигмента при выращивании зеленого мутанта № 1 на свету и в темноте были подтверждены результатами определения спектров поглощения целых клеток. При выращивании культуры на качалке при слабом освещении (200—400 эрг/см²·сек) образуется преимущественно форма пиг-

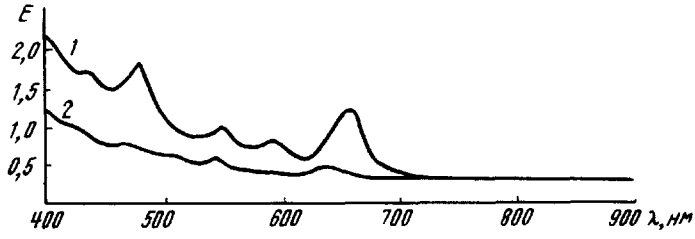


Рис. 6. Образование зеленым мутантом № 1 разных форм протохлорофиллного пигмента в зависимости от наличия света при сильной аэрации:
1 — свет, *2* — темнота

мента с максимумом поглощения при 652 нм (соотношение форм 632/652 примерно 0,7 по поглощению). При выращивании культуры на качалке в темноте образуется преимущественно форма пигмента с максимумом поглощения при 632 нм. При этом количество формы 632 нм, образующейся в темноте, приблизительно в семь раз меньше, чем формы 652, образующейся в клетках, выросших на свету (рис. 6).

Авторы приносят глубокую благодарность сотрудникам Института биохимии АН СССР Л. М. Воробьевой, М. И. Быстровой и сотрудникам кафедры биофизики МГУ Ф. Ф. Литвину и О. И. Беляевой за помощь в работе.

Литература

Воробьева Л. М., Быстрова М. И. и Красновский А. А. 1963. Фитольные и безфитольные формы пигментов в листьях и гомогенатах. Биохимия, т. 28, вып. 3.

Воробьева Л. М. и Красновский А. А. 1966. Хлорофиллид в хлоропластах и гомогенатах листьев. Физиология растений, т. 13, вып. 6.

Годнев Т. Н. 1963. Хлорофилл. Его строение и образование в растении. Минск.

Кондратьева Е. Н. и Малофеева И. В. 1964. К изучению каротиноидов пурпурных бактерий. Микробиология, т. 33, вып. 5.

Красновский А. А., Быстрова М. И. и Сорокина А. Д. 1961. Фракционирование различных пигментных форм в гомогенатах этиолированных и освещенных листьев. Докл. АН СССР, т. 136, № 5.

Успенская В. Э. и Кондратьева Е. Н. 1962. Отношение фотоавтотрофных бактерий к витаминам и синтез витаминов этими организмами. Микробиология, т. 31, вып. 3.

Drews G. u. Schick J. 1966. Die Isolierung phototroph negativen Mutanten von Rhodospirillum rubrum. Z. Naturforsch., Bd. 21b, № 11.

Feldman L. A. a. Lindstrom E. S. 1964. The effect of carotenoid pigments on photooxidation of some photosynthetic bacteria. Biochim. a. biophys. acta, vol. 79., p. 266.

Granich S. 1950. Magnesium vinyl pheoporphyrin a_5 another intermediate in the biological synthesis of chlorophyll. Journ. Biol. Chem., vol. 183, № 2.

Griffiths M. 1962. Further mutational changes in photosynthetic pigments system of Rhodopseudomonas spheroides. Journ. Gen. Microbiol., vol. 27, № 3.

Griffiths M., Sistrom W. R., Cohen-Bazire G. a. Stanier R. Y. 1955. Function of carotenoids in photosynthesis. Nature, vol. 176, p. 1211.
Griffiths M. a. Stanier R. Y. 1956. Some mutational changes in photosynthetic pigment system of Rhodopseudomonas spheroides. Journ. Gen. Microbiol., vol. 14, № 3.
James R. P. a. Lindstrom E. S. 1967. Effect of thiosulfate on the photosynthetic growth of Rhodopseudomonas palustris. Journ. Bacteriol., vol. 94, № 4.
Jones O. T. G. 1963. Magnesium 2,4-divinylphaeoporphyrin a_5 monomethyl ester, a protochlorophyll-like pigment produced by Rhodopseudomonas spheroides. Biochem. Journ., vol. 89, № 2.
Jones O. T. G. 1964. Studies on the structure of a pigment related to chlorophyll a produced by Rhodopseudomonas spheroides. Biochem. Journ., vol. 91, p. 572.
Jones O. T. G. 1965. Protochlorophylls of green plants and bacteria. Biochem. Journ., vol. 96, № 1.
Jones O. T. G. 1967. Intermediates in chlorophyll biosynthesis in Rhodopseudomonas spheroides: effects of substrates and inhibitors. Phytochemistry, vol. 6, № 10.
Lascelles J. 1960. The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of Rhodopseudomonas spheroides. Journ. Gen. Microbiol., vol. 23, p. 487.
Lascelles J. 1966. The accumulation of bacteriochlorophyll precursors by mutant and wild-type strains of Rhodopseudomonas spheroides. Biochem. Journ., vol. 100, p. 175.
Niel C. B., van. 1944. The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. Bacteriol. Revs., vol. 8, p. 1.
Sistrom W. R. 1966. The spectrum of bacteriochlorophyll in vivo: observations on mutants of Rhodopseudomonas spheroides unable to grow photosynthetically. Photochem. et photobiol., vol. 5, p. 845.
Sistrom W. R., Griffiths M. a. Stanier R. Y. 1956. The biology of photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. Journ. Cell. a. Comp. Physiol., vol. 48, № 3.
Zimmerman F. R., Schweier R. a. Laer U. V. 1965. The influence of pH on the mutagenity in yeast of N-methylnitrosamides and nitrous acid. Z. Vererbungslehre, Bd. 97, № 1.

Рекомендована кафедрой микробиологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Поступила
15 января 1969 г.

Reprint from

Progress in Photosynthesis Research

Edited by Helmut Metzner

Tübingen 1969

Progress in Photosynthesis Research, Vol. II, 709–727 (1969)

The Principles of Light Energy Conversion in Photosynthesis: Photochemistry of Chlorophyll and the State of Pigments in Organisms

A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry
USSR Academy of Sciences, Moscow, USSR,

In photosynthesis the light energy absorbed by the pigment system is converted into potential chemical energy of the stable products – organic compounds and molecular oxygen.

The fixation and reduction of carbon dioxide proceeds in the cycle of "dark" enzymatic reactions using reduced pyridine nucleotides and adenosine triphosphate formed as a result of the work of the photosynthetic electron transfer system. Thus, the light energy conversion proceeds in the chain of photosynthetic electron transfer where photochemical reactions of excited chlorophyll molecules are coupled with the work of biochemical oxido-reductive systems. These reactions are localized in chloroplasts and chromatophores and the peculiarities of molecular organizations of these subcellular structures are closely bound with the mode of photosynthetic electron transfer.

To understand the action principles one can reduce the whole system to more simple units. The system can be studied at different levels of structural organization ranging from isolated pigments in lipoproteinic complexes to intact organisms.

The work of our laboratory is based on the following logical scheme: Photosynthesis begins with the absorption of light quanta by the pigment system. Thus, we must know the properties of excited pigment molecules and mode of their participation in photochemical electron transfer. A study of photochemistry of isolated pigments shows only the possible hypothetic ways of their participation in photosynthesis.

To understand the function of pigments we need to study the nature of the state and transformations of pigments in the organisms, the molecular organization of lipoproteinic structures in chloroplasts and chromatophores. The next step is to study the pigment changes directly in intact cells. We have compared the pigments of green plants and photosynthetic bacteria and studied the analogs of chlorophyll differing by their chemical structure. We used mostly spectral methods – various modifications of absorption and luminescence spectrophotometry providing information on the fast primary reactions and the state of molecules without violation of the cell structure. Reviews of

the work of our laboratory have been published elsewere [1–4]; I wish to present here only some recent results avoiding the historical survey of the questions under study.

Excited states. The absorption of a light quantum by a molecule of chlorophyll leads to a singlet excited state (S*) which is converted into a metastable triplet molecule (T) capable of absorbing a second light quantum (fig. 1, 2). Such excited triplet molecules which accumulated the energy of two quanta were observed only at very high light intensities when the stationary concentration of triplet molecules is high enough; this type of elementary processes is very improbable in photosynthesis which requires rather low intensities of light.

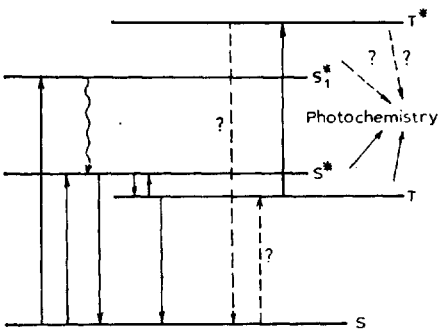


Fig. 1: Scheme of excited electronic levels of chlorophyll.

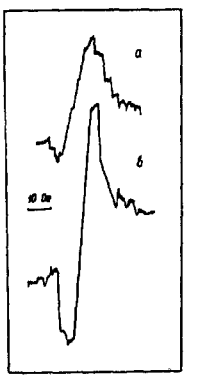


Fig. 2: ESR spectra. Illumination of chlorophyll b in alcohol at -196°C; a – triplet (H 1600 Oe), b – radical (H 3300 Oe).

The phenomenon of fluorescence quenching is widely used in studies of the properties of excited singlet molecules; the properties of triplet molecules were investigated with the aid of flash photolysis and delayed fluorescence due to transition $T \rightarrow S^* \rightarrow S$.

Vast experimental material suggests that the photochemistry of organic molecules in solutions proceeds mainly with the participation of triplet excited states.

Reversible photoreduction. We have found that excited chlorophyll and its analogs easily react with electron donors: ascorbic acid and dienols, cysteine, hydroquinone, reduced pyridine nucleotides, some ferrous compounds, phenylhydrazine etc. The reaction is observed both in basic media (as pyridine, see fig. 3) and in acids where rather stable intermediates are formed. The electron donors listed above practically do not quench fluorescence. Thus triplet excited molecules take part in the reaction; as shown by LIVINGSTON [5] and others in flash photolysis experiments.

An ion-radical pair is formed in the elementary electron transfer from a donor molecule to the excited pigment $P^* + AH \rightleftharpoons \cdot P^- + \cdot AH^+$.

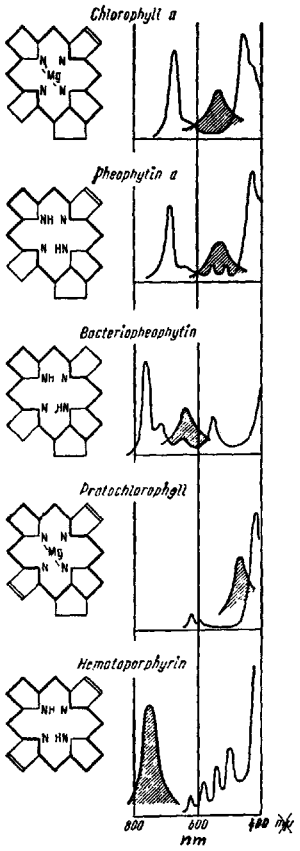


Fig. 3: Absorption spectra of pigments and their photoreduced forms (shadowed).

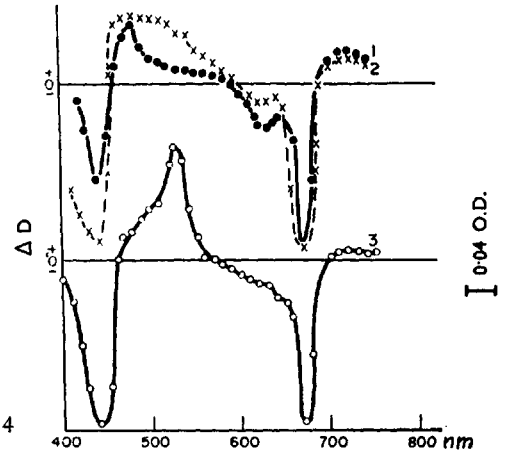


Fig. 4

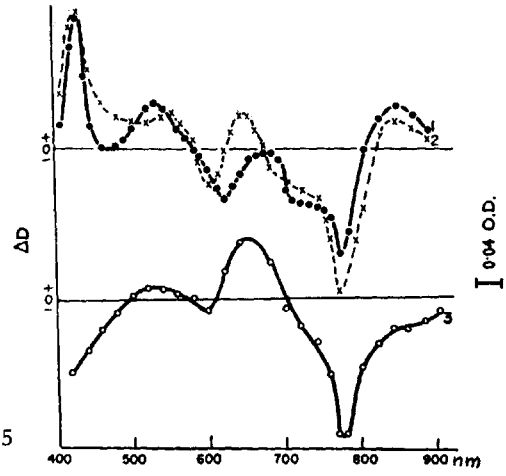


Fig. 5

Fig. 4: Differential absorption spectra upon photochemical oxidation and reduction of chlorophyll a: 1 – oxidation by p-benzoquinone; 2 – by oxygen; 3 – reduction by ascorbic acid.

Fig. 5: Differential absorption spectra upon photochemical oxidation and reduction of bacteriochlorophyll: 1 – oxidation by p-benzoquinone; 2 – by oxygen; 3 – reduction by sodium sulfide.

Fig. 6: Differential absorption spectra upon photochemical oxidation and reduction of bacterioviridin: 1 – oxidation by p-benzoquinone; 2 – by oxygen; 3 – reduction by ascorbic acid.

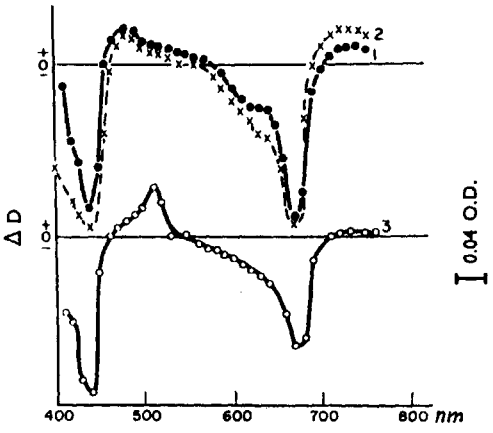
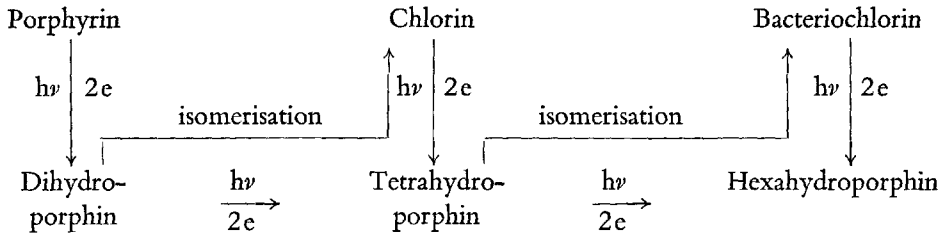


Fig. 6

The accepted electron is probably delocalized in the circulary conjugated double bond system of the pigment molecule; at the same time a cation-radical of the electron donor is formed, e.g. monodehydroascorbic acid. The radicals are observed by ESR measurements, initiation of monomer polymerisation technique and by flash photolysis. FUJIMORI [6] recently found that in the photoreduction of chlorophyll by hydroquinone the ejection of a proton into the medium proceeds with a change of pH.

More stable reduced compounds (such as pink reduced chlorophyll) differ by the number of accepted electrons and protons but the site of the hydrogen atoms in the reduced pigment molecules is still unclear; SEELY [7] proposed the formation of phlorine type structures; however the reduction may proceed at the nitrogen atom, methine bridge etc. (SIDOROV, GURINOVICH).

The following simplified scheme of the porphyrin photoreduction can be proposed [8]:



The intermediates having odd numbers of electrons are free radicals which depending on the acid-base properties of the medium can be cation or anion radicals.

Photoreduced pigments easily react with oxidants regenerating the initial pigment molecule. As oxidants we used oxygen, quinones, riboflavin, methylviologen, some dyes, pyridine nucleotides etc. The photoreduced intermediates easily exchange the central magnesium atom for hydrogen and thus the photochemical pheophytin formation [9–11] is a criterion of intermediate photoreduction in the case where no stable reduced compounds are formed (as in the reaction with hydroquinone or the solvent molecule).

Table 1

Half-time of pheophytinization (min)

Pyridine + 10% water, anaerobic, chlorophylls 10^{-5} M, oxalic acid 10^{-2} M, red light 10^5 erg/cm²/sec, 20° C

Pigment	Dark	Light
Bacterioviridin	60	14
Chlorophyll a	180	12
Protochlorophyll	600	10
Chlorophyll b	1400	9

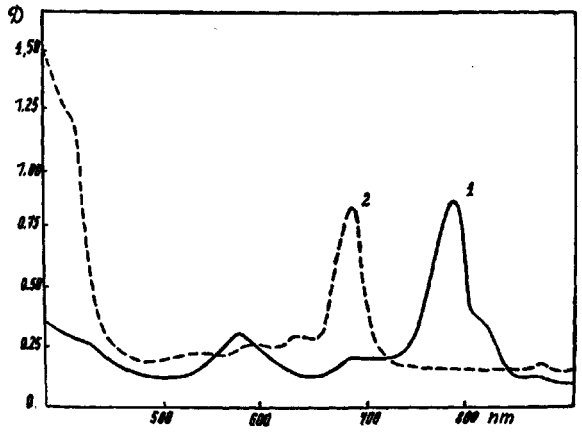


Fig. 7: Irreversible photoxidation of bacteriochlorophyll by o-quinone in acetone at + 20° C: 1 – initial absorption spectra; 2 – after illumination (3 min).

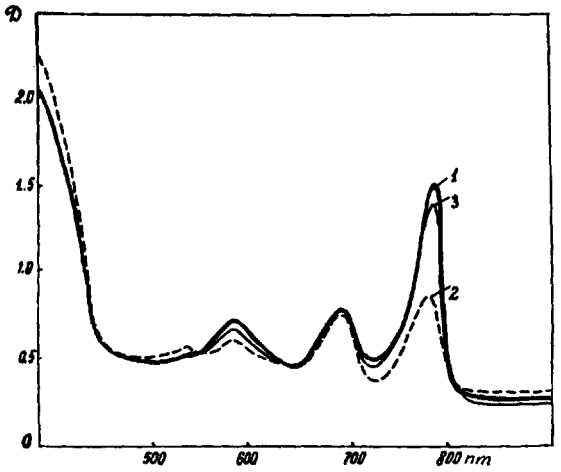


Fig. 8: Reversible photoxidation of bacteriochlorophyll by o-quinone in acetone at -70° C: 1 – initial absorption spectra; 2 – after illumination (3 min); 3 – after back reaction.

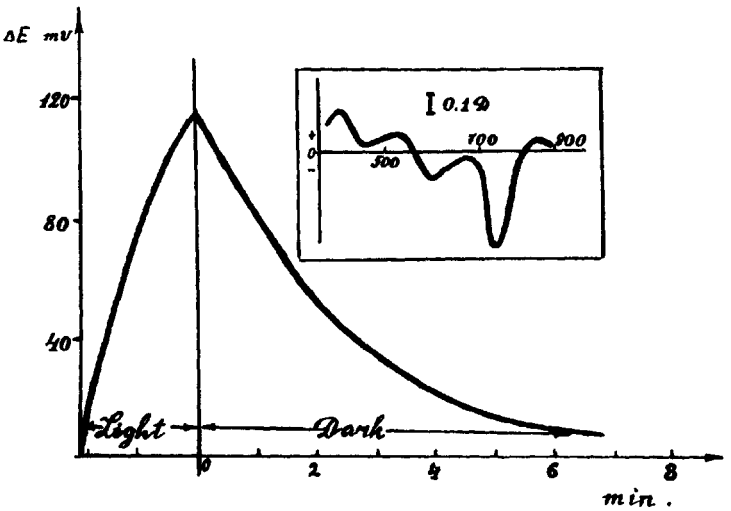
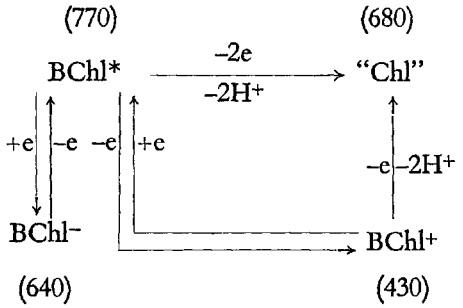


Fig. 9: Reversible photoxidation of bacteriochlorophyll by ubiquinone: A – differentialspectrum light-dark; B – change of photopotential of Pt electrode.

Reversible photoxidation of chlorophyll by ferric ions was discovered more than 30 years ago by RABINOWITCH and WEISS [12]; LINSHITZ [13] and TOLLIN [14] observed the reaction with p-quinone in rigid media; in our laboratory oxygen and benzoyl-peroxyde were effective [15]. We compared the photoxidation of chlorophyll, bacterio-viridin and bacteriochlorophyll by quinones in viscous ethyl alcohol-glycerol media at –70° C in which intermediate photoxidized pigments are stabilized but react back upon defreezing (fig. 4–6). We have measured the absorption spectra of photoxidized pigments which resemble the spectra of reduced intermediates [16–18]. The differential (light-dark) absorption spectra of photoxidized pigment are the same in viscous media at –70° C and in alcohol at +20° C measured by flash photolysis technique [19]. The photoxidation of bacteriochlorophyll by quinones [20] reveals, depending on the conditions of experiment, irreversible formation of a green chlorophyllous compound (at +20° C) or a reversible reaction (at –70° C) with formation of a labile intermediate (probably a free radical) with characteristic absorption at 430 nm (fig. 8, 9). This sequence of bacteriochlorophyll reactions is shown in the following scheme:



The reversible reaction of bacteriochlorophyll with ubiquinone can be observed at room temperature (fig. 10). This reaction may serve as a model of primary reactions of bacteriochlorophyll in photosynthesis.

EVSTIGNEEV and GAVRILOVA [21] demonstrated that in acidic media the photoxidation of pigment is more profound and is accompanied by the formation of electrode-active intermediates probably cation-radicals of chlorophyll. The problem will be covered in EVSTIGNEEV's lecture. The oxidized intermediates of bacteriochlorophyll and its analogs react with reductants – ascorbate, thiourea etc. – regenerating the initial pigment molecule ([22, 23]; fig. 7). After photoxidation of the pigments by oxygen chemiluminescence is observed which is caused by the transformations of primary pigment peroxides (fig. 11). In the chemiluminescence spectra along with an afterglow, identical with fluorescence, shortwave components are measured probably due to photoxidized products. This afterglow is effectively inhibited by thiourea, ascorbic acid, carotene – the substances reacting with primary moloxides [24].

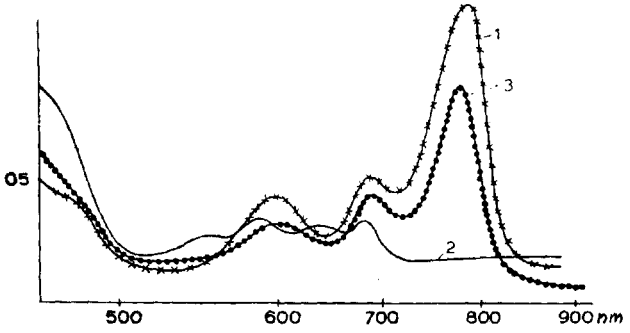


Fig. 10: Reversible bacteriochlorophyll photoxidation in alcoholic solution by oxygen. Red light 10^4erg/cm^2/sec: 1 – initial absorption spectrum; 2 – after 45 sec illumination.

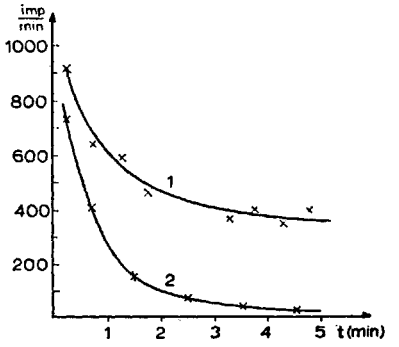


Fig. 11: Chemiluminescence after photoreduction and photoxidation of chlorophyll solution in pyridine: 1 – after 10 sec illumination of chlorophyll solution (aerobic); 2 – after air and ammonia admittance to photoreduced solution (by ascorbic acid).

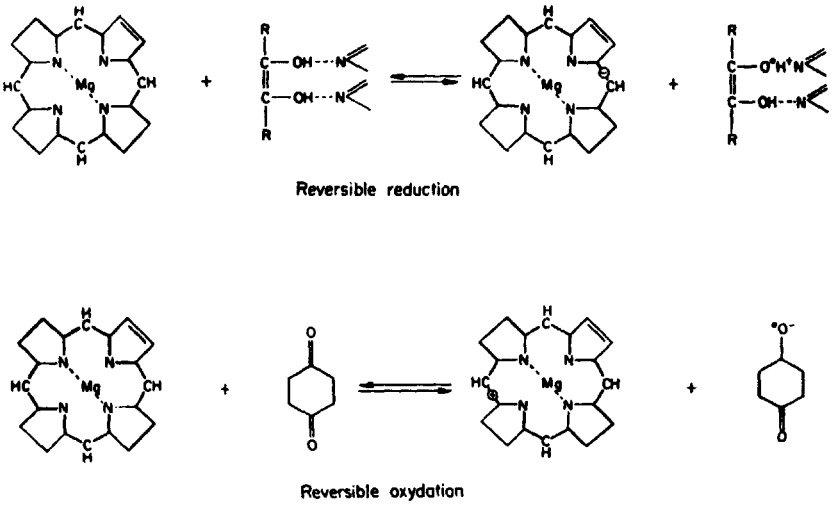


Fig. 12: The scheme of reversible oxidation and reduction of chlorophyll.

The photochemical properties of excited chlorophyll and analogs are summarized on fig. 12 and in the following table.

The electron acceptors which photoxidize chlorophylls are able to cause "dark" oxidation of photoreduced pigments. Thus the electron donor-acceptor pairs listed above can work as partners of oxido-reductive reactions photosensitized by chlorophylls. The quenching of fluorescence by electron donors and acceptors indicates the properties of excited singlet states of chlorophyll [25]. The electron donors practically do not quench the chlorophyll fluorescence.

Table 2

Electron donors and acceptors reacting with excited chlorophylls

Electron donors for photoreduction	Electron acceptors for photoxidation
Ascorbic acid	Oxygen
Dienols	Ferric compounds
Cystein	Quinones (o- and p-)
Tryptophane	Ubiquinones
Phenylhydrazine	Plastoquinones
NADH, NADPH	Nitro compounds
Hydroquinone	Methylviologen, dyes
Ferrous compounds	

Correlation with photoxidation was studied in the case of oxidants (electron acceptors) which quench fluorescence. Oxygen quenches the fluorescence of chlorophyll analogs irrespective of the efficiency of photoxidation.

For instance, the fluorescence of pheophytin is quenched by oxygen more effectively than that of chlorophyll [25]; in contrast chlorophyll is photoxidized by oxygen more effectively than pheophytin (which is very stable with respect to photoxidation). At –70° C when quenching disappears the photoxidation proceeds at the same rate. In the case of quinones the quenching effect does not depend on the pH values while photoxidation by quinones shows a characteristic dependence on pH; at –70° C quenching disappears but the photoreaction is preserved. All these observations along with the flash photolysis experiments indicate the pronounced activity of triplet excited states in the photoreactions of dissolved chlorophylls.

Photosensitization. Photosensitized electron (hydrogen) transfer was observed in the triplet system (electron donor – pigment – electron acceptor) upon illumination in the

longwave absorption band of the pigments. The reactions were studied in organic solvents, aqueous solutions of detergents, homogenates and chloroplast suspensions.

We used as electron donors ascorbic acid, cystein, thiourea, reduced pyridine-nucleotides etc., as electron acceptors oxygen, various dyes, $NADP^+$, viologens etc. For example, in an aqueous solution of the detergent Triton X-100 *in vacuo* chlorophyll sensitizes the photoreduction of cytochrome c and after admittance of air photoxidation of reduced cytochrome. Under the same conditions chlorophyll sensitizes the

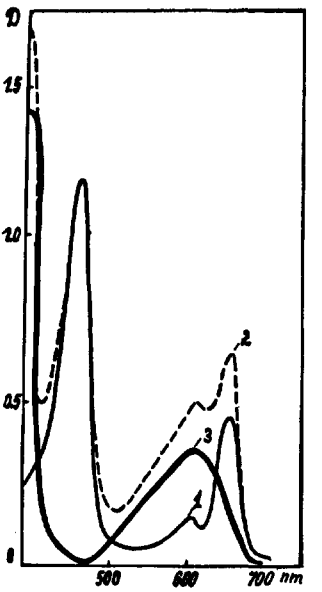


Fig. 13: Chlorophyll b photosensibilized reduction of methylviologen by cysteine: 1 – dark; 2 – light; 3 – difference spectrum.

reduction of methylviologen by cysteine (fig. 13); in this case the extent of reduced viologen is comparable with the reaction observed in chloroplasts [26, 27]. The reactions studied may be considered as models for photochemical reaction I of photosynthesis with the use of viologen instead of ferredoxin.

The mechanism of the reaction studied does not involve energy transfer from excited triplet pigment molecule to the reacting molecules because the electron acceptors and donors used according to present knowledge do not possess triplet levels situated lower than the T level of chlorophyll, this being a necessary prerequisite of energy transfer. But probably this is the case when carotene or tetracene inhibit the photoreactions of chlorophyll [43]. The experiments indicate that the elementary mechanism of reactions studied involves primary photoxidation or photoreduction of the sensitizing pigment accompanied by a "dark" stage of interaction between the primary photoproducts and electron donors or acceptors (see fig. 14). The domination of a given type of primary photoreaction depends on the nature of the medium and the properties of reactants.

Using thiourea we could not see the photoreduction of chlorophyll; so a primary reaction with methylviologen is possible. This substance is an effective quencher of chlorophyll fluorescence and the flash technique had shown the effective interaction of methylviologen with triplet excited chlorophyll [28].

Along with involvement of photoreduced and photoxidized pigments in the system of sensitized reactions there is a possibility of participation in the intermediate reactions of semi-oxidized electron donors and semi-reduced electron acceptors; the photoxidation of thiourea leads to the appearance of very active reducing substances able to reduce in the dark viologens, safranine and other electron acceptors.

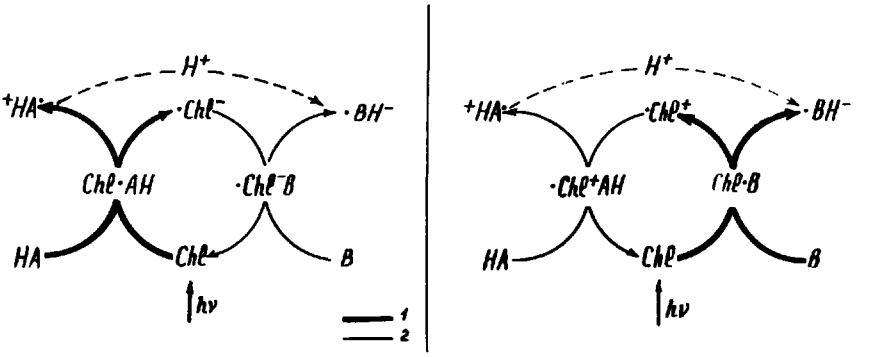


Fig. 14: Mechanism of photosensitization by chlorophyll: 1 – light stage; 2 – dark stage. AH – electron donor, B – electron acceptor.

Thus the mechanism of photochemical electron transfer in model systems usually involves a reversible transformation of the pigment sensitizers. The question is what mechanism of electron transfer operates in living organisms; the elucidation of this problem requires knowledge of the state of pigments in the photosynthetic organisms.

The state of pigments in cells differs from that in solution. Usually the absorption and fluorescence spectra of pigments are situated in the longwave region as compared with dissolved pigments. This phenomenon is particularly pronounced in the case of bacterial chlorophylls. The bulk of pigments in chloroplasts and chromatophores exists in closely packed aggregated forms. Many years ago we observed that pigments in solid films and colloids reveal the types of aggregation seen in living cells and perfectly reproduce the spectra of pigments in organisms [29].

Thus solid films of chlorophyll a (obtained by evaporation of ether solution) have an absorption maximum at 680 nm just as in chloroplasts; in water vapor at +20° C a shoulder appears at 705–715 nm; heating up to 50° C leads to a crystalline form absorbing at 740–745 nm ([30, 31]; fig. 15). The vapor of methanol, ethanol, aqueous solutions of acetaldehyde, formaldehyde and ammonia produced the same effect at room temperature probably due to bonding with magnesium atoms of chlorophyll making

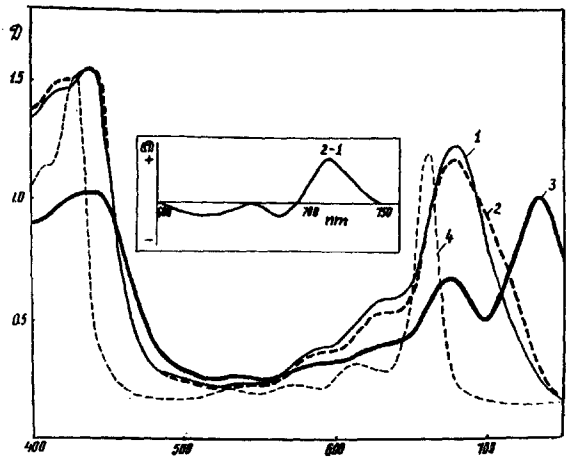


Fig. 15: Absorption spectra of chlorophyll a: 1 – solid film; 2 – in H_2O vapour; 3 – in CH_3OH vapour; 4 – dissolved in ether.

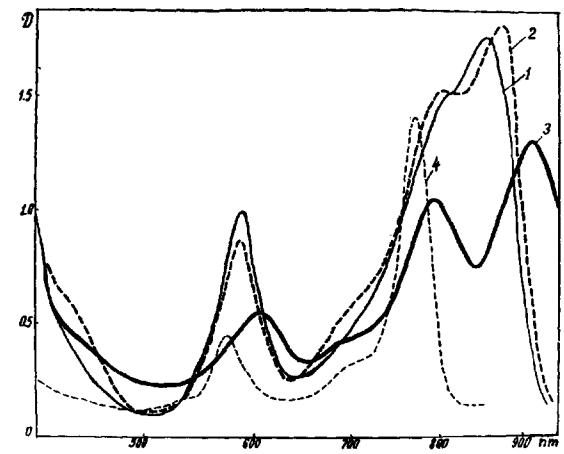


Fig. 16: Absorption spectra of bacteriochlorophyll: 1 – solid film; 2 – in H_2O vapour; 3 – in CH_3OH vapour; 4 – dissolved in ether.

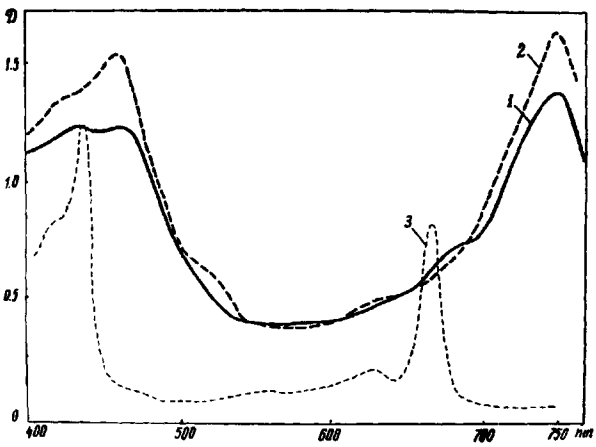


Fig. 17: Absorption spectra of bacterioviridin: 1 – solid film; 2 – in green bacteria; 3 – dissolved in ether.

"bridges" between the pigment molecules in aggregates. The solid films of bacteriochlorophyll possess usually two absorption maxima at 800 and 860 nm; in the vapors of water, alcohols or acetaldehyde containing ether a longwave maximum at 900–920 nm appears (fig. 16). The films of *Chlorobium* chlorophyll (bacterioviridin) display the same longwave shift (740–760 nm) as the pigment in green bacteria (fig. 17) when dissolved pigment absorbs at 665 nm as chlorophyll a. The shorter farnesol "tail" in bacterioviridin molecule as compared with phytol in chlorophyll facilitates aggregation. Similar effects are seen in low temperature fluorescence spectra of aggregated pigments (e.g. [32]; fig. 18). A study of the fine structure of absorption and luminescence spectra of aggregated pigments in cells and in solid films has shown their pronounced similarity [33].

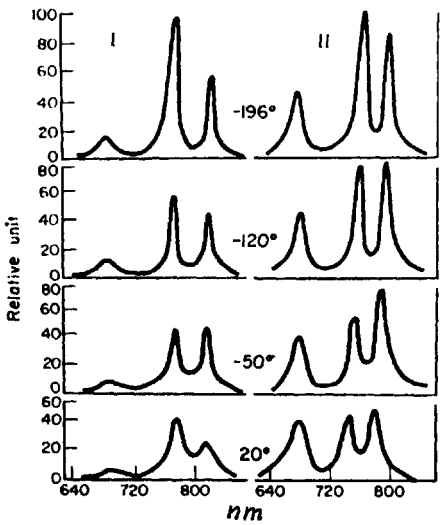


Fig. 18: Fluorescence spectra of bacterioviridin in the cells of sulfur bacteria (I) and in solid films (II) at different temperatures.

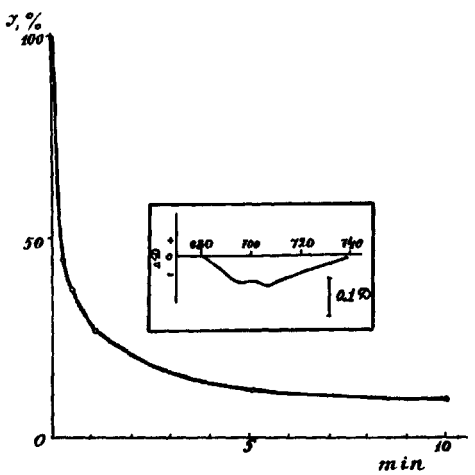


Fig. 19: Illumination of chlorophyll a solid film in air: A – decrease of fluorescence at 750 nm; B – light-dark differential spectrum.

Thus the chemical structure of the pigment molecule and the presence of low-molecular addenda determine the mode of pigment molecular arrangement in aggregated structures in chloroplasts and chromatophores. The fluorescence of solid films of chlorophyll and analogs measured at room temperature in air strongly decreases under the action of the light beam exciting the luminescence; the phenomenon is due to photoxidation of certain chlorophyll forms. The strongest bleaching was seen in the 695–705 nm region (fig. 19).

The gradual conversion from monomeric to aggregated chlorophyll forms in the course of greening of etiolated leaves was studied in our laboratory a long time ago with the aid of absorption and luminescence spectra measurements [34].

Studying a chlorophyll-deficient corn mutant, F. LANG and L. VOROBIEVA in our laboratory had shown that in etiolated mutant leaves along with large amounts of protochlorophyllide (fluorescence maximum at 665 nm, –198° C) there is an appreciable amount of protochlorophyll (630); when illuminated the precursors convert independently to the chlorophyllide and chlorophyll respectively.

Under the action of strong light on the homogenates and leaves bleaching of monomeric shortwave chlorophyll forms occurs first; this is followed by bleaching of the aggregated forms. We proposed [34, 35] that bleaching of chlorophyll in leaves requires intermediate disaggregation of aggregated pigment forms. This phenomenon was seen

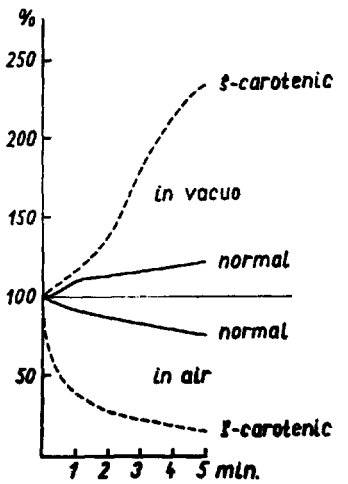
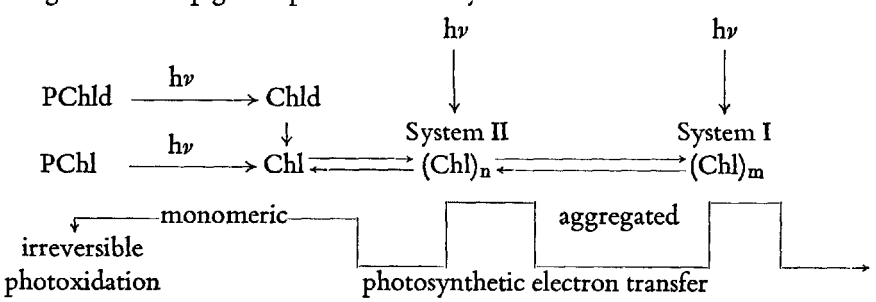


Fig. 20: Photo-desaggregation of chlorophyll in corn leaves, intensity of fluorescence maxima at 735 nm.

most clearly in the leaves of ζ-carotenic corn mutant in LANG's experiments in our laboratory. Illumination *in vacuo* of these leaves caused a drastic enhancement of fluorescence; after admission of air a rapid decrease of fluorescence occurred which was due to oxidative bleaching of monomeric chlorophyll. To observe the disaggregation one must carefully avoid the oxygen reacting rapidly with monomeric chlorophyll (fig. 20, 21). In this process the shortwave chlorophyll of System II may be formed from the bulk of aggregated longwave pigment of System I.

Thus we can propose the following scheme of interconversion of different chlorophyll forms serving the I and II pigment photochemical systems:



To study the pigment forms separately one must fractionate the solubilized chloroplast and chromatophore material. During the process of tissue dispersion there is a danger of chlorophyllide formation as an artifact [35] in the case of leaves having active chlorophyllase (*Chenopodium*, sugar beet leaves etc.). We have separated this component by centrifugation along with "shortwave" forms of chlorophyll. This phenomenon must be taken into account when isolating chlorophyll-proteinic complexes from leaves having active chlorophyllase.

Table 3

Chlorophyllide in leaf homogenates (percent of chlorophyll)

Plant	after 30 min +2°C	after centrifugation 21,000 g, 30 min, +2°C
Beans	0.7	1.5
Chenopodium	10.5	23.3

Various aggregated forms of chlorophyll and bacteriochlorophyll in the cell are bound to different lipoproteinic structures. The fractionation of solubilized chromatophores on acrylamide gel by EROKHIN in our laboratory [36] allowed to separate aggregated form B 890 containing cytochromes and aggregated form B 850 bound with lipids (fig. 22);

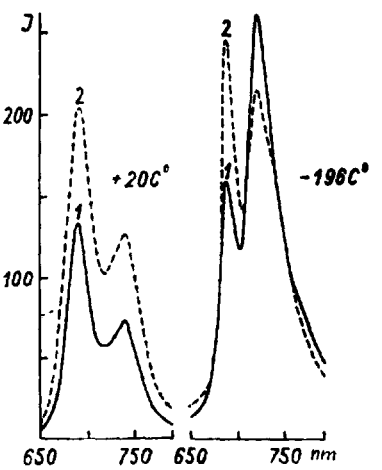


Fig. 21: Photo-desaggregation of chlorophyll in ζ-carotenic mutant corn leaves, fluorescence spectra: 1 – before illumination; 2 – after illumination (10^6 erg/cm^2 sec).

the results are in agreement with VERNON et al. [37] who resolved these fractions by ultracentrifugation. Isolated pigment-protein-lipid complexes are able to perform simple photochemical reactions but the problem is to reveal their mode of action in living organisms.

A study of light-dark differential spectra of green leaves and chloroplasts revealed a pronounced effect of red fluorescence burst (excited by the measuring monochromatic beam) under the action of the actinic light pulse ([38]; fig. 23). This phenomenon prevented the measurement of small changes of optical density in the red. In the case of light-dark differential spectra of purple bacteria studied first by DUYSENS [39] the absorption increase at 800–900 nm and decrease at 810, 850, 890 nm is not complicated by fluorescence changes. A study of light-dark spectra in the course of thermal inactivation of purple bacteria [40] had shown the diverse properties of different forms – B 980, 850 and 800 nm. For instance, the heating of *Chromatium spec.* up to 60°C leading to inhibition of photosynthesis drastically increases D (light-dark) of B 890 and increases the ESR signal in the light (fig. 24); this is probably due to disruption of the electron transfer chain coupled with the active center. The light-dark spectra observed in the case of bacteria differ from the oxidoreductive spectral changes in solution and probably reflect the changes in the state of pigment-protein complex involving the conformational rebuilding and the disaggregation of pigment forms under the action of light. The problem will be discussed by N. KARAPETYAN [44].

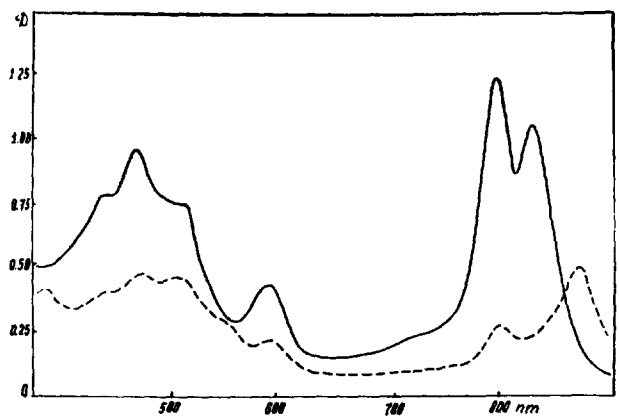


Fig. 22: Fractionation of solubilized (by Triton X-100) chromatophores of *Chromatium* on acrylamide gel.

At the same time the changes of the pigment active center (longwave trap) may be due to fast reversible oxido-reductive transformations which are difficult to measure by the technique of differential spectra measurement. As the bulk of the pigments in organisms represents aggregated highly concentrated forms the behavior of this semicrystalline forms may be described in terms of a semiconductor model.

The phenomenon of chloroplast thermoluminescence discovered by ARNOLD is due more to chemiluminescence of chlorophyll [41] than to thermoluminescence of the semiconductor type. On the other hand aggregated pigments in solid films, chloroplasts and chromatophores possess photoconductivity and the action spectra of this phenomenon points to the pronounced activity of longwave "crystalline" pigment forms ([42]; fig. 25, 26). It is not clear now whether this effect is an inevitable result of high pigment

concentration being only a side phenomenon; or whether the photoconductivity is closely coupled with the elementary mechanism of photosynthesis. In this case electron tunnelling in the conductance band of a longwave pigment trap from electron donor to the acceptor in the chain of photosynthetic electron transfer is possible. But the fact that under the action of light pulse changes in optical density are observed indicates the

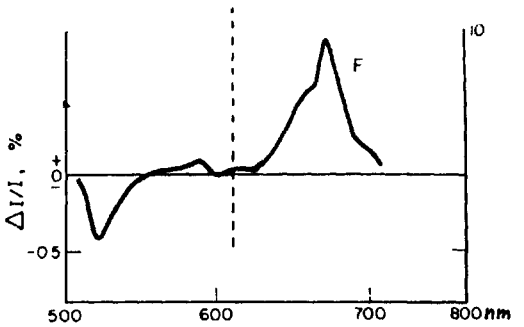


Fig. 23: Differential light-dark spectrum of *Chlorella* suspension: on the left – change in light transmission, on the right – change in fluorescence in relative units.

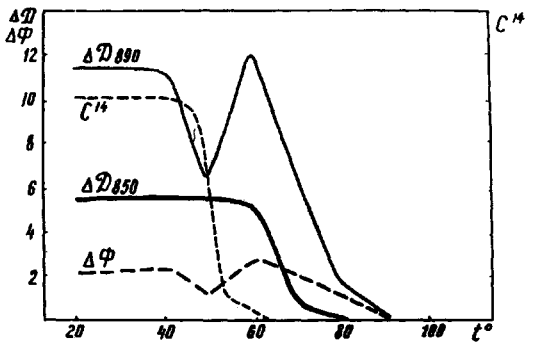


Fig. 24: Heating of *Rhodopseudomonas spec.* Incorporation of ^{14}C acetate, changes of absorption (Δ D) and fluorescence (Δ F).

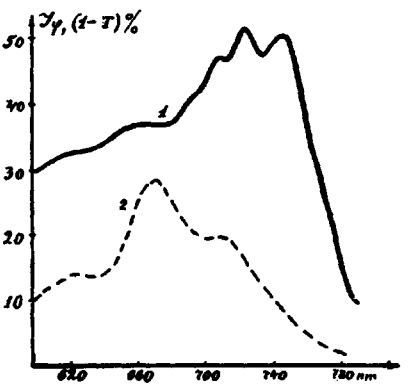


Fig. 25: Photoconductivity of chlorophyll a solid film (1), absorption spectrum (2).

possibility of rapid reversible photochemical interconversion of the active center in the course of its action. The active center is probably an aggregate of several pigment molecules.

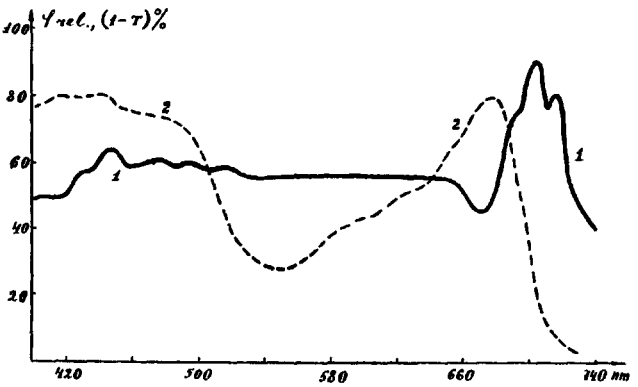


Fig. 26: Photoconductivity of chloroplasts (1), absorption spectra (2).

The experimental data available underline the wide-spread idea that the energy of light quanta absorbed by the bulk of pigment migrate to an active center which is a small amount of pigment in a peculiar state and which directly participates in the electron transfer mechanism. If the action of the active center is coupled with reversible acception or donation of the electron by a pigment molecule of the aggregate, a discussion of the physical or of the chemical mechanism of primary light quantum conversion is more the matter of terminology than the essence of the subject under study.

Summary

Excited molecules of chlorophyll, bacteriochlorophyll and its analogs are capable of undergoing reversible acception or donation of an electron (hydrogen) by interaction with a suitable partner molecule. As electron donors were used dienols, cysteine, hydroquinones, NADH etc.; as electron acceptors oxygen, o- and p-benzoquinones, ubiquinones, ferric compounds etc. A pair of free radicals is formed in the primary reaction, and chemiluminescence arises after photoreduction and photoxidation of pigment molecules in the presence of oxygen.

The ability of pigments to undergo reversible oxido-reductive transformations underlines the photosensitization of electron (hydrogen) transfer from donor molecule (ascorbate, cysteine etc.) to acceptor molecule (oxygen, pyridine nucleotides, viologens, dyes etc.).

The spectral peculiarities of pigments in organisms are due mostly to aggregation of pigment molecules. Solid films of chlorophyll, *Chlorobium* chlorophyll, bacteriochlorophyll display the same absorption and luminescence spectra as the pigments in organisms. The type of molecular arrangement in aggregated structures depends on the chemical

structure of the pigments and on low-molecular addenda (water, etc.) incorporation. A study of greening of etiolated leaves reveals a gradual conversion from monomeric to aggregated forms of phytolated and unphytolated pigments. By the action of strong light on leaves the primary bleaching of monomeric chlorophyll is observed and secondary bleaching of aggregated forms is coupled with the phenomenon of light disaggregation which can shift the proportions between the pigment pools in Systems I and II.

The different types of bacteriochlorophyll aggregates (890, 850, 800 nm) bound to proteins and lipids were separated from chromatophores of photosynthetic bacteria. These aggregated bacteriochlorophyll forms (B 800, 850, 890) in bacteria reveal diverse properties in the course of thermal inactivation which may be due to functional difference of the forms.

Light energy conversion at the level of the lowest trap (aggregated pigment) is probably coupled with direct participation of a pigment aggregate reaction center in the photosynthetic electron transfer chain.

References

[1] KRASNOVSKY, A.A.: Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 363 (1960).
[2] KRASNOVSKY, A.A.: Photochem. Photobiol. **4**, 641 (1965).
[3] KRASNOVSKY, A.A.: "Elementarnie fotoprocessy v moleculakh", 213, Izd. "Nauka" 1966.
[4] KRASNOVSKY, A.A.: "Biokhimya i Biophysika photosinteza", 26, Izd. "Nauka" 1965.
[5] LIVINGSTON, R.: Quart. Rev. **14**, 174 (1960).
[6] QUINLAU, K.P., and E.FUJIMORI: Photochem. Photobiol. **6**, 665 (1967).
[7] SEELY, G.R.: In "The Chlorophylls", 253, Academic Press, N.-Y., London, 1966.
[8] UMRIKHINA, A.V., G.A.JUSUPOVA, and A.A.KRASNOVSKY: Doklady Akad. Nauk SSSR. **175**, 1400 (1967).
[9] KRASNOVSKY, A.A., and E.V.PAKSHINA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **148**, 935 (1963).
[10] PAKSHINA, E.V., and A.A.KRASNOVSKY: Biokhimya **29**, 1132 (1964).
[11] PAKSHINA, E.V., M.I.BYSTROVA, and A.A.KRASNOVSKY: Molecularnaya biologya **1**, 154 (1967).
[12] RABINOWITCH, E., and J.WEISS: Proc. Roy. Soc. London **162**, 251 (1937).
[13] LINSHITZ, H., and J.RENNERT: Nature **169**, 193 (1952).
[14] TOLLIN, G., and G.GREEN: Biochim. Biophys. Acta **60**, 524 (1962).
[15] KRASNOVSKY, A.A.: Doklady Akad. Nauk SSSR. **58**, 835 (1947).
[16] KRASNOVSKY, A.A., and N.N.DROZDOVA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **150**, 1378 (1963).
[17] KRASNOVSKY, A.A., and N.N.DROZDOVA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **158**, 730 (1964).
[18] DROZDOVA, N.N., and A.A.KRASNOVSKY: Biokhimya **30**, 605 (1965).
[19] CHIBISOV, A.K., N.N.DROZDOVA, A.V.KARYAKIN, and A.A.KRASNOVSKY: Doklady Akad. Nauk SSSR. **175**, 737 (1967).
[20] KRASNOVSKY, A.A., N.N.DROZDOVA, and I.M.SAPOZHNIKOVA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **177**, 1225 (1967).
[21] EVSTIGNEEV, V.B., and V.A.GAVRILOVA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **165**, 1435 (1965).
[22] KRASNOVSKY, A.A., and K.K.VOINOVSKAYA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **81**, 879 (1951).
[23] GOEDHEER, J.C.: In "Bacterial Photosynthesis", p. 413, The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1963.
[24] KRASNOVSKY, A.A., jr., and F.F.LITVIN: Molecularnaya biologya **1**, 699 (1967).
[25] DROZDOVA, N.N., and A.A.KRASNOVSKY: Molecularnaya biologya **1**, 395 (1967).

[26] BRIN, G.P., A.N.LUGANSKAYA, and A.A.KRASNOVSKY: Doklady Akad. Nauk SSSR. **174,** 221 (1967).
[27] KRASNOVSKY, A.A., and G.P.BRIN: Doklady Akad. Nauk SSSR. **163,** 761 (1965).
[28] CHIBISOV, A.K., A.V.KARIAKIN, and V.B.EVSTIGNEEV: Biofizika **11,** 983 (1966).
[29] KRASNOVSKY, A.A., L.M.KOSOBUTSKAYA, and K.K.VOINOVSKAYA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **92,** 1201 (1953).
[30] KRASNOVSKY, A.A., and M.I.BYSTROVA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **174,** 480 (1967).
[31] BYSTROVA, M.I., and A.A.KRASNOVSKY: Molecularnaya biologia **1,** 362 (1967).
[32] KRASNOVSKY, A.A., G.E.EROKHIN, and B.A.GULIAEV: Doklady Akad. Nauk SSSR. **152,** 1231 (1963).
[33] LITVIN, F.F.: "Biokhimya i Biophysika fotosynteza", p. 96, Izd. "Nauka", 1965.
[34] KRASNOVSKY, A.A., and L.M.KOSOBUTSKAYA: Doklady Akad. Nauk SSSR. **85,** 177 (1952); Doklady Akad. Nauk SSSR. **91,** 343 (1953).
[35] VOROBIEVA, L.M., M.I.BYSTROVA, and A.A.KRASNOVSKY: Biokhimya **28,** 524 (1963).
[36] EROKHIN, G.E.: Studia Biophysica **5,** 171 (1967).
[37] GARSIA, A., L.P.VERNON, and H.MOLLENHAUER: Biochemistry **5,** 2399 (1966).
[38] KARAPETYAN, N.V., F.F.LITVIN, and A.A.KRASNOVSKY: Biofizika **8,** 191 (1963).
[39] DUYSENS, L.N.M.: Thesis (Utrecht, 1952).
[40] KARAPETYAN, N.V., I.V.KRAKHMALIEVA, and A.A.KRASNOVSKY: Doklady Akad. Nauk SSSR. **171,** 1201 (1966).
[41] LITVIN, F.F., G.A.VLADIMIROV, and A.A.KRASNOVSKY: Uspekhi Fiz. Nauk **71,** 149 (1960).
[42] LITVIN, F.F., and V.I.ZVALINSKY: Biofizika **13,** 241 (1968).
[43] CHIBISOV, A.K. and A.V. KARYAKIN: in H. METZNER "Progress in Photosynthesis Research" Vol. II, 757-762, Tübingen 1969.
[44] KARAPETYAN, N.V.: in H. METZNER "Progress in Photosynthesis Research" Vol. II, 778–785, Tübingen 1969.

Progress in Photosynthesis Research, Vol. II, 630–634 (1969)

Greening and Bleaching Processes in Mutant Maize Leaves

F. LÁNG, L. M. VOROBYEVA and A.A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences USSR, Moscow, USSR

Both kinds of immediate chlorophyll precursors (protochlorophyllide and protochlorophyll) have been found [1] in etiolated leaves. Measurement of fluorescence spectra of etiolated and greening leaves recorded at low temperatures (77°K) revealed that protochlorophyllide being accumulated in the dark, under illumination is converted into chlorophyllide, accompanied by the decrease of the 655 nm fluorescence maximum and by the appearance of the fluorescence band at 690 nm [2, 3]. By enzymatic phytolization this chlorophyllide is transformed to chlorophyll having a main peak of fluorescence at 680 nm. During gradual accumulation of chlorophyll this maximum is shifted to 686 nm [4] and a new band appears at about 730 nm [5]. The intensity of fluorescence at 730 nm increases as a result of the aggregation of chlorophyll molecules in the chloroplast lamellae. No marked photoconversion to chlorophyll has been observed in the case of the fluorescence band at 635 nm that has been ascribed to protochlorophyll. This might be due to the fact that in the majority of plants the 635 nm peak was very low. The 635 nm peak was found to be strikingly high in an etiolated mutant of maize, which accumulates ζ-carotene. This provided a good opportunity to study the greening process.

The present paper supplies information obtained by fluorescence spectroscopy about the greening and bleaching process of ζ-mutant and normal maize leaves.

Greening Process

The seedlings were grown in total darkness (28° C) for 8–10 days. The etiolated leaves were illuminated with a light intensity of 25 lux at 0° C and 20° C. The reason using this very low intensity was to avoid the destruction of pigments and to retard their transformation. Fluorescence spectra were recorded at 77°K by a spectrofluorometric apparatus [6].

Fluorescence spectra of etiolated and illuminated ζ-leaves are presented in fig. 1. In the spectra of etiolated leaves, according to previous data [2, 3], two maxima at 635 and 655 nm were observed. In addition to these some small maxima at 672, 686, 712 and 725 nm were also present. The peculiarity of the spectra of ζ-leaves consists of the 635 nm

peak which is much higher than that in the normal leaves. Under illumination both bands, at 655 nm and 635 nm, were decreased in intensity, while maxima at 674–680 and 686–690 nm increased.

In mutant leaves, having a high 635 nm peak, illumination during 5-30 minutes at 20° C or 0° C caused a pronounced increase in the 690 nm band and a shoulder of considerable height at 680 nm. The transformation 635 → 680 nm starts with a high velocity exposing etiolated leaves to light, but later proceeds at a lower rate. In normal leaves having a low intensity fluorescence at 635 nm this shoulder at 680 nm is much lower.

The greening of ζ-leaves proceeds with formation of the same pigment forms as in normal leaves except the final stage, when, as judged from the fluorescence spectra, the formation of aggregates takes place in a different way. The mutant leaves develop aggregates of anomalous structure [7].

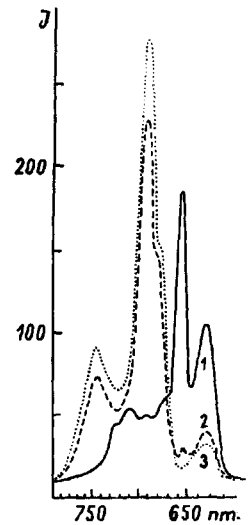
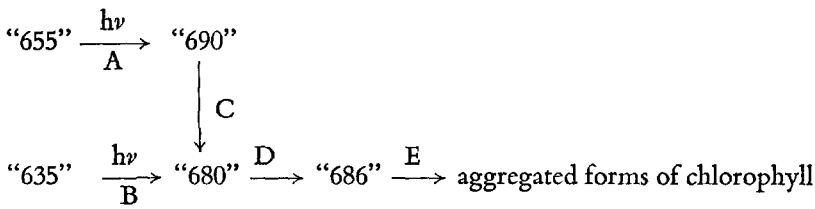


Fig. 1: Fluorescence spectra of etiolated and greening ζ-carotenic mutant maize leaves at 77° K.
1: etiolated leaf; 2: 5 min illumination at 0° C; 3: 30 min illumination at 0° C.

Pigment analyses of etiolated maize leaves show the following percentages of protochlorophyll: 6–7 percent in the normal [8] and 35 percent in the ζ-leaves respectively. This high ratio of the esterified pigments was not reflected in the fluorescence spectra, these being essentially identical with the spectra of bean leaves having only 20–30 percent protochlorophyll and 70–80 percent protochlorophyllide [9]. This similarity of the spectra suggests that the fluorescence measured at 655 nm is due to protochlorophyllide.

On the basis of fluorescence spectra the greening process of etiolated leaves can be visualized as follows:



In this scheme "A" and "B" denote photochemical reactions, "C" represents phytolization. The shift of maxima from 680 to 686 nm can be explained by the reabsorption of fluorescence. Another possible explanation, an appearance of new forms of chlorophyll cannot be excluded either. In the stage of rapid accumulation of chlorophyll aggregates start to be formed.

In green leaves there are a number of different forms of chlorophyll depending upon their interaction with proteins, lipids and packing of pigment molecules in aggregated structures [4, 7, 10–12].

Photochemical Properties of Pigment Forms

Various forms of chlorophyll are characterized by different spectral properties and photostability. It has been stated that a rapid pigment photodestruction in leaves requires the presence of oxygen. In a nitrogen atmosphere no considerable changes of chlorophyll absorption occur [13]. Photodestruction of chlorophyll b always proceeded at a lower rate than that of chlorophyll a [14].

"Monomeric" short-wave forms of chlorophyll in chloroplasts and green leaves are bleached at a higher rate than aggregated long-wave forms [15, 16].

A number of mutants has been described where pigments are completely lost when treated with light of high intensities. The ζ-mutant of maize is also of this type [7, 17, 18]. Because of the extreme high photosensitivity of the chlorophyll this mutant is a convenient material for studying the mechanism and the kinetics of the bleaching process.

In these experiments seedlings were grown at a light intensity of about 25 lux. Changes in the luminescence of leaves were studied under illumination in normal and mutant leaves with a light of high intensity (5×10^6 erg/cm^2 sec) at room temperature in ordinary atmosphere and in vacuum (fig. 2).

Under illumination with high light intensities in ordinary atmosphere the intensity of fluorescence of normal leaves shows a slow decrease. The same phenomenon presents itself in ζ-leaves but proceeded quicker and to a much higher extent. In a few seconds of illumination the intensity of fluorescence drops to the half. After 5 minutes only 15 percent of the initial fluorescence is left. The great photolability of the pigment in the ζ-leaves has been noted already [7].

When normal and ζ-leaves are illuminated in vacuum the intensity of fluorescence begins to increase. This change has been proved to be amounting to about 20–30 percent in normal leaves and to as much as 100 percent in the ζ-mutant. The fluorescence increase is irreversible in the dark.

Using different light filters we tried to find out which spectral region caused the fluorescence increase. A definite effect was caused by light absorbed in the region of chlorophyll absorption.

In order to study the mechanism of photobleaching fluorescence spectra of ζ-leaves

were measured at room temperature and 77° K before and after illumination in vacuum. A green mutant leaf was cut into two halves along the midrib. The halves were put into vacuum tubes; air was removed. Fluorescence spectra of both samples were recorded at room temperature. One half leaf was then illuminated with high light intensity. The unilluminated half in the other tube served as a dark control. After the illumination the spectra were recorded both at room temperature and at 77° K.

Comparison was made between the spectra taken at room temperature and at 77° K from illuminated and control halves of the leaves (fig. 3).

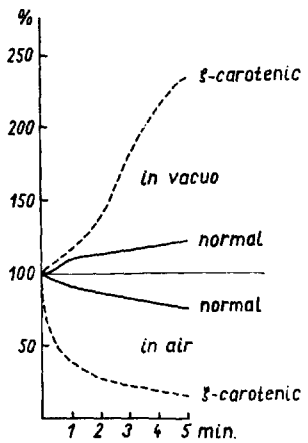


Fig. 2: Photobleaching and photodesaggregation of chlorophyll in normal and ζ-carotenic mutant maize leaves at room temperature (intensity of fluorescence maxima at 735 nm).

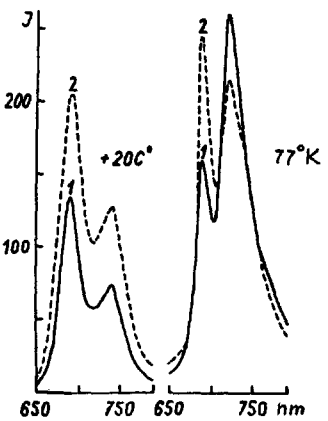


Fig. 3: Photodesaggregation of chlorophyll in ζ-carotenic mutant maize leaves; fluorescence spectra.
1: before illumination; 2: after 30 min illumination at room temperature (5×10^6 erg/cm²sec).

The initial spectra of leaf halves were completely identical when recorded at room temperature. They revealed two maxima at 686 and 735 nm both of which were increased under illumination in vacuum. The control leaves at 77° K show maxima at 686 and 720 nm. The maximum at short wavelength, due (at 77° K) to the monomeric chlorophyll increased considerably under illumination. In contrast the maximum at longer wavelength, ascribed to aggregates, drastically decreased.

On the basis of fluorescence spectra some definite conclusions can be drawn on the nature of photobleaching. The increase of fluorescence, produced by the monomeric form of chlorophyll accompanied by the decrease of the luminescence of aggregates, can be explained by irreversible photodesaggregation of the long-wave forms of chlorophyll.

The hypothesis on possible photodesaggregation of chlorophyll in plants [10] and on the role of this process in photobleaching of long-wave pigment forms was proposed [15]. The possibility of this phenomenon is seen also from another paper (cf. [7]).

Photodesaggregation is likely to be carried out in normal atmosphere too, but the monomeric form produced by this process is photoxidized by oxygen at a high rate.

Since the increase in fluorescence in normal leaves is only slight, photodesaggregation is supposed to depend on the structure of chlorophyll aggregates. Aggregates in the ζ-mutant might be more delicate in structure and more sensitive to photodecomposition. In our opinion two processes are going on simultaneously under illumination of green leaves with high light intensities: a decomposition of the aggregates and a photoxidation of the monomeric form of chlorophyll.

References

[1] Loeffler, J.E.: Carnegie Inst. Wash. Year Book **54**, 159 (1955).
[2] Litvin, F.F., and A.A.Krasnovsky: Dokl. Akad. Nauk. USSR **117**, 106 (1957).
[3] Litvin, F.F.: Biokhimia i biofizikha fotosinteza, Izd. "Nauka", Moscow, 1965, p. 96.
[4] Litvin, F.F., G.T.Rikhireva, and A.A.Krasnovsky: Biofizikha **7**, 578 (1962).
[5] Litvin, F.F., A.A.Krasnovsky, and G.T.Rikhireva: Dokl. Akad. Nauk USSR **135**, 1528, (1960).
[6] Erokhin, U.E., and A.A.Krasnovsky: Biofizikha **6**, 392 (1961).
[7] Shlyk, A.A., L.I.Fradkin, G.E.Savchenko, and Á.Faludi-Dániel: Photosynthetica **1**, 241 (1967).
[8] Godnev, T.N., N.K.Akulovith, and E.F.Shabelskaja: Bul. Inst. Biol. 1957, vip. 3, 1958, p. 89.
[9] Wolff, J.B., and L.Price: Arch. Biochem. Biophys. **72**, 293 (1957).
[10] Krasnovsky, A.A., and L.M.Kosobutskaja: Dokl. Akad. Nauk USSR **91**, 343 (1953).
[11] Krasnovsky, A.A., L.M.Kosobutskaja, and K.K.Vojnovskaja: Dokl. Akad. Nauk USSR **92**, 1201 (1953).
[12] Govindjee, and L.Yang: J. Gen. Physiol. **49**, 763 (1966).
[13] Sironval, C., and O.Kandler: Biochim. Biophys. Acta **29**, 359 (1958).
[14] Sauer, K., and M.Calvin: Biochim. Biophys, Acta **64**, 324 (1962).
[15] Vorobjeva, L.M., and A.A.Krasnovsky: Biofizika **12**, 240 (1967).
[16] Vorobjeva, L.M., and A.A.Krasnovsky: Biofizika **13**, 456 (1968).
[17] Smith, J.H.C., L.J.Durham, and C.F.Wurster: Plant Physiol. **34**, 340 (1958).
[18] Faludi-Dániel, Á., F.Láng, and L.I.Fradkin: "Biochemistry of Chloroplasts", Vol. 1, Acad. Press., London-N.Y., 1966, p. 269.

УДК 576.343

ФОТОФОСФОРИЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ РАЗРУШЕНИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ

Р. М. БЕКИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследовали влияние различных методов разрушения структуры хлоропластов (механических, ультразвука, детергентов) на фотофосфорилирующую активность получаемых фрагментов. Показано, что из всех примененных методов лишь ультразвук высокой частоты (800 *кгц*) и обработка некоторыми детергентами (твин-40 и дигитонин) приводят к фрагментированию хлоропластов с сохранением значительной активности системы фотохимического образования АТФ. Сравнительное исследование двух основных фотохимических активностей — фотофосфорилирования и реакции Хилла — подтвердило высокую чувствительность системы фотофосфорилирования ко всякого рода воздействиям на хлоропласты.

Известно, что целостность структуры хлоропласта не обязательна для осуществления ряда фотобиохимических функций. Полученные с помощью ультразвука, например, небольшие фрагменты хлоропластов сохраняли способность активно выделять O_2 [1—5].

Проведенные в последние годы исследования свойств фрагментов хлоропластов дали многое для понимания структурной организации и молекулярных основ процессов, происходящих при фотосинтезе. Бордман и Андерсон [6, 7] осуществили разделение I и II фотохимических систем с помощью дигитонина. Полученные ими фрагменты хлоропластов отличались по химическому и пигментному составу и фотохимическим активностям. В исследованиях Вернона с сотр. [8—10], которые применяли тритон X-100, дана характеристика фрагментов, содержащих главным образом фотосистему I.

В нашей лаборатории было показано [11], что обработка хлоропластов различными растворителями приводит как к изменению состояния хлорофилла, так и к повреждению электронтранспортной цепи.

Исследования связи между нарушениями структуры хлоропласта и нарушениями различных функций показали необходимость высокого уровня организации мембранной системы для процесса фотофосфорилирования. По данным Димера и Крофтса [12], а также Неймана и Ягендорфа [13], обработка хлоропластов очень низкими концентрациями тритона X-100 (0,007%) приводит к полному угнетению активности фотофосфорилирования. Согласно Гресселю и Аврону [14], действие липолитических ферментов отражается в первую очередь на фотофосфорилирующей функции хлоропластов. Существенное значение имеют наблюдения Весселса [15] о том, что обработка хлоропластов дигитонином сохраняет циклическое фотофосфорилирование в образующихся фрагментах. По данным Чиба и соавт. [16], фрагментация хлоропластов с помощью ультразвука приводила к значительной потере активности фосфорилирования, однако авторам удалось определить активность по фракциям.

Таким образом, к настоящему времени накоплен материал, касающийся различных методов фрагментации хлоропластов и свойств полу-

чаемых фрагментов, однако почти отсутствует информация о фотофосфорилирующей способности фрагментов хлоропластов.

В данной работе мы изучали влияние различных методов разрушения структуры хлоропластов на фотофосфорилирующую активность получаемых фрагментов. При некоторых видах фрагментации мы определяли реакцию Хилла, чтобы сравнить необходимость целостности мембранной системы хлоропластов для двух основных фотохимических функций — фотофосфорилирования и выделения O_2.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили с консервированными в жидком азоте хлоропластами гороха [17]. Хлоропласты выделяли из 10—14-дневных проростков гороха сорта Победитель, выращенных в условиях водной культуры. Выделение хлоропластов проводили по методу Уотли и Арнона в NaCl+*трис*-HCl-буфере с добавлением аскорбата Na в среду для измельчения растений и промывания осадка хлоропластов. В применяемый ранее метод выделения и хранения хлоропластов [17] внесены следующие изменения и дополнения: 1) проростки измельчали в гомогенизаторе, что значительно сокращает время при обработке большого количества растений; 2) при хранении выделенных хлоропластов использовали две среды с различным содержанием глицерина. 1-я среда для суспендирования хлоропластов перед замораживанием, которая была использована в предыдущей работе [17], содержала 50% глицерина, 0,125 *М* KCl и 0,02 *М* *трис*-HCl-буфер pH 7,5. Отношение объемов осадка и среды 1 : 9. 2-я среда содержала 10% глицерина, 0,035 *М* NaCl, 0,02 *М* *трис*-HCl-буфер pH 8,0 и 1% сывороточного альбумина быка. Отношение объемов осадка и 2-й среды 1 : 3—4. При использовании этой среды Вассерман и Флайшер [18] показали, что при хранении хлоропластов при —20° в течение 6 недель система фотофосфорилирования не инактивируется. По нашим данным, замораживание и хранение хлоропластов во 2-й среде при температуре жидкого азота и сухого льда обеспечивает полную сохранность фотофосфорилирующей активности в течение длительных сроков (проверен годовой срок хранения таких препаратов).

В данной статье хлоропласты, которые хранились в 1-й среде, или во 2-й будут обозначаться как хлоропласты I и II соответственно.

Все виды обработки проводили с препаратами неразбавленных **«глицериновых»** хлоропластов I и II, содержавшими соответственно 1 и 2 *мг* хлорофилла в 1 *мл* суспензии.

Реакцию фотофосфорилирования проводили, как это описано [17]. Инкубационная смесь содержала суспензию «глицериновых» хлоропластов (суспензии разводили перед опытом в 0,035 *М* NaCl и 0,02 *М* *трис*-HCl-буфере, pH 7,8) и следующие компоненты (*мкмоль*): *трис*-HCl-буфер—40, pH 7,8; АДФ-Na—5; K_2HPO_4—5; $MgCl_2$—2,5; феназинметасульфат (ФМС)—0,03. Общий объем проб 1,5 *мл*. Инкубация 10 *мин* при 20°. Освещенность 15 000 *лк*. Газовая фаза—воздух.

Неорганический фосфор определяли по методу Кондрашовой с соавт. [19] в надосадочной жидкости после осаждения белков трихлоруксусной кислотой.

Реакцию Хилла с феррицианидом в качестве окислителя определяли спектрофотометрически по восстановлению феррицианида и амперометрическим методом, в котором использовали замкнутую ячейку с закрытым точечным платиновым электродом [20]. Реакционная смесь содержала разбавленную перед определением 0,035 *М* NaCl и 0,02 *М* *трис*-HCl-буфером, pH 7,8, суспензию «глицериновых» хлоропластов и 5 *мкмоль* феррицианида. Объем пробы 3 *мл*. Измерения проводили при 20° и освещенности 15 000 *лк* в течение 5 *мин*. Активность фотофосфорилирования определяли при содержании хлорофилла 0,05—0,1 *мг* в пробе; реакцию Хилла—при содержании 0,4—0,5 *мг*. Источником света служила лампа накаливания.

Хлорофилл определяли в 80%-ной ацетоновой вытяжке спектрофотометрически по методу Арнона [21]. Смещение длинноволнового максимума хлорофилла измеряли *in vivo* на спектрофотометре СФД-2 с большой разрешающей способностью в красной области спектра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы исследовать фотофосфорилирующую активность фрагментов, были применены следующие способы разрушения структуры хлоропластов: механический (**продавливание в замороженном состоянии** и разрушение с помощью микробус), ультразвук и обработка детергентами.

Разрушение путем продавливания в замороженном состоянии на прессе Френча. Разработка метода хранения хлоропластов в замороженном состоянии без инактивации системы фотофосфорилирования [17]

позволила применить этот способ для получения фрагментов хлоропластов.

Продавливание проводили в камере, описанной в работе Любимова и Львова [22]. При продавливании хлоропластов с 50%-ным содержанием глицерина охлаждающую рубашку камеры заполняли жидким азотом. При содержании 10% глицерина в суспензии достаточным было охлаждение с помощью сухого льда.

Как видно из данных табл. 1, во фрагментах хлоропластов, разрушенных путем продавливания, почти полностью инактивируется фотофосфорилирование. Величина подводимого давления — 60 или 180 *атм* — не имела существенного значения для сохранения этой функции. В противоположность фотофосфорилированию, реакция Хилла в полученных таким способом фрагментах не только не угнеталась, но была выше, чем у исходных неразрушенных хлоропластов, по-видимому, вследствие эффекта разобщения.

Таблица 1

Фотофосфорилирование и реакция Хилла после разрушения хлоропластов с помощью пресса (хлоропласты I)

Содержание хлорофилла в пробе при определении фотофосфорилирования 0,05 *мг*; при определении реакции Хилла 0,43 *мг*

Убыль неорганического фосфата, *мкг* в пробе		Восстанавление $Fe(CN)_6^{3-}$, *мкг* в пробе	
контроль	после продавливания	контроль	после продавливания
128,1	0*	1340	1520*
123,5	7,6**	1070	1480**

* Продавливание при 180 *атм*.
** Продавливание при 60 *атм*.

Известно [17], что при нормальном атмосферном давлении замерзание жидкой фазы суспензии хлоропластов, содержащей глицерин, не вызывает существенных повреждений мембраны и поэтому не отражается на активности фотофосфорилирования. При фрагментировании хлоропластов путем продавливания в замороженном состоянии потеря фотофосфорилирующей активности вызвана, по-видимому, глубокими нарушениями мембраны хлоропластов в результате сильного уплотнения (сжатия) замерзшей жидкой фазы при повышенном давлении. Степень разрушения структуры хлоропластов при продавливании в замороженном состоянии сравнительно невелика, так как все фрагменты могли быть осаждены в растворе большой плотности (50% глицерина) при 105 000 *g* в течение 1 часа. Спектр поглощения хлорофилла разрушенных таким путем хлоропластов свидетельствует о тенденции к дезагрегации: длинноволновый максимум поглощения хлорофилла сдвигается на 1—2 *ммк* в коротковолновую область.

Разрушение с помощью микробус. Разрушение клеток хлореллы, имеющих прочную оболочку, успешно осуществляется с помощью этого метода [23]. Микробусы используются и для фрагментации более «нежного» объекта — хлоропластов [3].

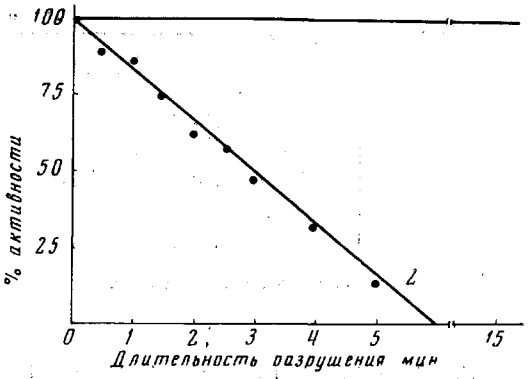
Мы использовали дезинтегратор, описанный в работе Романова и др. [23]. Стакан дезинтегратора заполняли на $^1/_3$ оттаявшей суспензией хлоропластов и стеклянными микробусами № 16 в объемном отношении 2 : 2,5. Разрушение проводили при 0° и скорости вращения винта 5000 *об/мин*.

Этот метод, как и разрушение путем продавливания в замороженном состоянии, дает фрагменты, сохраняющие способность к выделению O_2, но не к фотофосфорилированию. Из данных, представленных на рисунке, видно, что 15-минутное разрушение хлоропластов не приводит к снижению скорости выделения O_2 по сравнению с исходной у неразрушенных хлоропластов. Однако фотофосфорилирующая функция таких фрагментов быстро утрачивается и через 5—6 *мин* разрушения достигается полная инактивация. Как и в случае продавливания, степень разрушения хлоропластов была невелика: почти все фрагменты в 10%-ном

растворе глицерина после 15-минутного разрушения могли быть осаждены при 50 000 *g* за 30 *мин*. Спектр поглощения хлорофилла после разрушения хлоропластов микробусами практически не изменяется.

Ультразвук. Озвучивание хлоропластов с помощью магнитострикционного излучателя проводили в титановой ячейке. Ячейка имела охлаждающую рубашку, в которой поддерживали необходимую температуру. Для охлаждения использовали смесь спирт — сухой лед. Озвучивание проводили при помощи осциллятора MSE при 20 *кгц* и мощности 500 *вт* в течение 30—120 *сек* при —25° в присутствии 0.5%-ного аскорбата Na.

При озвучивании хлоропластов низкочастотным генератором наблюдалось быстрое ингибирование системы фотофосфорилирования, несмотря на относительно короткую продолжительность озвучивания (60—120 *сек*) (см. табл. 2). Реакция Хилла при этих условиях озвучивания сохраняется (см. работы, отмеченные в вводной части статьи). Представляло интерес также провести разрушение на высокочастотном приборе. Для этих целей мы использовали пьезокварцевый излучатель, любезно предоставленный нам Лабораторией биофизики ультразвука АН СССР.



Влияние продолжительности разрушения хлоропластов микробусами на фотохимическую активность образующихся фрагментов

1 — реакция Хилла (определяли амперометрически), содержание хлорофилла — 0,45 *мг* в пробе; *2* — реакция фотофосфорилирования, содержание хлорофилла — 0,1 *мг* в пробе

Озвучивание хлоропластов с помощью пьезокварцевого генератора проводили в конической колбе (25 *мл*), которую помещали в ультразвуковой фонтан, создаваемый пьезокварцевой пластинкой в заполненной водой ванне. Озвучивание проводили при 0—4° в присутствии 0,5% аскорбата Na в атмосфере N_2 при частоте 800 *кгц* и интенсивности 15 *вт/см*^{2}.

Таблица 2

Активность фотофосфорилирования после озвучивания хлоропластов магнитострикционным излучателем (хлоропласты I)

В скобках величина ингибирования, % по отношению к контролю

Длительность озвучивания, *сек*	Убыль неорганического фосфата, *мкг* в пробе		
Контроль	83,9	158,6	132,7
30	77,8 (7,2)	—	—
60	10,7 (87,2)	—	—
90	0	27,4 (82,7)	—
120	0	—	7,6 (94,6)
Хлорофилл (*мг* в пробе)	0,06	0,06	0,1

Из представленных в табл. 3 данных видно, что сохранение активности фотофосфорилирования при разрушении хлоропластов озвучиванием зависит от трех факторов: продолжительности озвучивания, состава газовой фазы и вязкости среды. Если озвучивание проводилось в течение 15 *мин* — время минимальное среди проверенных нами сроков — в атмосфере N_2 и при большой вязкости суспензии (в 50%-ном растворе глицерина), то ингибирование фотофосфорилирования отсутствовало или же было небольшим (около 4% по сравнению с необработанными хлоропластами). При тех же условиях, но в присутствии O_2 воздуха инактивация резко возрастала, достигая 75%. Разрушение хлоропластов мы контролировали с помощью микроскопа, и при 15-минутном

Таблица 3

Активность фотофосфорилирования после озвучивания хлоропластов пьезокварцевым излучателем в атмосфере N_2

В скобках—величина ингибирования, % по отношению к контролю

Хлоропласты	Убыль неорганического фосфата, *мкг* в пробе				Хлорофилл, *мг* в пробе
	контроль	длительность озвучивания, *мин*			
		15	30	60	
I	158,6	160,1	—	—	0,1
	157,1	152,6 (3,9)	—	—	0,08
	147,9	—	—	90,7 (38,2)	0,06
	129,6	32,0*(75,3)	22,9* (82,3)	24,4* (81,2)	0,05
II	120,5	—	—	0	0,06

* Озвучивание в атмосфере воздуха.

озвучивании уже отчетливо наблюдалась дезинтеграция структур. Для того чтобы получить максимальную степень разрушения хлоропластов и сохранить значительную часть активности фотофосфорилирования, мы увеличили продолжительность озвучивания до 1 часа. Из трех указанных выше условий наибольшее значение для сохранения активности фотофосфорилирования имеют два последних. Так, при озвучивании в течение 1 часа в атмосфере N_2 при большой вязкости среды (в присутствии 50%-ной концентрации глицерина) сохраняется около 60% активности фотофосфорилирования. Уменьшение концентрации глицерина до 10% приводит в тех же условиях к полной потере фотофосфорилирующей способности.

Таким образом, разрушение хлоропластов ультразвуком высокой частоты дало положительные результаты. Этот более мягкий тип озвучивания по сравнению с низкочастотными приборами обеспечивает в определенных условиях (в атмосфере N_2 и при высокой вязкости среды) фрагментирование с хорошим сохранением системы фотофосфорилирования.

Для того чтобы определить при этом характер фрагментации, озвученные хлоропласты подвергали дифференциальному центрифугированию; были получены пять фракций частиц. Частицы осаждали во фракции 1 в течение 10 *мин* при 1000 *g*, во фракциях 2, 3 и 4 — 30 *мин* при 10 000 *g*, 20 000 *g* и 50 000 *g* соответственно, во фракции 5—60 *мин* при 105 000 *g*. Первые три фракции тяжелых частиц (1000 *g*, 10 000 *g*, 20 000 *g*) имеют отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b*, близкое к 3, т. е. такое же, как у интактных хлоропластов. В легких фракциях (50 000 *g* и 105 000 *g*) это отношение возрастает до 4—4,6. Обогащение структур хлорофиллом *a* свидетельствует о наличии в составе легких фракций частиц первой фотосистемы.

Исследования состава и фотохимических свойств фрагментов хлоропластов, полученных озвучиванием низкочастотными генераторами, показали, что этот вид дезинтеграции дает однотипные по составу и свойствам фрагменты [24]. Наши данные о различном пигментном составе легких и тяжелых частиц указывают на возможность получения с помощью ультразвукового диспергирования частиц разного типа (с I и II фотосистемами).

Детергенты. Детергенты прочно вошли в арсенал методов при изучении процессов, осуществляемых мембранными системами бактериального, растительного и животного происхождения. В данной работе для фрагментации хлоропластов были применены неионные детергенты: дигитонин, твин-40, твин-60 и тритон X-100.

Таблица 4

Фотофосфорилирование и реакция Хилла после обработки хлоропластов различными детергентами (хлоропласты II)

В скобках — ингибирование, % по отношению к контролю

Детергенты	Убыль неорганического фосфата, *мкг* в пробе		Восстановление $Fe(CN)_6^{3-}$, *мкг* в пробе
Контроль	105,2	103,7	809
Тритон Х-100, %:			
0,05	89,2 (15,2)	63,3 (39,0)	—
0,1	32,0 (69,2)	43,5 (58,1)	1316
0,5	0	0	1151
Дигитонин, %:			
0,1	88,4 (15,7)	99,9 (3,7)	—
0,5	42,7 (59,4)	38,1 (63,3)	—
1	—	0	—
Хлорофилл, *мг* в пробе	0,08	0,08	0,35
Контроль	123,5	121,2	1171
Твин-40, %:			
0,1	97,6 (19,4)	102,9 (15,2)	—
0,5	77,0 (37,7)	76,3 (37,0)	1148
1	0	0	1076
Хлорофилл, *мг* в пробе	0,12	0,08	0,43
Контроль	121,2	74,7*	1250
Твин-60, %:			
0,1	36,6 (69,8)	34,3 (54,1)*	1142
0,5	0	0*	1171
Хлорофилл, *мг* в пробе	0,08	0,05	0,41

* Перед определением активности фотофосфорилирования детергент удаляли центрифугированием суспензии хлоропластов при 20 000 *g* в течение 30 *мин*. Осадок промывали 0,035 *М* NaCl и 0,02 *М трис*-HCl-буфером pH 7,8 и вновь осаждали центрифугированием. Контрольная проба подвергалась аналогичной обработке.

Обработку хлоропластов проводили различными концентрациями детергента в течение 30 *мин* при 0° и периодическом перемешивании проб. Фотохимическую активность определяли, как правило, без предварительного удаления детергента.

В табл. 4 представлены данные действия четырех использованных детергентов на основные фотохимические функции хлоропластов. Наибольшим ингибирующим действием на систему фотохимического образования АТФ обладает тритон Х-100 и твин-60, а наименьшим — дигитонин и твин-40. Так, тритон Х-100 и твин-60 в концентрации 0,5% полностью инактивирует систему фотофосфорилирования, тогда как для подобного эффекта требовалась 1%-ная концентрация дигитонина и твина-40. При обработке же хлоропластов 0,5%-ным раствором дигитонина сохранялось почти 40%, а при обработке 0,5%-ным раствором твина-40 около 60% первоначальной фотофосфорилирующей активности.

В противоположность действию детергентов на фотофосфорилирование O_2 выделяющаяся система после обработки хлоропластов детергентами сохраняется неповрежденной. Твин-40 и твин-60 в примененных концентрациях не вызывали существенных изменений активности реакции Хилла [11]. При обработке хлоропластов тритоном Х-100 в концентрации 0,1 и 0,5% наблюдалось повышение активности по сравнению с исходной величиной благодаря, по-видимому, эффекту разобщения. Мы не определяли реакцию Хилла после обработки дигитонином. Реак-

ция Хилла при этом сохраняется, как это показано Бордманом и Андерсоном [6].

Следует отметить, что наши данные относительно действия тритона X-100 на фотофосфорилирующие свойства фрагментов хлоропластов отличаются от данных Неймана и Ягендорфа [12], а также Димера и Крофтса [13], которые показали, что концентрация тритона X-100 0,005—0,007% вызывает полное подавление активности фотофосфорилирования. В наших опытах для такого же эффекта требовалась значительно более высокая концентрация детергента (0,5%). Причиной таких расхождений может быть прежде всего различие условий при обработке детергентом. Известно, что солюбилизирующие свойства детергентов зависят от ряда факторов: состава и ионной силы среды, в которой ведется обработка хлоропластов, температуры, pH и других [25]. В наших опытах обработка хлоропластов велась в буферной смеси более сложного состава (см. состав среды II в разделе «Методы исследования»), чем та, которую использовали в своих опытах указанные авторы. Такие же расхождения между нашими и данными других авторов могут быть отмечены и для действия детергентов на реакцию Хилла.

Подводя итог изложенным в работе результатам по влиянию различных методов разрушения структуры хлоропластов и исследованию фотофосфорилирующих свойств получаемых фрагментов, можно прийти к выводу, что чрезвычайная лабильность системы фотофосфорилирования требует тщательного подбора условий для осуществления фрагментации без значительной инактивации функции. Из всех использованных нами видов разрушения структуры хлоропласта только обработка высокочастотным ультразвуком и такими неионными детергентами, как твин-40, фрагментирует хлоропласты с сохранением значительной фотофосфорилирующей активности.

Наши данные подтвердили высокие требования системы фотофосфорилирования к целостности мембранного аппарата хлоропластов. Иначе реагирует на фрагментацию система выделения O_2, которая сохраняется при всех примененных видах механического дробления мембраны или разрушения ее с помощью ультразвука. Для инактивации O_2 — выделяющей системы по сравнению с фотофосфорилированием — требуются более высокие концентрации детергента.

Выражаем глубокую благодарность И. Е. Эльпинеру за помощь и советы при выполнении раздела работы с ультразвуком.

В экспериментальной части работы принимала участие дипломница Казанского государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина Л. П. Серова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thomas J. B., Blaauw O. H., Duysens L. N. M., Biochim. et biophys. acta, **10**, 230, 1953
2. Park R. B., Pon N. G., J. Mol. Biol, **3**, 1, 1961
3. Izava S., Good N. E., Biochim. et biophys. acta, **109**, 372, 1965
4. Becker M. J., Shefner A. M., Gross J. A., Plant Physiol., **40**, 243, 1965
5. Katoh S., San-Pietro A., J. Biol. Chem., **241**, 3575, 1966
6. Anderson J. M., Boardman N. K. Biochim. et biophys. acta, **112**, 403, 1966
7. Boardman N. K., Anderson J. M., Biochim. et biophys. acta, **143**, 187, 1966
8. Vernon L. P., Shaw E. R., Plant Physiol., **40**, 1269, 1965
9. Vernon L. P., J. Biol. Chem., **241**, 4101, 1965
10. Vernon L. P., Ke B., Shaw E. R., Biochemistry, **6**, 2210, 1967
11. Красновский А. А. и Брин Г. П., Докл. АН СССР, **179**, 726, 1968
12. Deamer D. W., Crofts A., J. Cell Biol., **33**, 395, 1967
13. Neumann J., Jagendorf A. T., Biochim. et biophys. acta, **109**, 382, 1965.
14. Gressel J., Avron M., Biochim. et biophys. acta, **94**, 31, 1965.
15. Wessels J. S. C., Proc. Roy. Soc. **B 157**, 345, 1963
16. Chiba Y., Sugahara K., Oku T., Plant and Cell Physiol., **5**, 381, 1964.
17. Бекина Р. М. и Красновский А. А., Биохимия, **33**, 178, 1968.

18. Wasserman A. R., Fleisher S. Biochim. et Biophys. acta, 153, 154, 1968.
19. Кондрашова М. Н., Лесогорова М. Н., Шноль С. Э. Биохимия, 30, 567, 1967.
20. Гришина Г. С., Белл Л. Н., Букина Г. С., Физиол. растений, 13, 737, 1966
21. Arnon D. I., Plant Physiol., 24, 1, 1949
22. Любимов В. И., Львов Н. П., Прикл. биохим. и микробиол., 4, 592, 1968
23. Романов В. И., Евстигнеева З. Г., Кретович В. Л., Прикл. биохим. и микробиол., 1, 494, 1965
24. Vernon L. P., Ke B., Katoh S., San-Pietro A., Shaw E. R., Brookhaven Symp. in Biol., № 19, 102, 1966
25. Anderson J. M., Vernon L. P., Biochim. et biophys. acta, 143, 363, 1967

Поступила в редакцию
30.IV.1969

EFFECT OF VARIOUS METHODS OF CHLOROPLAST DESTRUCTION ON THE PHOTOPHOSPHORYLATING ACTIVITY

R. M. BEKINA and *A. A. KRASNOVSKII*

Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The photophosphorylating activity of the fragments obtained has been studied by using various methods of chloroplast destruction (mechanical, sonication, detergents). Of all the methods applied only high frequency sonication (800 *kH*) and treatment with some detergents (Twin-40 and digitonin) result in chloroplast fragmentation, with a considerable activity of the system of photochemical ATP synthesis being retained. The comparative study of two basic photochemical processes — photophosphorylation and the Hill reaction — has confirmed the high sensitivity of the photophosphorylation system to various treatment of chloroplasts.

В сб. "Методы выделения хлоропластов"
Материалы Всесоюзного семинара 16-18
июля 1969 г.
Пущино-на-Оке, 1970, с. 32-37

КОНСЕРВАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ С СОХРАНЕНИЕМ ИХ СПОСОБНОСТИ К ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЮ

Р.М.Бекина, А.А.Красновский

Институт биохимии им. А.Н.Баха АН СССР, Москва

В связи с широким использованием изолированных хлоропластов в качестве объекта при изучении фотосинтеза возник вопрос о консервации этих фотосинтезирующих структур.

Такой распространенный способ консервации, как замораживание и хранение при низких температурах, был применен к хлоропластам с целью сохранения их фотохимической активности. В наших опытах суспензия хлоропластов сахарной свеклы, выделенная в фосфатном буфере pH 6,5, хранилась замороженной жидким воздухом или азотом /1,2/. При указанном способе хранения в течение тринадцати дней (более длительные сроки не исследовались) хлоропласты после размораживания обнаруживали такую же активность реакции Хилла, как и свежевыделенные структуры.

В 1963 году Дван и Кротманн /3/ сообщили, что хлоропласты шпината полностью сохраняют в течение месяца скорость реакции Хилла и способность к фотофосфорилированию, если суспензию хлоропластов в 0,4 М сахарозе быстро заморозить и затем хранить при - 196°С. Быстрое замораживание и оттаивание является, по данным авторов, обязательным условием сохранения функций. Поэтому замораживание проводили небольшими порциями (~1 мл) в закрытом

вращающемся цилиндре в смеси ацетона и сухого льда. Цилиндр с замерзшей в виде тонкой пленки суспензией хранили в жидком азоте. При размораживании вращающийся цилиндр погружали на короткое время (5 сек.) в водяную баню с температурой +35°С, и процедуру повторяли несколько раз до полного оттаивания суспензии. Однако этот метод не получил распространения в лабораторной практике, так как не был удобен для хранения больших количеств хлоропластов.

Многочисленные поиски оптимальных режимов длительной консервации биологического материала с сохранением его жизнеспособности привели к выводу о необходимости совокупного применения низкой температуры и защитных веществ, предотвращающих повреждающее действие замораживания /4,5/. При консервации различных тканей и органов холодом широко используются такие защитные вещества, как глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и другие /6,7/. Пэкер и Бернард /8/ применили глицериновую среду и низкую температуру (-20°С) для предохранения системы фотофосфорилирования в хлоропластах от быстрой инактивации. Эти условия обеспечивали некоторую стабилизацию данной системы: так, к концу недельного срока "старения" хлоропластов активность синтеза АТФ составляла 50% от исходной. Ранее нами исследовалась сохранность функции фотофосфорилирования при длительном хранении препаратов хлоропластов в водно-глицериновой среде при различных температурных режимах /9, 10, 11/.

В настоящей работе описывается способ консервации хлоропластов с полным сохранением их способности к фотофосфорилированию. Консервация выделенных хлоропластов может быть осуществлена с различными концентрациями глицерина в среде для замораживания и

при различных температурных режимах. Использовалось две среды: I - 10% глицерина, 0,035 М NaCl и 0,02 М трис-HCl буфера pH 7,8; II - 50% глицерина, 0,125 М KCl и 0,02 М трис-HCl буфера pH 7,8. Температура хранения препаратов хлоропластов в среде I может быть -20^{0}C и ниже, в среде II -79^{0}C (температура сухого льда) и ниже.

Для осуществления консервации хлоропластов без потери последними активности фотофосфорилирования необходимы следующие условия: наличие в суспендирующей среде защитных веществ (в наших опытах это глицерин) и определенный уровень температуры, при котором суспензия хлоропластов должна находиться в замороженном состоянии. Если температура недостаточно низка для замерзания "глицериновой" суспензии хлоропластов, например, -20^{0}C при 50%-ном содержании глицерина, то в этих условиях происходит инактивация системы фотофосфорилирования и активность таких препаратов, по нашим и литературным данным /8, 9/, к десятому-пятнадцатому дню хранения исчезает практически полностью. Если замораживание проводить в среде без глицерина, то инактивация системы фотохимического образования АТФ наступает сразу же вследствие необратимых повреждений мембраны хлоропластов. Защитное действие глицерина и других соединений при замораживании биологических объектов подробно обсуждается в сборниках /6, 7/.

Метод выделения хлоропластов не имеет значения для последующей их консервации, как показано в нашей предыдущей работе /9/. Хлоропласты, выделенные в NaCl + трис + HCl буфер и в NaCl + версен + фосфатный буфер, в равной мере сохраняли полную активность фотофосфорилирования.

Для консервации выделенный осадок хлоропластов суспендируется

в среде I или II (соотношение осадка и среды I:4) и сразу же замораживается. Этот процесс удобнее всего провести в жидком азоте, так как медленно вылитая в дьюар с жидким азотом из пипетки или стаканчика суспензия мгновенно замерзает в виде небольших шариков и хранится затем при соответствующем температурном режиме. Перед опытом такую суспензию легко извлечь в необходимых количествах, не размораживая весь препарат. Если замораживание и хранение проводится при более высоких температурах, например, при -20°С или при температуре сухого льда, то целесообразно "глицериновую" суспензию сразу же после получения заморозить небольшими порциями (~I мл) для того, чтобы в процессе работы не размораживать многократно весь хранимый материал.

Размораживание суспензии проводится непосредственно перед опытом при комнатной температуре. Необходимая для эксперимента порция хлоропластов (~I мл) размораживается в течение 5-7 мин. без дополнительного подогрева.

В таблице приведены данные, показывающие отсутствие изменений активности фотофосфорилирования в процессе годового хранения хлоропластов в средах с разным содержанием глицерина и при различных температурах.

Активность ФМС-фотофосфорилирования при хранении "глицериновых" хлоропластов

Температура хранения, С°	Среда при замораживании хлоропластов	Поглощение Рн, мкг/0,05 мг Хл, на пробу	
		исходная величина до замораживания	после I года хранения
-20°	I	I29	I35
-79°	I	II5	I23
	II	87	94
-I96	I	I08	I03
	II	I32	I28

184

Опыты проводились с хлоропластами двухнедельных проростков гороха сорта "Победитель", выращенного в условиях водной культуры. Хлоропласты выделялись по методу Уотли и Арнона /I2/. Подробное описание условий выращивания растений, метода выделения хлоропластов и проведения реакции фотофосфорилирования приводится в работах /9, I0/. Инкубационная смесь при определении фотофосфорилирования содержала суспензию "глицериновых" хлоропластов, которую разводили перед опытом 0,035 М NaCl, и следующие компоненты в мкМ на I,5 мл пробы: трис-HCl буфер - 40, pH 7,8; K_2HPO_4 - 5; $MgCl_2$ - 2,5; АДФ Na-соль - 5; аскорбат Na - 5; феназинметасульфат (ФМС) - 0,03. Продолжительность инкубации 20 мин. при +20°С. Газовая фаза - воздух. Источник света - лампа накаливания. Освещенность - I5000 люкс. Активность фотофосфорилирования определяли по убыли неорганического фосфора. Неорганический фосфор измеряли по методу Кондрашовой с сотр. /I3/; хлорофилл - по Арнону /I4/. Присутствие глицерина в инкубационной смеси, количество которого после разведения суспензии хлоропластов обычно не превышает 3% в пробе, не оказывает никакого ингибирующего действия на процесс фотохимического образования АТФ.

Предлагаемый метод консервации изолированных хлоропластов достаточно прост и удобен, так как не требует специального оборудования. Препарат хранится при температуре сухого льда и жидкого азота в сосудах Дьюара, но могут быть использованы также обычные пищевые термосы. Применение этого метода позволяет исключить такие помехи в работе, как сезонные изменения активности фотофосфорилирования, обеспечивает высокую воспроизводимость результатов и устраняет трудоемкую процедуру получения хлоропластов перед опытом,

184

ЛИТЕРАТУРА

I. Верещинский И.В., Красновский А.А., Биохимия, 16, 621 (1951).

2. Верещинский И.В., Биохимия, 16, 350 (1951).

3. Duane W.C., Krogmann D.W., Biochim. Biophys. Acta, 71, 195 (1963).

4. Рэ Л., "Консервация жизни холодом". М., изд. "Медгиз" (1962).

5. Смит О., "Клетка и температура среды". М., изд. "Наука" (1964).

6. Huggings C.E., Federat. Proc., 24, 2, Part 3, 190 (1965).

7. Mevyman H.T., "Cryobiology", Part 2, N.Y., Acad. Press (1966).

8. Packer L., Bavnard A.C., Biochim. Biophys. Acta, 126, 443 (1966).

9. Бекина Р.М., Красновский А.А., Биохимия, 33, 178 (1968).

10. Бекина Р.М., Красновский А.А., В сб.: "Фотосинтез и использование энергии солнечной радиации". М., изд. "Наука" (в печати).

11. Бекина Р.М., Красновский А.А., Биохимия (в печати).

12. Whatley F.R., Arnon D.I., In : "Methods in Enzymology", 6, N.Y., Acad. Press, 308 (1963).

13. Кондрашова М.Н., Лесогорова М.Н., Шноль С.Э., Биохимия, 30, 567 (1965).

14. Arnon D.I., Plant Physiol., 24, 1 (1949).

В сборнике "Физиология и биохимия
здорового и больного растения"
Изд. МГУ 1970, с. 198–206

Г. П. БРИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ ХИЛЛА

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР

Реакция Хилла представляет собой сравнительно короткий фрагмент цепи фотосинтетического переноса электрона, соответствующий так называемой второй фотохимической системе. В этой реакции, так же как и в фотосинтезе, исходным донором электрона (водорода) являются молекулы воды, а акцептором электрона — вводимые извне окислители — соединения трехвалентного железа, хиноны и др. При реакции Хилла, так же как и при фотосинтезе, кислород воды выделяется в молекулярной форме; поэтому изучение ее приближает нас к пониманию наименее исследованной стадии фотосинтеза — фотоокислению воды.

Одним из возможных подходов к изучению механизма фотоокисления воды является создание модельных реакций такого типа. Используя неорганические полупроводники в качестве фотосенсибилизаторов, мы изучили возможность создания моделей реакции Хилла, в которых вода использовалась бы в качестве донора электрона, а соединения окисного железа — акцептора электрона (Красновский, Брин, 1962, 1966). Такие реакции удалось сенсибилизировать к близкой ультрафиолетовой и сине-фиолетовой области спектра; их квантовый выход не превышал 1%. Однако изучение механизма этих модельных реакций, по-видимому, может дать лишь весьма ограниченную информацию, необходимую для понимания элементарных процессов фотоокисления воды, идущих в хлоропластах.

Другой путь исследования заключается в «разборке» хлоропластов на более простые компоненты и обратной «сборке» активной системы, способной к осуществлению реакции Хилла (Красновский, Брин, 1968). Исследования такого рода затрудняются большой чувствительностью интактных белково-липоидных структур хлоропластов, легко повреждаемых при «разборке» системы.

Способность гомогенатов и хлоропластов зеленых листьев к

реакции Хилла быстро утрачивается при комнатной температуре; еще быстрее реакция нарушается при нагревании препаратов. В нашей лаборатории было показано, что реакция Хилла подавляется под действием растворителей на хлоропласты; наиболее сильным оказалось действие пиридина (Кособуцкая, Красновский, 1953; Брин, Красновский, 1959). В работах лаборатории Вернона (Vernon, Shaw, 1965) и Нойменна, Джагендорфа (Neumann, Jagendorf, 1965) было показано, что введение детергента тритона Х-100 (0,007%) в суспензию хлоропластов активирует реакцию Хилла, тогда как более высокие концентрации детергента ингибируют ее. Эффект стимулирования реакции Хилла был связан с подавлением фотофосфорилирования.

Важно найти условия для восстановления реакции Хилла, нарушенной под влиянием различных воздействий, чтобы получить данные о структурной организации, ответственной за реакцию выделения кислорода. Этому вопросу посвящено настоящее исследование.

В работе использовались водно-глицериновые среды (Воробьева, Красновский, 1956). Активность хлоропластов в реакции Хилла в этих средах выше, чем в водных.

Хлоропласты были выделены из проростков гороха обычными методами (Сисакян, Филиппович, Светайло, 1962). В опытах использовались хлоропласты свежевыделенные и консервированные в жидком азоте по методу, применяемому в нашей лаборатории без добавления (Верещинский, Красновский, 1951) или с добавлением глицерина (Бекина, Красновский, 1968), т. е. в условиях, когда наряду с реакцией Хилла сохраняется способность хлоропластов к фотофосфорилированию. Активность хлоропластов к реакции Хилла измерялась по скорости выделения кислорода в присутствии *p*-бензохинона как акцептора электрона амперометрическим методом с использованием платинового электрода, покрытого тефлоновой пленкой (Гришина, Белл, Букина, 1966). Концентрация хлорофилла в суспензии хлоропластов составляла 10^{-4} М, хинона — $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ М.

Ячейку из плексигласа с суспензией хлоропластов (5 *мл*) освещали конденсированным светом кинолампы 300 *в* через светофильтр КС-10 и слой 0,5%-ного водного раствора медного купороса в 2 *см*. Интенсивность света 10^5 *эрг/см*^{2}*·сек*. Измерения спектров поглощения проводили на спектрофотометре СФ-5, обладающем лучшим разрешением в красной области спектра, чем СФ-4. Активность хлоропластов обычно выражалась в процентах от средней скорости выделения кислорода за 10 *мин* освещения водной суспензии хлоропластов при 20° С.

Нагревание хлоропластов в водной среде

Суспензию хлоропластов выдерживали 3 *мин* при заданной температуре (от 20 до 50°) на водяной бане. Затем при комнатной температуре добавляли свежевозогнанный хинон и измеряли ки-

нетику выделения кислорода при освещении. На рис. 1 показана зависимость скорости выделения кислорода от предварительного нагревания суспензии. Нагревание до 25° ведет к небольшому увеличению активности. Дальнейшее повышение температуры вызывает снижение активности, и при 50° суспензия практически те-

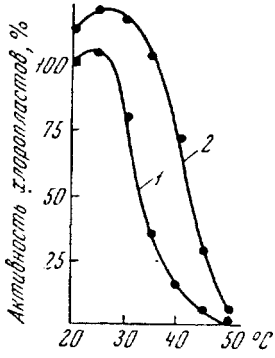


Рис. 1. Зависимость скорости реакции Хилла от предварительного нагревания хлоропластов: *1* — в водной среде; *2* — в водно-глицериновой среде

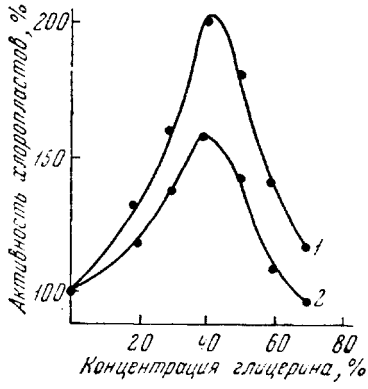


Рис. 2. Зависимость скорости реакции Хилла от концентрации глицерина: *1* — свежевыделенные хлоропласты; *2* — хлоропласты, консервированные в жидком азоте

ряет фотохимическую активность. Поведение свежевыделенных и консервированных в жидком азоте хлоропластов было аналогичным. При нагревании до 50° С максимум поглощения хлорофилла в суспензии не изменялся в пределах 680±2 *нм*.

Нагревание хлоропластов в водно-глицериновой среде

Глицерин добавляли к суспензии хлоропластов так, чтобы концентрация хлорофилла оставалась постоянной во всех вариантах опытов. После 10 *мин* стояния смеси при 20° измеряли выделение кислорода. Из рис. 2 видно, что в присутствии глицерина реакция выше, чем в водной среде; максимум активности наблюдается при 40% глицерина. В этом случае активность почти в два раза выше, чем без глицерина. Введение глицерина не влияет на положение максимума поглощения хлорофилла в хлоропластах в пределах ±2 *нм*. Следует отметить, что в большинстве опытов консервированные в жидком азоте хлоропласты активируются глицерином сильнее, чем свежевыделенные. В присутствии глицерина хлоропласты гораздо устойчивее к нагреванию (см. рис. 1). Например, при 40° С активность без глицерина падает до 10% от исходной, а в присутствии глицерина сохраняется на 60—70%.

Добавление глицерина (60%) к инактивированным нагреванием хлоропластам приводило к увеличению скорости выделения кислорода (см. рис. 1). Добавление глицерина к суспензии хлоропластов до нагревания (40°) ведет к несколько более интенсивному, чем при введении глицерина после нагревания, увеличению активности (рис. 3). Этот опыт проведен с хлоропластами, которые хранились в жидком азоте. Однако здесь трудно разграничить собственно реактивирующий эффект и увеличение остаточной (после нагревания) активности препаратов.

Действие детергентов

Неионный детергент твин-60 в концентрации до 2% мало изменяет скорость реакции Хилла, но проявляет эффект стабилизации под действием нагревания (рис. 4). Однако уже 0,1% детергента

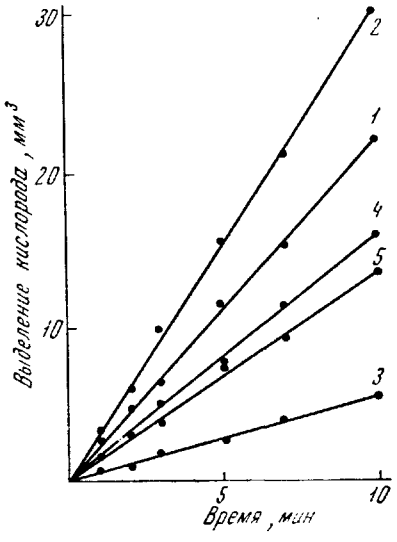


Рис. 3. Кинетика выделения кислорода хлоропластами при 20°: *1* — в водной среде; *2* — в водно-глицериновой; при 40°; *3* — в водной среде; *4* — в водно-глицериновой; *5* — при добавлении глицерина после нагревания суспензии до 40°

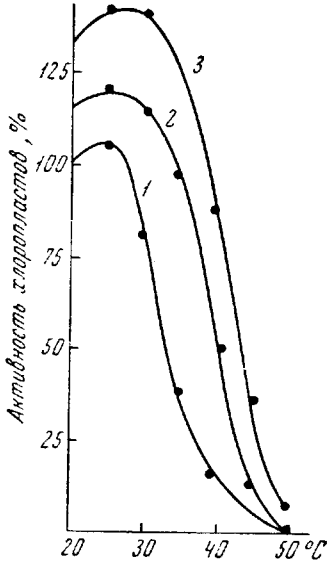


Рис. 4. Зависимость скорости реакции Хилла от предварительного нагревания хлоропластов: *1* — в водной среде; *2* — в водной среде с 2%-ным твином; *3* — с твином, добавленным после нагревания суспензии

сдвигает максимум поглощения хлорофилла в хлоропластах на 2 *нм* в сторону коротких волн. При 2% происходит раздвоение максимума с образованием форм 672 и 680 *нм*. При добавлении этого детергента к хлоропластам, активность которых подавлена

нагреванием, наблюдается реактивирующее действие (рис. 4). Добавленный к хлоропластам перед нагреванием твин-60 увеличивает активность на 30%, тогда как добавленный к нагретым хлоропластам детергент увеличивает активность на 70%.

Натрийдодецилсульфат от 0,02 до 2% полностью ингибирует реакцию Хилла; в малых концентрациях реактивирующее действие этого детергента на нагретые хлоропласты не проявляется.

Мы подтвердили данные Джагендорфа, Вернона (Neumann, Jagendorf, 1965; Vernon, Shaw, 1965) об активации реакции Хилла детергентом тритон Х-100 в концентрации 0,007%. При добавлении 0,1% тритона активность полностью исчезает. Максимум поглощения хлорофилла в суспензии хлоропластов при добавлении 0,1% тритона сдвигается в сторону коротких волн — к 672 *нм*.

Влияние мочевины

При концентрации мочевины 0,1 М сдвигается максимум поглощения хлорофилла в хлоропластах от 680 до 676 *нм*, при 0,2 М наблюдается два максимума — при 672 и 680 *нм*. Таким образом

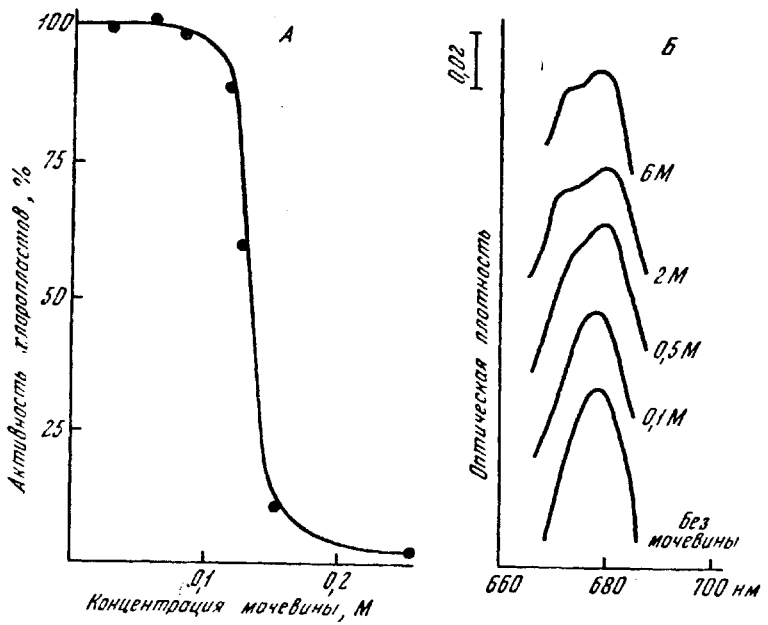


Рис. 5. Зависимость скорости реакции Хилла (*А*) и положения максимумов поглощения хлорофилла (*Б*) от концентрации мочевины в суспензии хлоропластов

проявляется дезагрегирующее действие мочевины, так же как и в случае с детергентами. При концентрации мочевины 0,15 М реакция Хилла полностью подавлена. Введение в суспензию хлоро-

пластов глицерина препятствует подавлению реакции Хилла мочевиной. Так, при концентрации мочевины 0,15 М и 60% глицерина активность сохраняется на 30% и лишь 0,2 М мочевины полностью подавляет активность хлоропластов (рис. 5).

Следует указать на то, что мочевина является агентом, приводящим к денатурации (дезагрегации) белков, и поэтому ингибирование реакции Хилла, вероятно, требующей интактной структуры белково-липоидных компонентов, вполне закономерно. Однако явление дезагрегации пигментов под влиянием большой концентрации мочевины, возможно, связано с нарушением межмолекулярных координационных связей между молекулами пигментов в агрегированных структурах. Нам не удалось наблюдать полную корреляцию между ингибирующим действием мочевины на реакцию Хилла (которая наступает при 0,15 М) и дезагрегацией хлорофилла, которая при этой концентрации мочевины незначительна. Денатурация белковых структур, ведущая к подавлению реакции Хилла, наступает раньше, чем дезагрегация пигмента.

Действие органических растворителей

Мы уже указывали на то, что органические растворители необратимо ингибируют реакцию Хилла. В настоящем исследовании мы пытались выяснить возможность восстановления активности после удаления растворителя в вакууме; одновременно было исследовано обратимое изменение состояния хлорофилла, которое характеризуется положением «красного» максимума поглощения пигмента.

Метанол. Метанол в концентрации до 5% практически не оказывает ингибирующего действия на реакцию Хилла. При дальнейшем увеличении концентрации активность падает и при 25% реакция полностью ингибируется. Однако если метанол после воздействия на хлоропласты удалить путем откачивания в вакууме, то активность несколько увеличивается. Одновременно измеряли спектр поглощения в области красного максимума хлорофилла и наблюдали дезагрегирующее действие метанола.

Этанол. Уже 5% этанола полностью ингибирует реакцию Хилла (рис. 6). Глицерин, добавленный к суспензии хлоропластов, защищает их от воздействия этанола. В присутствии глицерина даже 20% этанола не полностью подавляет активность. Таким же оказалось действие детергента твина-60. Если добавить твин (2%-ный раствор) к суспензии хлоропластов, то порог ингибирования смещается. Исследование спектров поглощения показало, что при концентрации этанола от 0 до 5% максимум поглощения хорофилла в суспензии хлоропластов не смещается. Удаление этанола в вакууме не приводит к реактивации.

Хлороформ. Хлороформ в очень малых концентрациях ингибирует реакцию Хилла. Уже 1% хлороформа ингибирует реак-

цию на 70%. Откачивание в вакууме не восстанавливает подавленную хлороформом активность. При добавлении 1% хлороформа спектр поглощения резко изменяется, максимум перемещается к 670 *нм* (рис. 7), что свидетельствует о дезагрегации пигмента.

Ацетон. Добавление к суспензии хлоропластов до 4% ацетона не вызывает подавления реакции Хилла. От 4 до 10% ацетон ингибирует реакцию. При откачивании ацетона в вакууме актив-

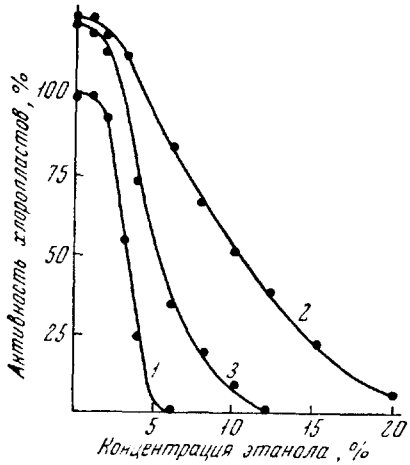


Рис. 6. Зависимость скорости реакции Хилла от концентрации этанола: *1* — в водной среде; *2* — в водно-глицериновой среде; *3* — в водной среде в присутствии 2%-ного раствора твина-60

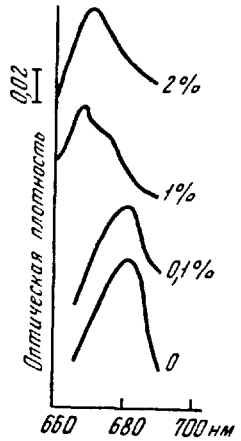


Рис. 7. Зависимость положения максимума поглощения от концентрации хлороформа в суспензии хлоропластов

ность частично восстанавливается; после 15% ингибирование необратимо. Измерение поглощения показало, что при добавлении 5 и 10% ацетона в спектре виден перегиб при 670 *нм*, который сглаживается при удалении ацетона из суспензии (рис. 8).

Этиловый эфир. Растворимость этилового эфира в воде при 20° С составляет 7,5%. Мы добавляли к суспензии хлоропластов от 1 до 10% этилового эфира. Смесь инкубировали 5 *мин* и затем измеряли скорость выделения кислорода и спектр поглощения. 1% эфира активирует реакцию Хилла (рис. 9) и не сдвигает максимум поглощения хлорофилла в суспензии хлоропластов (рис. 10). Дальнейшее увеличение концентрации эфира подавляет реакцию и при 6% полностью ингибирует. Максимум поглощения хлорофилла в суспензии хлоропластов при введении 3% эфира остается при 680 *нм*. Дальнейшее увеличение количества эфира в хлоропластах приводит к коротковолновому смещению максимума поглощения хлорофилла до 672 *нм* при 10% эфира.

В отдельной серии опытов эфир удаляли из суспензии хлоропластов (после 5 *мин* стояния) путем откачивания водоструйным

насосом в течение 10 *мин*. Весьма существенно то, что удаление растворенного эфира из суспензии полностью восстанавливает начальную активность хлоропластов: при этом максимум поглощения хлорофилла также возвращается к исходному положению (от 672 до 680 *нм*). Необратимые эффекты увеличиваются при перехо-

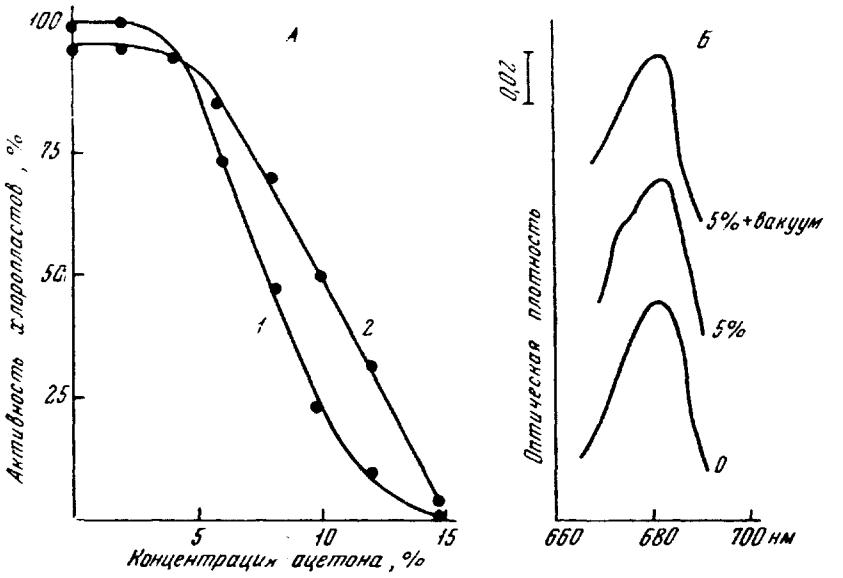


Рис. 8. Зависимость скорости реакции Хилла и положения максимума поглощения от концентрации ацетона
А: *1* — скорость реакции Хилла в присутствии ацетона; *2* — после удаления ацетона; Б (снизу вверх): *1* — спектр без ацетона; *2* — с 5% ацетона; *3* — после удаления ацетона

де через порог растворимости эфира. Таким образом, растворенный в воде этиловый эфир нарушает состояние хлорофилла в хлоропластах обратимо. В связи с этим следует отметить, что обратимое действие эфира на фотосинтез некоторых растений наблюдалось давно (Рабинович, 1951).

Вероятно, нарушение реакции Хилла под действием нагревания, детергентов и растворителей связано скорее с изменением структурной организации системы, чем с ее «химическим» повреждением. Глицерин, стабилизирующий белковые системы, способствует большей устойчивости хлоропластов к повреждающим воздействиям. Для нас наиболее интересны «обратимые» структурные изменения, наблюдаемые, например, при действии этилового эфира.

Изложенный экспериментальный материал дает основание заключить, что явление обратимого ингибирования реакции Хилла этиловым эфиром может быть использовано для осторожной «раз-

борки» и «сборки» фотохимической системы, выделяющей кислород.

Ингибирование реакции Хилла эфиром сопровождается дезагрегацией хлорофилла, максимум поглощения которого сдвигается в коротковолновую область спектра. Удаление эфира приводит к обратимому сдвигу максимума в длинноволновую область спектра, что свидетельствует об обратимой агрегации пигмента в струк-

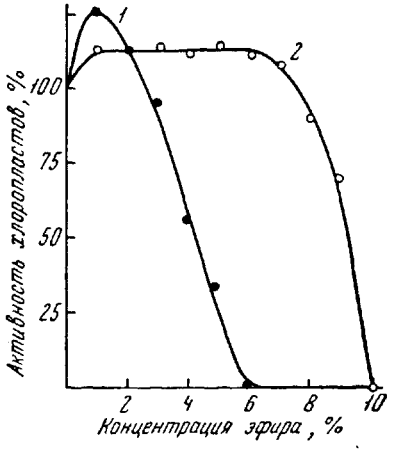


Рис. 9. Влияние этилового эфира на скорость реакции Хилла:
1 — в присутствии эфира; *2* — после удаления эфира в вакууме

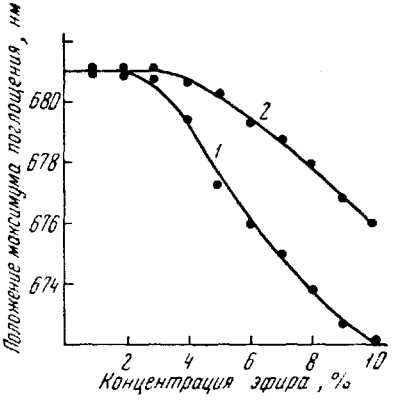


Рис. 10. Влияние этилового эфира на положение максимума поглощения в хлоропластах:
1 — в присутствии эфира; *2* — после удаления эфира в вакууме

туре хлоропласта. Существенно то, что при этом дезагрегирующее действие эфира (в пределах концентрации, соответствующей его растворимости в воде) не сопровождается выходом хлорофилла в раствор. Дезагрегация осуществляется *in situ* в белково-липоидных структурах хлоропластов. Понятно поэтому, что столь осторожное воздействие не приводит к необратимым повреждениям белково-липоидной структуры.

Можно думать, что при действии эфира нарушается молекулярная организация (конформация?) липоидного компонента системы хлоропласта, что, в свою очередь, приводит к нарушению условий структурного сопряжения и миграции энергии между формами хлорофилла. С удалением эфира система самопроизвольно возвращается к исходному типу молекулярной организации. Природа этого явления нуждается в дальнейшем исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

Бекина Р. М., Красновский А. А. Хранение изолированных хлоропластов без изменения активности фотофосфорилирования. Биохимия, 1968, **33**, 178.

Брин Г. П., Красновский А. А. Фотосенсибилизированные хлорофиллом окислительно-восстановительные превращения пиридин-нуклеотидов в растворах хлорофилла и гомогенатах листьев растений. Биохимия, 1959, **24**, 1085.

Верещинский И. В., Красновский А. А. Действие ультрафиолетовых лучей на фотохимическую активность вещества хлоропластов. Биохимия, 1951, **16**, 622.

Воробьева Л. М., Красновский А. А. Фотохимически активная форма хлорофилла в листьях и ее превращения. Биохимия, 1956, **21**, 126.

Гришина Г. С., Белл Л. Н., Букина Г. С. Применение амперометрического метода для исследования обмена кислорода на свету. Физиол. раст., 1966, **13**, 737.

Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. Действие растворителей на спектральные свойства и фотохимическую активность хлорофилла в естественном состоянии. Биохимия, 1953, **18**, 340.

Красновский А. А., Брин Г. П. Неорганические модели реакции Хилла. Докл. АН СССР, 1962, **147**, 656.

Красновский А. А., Брин Г. П. Фотохимическое выделение кислорода в водных растворах окисного железа; сенсибилизация окислами вольфрама, титана и цинка. Докл. АН СССР, 1966, **168**, 1100.

Красновский А. А., Брин Г. П. Нарушение реакции Хилла действием нагревания, растворителей и детергентов; условия реактивации. Докл. АН СССР, 1968, **179**, 726.

Рабинович Е. Фотосинтез. М., 1951, **1**.

Сисакян Н. М., Филиппович И. И., Светайло Э. Н. Участие рибосом хлоропластов в синтезе белка. Докл. АН СССР, 1962, **147**, 488.

Neumann J., Jagendorf A. Uncoupling photophosphorylation by detergents. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 109, 382.

Vernon L. P., Shaw E. Photochemical Activities of Spinach Chloroplasts Following Treatment with the Detergent Triton X-100. Plant Physiol., 1965, 40, 1269.

Доклады Академии наук СССР
1970. Том 195, № 3

УДК 582.132.1

БИОХИМИЯ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООКИСЛЕНИЕ ФЕОФИТИНА, СОПРЯЖЕННОЕ С ДЕЗАГРЕГАЦИЕЙ ДЛИННОВОЛНОВОЙ ФОРМЫ ПИГМЕНТА

При освещении раствора феофитина в водном ацетоне и диоксане, содержащих мономерную и агрегированную формы пигмента, была обнаружена необратимая фотохимическая дезагрегация его длинноволновой формы ([1]); существенно то, что дезагрегация наблюдалась только в присутствии кислорода воздуха. Поэтому было необходимо исследовать фотохимическое взаимодействие феофитина с кислородом, практически не изучавшееся ранее; есть лишь данные об индуцированной светом хемилюминесценции растворов феофитина в присутствии кислорода ([2]).

В данной работе исследовали свойства продукта, накапливающегося в растворах феофитина а при освещении в присутствии O_2, а также промежуточные ступени реакции, ведущей к образованию этого продукта. Основные методы работы и условия проведения опытов описаны ранее ([1]).

Наши опыты показали, что при освещении растворов феофитина а в сухом и водном (40% воды) ацетоне и серном эфире красным или белым светом (рис. 1) накапливается продукт, отличный от исходного пигмента: при разделении при помощи тонкослойной хроматографии образованный на свету пигмент обладал меньшей подвижностью (R_f 0,42) по сравнению с исходным феофитином (R_f 0,74). Существенно то, что мы не смогли обнаружить различий в спектрах поглощения измененного продукта и исходного феофитина в видимой и у.-ф. области спектра (220—750 мμ), а также в спектре флуоресценции (600—800 мμ).

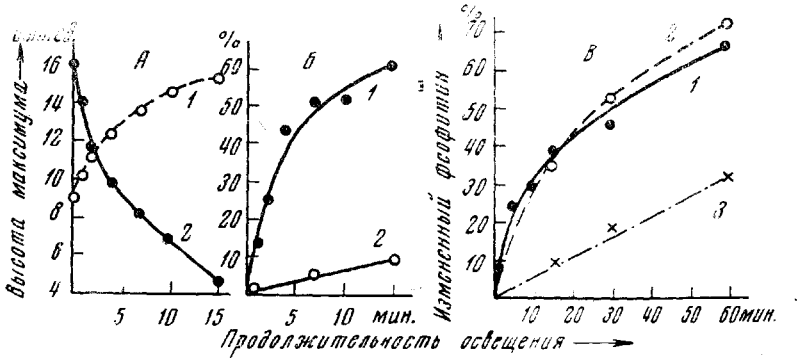


Рис. 1. Изменение высоты максимумов поглощения 670 мμ (*1*) и 700 мμ (*2*) при освещении феофитина а в 63% ацетоне белым светом в присутствии кислорода (*А*) и кинетика накопления измененного феофитина а при освещении в присутствии кислорода (*Б*, *В*). *Б* — освещение пигмента в 63% ацетоне белым светом при 20° (*1* — доля измененного феофитина; *2* — доля фотодеструкции); *В* — освещение пигмента светом $\lambda > 700$ мμ при —30° в 63% ацетоне (*1*) и белым светом при 21° в 100% ацетоне (*2*) и серном эфире (*3*)

Сравнительное исследование фотохимических свойств показало, что измененный продукт более легко восстанавливается аскорбиновой кислотой в ацетоне и пиридине в отсутствие воздуха при 20 и —40°. Спектральные изменения при фотовосстановлении были аналогичными в опытах с исходным и измененным феофитином, однако скорость фотовосстановления последнего (о которой судили по кинетике понижения поглощения в «красном» максимуме) была в 2—3 раза более высокой. При этом фотовосстановление аскорбиновой кислотой не вело к превращению измененного пигмента в исходный феофитин.

Для изучения промежуточных ступеней фотопревращения феофитина а в водном ацетоне, ведущего к образованию измененного продукта, исследовали спектральные изменения, происходящие в результате освещения растворов пигмента в 60% водном ацетоне при —30° и —196°.

Спектры поглощения при —30°. Освещение при —30° вызывало лишь незначительное понижение длинноволнового максимума поглощения агрегированной формы пигмента, возрастания поглощения мономера не наблюдалось. При помощи нашей методики мы не смогли обнаружить сдвига максимума поглощения агрегированного феофитина в результате освещения при —30° или образования новой спектральной формы пигмента. После нагревания освещенного раствора до комнатной температуры обнаруживалось возрастание максимума поглощения мономерного пигмента по сравнению с неосвещенным образцом. Таким образом, несмотря на то что при освещении водно-ацетоновых растворов феофитина при 20° изменения характеризуются изобестическими точками, свидетельствующими об отсутствии промежуточных продуктов ([1]), изучаемая реакция, по-видимому, обладает промежуточными стадиями, ускользающими от наблюдения в том случае, когда процесс прослеживается по спектрам поглощения и флуоресценции при комнатной температуре.

Спектры флуоресценции при —196°. При —196° феофитин а в 60% ацетоне обладает, помимо флуоресценции мономера при 674—676 мμ, максимумом агрегированной формы пигмента при 745—750 мμ (рис. 2) ([4]). В замороженном растворе при —196° мы не смогли заметить существенных изменений при освещении,— лишь немного снижалась интенсивность флуоресценции.

Однако в случае освещения раствора красным светом $\lambda > 700$ мμ при —30° и измерения флуоресценции при —196° происходило быстрое понижение максимума агрегированной формы при 750 мμ и образование нового максимума при 772—780 мμ; высота «мономерного» максимума 675 мμ при этом существенно не менялась. Через 30 сек. освещения исходная «форма 750» остается лишь в виде «плеча». Форма пигмента, обладающая флуоресценцией при 775 мμ, представляет собой нестойкое соединение и при повышении температуры до 20° превращается в исходную агрегированную форму феофитина с максимумом низкотемпературной флуоресценции при 750 мμ.

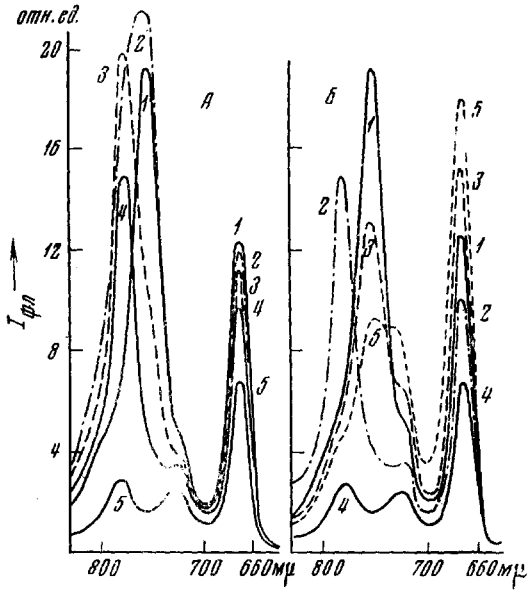


Рис. 2. Спектры флуоресценции (—196°) при фотоокислении феофитина а в 63% ацетоне кислородом. *А*: *1* — исходный раствор при —30°, *2* — 5 сек., *3* — 30 сек., *4* — 5 мин., *5* — 60 мин. освещения при —30°, $\lambda > 700$ мμ. *Б* — сразу после освещения при —30° 5 мин. (*2*) и 60 мин. (*4*) и после размораживания и 1 часа выдерживания в темноте исходного раствора (*1*), и освещенного в течение 5 мин (*3*) и 60 мин. (*5*)

По мере дальнейшего освещения при —30° и немедленной фиксации продуктов реакции в жидком азоте наблюдалось понижение флуоресценции в обоих максимумах, причем максимум промежуточного продукта при 775 мμ уменьшался с большей скоростью, чем мономерный при 675 мμ.

После размораживания растворов и измерения флуо-

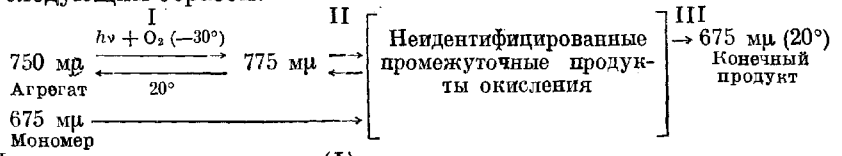
ресценции при 20 и —196° было обнаружено возрастание максимума мономера (в результате освещения, проведенного при —30°).

Спектры флуоресценции при —30°. Несколько иная спектральная картина наблюдалась в том случае, когда освещение и измерение флуоресценции растворов феофитина производили при —30°. В этих условиях в спектре исходного раствора до освещения, помимо флуоресценции мономера при 675 мμ и второго максимума этой формы при 720 мμ, обнаруживалась длинноволновая форма 775 мμ; обычный максимум агрегированной формы при 750 мμ практически отсутствовал. По-видимому, в этих условиях образование промежуточной формы 775 мμ происходит под влиянием возбуждающего света (рис. 3). В начале освещения (до 30 сек.) наблюдалось дальнейшее возрастание максимума 775 мμ, тогда как мономерный по величине существенно не изменялся. После 5—15 мин. освещения флуоресценция при 775 мμ значительно понижалась, максимум 675 мμ возрастал; последующее выдерживание в темноте при —30° вызывало увеличение флуоресценции при 775 мμ.

В результате 30 мин. освещения происходило дальнейшее понижение максимума 775 мμ и значительное возрастание флуоресценции при 675 мμ; в темноте при —30° величина флуоресценции при 775 мμ не изменялась, но наблюдался дальнейший рост максимума при 675 мμ.

Освещение в отсутствие воздуха в течение 15 мин. при —30° приводило лишь к общему небольшому снижению флуоресценции по всей измеряемой области спектра. Пуск кислорода не изменял вида спектра. Освещение (2 мин.) в присутствии кислорода воздуха при —30° вызывало появление длинноволнового максимума 775 мμ.

Результаты описанных выше опытов свидетельствуют о том, что феофитин в водно-ацетоновых растворах подвергается фотохимическому превращению, идущему в несколько ступеней. Схематически наблюдаемые спектральные изменения (максимумы флуоресценции в мμ) можно изобразить следующим образом:



Первая ступень реакции (I) проявляется в результате кратковременного освещения при —30° и заключается в превращении агрегированной формы пигмента 775 мμ в новую форму, флуоресцирующую при 775 мμ. Возможно, что в результате световой реакции образуется комплекс агрегированного феофитина с кислородом типа перекиси, распадающийся при нагревании до комнатной температуры. Растворитель, по-видимому, входит в образующийся молекулярный комплекс ([5], [6]); предполагается, что в водно-диоксановых коллоидах две молекулы пигмента связываются с кислородами молекулы диоксана. Возможно предположить, образование при освещении димеров, у которых две молекулы пигмента связаны с молекулой кислорода, образуя таким образом агрегированную форму феофитина с максимумом флуоресценции при 775 мμ.

Второй ступенью реакции (II) является фотоокисление пигмента кислородом в предполагаемом комплексе, сопровождающееся понижением флуоресценции по всему спектру. Максимумов поглощения и флуоресценции промежуточных продуктов окисления измерить пока не удалось. Тот факт, что в начале освещения раствора при —30° после выключения света наблюдается возрастание максимума промежуточного продукта 775 мμ, а после более продолжительного освещения — увеличение флуоресценции мономера, может указывать на то, что пока ускользающая от изучения стадия окисления феофитина включает две элементарные реакции, одна из которых обратима. Понижение максимума 675 мμ, наблюдающееся на этой стадии реакции, свидетельствует о том, что мономерная форма феофитина в этих условиях также окисляется кислородом.

В темноте при комнатной температуре происходит обратная реакция (III), в результате которой из окисленных продуктов образуется соединение, сходное по спектральным свойствам с мономерным феофитином. В случае проведения опыта при комнатной температуре промежуточные стадии окисления феофитина протекают быстро и поэтому не могут быть обнаружены. Конечным спектральным проявлением окисления феофитина в этом случае является дезагрегация длинноволновой формы, которая, по-видимому, связана с большей растворимостью в водном ацетоне продукта обратной реакции фотоокисления феофитина.

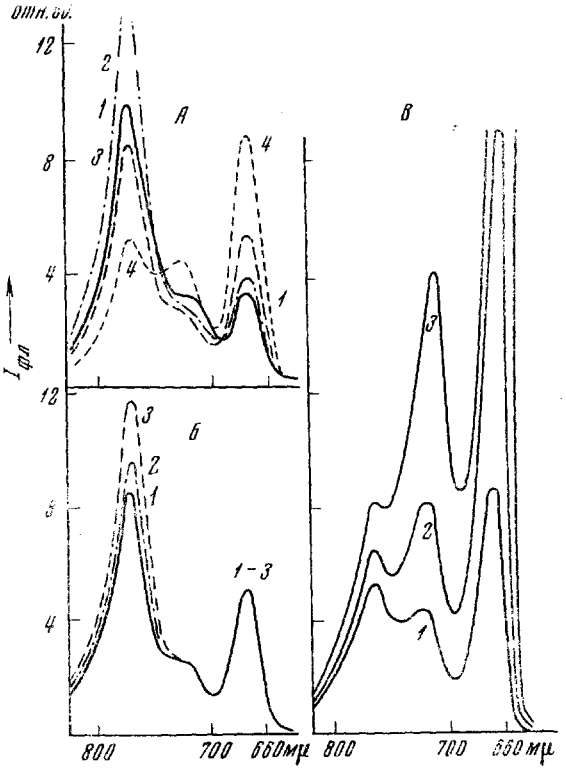


Рис. 3. Спектры флуоресценции (—30°) при фотоокислении феофитина а в 63% ацетоне кислородом в результате освещения при —30° светом $\lambda > 700$ мμ. *А* — освещение: *1* — исходный раствор, *2* — через 30 сек., *3* — 5 мин., *4* — 30 мин.; *Б* — возрастание максимума 775 мμ в темноте после освещения раствора в течение 5 мин.: *1* — сразу после освещения, *2* — через 3 мин. темноты, *3* — через 10 мин. (—30°); *В* — возрастание максимума 675 мμ в темноте после освещения раствора в течение 30 мин.: *1* — сразу после освещения, *2* — через 5 мин., *3* — через 10 мин. (—30°)

При кратковременном (15—30 сек.) освещении феофитина а в безводном ацетоне при температуре от 20 до —100° мы не смогли обнаружить промежуточных стадий окисления пигмента кислородом, однако при этом наблюдается накопление того же измененного продукта, что и в водном ацетоне. Хроматографическое разделение показало, что после 1,5 час. освещения феофитина в ацетоне при 20° весь исходный пигмент превращался в измененный феофитин и продукты деструктивного окисления.

Полученные данные недостаточны для суждения о природе химических изменений, происходящих в молекуле феофитина под действием света в присутствии кислорода, однако трудно сомневаться в том, что ранее обнаруженная фотохимическая дезагрегация длинноволновой формы феофитина сопряжена с фотоокислением пигмента кислородом. В связи с полученными данными требует исследования участие кислорода в механизме обнаруженной ранее фотодезагрегации хлорофилла в листьях растений ([7]), возможно тоже сопряженной с фотоокислением пигмента.

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

Поступило
25 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, 189, 420 (1969). [2] А. А. Красновский мл., Ф. Ф. Литвин, Молек. биол., 3, 282 (1969). [3] А. А. Красновский, М. Г. Шапошникова, Физиол. раст., 17, 436 (1970). [4] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молек. биол., 2, 847 (1968). [5] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 340 (1953). [6] T. T. Bannister, B. B. Love, J. Biophys., 3, 99 (1963). [7] Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, 183, 711 (1968).

Доклады Академии наук СССР
1970. Том 195, № 5

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Н. Н. ДРОЗДОВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАТИМОЕ ФОТООКИСЛЕНИЕ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ХЛОРОФИЛЛА ХИНОНАМИ

В нашей лаборатории ([1–3]) было установлено, что пигмент пурпурных бактерий — бактериохлорофилл обладает способностью к «самосборке» агрегированных форм в твердых пленках и коллоидных растворах, обладающих максимумами поглощения в близкой и.-к. области спектра при 800; 850 и 890 мμ. Спектр поглощения фотосинтезирующих бактерий характеризуется теми же тремя максимумами, что указывает на наличие в бактериях различных агрегированных форм бактериохлорофилла. Исследование действия нагревания, освещения и органических растворителей на хроматофоры бактерий и на искусственные агрегированные формы пигмента показало наличие сходных эффектов ([1]).

Способность бактериохлорофилла, находящегося в мономерной форме, к обратимому фотохимическому взаимодействию с *n*-бензохиноном и убихинонами в высоковязкой спирто-глицериновой среде была установлена нами ранее ([4, 5]). Обратимые изменения в спектре поглощения бактериохлорофилла в пурпурных бактериях, наблюдаемые при освещении и в присутствии окислителей, свидетельствуют о возможном обратимом окислении пигмента ([6, 7]). Следовало выяснить возможность обратимого фотоокисления агрегированных форм бактериохлорофилла, доминирующих в фотосинтезирующих организмах.

В данной работе исследовалось фотохимическое взаимодействие бактериохлорофилла и хлорофилла а с различными хинонами в агрегированных коллоидных формах, образованных в вязкой спирто-глицериновой среде.

В опытах использовали бактериохлорофилл, выделенный из пурпурных бактерий с конечной хроматографией на сахарозе, *n*-бензохинон (очищенный возгонкой) и убихиноны, использованные нами в одной из предыдущих работ ([8]); этиловый спирт (ректификат) и глицерин (ч.д.а.). Опыты проводили в вакуумных трубках Тунберга; в трубку вводили требуемое количество спиртового раствора пигмента и глицерина. Освещение раствора — красным светом (светофильтр КС-19) от киноламлы 300 вт, сфокусированным при помощи двухлинзового конденсора на трубку с раствором. Источник синего света — ртутно-кварцевая лампа СВД-120 (осветитель ОИ-18) со светофильтрами ФС-1 и БС-8, выделяющими линии ртути 405 и 435 мμ. Интенсивность красного и синего света обычно 10^5 эрг/см^2·сек. Запись спектров поглощения бактериохлорофилла до и после фотохимической реакции производили на модифицированном спектрофотометре СФ-10 от 400 до 900 мμ. Запись спектров хлорофилла а — на СФ-14.

В наших прежних опытах по обратимому фотоокислению пигментов ([4, 5]) реакция осуществлялась в смеси этилового спирта и глицерина при их соотношении по объему 3 : 7. В этой среде пигмент находится в мономерной форме (с максимумом поглощения при 775 мμ); при относительном увеличении количества глицерина до 90% (10% спирта) происходит агрегация бактериохлорофилла с образованием длинноволновых форм этого пигмента с максимумами поглощения при 790 и 850 мμ, при этом в области 590—620 мμ наблюдается сужение полосы поглощения с выраженным максимумом при 590 мμ (рис. 1). В этих условиях часть пигмента оста-

ется в мономерной форме, хотя на спектре поглощения не видно выраженного максимума 775 мμ; измерение спектра флуоресценции при +20° показало наличие максимума при 785 мμ, характерного для растворенного бактериохлорофилла. Охлаждение раствора до —70° приводило к росту длинноволнового максимума и сдвигу его в длинноволновую сторону до 860—870 мμ. Нагревание охлажденного раствора до +70° вызывало резкое уменьшение поглощения при 850—860 мμ и увеличение при 790 мμ. Эти данные подтверждают опыты нашей лаборатории о термолабильности формы 850 по сравнению с формой 790 (1).

Мы исследовали возможность фотохимического взаимодействия агрегированных форм бактериохлорофилла в спирто-глицериновой среде с *n*-

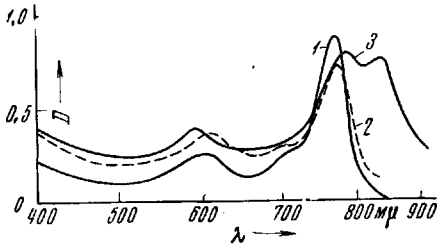


Рис. 1

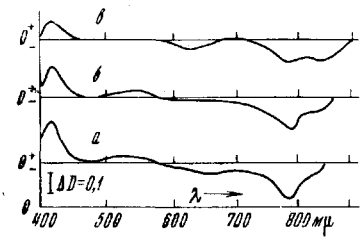


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения бактериохлорофилла в спирте (*1*) и в смеси спирта с глицерином в разных объемных соотношениях: *2* — 3 : 7; *3* — 1 : 9

Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения при фотоокислении агрегированного бактериохлорофилла *n*-бензохиноном ($4 \cdot 10^{-4}$ *M*), измеренные через разное время освещения: *а* — 2 мин.; *б* — 5 мин., *в* — 12 мин.

бензохиноном и убихинонами. В этих опытах к 0,4 мл спиртового раствора пигмента добавляли 3,6 мл глицерина, записывали спектр поглощения, чтобы убедиться в образовании двух агрегированых форм бактериохлорофилла, затем добавляли спиртовый раствор окислителя, перемешивали раствор, откачивали воздух вакуумным насосом с удалением избытка спирта до его содержания 10% в смеси, записывали спектр, освещали при +20° и после освещения опять записывали спектр поглощения. По этим данным получали дифференциальный спектр (свет — темнота). Концентрация окислителя в опыте $\sim 10^{-4}$ *M*.

На рис. 2 видно, что освещение ведет к падению максимумов поглощения агрегированных форм и появлению новой полосы поглощения окисленного продукта при 430 мμ. В темноте реакция идет обратно с регенерацией агрегированных форм. Следует отметить, что форма 790 фотохимически более активна, чем форма 850. Так, при освещении до 2 мин. наблюдаются изменения только в области 790 мμ, при увеличении времени освещения до 5 мин. появляется заметное уменьшение полосы 850 мμ, которое увеличивается при дальнейшем освещении (12 мин.).

Как видно из рис. 3, в реакции с убихиноном также наблюдается появление полосы поглощения при 430 мμ, при одновременном уменьшении поглощения при 790 и 850 мμ. Реакция обратима при выключении света.

Существенно то, что при фотохимическом окислении бактериохлорофилла, независимо от формы нахождения пигмента в растворе — мономерной или агрегированной, продукт фотоокисления обладает максимумом при 430 мμ, совпадающим по положению с продуктом фотоокисления мономерного бактериохлорофилла. Казалось бы, поэтому реакция с хинонами могла и в этой системе идти с мономерной формой пигмента, которая находится в равновесии с агрегированными формами. Однако в данном случае обратная реакция должна была вести к образованию мономерной формы пигмента, тогда как в действительности в «темноте» происходит регенерация

длинноволновых агрегированных форм. Кроме того, ранее нами было показано, что обратимая реакция бактериохлорофилла в растворе (в мономерной форме) с *n*-бензохиноном наблюдается в данных условиях опыта только при —70°, тогда как фотореакция агрегированных форм бактериохлорофилла с *n*-бензохиноном и убихиноном идет при комнатной температуре. При —70°, в отличие от мономерных растворов, обратимую реакцию нам наблюдать не удалось. Поэтому наиболее вероятно, что в описанных опытах протекает фотохимическая реакция длинноволновых агрегированных форм бактериохлорофилла; при этом, однако, нельзя исключить промежуточной фотодезагрегации длинноволновых форм пигмента.

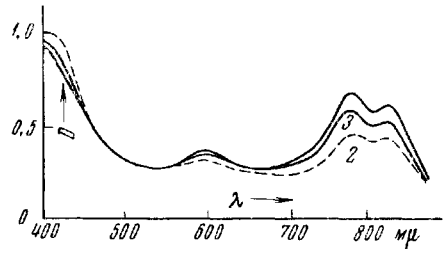


Рис. 3

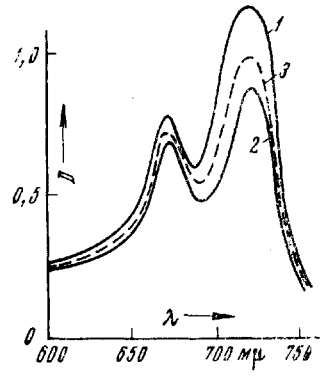


Рис. 4

Рис. 3. Обратимое фотоокисление агрегированного бактериохлорофилла убихиноном (UO_2) ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*). *1* — исходный спектр, *2* — после освещения в течение 2 мин., *3* — после обратной реакции в темноте

Рис. 4. Обратимое фотоокисление агрегированного хлорофилла а *n*-бензохиноном ($4 \cdot 10^{-4}$ *M*) в системе спирт — глицерин (1 : 9). *1* — исходный спектр, *2* — после 10 мин. освещения, *3* — после обратной реакции в темноте

Мы нашли, что лабильная окисленная форма бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 мμ, образующаяся при обратимом фотоокислении пигмента ([9]), активируется синим светом ([10]). Изучение действия синего света на реакцию фотоокисления агрегированного бактериохлорофилла хинонами привело к тем же результатам. Освещение синим светом ведет к ускорению обратной реакции продукта фотоокисления с регенерацией исходных агрегированных форм пигмента. Так же как и в растворе, в системе, содержащей агрегированный бактериохлорофилл и *n*-хинон, наблюдается изменение фотопотенциала в положительную сторону под действием красного света. В темноте происходит медленное возвращение фотопотенциала к первоначальной величине; синий свет заметно ускоряет этот процесс.

В хроматофорах бактерий и в целых бактериальных клетках методом дифференциальной спектроскопии были обнаружены светоиндуцированные изменения поглощения, которые относятся к окислению реакционного центра бактериохлорофилла, П 870 или П 890, окислению цитохрома и восстановлению убихинонов. Изменение спектра поглощения бактериохлорофилла в близкой и.-к. части спектра сопровождается одновременным появлением новой полосы поглощения около 430 мμ. Высказывалось предположение, что эти изменения обусловлены фотоокислением бактериохлорофилла ([6], [7], [11]). Было показано, что освещение целых клеток R. rubrum вызывает возникновение сигналов э.п.р. и изменения оптической плотности, идентичные с теми, которые получаются при химическом окислении бактериохлорофилла ([12]). Однако есть указания на отсутствие ([13]) или наличие ([14]) корреляции между изменениями поглощения при 430 мμ и изменениями в близкой и.-к. области; появление положительного максимума 430 мμ ука-

зывает также на изменения цитохромов, которые поглощают в этой же области спектра. По-видимому, в клетках бактерий наблюдаемые изменения в синей части спектра вызваны не одной реакцией (фотоокислением бактериохлорофилла), а несколькими.

Мы показали, что при обратимом фотоокислении бактериохлорофилла ([8], [9]) образование продукта 430 не зависит от того, находится ли пигмент в мономерной или агрегированной форме. Следовательно, если в клетках бактерий при освещении появляется полоса при 430 мμ, то вероятно, что часть увеличения поглощения может быть обусловлена образованием окисленной формы пигмента.

Наряду с бактериохлорофиллом мы исследовали фотоокисление агрегированного хлорофилла а в спирто-глицериновой среде. При соотношении спирта и глицерина 1:9 хлорофилл образует две формы с максимумами поглощения 680 и 720 мμ. Исследование обратимого фотоокисления этих форм *n*-бензохиноном показало, что более активной является форма 720. Обычно освещение раствора красным светом в присутствии *n*-бензохинона или убихинона в вакууме сопровождается значительным уменьшением полосы 720 мμ и меньшими изменениями в области 680 мμ (см. рис. 4). Это согласуется с опытами нашей лаборатории по фотоокислению агрегированных форм хлорофилла а кислородом ([15]). Так же как и в случае бактериохлорофилла, изменения в спектре поглощения агрегированного хлорофилла а наблюдались лишь при комнатной температуре.

Таким образом, изложенный экспериментальный материал свидетельствует о фотохимической активности агрегированных форм бактериохлорофилла и хлорофилла а в реакции обратимого фотоокисления хинонами.

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

Поступило
17 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Воробьева, ДАН, 85, 389 (1952); 92, 120 (1953). [2] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биол., 1, 362 (1967). [3] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, ДАН, 174, 480 (1967). [4] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 158, 370 (1964). [5] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [6] L. N. M. Duysens, W. J. Hulskamp et al., Biochim. et biophys. acta, 19, 188 (1956). [7] L. N. M. Duysens, Research in Photosynthesis, N. Y., 1957, p. 164. [8] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский и др., ДАН, 183, 221 (1968). [9] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова, ДАН, 177, 1225 (1967). [10] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 188, 1384 (1964). [11] R. K. Clayton, Bacterial Photosynthesis, Ohio, 1963, p. 377. [12] I. D. McElroy, G. Feher, D. C. Mauzerall, Biochim. et biophys. acta, 172, 180 (1969). [13] I. M. Olson, B. Kok, Biochim. et biophys. acta, 32, 278 (1959). [14] W. W. Parson, Brookhaven Symp. Biol., 19, 95 (1966). [15] М. И. Быстрова, Тез. докл. II Всесоюзн. биохимич. съезда, секция 19, Ташкент, 1969, стр. 38.

ФОТОХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПИГМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМОВ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

Лаборатория фотобиохимии Ордена Ленина Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Преобразование энергии квантов света при фотосинтезе происходит путем последовательных стадий, в которых возникают запасающие энергию света молекулярные образования, обладающие различной длительностью жизни.

Трудность изучения механизма фотосинтеза в значительной мере определяется нестойкостью разнообразных промежуточных продуктов, несущих энергию квантов света. Эти продукты легко ускользают от экспериментатора, когда он пытается их изолировать и нарушает нормальное состояние фотосинтетического аппарата.

Успехи в изучении фотосинтеза за последние годы во многом определяются применением спектральных методов, позволяющих изучать короткоживущие активные вещества, и изотопных методов, дающих возможность установить химическую природу более долгоживущих промежуточных продуктов. Расшифровка принципов работы «фотосинтетического» углеродного цикла оказалась возможной главным образом благодаря использованию углекислоты, меченной долгоживущим изотопом углерода C^{14}.

Существует несколько методов подхода к изучению природы преобразования энергии квантов света в потенциальную химическую энергию при фотосинтезе. В нашей лаборатории в течение многих лет изучалась фотохимия хлорофилла — взаимодействие молекулы хлорофилла с квантом света и превращение возбужденных молекул пигментов. Чтобы понять специфику этих процессов, идущих в живой клетке, мы уделяем много внимания изучению состояния пигментов в хлоропластах и хроматофорах — молекулярной организации пигментной системы организмов. В данной статье дается краткая сводка работ за последние годы, проведенных в лаборатории, руководимой автором.

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУЖДЕННЫХ МОЛЕКУЛ ХЛОРОФИЛЛА [1]

Общепринятая схема энергетических уровней органических молекул применима для хлорофилла и его аналогов (рис. 1). Молекула хлорофилла в «темноте» находится на нижнем синглетном уровне S; населенность колебательных уровней на схеме не изображается. Согласно данным современных исследований, отдельные полосы в спектре поглощения молекулы хлорофилла принадлежат различным электронным переходам; на схеме изображены два перехода, соответствующие «красному» ($S \rightarrow S^*$) и «синему» ($S \rightarrow S^*_1$) максимумам поглощения молекулы хлорофилла. Хорошо изучены безызлуча-

[1] Ссылки на оригинальные работы см. в обзоре автора [23а].

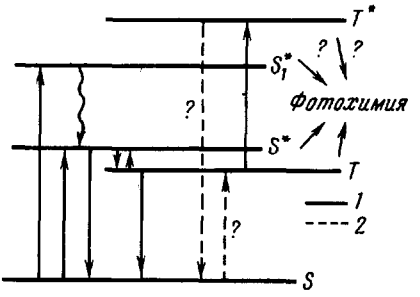


Рис. 1. Схема электронных уровней хлорофилла

Переходы:
1 — изученные;
2 — неизученные

тельные переходы с более высоких возбужденных уровней на нижний уровень с последующим испусканием кванта света флуоресценции ($S^* \rightarrow S$); безызлучательный переход, при котором образуется триплетное состояние ($S^* \rightarrow T$), и поглощение кванта света долгоживущим состоянием T с образованием возбужденного состояния T^*, несущего энергию двух квантов света.

Об образовании метастабильного (триплетного) состояния хлорофилла свидетельствуют фосфоресценция хлорофилла в замороженных до — 196° средах, наблюдение переходов $T \rightarrow T^*$, измеренных с помощью импульсной спектроскопии при комнатной температуре, и измерение замедленной флуоресценции $T \rightarrow S^* \rightarrow S$.

Недавно удалось измерить полосу электронного резонанса триплетных состояний хлорофилла *b* в спирте при — 196°; при этом наблюдалось образование радикальных форм [49].

Прямой маловероятный переход $S \rightarrow T$ должен дать полосу поглощения в близкой инфракрасной области спектра в концентрированных растворах хлорофилла. Нам удалось наблюдать такие полосы поглощения в области 720—850 *ммк* [23], но они, скорее всего, принадлежат агрегированным формам пигмента.

Таким образом, спектроскопические наблюдения показывают образование всех типов возбужденных состояний, изображенных на схеме,—синглетных S^*, S^*_1 и триплетных T и T^*.

Наиболее важно получить сведения о химических свойствах возбужденных состояний, коренным образом отличающихся от свойств молекулы в нижнем невозбужденном состоянии. По сути дела, все типы возбужденных состояний — это новые неустойчивые активные молекулярные конфигурации, несущие большую часть энергии кванта света. Они способны претерпевать химические превращения, либо отдавать свою энергию (электрон) подходящему акцептору, т. е. участвовать в процессах миграции энергии. А. Н. Теренин [52, 78] подчеркнул, что роль триплетных состояний в фотохимии определяется большой длительностью их жизни и химической ненасыщенностью (свойствами бирадикала) из-за наличия неспаренного электрона.

Известно, что оба типа возбужденных состояний хлорофилла эффективно инактивируются (тушатся) молекулами-окислителями и весьма малоэффективно — восстановителями. Следует полагать, что тушение реализуется в комплексе возбужденный пигмент—тушитель, предшествуя «истинному» фотохимическому процессу, когда партнеры, получившие и отдавшие электрон, расходятся в виде самостоятельно диффундирующих молекулярных образований. Цикл работ нашей лаборатории, посвященных этому вопросу, выходит за рамки настоящей статьи.

Посмотрим теперь, как реализуется фотохимический процесс при реакции возбужденных пигментов с донорами и акцепторами электрона, ведущей к образованию более долгоживущих фотопродуктов.

ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Способность возбужденных светом молекул хлорофилла, его аналогов и производных к реакции обратимого фотовосстановления (обратимому фотохимическому взаимодействию с молекулами восстановителя — донорами электрона) была обнаружена нами в 1948 г. [22, 24]. При фотореакции образуются восстановленные формы пигментов, различающиеся по спектральным свойствам и реакционной способности в зависимости от числа воспринимаемых электронов и протонов и условий кислотноосновного равновесия в среде. После выключения света реакция идет в обратном направлении с различной скоростью в зависимости от природы среды, свойств донора электрона и наличия в системе акцептора электрона. Предложенная в нашей первой работе схема обратимого фотовосстановления хлорофилла (Хл) и его аналогов в триплетном возбужденном состоянии с промежуточным образованием ион-радикалов была подтверждена в последующих работах нашей и других лабораторий [24].

$$Хл + h\nu \rightarrow Хл^* \rightarrow \cdot Хл\cdot; \qquad \cdot Хл\cdot + АН \rightarrow \cdot Хл^- + \cdot АН^+$$

Воспринимаемый в первичном акте электрон, по-видимому, делокализован в системе сопряженных двойных связей молекулы пигмента; локализация атомов водорода в восстановленных формах не установлена с полной определенностью и является предметом дискуссии [10, 51, 73].

Для прямых определений свободных радикалов, образующихся при реакции, применяли методы инициирования цепной полимеризации и измерения ЭПР. Так, система хлорофилл — донор электрона энергично фотосенсибилизирует полимеризацию метилметакрилата, поэтому реакция сопровождается образованием свободных радикалов; освещение системы в резонаторе ЭПР-спектрометра приводило к появлению сигнала [39]. С помощью метода ЭПР удалось найти сигнал монодегидроаскорбиновой кислоты, образующейся при реакции [5]. Освещая замороженные системы, содержащие пигмент и растворитель, удалось измерить синглетный сигнал, по-видимому вызванный переходом электрона от молекулы матрицы-растворителя к возбужденной молекуле пигмента [49].

При фотовосстановлении в пиридине образуются достаточно устойчивые окрашенные фотовосстановленные формы: у хлорофилла и бактериовиридина — красного цвета, у бактериохлорофилла — зеленого (рис. 2). Фотовосстановление в спирте обычно ведет к обратимому падению «красного» максимума поглощения без образования окрашенных восстановленных форм.

Фотовосстановление наблюдается и в кислых средах: так, например, порфирины восстанавливаются аскорбиновой кислотой в водном растворе серной кислоты с образованием ряда взаимопереходящих фотовосстановленных форм. Промежуточные формы могут изомеризоваться с образованием хлорина и бактериохлорина [56]. При освещении порфиринов в кислом замороженном спирте наблюдается синглетный сигнал ЭПР [49], который следует приписать ион-радикалу восстановленной спиртом молекулы пигмента. Течение реакции зависит от свойств среды. Мы наблюдали, что в диоксане идет восстановление хлорофилла и других пигментов аскорбиновой кислотой и при отсутствии света. Применение метилвиологена в качестве редокс-индикатора обнаружило различия восстановительного потенциала аскорбиновой кислоты в пиридине в зависимости от количества воды в этом растворителе [25].

В качестве доноров электрона при фотовосстановлении пигментов используются аскорбиновая кислота и другие диэнолы, фенилгидразин, соединения двухвалентного железа. Любопытно, что восстановленные пиридиннуклеотиды ($НАД\cdot H_2$) и их аналог N-бензилникотинамид (БНА·Н) не приводят к фотовосстановлению хлорофилла при освещении красным светом, т. е. в области поглощения хлорофилла, но приводят к фотовосстановлению хлорофилла при возбуждении близким ультрафиолетом в области поглощения $НАД\cdot H_2$ — при 340 *ммк* [25, 26]. При этом образуется «красная» восстановленная форма хлорофилла, а $НАД\cdot H_2$ необратимо окисляется. Освещение раствора

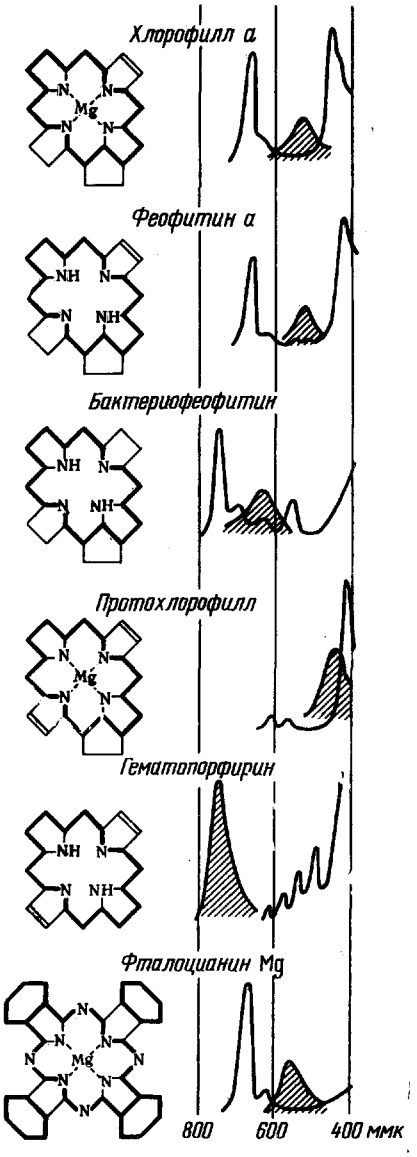


Рис. 2. Изменения спектров поглощения хлорофилла и его аналогов при фотовосстановлении аскорбиновой кислоты в пиридине (структура молекул пигментов показана схематично)

Кривые — спектры поглощения пигмента до реакции и после обратной реакции; заштрихованы спектры поглощения промежуточных фотовосстановленных форм

НАД · H_2 в пиридине в вакууме линиями ртути 365 *ммк* ведет к образованию фотопродуктов, не разрушающихся при освещении и способных в темноте восстанавливать хлорофилл, сафранин и другие соединения [25].

С фотовосстановленными формами хлорофилла и его аналогов реагирует широкий круг соединений — пиридиннуклеотиды, N-бензилникотинамид, соединения окисного железа, различные красители (сафранин Т, рибофлавин, метиловый красный и др.), хиноны и кислород.

При фотореакции в тройной системе донор электрона — пигмент — акцептор электрона наблюдается сенсибилизированное восстановление молекул-акцепторов и блокирование реакции фотовосстановления.

Резкое торможение фотовосстановления хлорофилла каротином [11] не укладывалось в описанную схему, поскольку нам не удалось обнаружить продуктов фотосенсибилизированного восстановления каротина. Эти опыты побудили к систематическому изучению влияния полиенов и циклических соединений с различной структурой на фотовосстановление хлорофилла. Мы изучали влияние разных соединений: каротиноидов и их аналогов с различной длиной сопряженных двойных связей; молекул полиметиновых красителей, в которых полиеновая цепь сочетается с гетероциклом; полициклических углеводородов (нафталин, антрацен, тетрацен), гетероциклических соединений, содержащих в цепи сопряженные атомы азота и кислорода (эти соединения лежат в основе структуры обратимо восстанавливающихся красителей).

Возможны следующие механизмы блокирования реакций перечисленными соединениями: дезактивация возбужденных состояний хлорофилла (эффективная дезактивация триплетов возможна в случае полиенов и полициклических соединений); реакция обратимого фотовосстановления возбужденного хлорофилла молекулами-акцепторами, конкурирующая с фотовосстановлением; реакция блокирующих соединений с фотовосстановленными формами хлорофилла, что наблюдается у большинства изученных соединений. Надежно действующая электронная «ловушка» представляет собой сочетание полиеновой цепочки с гетероциклом. Эти соединения не только воспринимают электрон, но могут образовывать более устойчивые и долгоживущие восстановленные продукты.

ФОТОФЕОФИТИНИЗАЦИЯ

Реакция феофитинизации представляет собой замещение центрального атома магния в молекуле пигмента на два атома водорода и обычно наблюдается в кислых средах

$$\text{Хлорофилл} + 2H^+ \longrightarrow \text{феофитин} + Mg^{2+}.$$

Скорость образования феофитинов из соответствующих магниевых комплексов — аналогов хлорофилла — соответствует убывающему ряду: бактериовиридин > хлорофилл *a* > протохлорофилл > бактериохлорофилл > > хлорофилл *b* [41, 48].

Различия в степени восстановления полуизолированных двойных связей в молекуле пигмента не оказывают влияния на реакцию; упрочение связи магния следует приписать наличию электроотрицательных заместителей (альдегидная группа у хлорофилла *b*).

В нашей лаборатории было установлено [38, 41, 48], что феофитин образуется при освещении таких систем, где не удается спектроскопически наблюдать образования продуктов фотовосстановления, например в системах хлорофилл — пиридин — соляная кислота, пиридин — щавелевая кислота, спирт — гидрохинон и т. д. (рис. 3). Этим методом удается установить обратимую реакцию хлорофилла с гидрохиноном в спиртовом растворе [48].

Ниже показано время полупревращения (в минутах) пигментов в феофитины (растворитель: пиридин + 10% воды, без воздуха; щавелевая кислота — $2 \cdot 10^{-2}$ *M*; красный свет — 10^5 *эрг/см²·сек*).

Пигмент	Темнота	Свет
Бактериовиридин*	60	14
Хлорофилл *a*	180	12
Протохлорофилл	600	10
Хлорофилл *b*	1400	9

* В опыте $0{,}4 \cdot 10^{-2}$ *M* щавелевой кислоты.

Из приведенных данных видно чрезвычайное ускорение феофитинизации на свету. Реакция фотофеофитинизации, так же как и фотовосстановление, блокируется акцепторами электрона — метиловым красным, рибофлавином, сафранином, а также β-каротином и тетраценом. Блокирующее действие этих соединений, вероятно, определяется обратимой реакцией с промежуточной восстановленной формой пигмента — конкуренцией за возбужденную молекулу пигмента (путем обратимого фотоокисления) или дезактивацией триплетных состояний пигмента. Трудно сомневаться в том, что в основе изученной реакции лежит обратимое фотовосстановление хлорофилла экзогенными донорами электрона или молекулами растворителя, сопровождающееся быстрой феофитинизацией промежуточных фотовосстановленных форм пигмента.

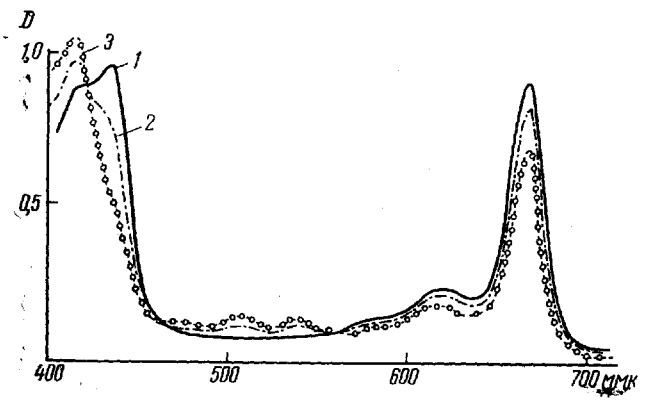


Рис. 3. Фотофеофитинизация хлорофилла *a* в абсолютном спирте pH 3,6 в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ *M* щавелевой кислоты и $4{,}5 \cdot 10^{-2}$ *M* гидрохинона

Спектр поглощения исходного пигмента:
1 — после 45 мин. темноты;
2 — после 15 мин. освещения;
3 — после 30 мин. освещения

Рабинович и Вейс [72] установили, что реакция хлорофилла с окисными соединениями железа представляет собой обратимое окисление.

Давно известно, что при интенсивном освещении растворов хлорофилла на воздухе происходит деструктивное фотоокисление. Мы нашли, что наряду с продуктами необратимого окисления хлорофилла и фталоцианина магния образуются промежуточные лабильные продукты, из которых частично регенерируется пигмент при добавлении восстановителей. Эти процессы наиболее отчетливо идут в спиртовых растворах [22]. Явление обратимости очень ярко выражено в опытах с бактериохлорофиллом [30].

В опытах Евстигнеева и Теренина [19] измерением фотопотенциалов пленок пигментов, нанесенных на металлический электрод и опущенных в раствор электролита, содержащего окислитель или восстановитель, при освещении было обнаружено обратимое изменение потенциала, что свидетельствует о способности пигментов обратимо отдавать или воспринимать электрон.

Качан и Даин [21], освещая хлорофилл ультрафиолетовым светом в «жестких» средах при температуре —190°, нашли изменения поглощения хлорофилла, которое они объяснили элементарным фотоокислением. Линшитц и Реннерт [65] освещали хлорофилл красным светом при температуре жидкого азота в смеси эфир — изопентан — спирт и выяснили, что при этом происходит выцветание, которое усиливается в присутствии хинона и объясняется фотоокислением. Процесс обратим при размораживании раствора. Толлин и Грин [79] наблюдали при освещении системы хлорофилл — хинон в той же «жесткой» среде появление сигнала ЭПР со спектром семихинона, что указывает на одновременно идущее одноэлектронное фотоокисление хлорофилла. Эти результаты можно также интерпретировать как сенсибилизированное хлорофиллом восстановление хинона с использованием компонентов растворителя в качестве донора электрона.

В нашей лаборатории было установлено, что фотоокисление легко наблюдать в спиртоглицериновых средах [7]. Смесь спирта с глицерином при — 70° прозрачна и образует высоковязкую систему. В этих средах хлорофилл и его аналоги дают растворы, в которых удается наблюдать обратимое фотоокисление хиноном и другими окислителями [11, 32].

Реакция с кислородом. Мы исследовали фотохимическое окисление хлорофиллов *a* и *b*, бактериохлорофилла, бактериовиридина, протохлорофилла и феофитина кислородом воздуха в спиртоглицериновых растворах. Явный эффект обратимости наблюдается только после добавления некоторого количества аскорбиновой кислоты при освещении или при введении аскорбиновой кислоты в среду до начала освещения.

Понижение температуры до —70° приводит к ускорению фотоокисления в опытах с хлорофиллом *a* и незначительному замедлению — с бактериохлорофиллом и бактериовиридином. Возможно, что хлорофилл *a* при низких температурах склонен вступать в темновое взаимодействие с кислородом с образованием лабильного молекулярного комплекса, внутри которого и осуществляется перенос электрона при поглощении кванта света.

Наблюдения хемилюминесценции после освещения растворов хлорофилла, содержащих кислород, приводят к выводу о существовании лабильных фотоокисленных форм хлорофилла [42].

Реакция с хиноном. Проводились наблюдения за обратимым выцветанием исследуемых пигментов в присутствии *n*-бензохинона в спиртоглицериновой среде. При — 70° удается обнаружить обратимое выцветание хлорофилла и его аналогов. Ниже показано обратимое изменение оптической плотности в «красном» максимуме поглощения при окислении пигментов *n*-бензохиноном ($\Delta D \cdot 1000$) минус падение интенсивности за 2 мин. света (С), плюс возрастание за 2 мин. темноты (Т) (см. таблицу).

Мы проверяли возможность взаимодействия разных хинонов с хлорофиллом *a*. Опыты ставили по той же методике при температуре —70°. Обра-

Обратимое изменение оптической плотности ($\Delta D \cdot 10^3$) в «красном максимуме» при окислении пигментов *n*-бензохиноном

Пигмент	При световой реакции (С—Т), $-\Delta D$	При темновой обратной реакции (Т—С), $+\Delta D$	Регенерация пигмента, %
Бактериохлорофилл	170	140	82
Бактериовиридин	140	110	82
Хлорофилл *a*	120	110	90
Хлорофилл *b*	50	30	60
Протохлорофилл	30	20	33
Феофитин *a*	0	0	0

тимая фотореакция наблюдалась с *n*-бензохиноном, 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном; с антрахиноном реакцию наблюдать не удалось. Опыты указывают на возможность реакции хлорофилла с пластохиноном.

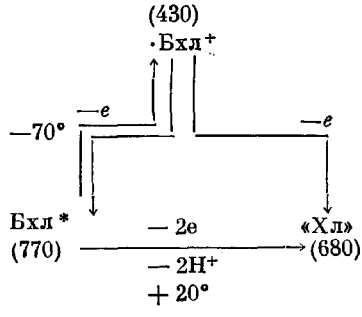
При действии «красного» света происходит обратимое фотохимическое взаимодействие пигмента (Хл) с хиноном (Хин) и образование семихинона согласно реакции:

$$Хл^* + Хин \longrightarrow \cdot Хл^+ + \cdot Хин^-.$$

Обратимый эффект в этой реакции наблюдается при действии «красного» света. В белом свете лампы накаливания мы не уловили обратимых эффектов. Это явление можно объяснить тем, что продукт окисления хлорофилла *a* *n*-бензохиноном имеет максимум поглощения около 480 *ммк* и действие белого света вызывает быстрые превращения этого продукта.

Евстигнеев и Гаврилова [16] нашли, что в кислом спирте реакция окисления хлорофилла *n*-бензохиноном идет глубже, чем реакция в вязких спиртоглицериновых средах, описанная в наших опытах. Одновременно удается наблюдать изменение фотопотенциала в положительную сторону, что приписывается образованию семихинона хлорофилла, тогда как в вязких средах при —70° невозможно провести измерения потенциала ввиду малой подвижности ионов. Эффект кислой среды определяется, по-видимому, увеличением окислительного потенциала хинона в этих условиях. В кислом спирте видны те же типы спектральных изменений, которые мы наблюдали в спиртоглицериновой среде при —70°.

При окислении бактериохлорофилла при 20° хинонами происходит преимущественно необратимая реакция «двуэлектронного» окисления с отнятием двух атомов водорода в положениях 7,8 и образованием хлорофиллоподобного продукта; в отличие от этого, проводя фотореакцию при низкой температуре, удается наблюдать обратимое, вероятно «одноэлектронное», окисление, ведущее к появлению промежуточного продукта с поглощением при 430 *ммк*. Следует полагать, что эти два типа фотореакций могут быть независимыми, либо продукт 680 может образоваться путем промежуточного образования продукта 430 [33].



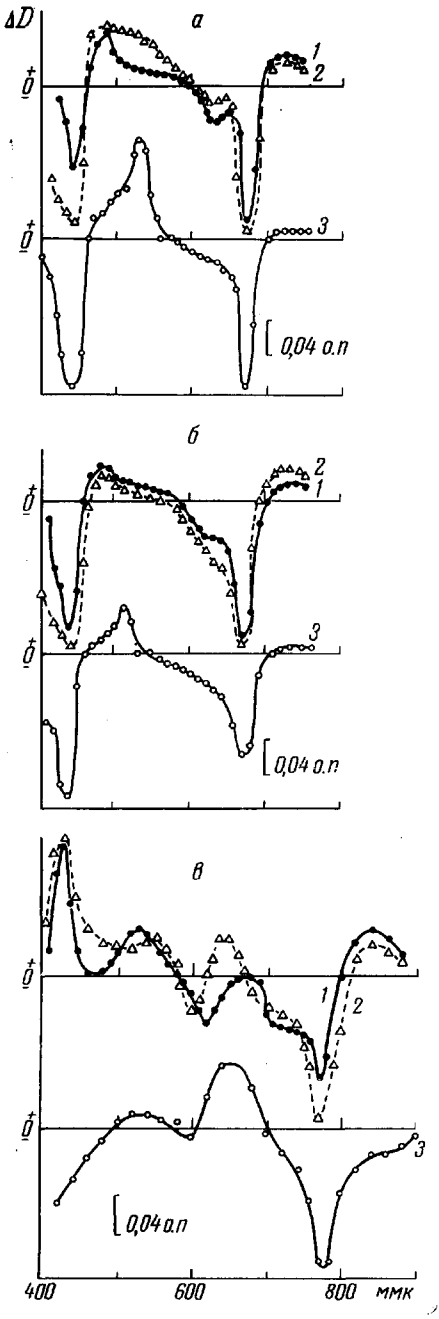


Рис. 4. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении хлорофилла *а* (*а*), бактериовиридина (*б*) и бактериохлорофилла (*в*)

1 — окисление *n*-бензохиноном;
2 — окисление кислородом;
3 — восстановление аскорбиновой кислотой (при восстановлении бактериохлорофилла применяли сернистый натрий)

Изложенное можно выразить гипотетической схемой, где Бхл * — возбужденный бактериохлорофилл, Хл — хлорофиллоподобный продукт с максимумом поглощения при 680 *ммк*, $Бхл^+$ — промежуточный продукт окисления бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 *ммк*.

В связи с развитием техники дифференциальной спектроскопии в литературе оживленно обсуждается вопрос о наличии в живых фотосинтезирующих организмах фотохимически измененных форм хлорофилла и его аналогов. В таких поисках может помочь знание дифференциальных спектров поглощения продуктов фотохимического взаимодействия пигментов с окислителями и восстановителями. Эти измерения проведены в вязкой спиртоглицериновой среде при реакции пигментов с хиноном и кислородом и в пиридинглицериновой среде при реакции с аскорбиновой кислотой (рис.4).

Рассмотрим вид спектров промежуточных форм хлорофилла *а*. Для обеих реакций (окисления и восстановления) характерно падение «красного» и «синего» максимумов и появление поглощения в средней области видимого спектра при окислении с максимумом при 480 *ммк*, при восстановлении — при 525 *ммк*. При окислении появление полосы поглощения наблюдается около 740 *ммк*, при восстановлении — в близкой инфракрасной области — лишь при более длительном освещении и в особых условиях.

Были сопоставлены дифференциальные спектры поглощения в спиртоглицериновых средах при — 70° и в спирте при +20° с помощью импульсной спектроскопии. Спектры промежуточных соединений оказались идентичными [59]. Таким образом, оба метода приводят к наблюдению одних и тех же первичных продуктов.

Заметно сходство дифференциальных спектров поглощения при обратимом окислении пигментов хиноном и преимущественно необратимом — кислородом. Большое сходство окисленных и восстановленных форм указывает на то, что в обоих случаях происходит нарушение системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента.

Спектры бактериовиридина подобны хлорофиллу *а*: максимум окисленного

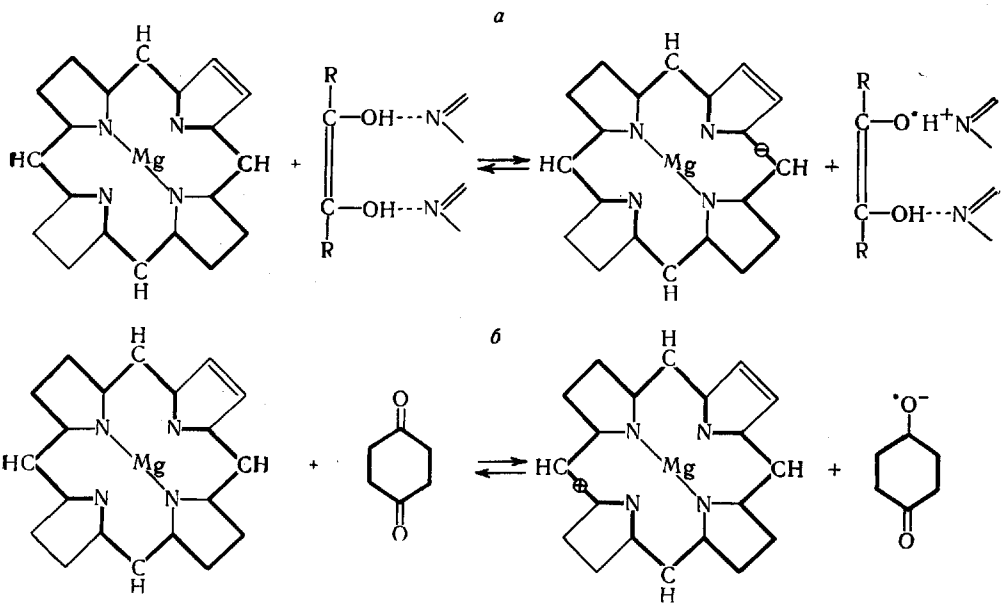


Рис. 5. Схема обратимого фотохимического восстановления (*а*) и окисления (*б*) хлорофилла

продукта лежит при 480 *ммк*, а восстановленного — при 510 *ммк*. В случае бактериохлорофилла более отчетливо выражены различия окисленных и восстановленных форм. Окисленные формы характеризуются максимумами при 430, 530, 840 *ммк*, при окислении кислородом наблюдается, кроме того, увеличение поглощения при 650 *ммк*; для восстановленных форм характерно увеличение поглощения в красной области с максимумом при 650 *ммк* (рис. 5).

Приведенные результаты исследований указывают на то, что возбужденные молекулы хлорофилла могут играть роль акцепторов и доноров электрона.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

Давно известно фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в растворах. Еще в 20-х годах нашего столетия в лаборатории Эмиля Баура был изучен ряд случаев сенсибилизации окислительно-восстановительных реакций хлорофиллом. В качестве доноров электрона применяли фенилгидразин и органические амины, а в качестве акцепторов электрона — разнообразные красители, преимущественно азосоединения.

В нашей лаборатории изучались разнообразные окислительно-восстановительные реакции, сенсибилизированные хлорофиллом и аналогами, идущие в органических растворителях и в воде. Суть реакции заключается в том, что возбужденная молекула хлорофилла играет роль переносчика электрона (водорода) от молекулы донора электрона к молекуле акцептора. В результате реакции донор электрона окисляется, а акцептор восстанавливается, тогда как молекулы пигмента-сенсибилизатора практически не изменяются в процессе реакции. Ниже дается краткая сводка экспериментального материала, полученного в нашей лаборатории.

Пигменты-сенсибилизаторы. Фотосенсибилизирующим действием обладают хлорофиллы *а* и *b*, бактериохлорофилл, бактериовиридин, феофитины, протохлорофилл, порфин, разнообразные порфирины и другие аналоги и производные хлорофилла, содержащие в центре молекулы атомы магния, водорода или цинка.

Доноры электрона. Мы часто использовали аскорбиновую кислоту, которая оказалась универсальным донором электрона, действующим в широком диапазоне условий. Наряду с этим применяли другие диэнолы: фенилгидра-

зин, цистеин, сернистый натрий и т. п. Своеобразная группа соединений, используемых в качестве доноров электрона,— восстановленные пиридиннуклеотиды и N-бензилникотинамид. В ряде реакций пользовались соединениями двухвалентного железа, в том числе цитохромом *с*.

Акцепторы электрона. В качестве акцепторов электрона в нашей лаборатории применялся широкий круг разнообразных соединений, которые менее специфичны в данной реакции, чем доноры электрона,— кислород, метиловый красный и другие азокрасители, сафранин Т, различные хиноны, рибофлавин, ди- и трифосфопиридиннуклеотиды, N-бензилникотинамид, метилвиологен. Акцепторами электрона служат системы, обладающие широчайшим пределом редокс-потенциалов — от кислородного электрода до водородного электрода (метилвиологен). Применение метилвиологена особенно интересно, так как это соединение обладает восстановительным потенциалом, равным потенциалу ферредоксина, работающего в цепи фотосинтетического переноса электрона [2, 25].

Природа среды. Молекулы среды — растворителя, взаимодействуя с молекулами, участвующими в реакции, приводят к изменению их электронодонорных и электроноакцепторных свойств. Так, основные среды (пиридин) вызывают усиление электронодонорных свойств аскорбиновой кислоты, облегчая тем самым реакции фотосенсибилизированного восстановления. Применение водных кислых сред позволяет использовать соединения двухвалентного железа (наряду с аскорбиновой кислотой) в качестве донора электрона при сенсибилизированном восстановлении метилового красного [24].

Хлорофилл и его аналоги нерастворимы в воде. В нашей лаборатории в 1948 г. показана большая фотохимическая активность водных коллоидных растворов хлорофилла, полученных с помощью детергентов [25]. Это явление было детально изучено для коллоидных растворов, полученных с разными детергентами, при различных pH, с использованием разных доноров электрона [3]. По-видимому, хлорофилл в мицелле детергента находится в «мономерной» форме, чем объясняется его высокая активность. Хлорофилл, адсорбированный на цитохроме *с*, в водном растворе фотосенсибилизирует окислительно-восстановительные превращения этого соединения [22]. Наблюдалось фотосенсибилизированное восстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в водных коллоидных растворах хлорофилла и гомогенатах листьев [7]. Евстигнеев и Гаврилова [18] изучали фотосенсибилизированное восстановление метилового красного коагулированными коллоидами хлорофилла и в последующих работах — активность хлорофилла при этой реакции в адсорбированном состоянии на неорганических и органических адсорбентах и в коацерватах. Вернон с сотр. [80] изучали фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в водных растворах, содержащих ферментные препараты. Им удалось показать возможность фотосенсибилизированного восстановления пиридиннуклеотидов по типу реакций, изученных нами ранее в органических растворителях [4, 25].

Из всех этих работ можно сделать вывод, что различные формы хлорофилла в гомогенных и гетерогенных условиях обладают фотосенсибилизирующим действием в окислительно-восстановительных реакциях. В тех средах, где пигменты находятся в «мономерных» формах, реакции обычно более эффективны, чем в средах, где участвуют агрегированные формы пигмента.

Влияние вязкости среды [32]. Были исследованы фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода в вязких средах различной природы. Для этой цели использовали систему аскорбиновая кислота — хлорофилл — акцептор электрона. Изучали сенсибилизированное восстановление акцептора электрона (преимущественно метилового красного) в разных средах при температуре от +20 до —70°. В системе спирт — глицерин сенсибилизированное восстановление метилового красного становится все менее эффективным с увеличением вязкости по мере понижения температуры. Реакция при —10° идет медленнее, чем при +20°, а при —40° в этой системе уже не удается наблюдать сенсибилизированной реакции. Сущест-

венно, что в этиловом спирте даже при —70° идет быстрая сенсибилизация. Таким образом, эффект связан не с понижением температуры, а с увеличением вязкости системы при понижении температуры. Сенсибилизированное фотовосстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в системе пиридин — глицерин дает ту же картину. В фосфорной кислоте и в смеси фосфорной кислоты с глицерином сенсибилизация идет эффективно при комнатной температуре, а при —20° (в переохлажденной вязкой системе) процесс полностью останавливается. Сенсибилизированное восстановление сафранина и рибофлавина имеет те же закономерности.

Таким образом, фотосенсибилизация в растворах требует диффузии активных продуктов и может быть поэтому представлена в виде чередования элементарных стадий, требующих соударений между промежуточными соединениями с вероятным образованием долгоживущих предреакционных комплексов. Известны схемы, рассматривающие перенос энергии от возбужденной молекулы пигмента к молекулам веществ, превращающихся при сенсибилизированной реакции. Наряду с этим распространены представления, согласно которым реакция идет в результате обратимых фотохимических превращений возбужденных молекул пигментов сенсибилизаторов [53]. Рассмотрим возможные механизмы реакций.

Перенос энергии от возбужденной молекулы пигмента к молекулам-акцепторам, подвергающимся фотохимическим превращениям. Длительность жизни возбужденного состояния на несколько порядков выше у триплетной молекулы, чем у синглетной. Переносу энергии благоприятствует длительный контакт между возбужденной молекулой — донором энергии (S^*, T) и молекулой — акцептором энергии (A), определяющийся образованием комплексов типа $S \cdot A$, $S^* \cdot A$ или TA. В случае хлорофилла и других пигментов в растворе известна возможность передачи энергии по механизму Вавилова — Перрена [54]: необходимое условие — молекула-акцептор должна иметь электронный уровень, расположенный ниже S^*. При сенсибилизированных хлорофиллом реакциях это условие не соблюдается, так как донор электрона (например, аскорбат) и широкий ряд изученных акцепторов обладают полосами поглощения в более коротковолновой области, чем электронный уровень хлорофилла, соответствующий красной полосе поглощения. Перенос энергии с коротковолнового электронного уровня хлорофилла S^*_1 (синяя полоса поглощения) до сих пор не наблюдали ввиду малой длительности жизни этого возбужденного состояния и эффективной внутримолекулярной деградации энергии до уровня S^* и S; недавно Марти и Рабинович [71] описали тушение флуоресценции хлорофилла каротином при возбуждении в синем максимуме поглощения хлорофилла; в условиях образования долгоживущих комплексов $S \cdot A$ иногда можно наблюдать подобные переходы. Однако в изученных нами случаях реакция возбуждается в «красном» максимуме хлорофилла и описанная возможность переноса энергии исключена.

Условием переноса энергии на триплетном уровне по механизму Теренина — Ермолаева [56] является более низкое расположение T-уровня молекулы-акцептора энергии. У партнеров сенсибилизированных реакций, которые могут быть акцепторами энергии, недостаточно изучены низшие триплетные уровни. У большинства этих соединений не удалось найти фосфоресценцию, лежащую в более длинноволновой области, чем фосфоресценция хлорофилла (около 850 *ммк*).

Тушение триплетного состояния в опытах с применением импульсной спектроскопии может быть результатом восприятия энергии молекулой-тушителем или химического взаимодействия триплетной молекулы с тушителем. Эффективное тушение триплетного состояния молекулами-окислителями (хинонами, нитросоединениями) следует приписать химической реакции, так как триплетные уровни этих молекул, вероятно, расположены выше, чем у хлорофилла. Есть основания полагать, что у полиенов и полициклических соединений триплетные уровни могут быть расположены достаточно низко, чтобы объяснить ингибирование реакций хлорофилла этими соединениями.

Элементарные реакции переноса электрона при фотосенсибилизации. Результатом взаимодействия возбужденной молекулы-сенсибилизатора с донором или акцептором электрона может быть элементарное фотовосстановление или фотоокисление; какие из этих процессов реализуются в сенсибилизированные реакции?

При фотовосстановлении хлорофилла и аналогов в пиридине происходит образование долгоживущих промежуточных продуктов, превращение которых можно наблюдать обычными спектральными методами. Это облегчает изучение механизма реакций в таких средах.

В нашей лаборатории было показано следующее: группа сенсибилизированных реакций переноса водорода от донора к акцептору наблюдалась с теми донорами электрона, которые способны к фотовосстановлению хлорофилла; введение в систему акцептора электрона (сафранин, рибофлавин, метиловый красный) блокирует фотовосстановление, наблюдаемое методом спектроскопии, измерением фотопотенциала и фотопроводимости; в «темновом» акте реакции удается наблюдать обратимое взаимодействие фотовосстановленных форм пигментов с акцепторами электрона.

Описанные опыты указывали на то, что сенсибилизация может быть связана с промежуточным обратимым фотовосстановлением пигмента-сенсибилизатора в изученных типах реакций, идущих преимущественно в основных средах.

Труднее изучить механизм реакций в тех средах, где не удается наблюдать образования долгоживущих промежуточных продуктов с выраженным спектром поглощения. Мы указывали на вероятность механизмов, связанных с фотовосстановлением пигмента в основных средах, и на фотоокисление в спиртовых средах [27]. Анализируя кинетику сенсибилизированного хлорофиллом восстановления метилового красного в спиртовом растворе, Ливингстон с сотр. [66] предположил, что в основе элементарного механизма реакции лежит перенос электрона в комплексе метиловый красный — хлорофилл с последующей реакцией образованного «комплекса переноса заряда» с донором водорода — фенилгидразином. Согласно этой схеме, метиловый красный воспринимает электрон возбужденной молекулы хлорофилла. В работе Ливингстона и Ке Чунь-линь [68] показано, что метиловый красный энергично тушит флуоресценцию хлорофилла наряду с сильными окислителями (хиноном, нитросоединениями и др.). Эти наблюдения свидетельствуют о возможности «окислительного» механизма сенсибилизации в данной системе. В других работах Ливингстон рассматривает «восстановительный» механизм, согласно которому первичной является фотореакция хлорофилла с фенилгидразином.

Систематическое изучение фотопотенциала на границе твердая пленка пигмента — раствор позволило Евстигнееву [13, 19] выяснить условия, благоприятствующие восприятию и отдаче электрона при освещении пленки.

Так, например, в этих опытах было показано, что кислород и метиловый красный в кислых средах наиболее отчетливо обусловливают появление положительного фотопотенциала пленки пигментов, т. е. играют роль акцепторов электрона; в отличие от этого, аскорбат и фенилгидразин способствуют появлению отрицательного фотопотенциала пленки.

При изучении фотосенсибилизированного феофитином восстановления метилового красного Евстигнеев с сотр. [13, 16, 17] нашли повышение эффективности сенсибилизации в нейтральной и кислой среде, возможно соответствующее элементарному фотовосстановлению и фотоокислению пигмента.

В опытах Чибисова и Карякина [57, 58] с применением импульсной спектроскопии удалось наблюдать первичную реакцию триплетной формы хлорофилла и образующихся первичных ион-радикалов пигмента с донорами и акцепторами электрона. Так, например, изучена реакция первичного ион-радикала хлорофилла с полиметиновыми красителями, играющими роль конечного акцептора электрона [57].

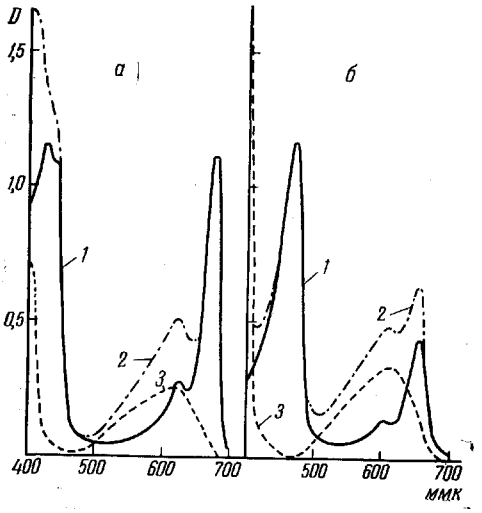


Рис. 6. Фотовосстановление метилвиологена в этаноле в присутствии цистеина ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*), сенсибилизированное хлорофиллом *а* (*а*) и хлорофиллом *b* (*б*)

1 — начальный спектр и спектр после обратной реакции с кислородом воздуха;
2 — после 15 мин. освещения красным светом;
3 — разность (*2—1*), соответствующая спектру восстановленного метилвиологена

В опытах Сили с сотр. [74, 75] применение кинетических методов привело к выводу о возможности первичного окисления или восстановления хлорофилла в процессе сенсибилизации.

Мы проводили сравнительное изучение аскорбата, цистеина и тиомочевины при сенсибилизированном хлорофиллом восстановлении метилвиологена [2]. Результаты представлены ниже.

Донор электрона	Этанол	Пиридин
Хлорофилл а		
Аскорбиновая кислота	7,1*	7,5
Тиомочевина	7,5	7,2
Цистеин	18,8	20,3
Хлорофилл b		
Аскорбиновая кислота	5,6	4,0
Тиомочевина	12,2	13,0
Цистеин	25,1	22,8
Феофитин а		
Аскорбиновая кислота	1,9	2,4
Тиомочевина	15,0	27,6
Цистеин	15,9	12,2

* Все цифры в % от начального количества метилвиологена.

В присутствии тиомочевины и цистеина сенсибилизированная реакция идет глубже, чем с аскорбиновой кислотой. На рис. 6 показана спектрофотометрическая запись опыта восстановления метилвиологена, сенсибилизированного хлорофиллами *а* и *b* в присутствии цистеина как донора электрона в этаноле.

Нам удалось наблюдать реакцию в водных растворах пигментов с детергентами, приготовленных путем прибавления 0,1 *мл* концентрированного раствора хлорофилла в пиридине к 5 *мл* 0,5%-ного раствора твина-80 [3]. Водный раствор хлорофилла *а* в присутствии цистеина ($2 \cdot 10^{-3}$*М*) как донора электрона восстанавливал 22% метилвиологена, а в случае хлорофилла *b* — 15%.

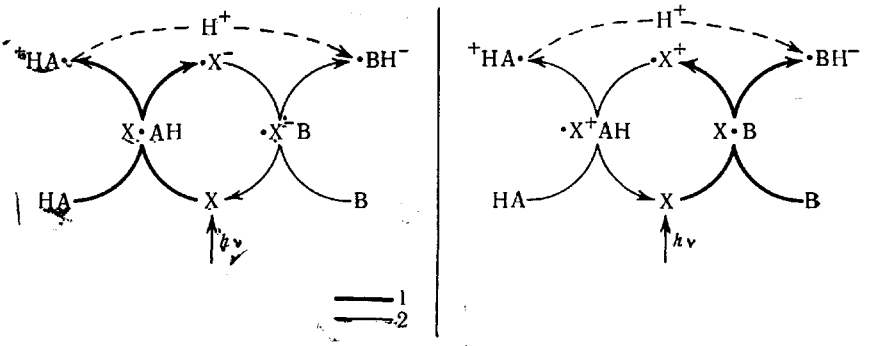


Рис. 7. Схема механизмов фотосенсибилизации

1 — световая стадия; *2* — темновая стадия; X — хлорофилл; AH — донор электрона; B — акцептор

Тот факт, что тиомочевина в описанных условиях не приводит к фотовосстановлению хлорофилла, указывает на большую вероятность первичной окислительно-восстановительной реакции возбужденной молекулы пигмента с метилвиологеном в процессе сенсибилизации; вторичным «темновым» процессом должна быть регенерация фотоокисленного пигмента тиомочевиной.

Следует предположить, что использование тиомочевины при сенсибилизированных реакциях, идущих в описанных условиях, может служить тестом на промежуточное фотоокисление возбужденной молекулы пигмента-сенсибилизатора в процессе реакции. В случае доноров электрона, способных к фотовосстановлению пигмента (аскорбиновая кислота, цистеин), следует ожидать конкуренции между реакциями возбужденного хлорофилла с донорами и акцепторами электрона, чем может определяться сложная зависимость глубины восстановления метилвиологена от концентрации донора.

Совокупность известного экспериментального материала указывает на возможность механизмов сенсибилизации, связанных с первичным фотовосстановлением или фотоокислением пигментов и вероятным промежуточным образованием комплекса возбужденной молекулы пигмента с донором или акцептором электрона. Эти возможности показаны на рис. 7. Оба механизма не исключают друг друга и могут работать одновременно с различной эффективностью [13, 14].

Исследования фотохимии хлорофилла, его аналогов и производных дали сведения, нужные для понимания природы элементарных процессов фотосинтеза. Основным представляется тот вывод, что возбужденный светом хлорофилл и его аналоги участвуют в процессах переноса электрона от молекул доноров к акцепторам путем обратимого восприятия или отдачи электрона. Можно предполагать, что таков путь включения разных форм хлорофилла в каждую из фотохимических стадий фотосинтетической цепи переноса электрона. Дальнейшие исследования должны показать природу элементарных фотопревращений отдельных форм хлорофилла и его аналогов непосредственно в живых фотосинтезирующих организмах.

В работающей цепи фотосинтетического переноса электрона акты восприятия и отдачи электрона быстро следуют один за другим, что затрудняет обнаружение измененных форм пигментов. Продукты фотохимического превращения хлорофилла могут накапливаться в измеримых количествах лишь при нарушении нормальной системы переноса электрона.

При рассмотрении природы первичного превращения хлорофилла следует указать на аналогию с работой цитохромов в цепи переноса электрона в митохондриях. В работающей циклической или открытой системе теряет значение вопрос о том, что первично — окисление или восстановление цитохрома. При спектроскопическом наблюдении накопление восстановленного или окисленного цитохрома зависит от метаболического режима — наличия субстратов — доноров электрона, степени аэрации. Равным образом наблю-

дение за накоплением измененных форм хлорофилла будет зависеть от условий эксперимента.

Работа цепи фотосинтетического переноса электрона не зависит от порядка чередования элементарных процессов. Согласно современным представлениям, в цепи переноса электрона при фотосинтезе существуют ветви, работающие в окислительной и восстановительной областях, которым соответствуют два типа фотореакций. В той и другой ветви переноса электрона можно искать оба типа элементарных реакций хлорофилла — обратимое восстановление и обратимое окисление.

Чтобы понять механизм работы пигментной системы в организмах, нужно знать состояние пигментов в хлоропластах и хроматофорах — молекулярную организацию пигментной системы.

РАЗНЫЕ ФОРМЫ ПИГМЕНТОВ В ОРГАНИЗМАХ [см. обзоры 26, 41]

Спектроскопическими наблюдениями уже давно установлено наличие в организмах полос поглощения хлорофилла и его аналогов, которые следовало приписать разным формам пигментов. Вассинк с сотр. [81] и Френч [61], измеряя спектры поглощения фотосинтезирующих бактерий, нашли максимумы поглощения бактериохлорофилла при 800, 850 и 890 *ммк*, которые приписаны разным формам пигмента.

В нашей лаборатории около 20 лет назад [25] было проведено измерение спектра поглощения молодого листа традесканции. Было установлено наличие двух форм хлорофилла — с максимумами при 670 и 680 *ммк*. При измерениях спектров поглощения красной водоросли филлофоры нашли структуру спектра поглощения с максимумами при 670, 680, 690 и 720 *ммк* [37].

Наша лаборатория изучала и состояние пигментов в процессе зеленения этиолированных листьев. Было обнаружено, что свежеобразованный хлорофилл находится в «мономерной» форме с максимумом поглощения при 670 *ммк*; дальнейшее накопление хлорофилла в процессе зеленения листьев ведет к агрегации с постепенным перемещением максимума до 678 *ммк* [36]. Мономерные формы, в отличие от агрегированных, быстро выцветают при сильном освещении.

Литвин и Рихирева [45] измеряли люминесценцию при — 196° в процессе зеленения этиолированных листьев. Отчетливо видно, что начальные — мономерные формы хлорофилла мало меняют люминесценцию при охлаждении, тогда как свечение агрегированных форм при 730 *ммк* резко усиливается по мере их накопления в листьях (рис. 8). Этот опыт также иллюстрирует постепенную агрегацию молекул пигмента по мере накопления хлорофилла в листьях.

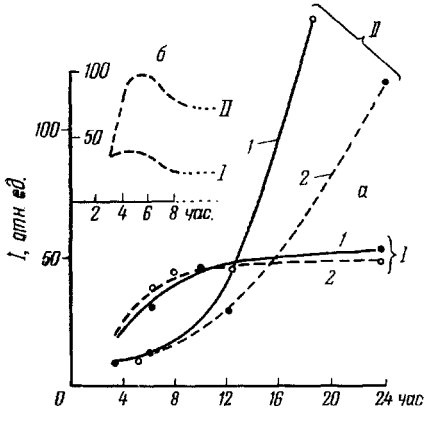


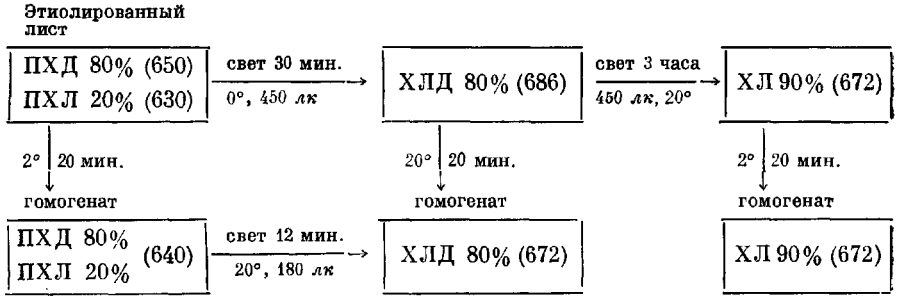
Рис. 8. Изменение интенсивности флуоресценции при — 196° в процессе зеленения этиолированных листьев фасоли (*1*) и их гомогенатов (*2*) (см. [45])

а — двенадцатидневные растения;
б — семидневные;
I — при 682 *ммк*;
II — при 730 *ммк*

Применяя низкотемпературную фиксацию и измерение люминесценции при температуре жидкого азота на начальных этапах зеленения этиолированных листьев [44], удалось обнаружить формы протохлорофилла с люминесценцией при 633 и 655 *ммк* и промежуточные формы хлорофилла с максимумами при 675, 694, 680 *ммк*. Эти данные согласуются с результатами измерений поглощения промежуточных форм, приведенных в работе Шибата [76].

Исследования ряда лабораторий [8, 69, 82] показали, что активная форма протохлорофилла представляет собой белковое соединение типа протохлорофиллида и первично образуется хлорофиллид. Путем сопоставления измерений спектров люминесценции пигментов в зеленеющих листьях и их разделения с помощью хроматографии на бумаге установлено, что «активная» форма протохлорофиллида и первичная «длинноволновая» форма хлорофилла представляют собой бесфитольные формы пигментов [29].

В спектрах поглощения и люминесценции листьев наряду с доминирующими формами хлорофилла обнаруживаются также и формы хлорофиллида, участие которого в фотосинтезе требует исследования. Превращение предшественников хлорофилла в листьях и гомогенатах показано на схеме [6]:



Хлорофилл-белковый комплекс. Выделение хлорофилл-белкового комплекса постоянного состава давно привлекает внимание исследователей. В работах Смита [50] из этиолированных листьев выделен «протохлорофилл-голохром», содержащий наряду с хлорофилл-белковым соединением также неактивные формы протохлорофиллида и протохлорофилла; молекулярный вес белка составляет около 3 млн. При освещении комплекс протохлорофиллид — белок переходит в хлорофилл-белковый комплекс.

Такашима [77] описал выделение кристаллического хлорофилл-белково-липоидного комплекса из смеси пиколин — диоксан — вода. Мы нашли [25], что из этой смеси кристаллизуется хлорофилл, не связанный с белком, обладающий «диоксановым» типом упаковки с максимумом поглощения при 690 *ммк*. Такая форма хлорофилла получается и при испарении в вакууме растворов хлорофилла в диоксане; электронографические исследования свидетельствуют о кристаллической структуре этой формы [1]. В опытах Такашима, по-видимому, происходило совместное осаждение кристаллов хлорофилла с белком хлоропластов. В работе Баннистера и Лове [70] продолжено изучение «диоксановой» формулы хлорофилла.

Недавно описан способ выделения водорастворимого хлорофилл-белкового комплекса из листьев лебеды [83]. В нашей лаборатории найдено, что листья этого растения содержат чрезвычайно активную хлорофиллазу и растирание листьев ведет к быстрому накоплению хлорофиллида [6]. Так, за сутки стояния листьев лебеды в гомогенате до 70% хлорофилла превращается в бесфитольную форму. Можно думать, что в работе [83] выделено не хлорофилл-белковое соединение, как полагают авторы, а хлорофиллид-белковый комплекс, возможно являющийся артефактом.

Методы, основанные на применении детергентов, по существу приводят к дезагрегации белков, а в ряде случаев — к нарушению связи с хлорофиллом. Наконец, мелкие частицы, полученные при звуковом диспергировании хлоропластов и скоростном центрифугировании, содержат все компонен-

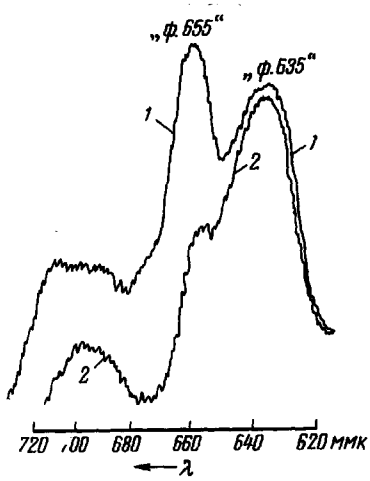


Рис. 9. Микрофотограмма спектров флуоресценции гомогената этиолированных листьев до (*1*) и после (*2*) центрифугирования в течение часа при 20 000 *g*, pH 8,5 (см. [29])

«ф. 635» и «ф. 655» — соответственно фракции протохлорофилла и протохлорофиллида

ты гранул: хлорофилл, каротиноиды, цитохромы, белки, липоиды и, конечно, не могут рассматриваться как индивидуальные хлорофилл-белковые соединения.

Фракционирование форм пигментов мы осуществляли с помощью центрифугирования при 20000 *g*. При этом разделялись сравнительно крупные структуры с мицеллярным весом в несколько миллионов. Однако и в этом случае удалось наблюдать спектральные различия пигментных фракций.

Особенно эффективно разделились в гомогенате этиолированных листьев активная форма протохлорофиллида (максимум флуоресценции при 655 *ммк*), связанная с тяжелыми частицами, и форма [29] протохлорофилла (635 *ммк*), содержащая также протохлорофиллид (рис. 9).

В гомогенатах листьев ряда растений при центрифугировании надосадочная жидкость обогащалась коротковолновой формой хлорофилла с характерным максимумом поглощения при 670—672 *ммк*; впоследствии мы нашли, что в этих препаратах много хлорофиллида и центрифугирование ведет к обогащению надосадочной жидкости «мономерными» формами хлорофилла и хлорофиллида [6].

Ерохин [20] разделил на акриламидном геле 890 и 850 формы бактериохлорофилла после обработки хроматофоров детергентом тритон *X*-100. Его результаты соответствуют данным Вернона [62], который разделил описанные формы бактериохлорофилла с помощью ультрацентрифуги.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ

Чтобы понять природу состояния пигментов в организмах, изучаются спектральные свойства пигментов, выделенных из организмов в различных модельных системах — растворах, коллоидах, твердых пленках, монослоях. Растворы хлорофилла и его аналогов в полярных органических растворителях содержат главным образом «мономерные» формы пигментов. Разбавление водой растворов пигментов (в спирте, ацетоне, пиридине, диоксане) и коагуляция (например, хлористым магнием) ведут к агрегации со сдвигом максимума поглощения в длинноволновую область спектра. Варьируя степень коагуляции и pH раствора, можно получить коллоиды — агрегаты с желаемым положением максимумов поглощения: в случае хлорофилла и бактериовиридина — от 660 до 760 *ммк* и для бактериохлорофилла — от 770 до 900 *ммк*.

В нашей лаборатории [15] и независимо в работах Ливингстона [67] было найдено, что в сухих неполярных органических растворителях, не содержащих полярных примесей, наблюдается частичная агрегация пигментов, вероятно образование димеров. Однако и в более концентрированных растворах пигмен-

тов в полярных растворителях удается наблюдать полосы поглощения в близкой инфракрасной области спектра, соответствующие агрегированным формам. Наиболее отчетливо это видно в случае бактериовиридина, вообще более склонного к агрегации, вероятно, потому, что в его молекуле карбоксил этерифицирован более «коротким» спиртом фарнезолом [63], вместо фитола у хлорофилла. Так, в эфирном или ацетоновом растворах бактериовиридина с концентрацией 10^{-4} M виден максимум поглощения при 730 *ммк*, увеличивающийся при охлаждении. Чтобы наблюдать эту форму у хлорофилла *а*, требуется гораздо большая концентрация пигмента.

Броди [60] обнаружил в замороженных растворах хлорофилла длинноволновую люминесценцию, соответствующую агрегированной форме пигмента.

При испарении в вакууме растворов хлорофилла и его аналогов образуются твердые пленки, в которых отмечены максимумы поглощения, смещенные в инфракрасную область, соответствующие разным видам упаковки. Так, в твердых пленках бактериохлорофилла мы наблюдали максимумы при 800 и 850—890 *ммк* [31], у бактериовиридина — при 740 *ммк*, соответствующие поглощению пигментов в живых бактериях [38]. Изучение монослоев хлорофилла позволило обнаружить упаковки с максимумами поглощения от 670 до 740 *ммк* [43]. Электронографическое исследование показало кристаллическую структуру форм хлорофилла с максимумами при 690 и 740 *ммк* [1].

Измерение люминесценции твердых пленок при — 196° позволило обнаружить ряд максимумов, соответствующих мономерным формам и разным типам агрегации [41, 46]. Соотношение между ними зависело от способа приготовления пленки и степени удаления растворителя. Целый ряд агрегированных форм хлорофилла *а* и сопровождающих пигментов получен в модельных системах — концентрированных растворах, монослоях и пленках пигментов [15].

Литвин и Гуляев [43] изучали люминесценцию и поглощение монослоев и тонких пленок хлорофилла и нашли максимумы, во многом аналогичные максимумам, наблюдаемым в твердых пленках, где ориентация молекул происходит «наугад». В твердых пленках удается установить те же максимумы поглощения и люминесценции, что и у пигментов в живых организмах. На рис. 10 и 11 показаны спектры люминесценции бактериохлорофилла [35] и бактериовиридина в твердых пленках и зеленых бактериях [34].

Температурная зависимость люминесценции объясняется условиями межмолекулярной дезактивации возбужденных молекул пигментов. В мономерных формах, где молекулы находятся на расстояниях, исключающих эффективное взаимодействие электронных облаков системы сопряженных связей, понижение температуры действует преимущественно на внутримолекулярные процессы дезактивации (слабое действие), при более плотных упаковках колебания и качания молекул ведут к межмолекулярной дезактивации за счет перекрывания электронных облаков порфиринового кольца, когда молекулы вступают в контакт при колебаниях. Понижение температуры, уменьшая колебания, ведет к изоляции молекул и, следовательно, к уменьшению межмолекулярной дезактивации и возгоранию люминесценции.

В нашей лаборатории систематически изучалось действие паров воды и других соединений на спектральные свойства твердых пленок хлорофилла и бактериохлорофилла [28]. Получены следующие результаты.

Хлорофилл. При испарении эфирных растворов обычно получается пленка с максимумом поглощения около 680 *ммк*. Под действием паров воды при комнатной температуре в течение 10—15 час. наблюдается «выпячивание» длинноволнового склона кривой поглощения; на дифференциальном спектре видно образование формы с максимумом поглощения около 715 *ммк* (рис. 12, *а*). В ряде опытов, нагревая пленку в парах воды при 50° в течение 30—45 мин., удалось наблюдать образование формы пигмента с максимумом поглощения около 740 *ммк* (рис. 12, *б*). Если открыть трубку и удалить воду, то нагревание пленки до 70° приводит к нарушению форм 740 и 715 *ммк* и возврату

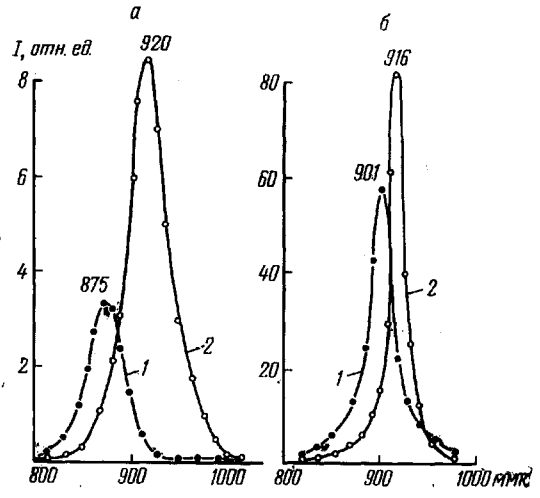


Рис. 10. Спектры флуоресценции бактериохлорофилла в твердой пленке (*а*) и в культуре *Rhodopseudomonas palustris* (*б*) при 20° (*1*) и при — 196° (*2*)

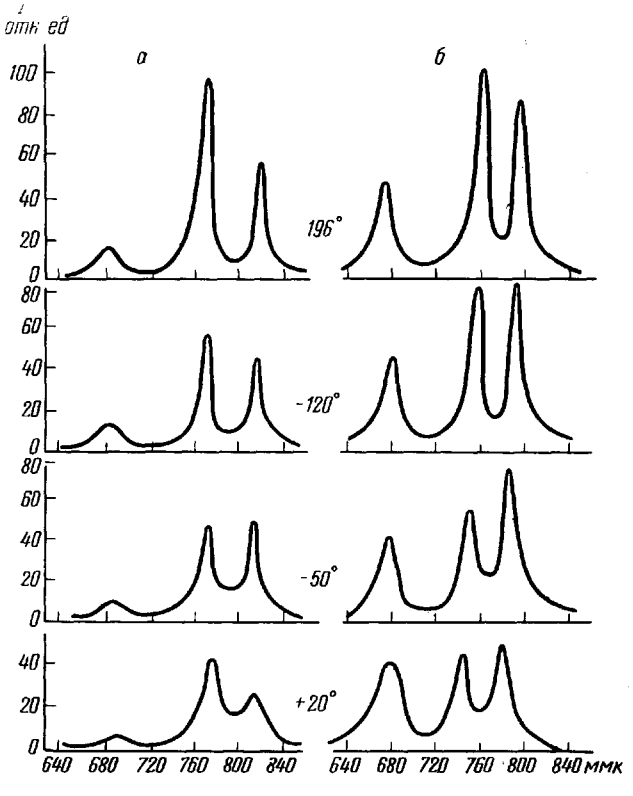


Рис. 11. Спектры люминесценции бактериохлорофилла в клетках зеленых серных бактерий (*а*) и в твердых пленках (*б*) при разных температурах

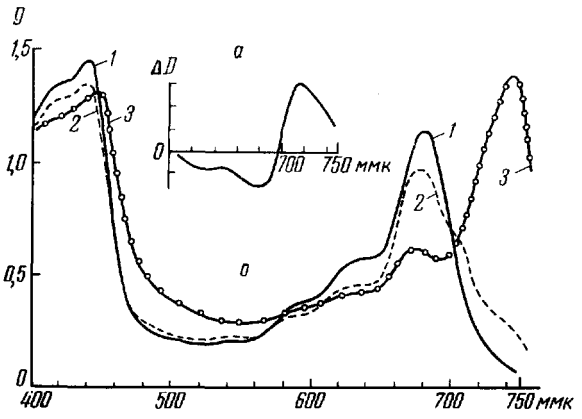


Рис. 12. Спектры поглощения пленки хлорофилла *а*

а — дифференциальный спектр пленки, обработанной парами воды в течение 15 час. при 20°, минус спектр исходной пленки; *б* — спектры поглощения пленки исходной (*1*) и после обработки парами воды при 50° в течение 15 мин. (*2*) и 1,5 час. (*3*

коротковолновой формы с поглощением около 675 *ммк*. В водных растворах аммиака (25%), ацетальдегида (14%) и формальдегида образование формы 740 *ммк* наступает скорее, чем в парах воды, и наблюдается уже при комнатной температуре.

В парах метилового спирта при комнатной температуре через несколько минут образуется форма с поглощением в области 710—715 *ммк*, через 30—60 мин. возникает форма, поглощающая при 740 *ммк*, которая доминирует в спектре (рис. 13). В парах этилового спирта также образуется форма 740 *ммк*.

В парах диоксана наблюдается образование «диоксановой» упаковки [1, 25] с максимумом поглощения при 690 *ммк*; обращает на себя внимание «острота» спектральной кривой (рис. 14).

В парах пиридина не видно образования длинноволновых форм. И наоборот, пары пиридина через 10—15 мин. устраняют длинноволновую «выпуклость» в спектре поглощения исходной пленки (695 *ммк*), смещая положение главного максимума до 676—674 *ммк*.

Хлорофилл *b* образует твердую пленку с максимумом поглощения при 658—660 *ммк*. В парах воды и других соединений длинноволновый сдвиг не превышает 3 *ммк*. По-видимому, это связано с прочностью образуемых в пленках агрегатов пигмента, в которых центральный атом магния одной молекулы сочленен координационными связями с альдегидной и карбонильной

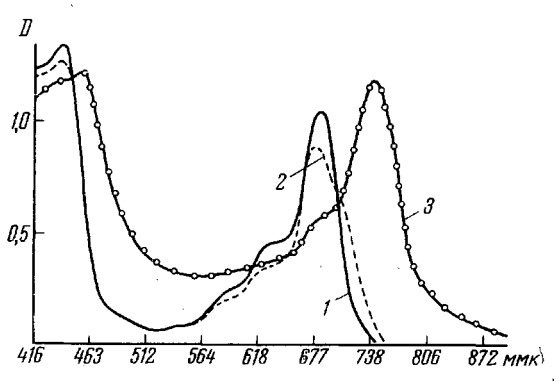


Рис. 13. Спектры поглощения пленки хлорофилла *а*

1 — исходный;

2 — после обработки парами метанола при 19° в течение 10 мин.;

3 — то же, что *2*, но в течение 55 мин.

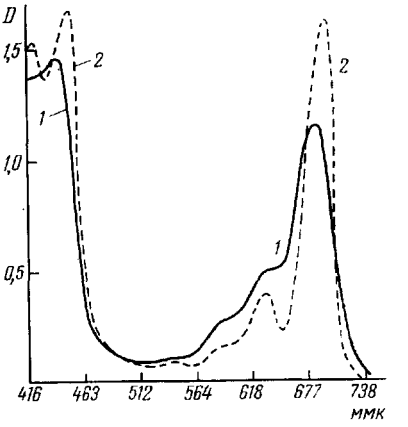


Рис. 14. Спектры поглощения пленки хлорофилла *а*

1 — исходный;

2 — после обработки парами диоксана при 18° в течение 10 мин.

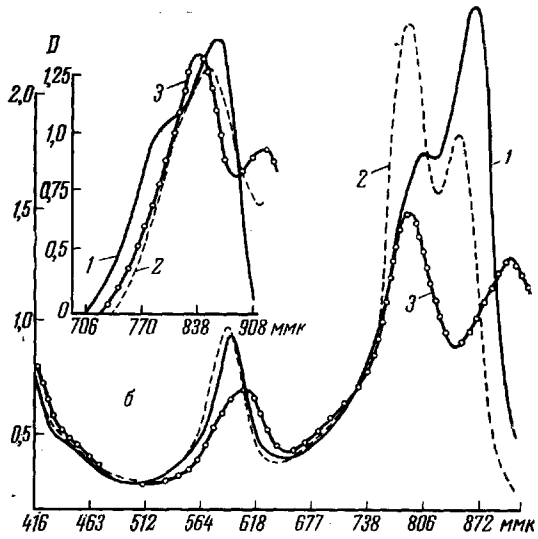


Рис. 15. Спектры поглощения пленки бактериохлорофилла

а: *1* — исходный; *2* — после обработки парами воды и серного эфира при 45° в течение 15 мин.; *3* — при 50° в течение 45 мин.; *б*: *1* — исходный; *2* — после обработки парами серного эфира при 20° в течение 30 мин.; *3* — с последующей обработкой парами метанола в течение 45 мин.

группировками других молекул [64]. Таким образом, в случае хлорофилла *b* координационные вакансии центрального атома магния насыщаются путем сочленения с другими молекулами пигмента, образуя достаточно прочные связи. Это явление не наблюдается у хлорофилла *a*, который не обладает альдегидной группировкой.

Бактериохлорофилл образует твердую пленку с максимумами поглощения при 800 и 860 *ммк* [31]. Выдерживание в парах воды приводит к сдвигу до 875 *ммк*. Однако при использовании воды, насыщенной серным эфиром, за 30—40 мин. при 50° удается наблюдать длинноволновую форму с максимумом поглощения около 910 *ммк* (рис. 15, *а*). Образование формы 900—920 *ммк* наблюдается в парах ацетальдегида и метилового спирта, но лишь в присутствии серного эфира (рис. 15, *б*). По-видимому, молекулы эфира сольватируют и расшатывают гидрофобную структуру пленки, делая ее доступной для проникновения паров воды. Таким образом, в модельных системах удается наблюдать наиболее длинноволновые формы бактериохлорофилла, существующие в живых фотосинтезирующих бактериях.

Пока не ясно, связаны ли наблюдаемые эффекты с присоединением «кристаллизационной» воды к молекуле пигмента [40], или происходит более полная сольватация с участием других полярных группировок молекул хлорофилла *a* и бактериохлорофилла.

Изученные полярные соединения, способные к координационному взаимодействию с центральным атомом магния, могут образовывать «мостики» между молекулами пигмента, приводя к возникновению «длинноволновых» агрегированных форм, обладающих более упорядоченной структурой.

Совокупность описанных данных свидетельствует о включении молекул воды или других низкомолекулярных полярных соединений в длинноволновые агрегированные структуры хлорофилла и бактериохлорофилла.

Изучение фрагментов цепи фотосинтетического переноса электрона указывает на то, что фотохимические стадии заключаются в переносе электрона (водорода) от донора к акцептору: этот перенос фотосенсибилизируется разными формами пигментов. В качестве доноров и акцепторов используются компоненты биохимических систем цепи фотосинтетического переноса элект-

рона. Следует полагать, что обратимое фотохимическое взаимодействие хлорофилла и его аналогов с донорами и акцепторами электрона определяет течение этих фотохимических стадий.

Хотя до сих пор не ясна пространственная молекулярная организация цепи фотосинтетического переноса электрона в хлоропластах и хроматофорах, трудно сомневаться в том, что бóльшая часть хлорофилла и его аналогов находится в агрегированных формах, обладающих разными типами упаковки, что особенно отчетливо видно на примере пигментов фотосинтезирующих бактерий.

Типы молекулярных упаковок, т. е. взаимодействия между молекулами пигментов в агрегированных формах, в значительной мере определяются структурой и свойствами молекул хлорофилла и его аналогов. В твердых пленках и концентрированных растворах пигментов обнаруживаются типы пигментных упаковок, обладающих теми же спектральными характеристиками, что и пигменты в организмах. Способы участия мономерных и агрегированных форм пигментов в реакциях фотосинтеза требуют дальнейшего углубленного исследования.

ВЫВОДЫ

Излагаются результаты изучения световых превращений хлорофилла и молекулярной организации пигментной системы организмов. Исследованы пигменты растений и бактерий в модельных системах и в живых клетках. Возбужденные (синглетные и триплетные) молекулы хлорофилла и его аналогов способны воспринимать электрон от молекулы донора (обратимое фотовосстановление) или отдавать электрон молекуле акцептора (обратимое фотоокисление). Промежуточные фотовосстановленные формы пигментов реагируют в темновом акте реакции с акцепторами электрона, при этом происходит регенерация исходного пигмента; фотоокисленные формы обратимо реагируют с донорами электрона. При фотореакции образуются свободные радикалы и более устойчивые вторичные соединения. В тройной системе донор электрона — пигмент — акцептор наблюдается фотосенсибилизированный перенос электрона от донора к акцептору. В растворах хлорофилла удается моделировать вторую фотосистему: перенос электрона от аскорбата или цистеина к НАД или метилвиологену. Элементарный механизм этих реакций основан на первичном фотовосстановлении или фотоокислении пигмента-сенсибилизатора, сопровождающемся «темновой» стадией взаимодействия фотопродуктов с донорами или акцепторами электрона. Чтобы выяснить природу первичных реакций в организмах, с помощью спектральных методов изучали состояние пигментов в процессе биосинтетического накопления в различных организмах и в модельных системах. При зеленении этиолированных листьев наблюдается смена мономерных и агрегированных форм пигментов. В твердых пленках удается моделировать спектры поглощения и флуоресценции пигментов в живых организмах. Типы молекулярных упаковок агрегированных пигментных форм диктуются химической структурой пигмента и наличием низкомолекулярных включений (вода и др.). Разные формы пигментов в хлоропластах и хроматофорах связаны с разными белково-липоидными структурами, которые удалось фракционировать на акриламидном геле и путем центрифугирования. Наблюдения пигментных превращений непосредственно в живых клетках осложнены изменениями флуоресценции и светорассеяния. Природа световых превращений пигментов в цепи фотосинтетического переноса электрона нуждается в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белавцева Е. В., Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Биофизика, 1959, **4**, 521.
2. *Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967, **174**, 22, 221.
3. *Брин Г. П., Красновский А. А.* Биохимия, 1957, **22**, 776.
4. *Брин Г. П., Красновский А. А.* Биохимия, 1959, **24**, 1085.
5. *Бубнов Н. Н., Красновский А. А., Умрихина А. В., Цепалов В. В., Шляпинтох В. Я.* Биофизика, 1960, 5, 191.
6. *Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Биохимия, 1963, **28**, 524.
7. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Биохимия, 1956, **21**, 126; 1958, **23**, 760.
8. *Годнев Т. Н., Шлык А. А., Ляхнович Я. П.* Физиол. раст., 1967, **4**, 393.
9. *Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф.* Биофизика, 1967.
10. *Гуринович Г. П.* В сб. «Биохимия, биофизика фотосинтеза». М., «Наука», 1965.
11. *Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Биохимия, 1965, 30, 605.
12. *Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Молекулярная биология, 1967, **1**, 395.
13. *Евстигнеев В. Б.* Биофизика, 1963, 8, 664.
14. *Евстигнеев В. Б.* Сб. Элементарные фотопроцессы в молекулах. М., «Наука», 1966.
15. *Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1949, **66**, 1133; 1950, **70**, 261.
16. *Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А.* Докл. АН СССР, 1965, **165**, 1435.
17. *Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Савкина И. Г.* Докл. АН СССР, 1963 **151**, 227.
18. *Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А.* Биофизика, 1959, **4**, 641; 1960, 5, 599.
19. *Евстигнеев В. Б., Теренин А. Н.* Докл. АН СССР, 1951, **81**, 223.
20. *Ерохин Ю. Е., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967.
21. *Качан А. А., Даин Б. Я.* Докл. АН СССР, 1951, **80**, 619.
22. *Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1947, **58**, 617; 1947, **58**, 835; 1948, **60**, 421; 1955, **103**, 283.
23. *Красновский А. А.* Журн. физ. химии, 1956, **30**, 968.

23а. *Красновский А. А.* В сб. «Элементарные фотопроцесы в молекулах». М., «Наука», 1966.

24. *Красновский А. А.* Успехи химии, 1960, **29**, 736.
25. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1948, **63**, 163; 1949, **67**, 325; 1954, **95**, 611; 1963, **153**; 212; 1964, **159**, 225; 1965, **163**, 761.
26. *Красновский А. А., Брин Г. П.* В сб. «Биохимия и биофизика фотосинтеза». М., «Наука», 1965.
27. *Красновский А. А., Брин Г. П., Войновская К. К.* Докл. АН СССР, 1949, 53, 393.
28. *Красновский А. А., Быстрова М. И.* Докл. АН СССР, 1967, **174**, 480.
29. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Сорокина А. Д.* Докл. АН СССР, 1960, **136**, 1227.
30. *Красновский А. А., Войновская К. К.* Докл. АН СССР, 1951, **81**, 879.
31. *Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М.* Докл. АН СССР, 1952, **85**, 389.
32. *Красновский А. А., Дроздова Н. Н.* Докл. АН СССР, 1963, 150, 1378; 1963, **153**, 721; 1964, **158**, 730.
33. *Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Сапожникова И. М.* Докл. АН СССР, 1967, 177, 1225.
34. *Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Гуляев Б. А.* Докл. АН СССР, 1963, **152**, 1231.
35. *Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй-цюнь.* Докл. АН СССР, 1962, **143**, 456.
36. *Красновский А. А., Кособуцкая Л. М.* Докл. АН СССР, 1952, **85**, 177; 1953, **91**, **343**.
37. *Красновский А. А., Нестеровская Е. А., Гольденберг А. Б.* Биофизика, 1956, **1**, 328.
38. *Красновский А. А., Пакшина Е. В.* Докл. АН СССР, 1959, **127**, 913; 1963, **148**, 935.
39. *Красновский А. А., Умрихина А. В.* Биофизика, 1958, **3**, 547.
40. *Кутюрин В. М., Князев В. П.* Докл. АН СССР, 1963, **149**, 456.
41. *Литвин Ф. Ф.* В сб. «Биофизика, биохимия фотосинтеза». М., 1965.
42. *Литвин Ф. Ф., Владимиров Ю. А., Красновский А. А.* Успехи физ. наук, 1960, **71**, 149.

43. *Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А.* Докл. АН СССР, 1964, **158**, 461.
44. *Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1957, **117**, 106.
45. *Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Г. Т.* Докл. АН СССР, **135**, 1528.
46. *Литвин Ф. Ф., Рихирева Г. Т., Красновский А. А.* Биофизика, 1962, **7**, 578.
47. *Пакшина Е. В., Красновский А. А.* Биохимия, 1964, **29**, 1132.
48. *Пакшина Е. В., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Молек. биол., 1967, **1**, 154.
49. *Рихирева Г. Т., Грибова З. П., Каюшин Л. П., Умрихина А. В., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1964, **159**, 196; 1965, **163**, 491.
50. *Смит Дж.* В сб. «Структура и функция фотосинтетического аппарата». М., 1962.
51. *Сидоров А. Н.* Успехи химии, 1966, **35**, 366.
52. *Теренин А. Н.* Журн. физ. химии, 1944, **18**, 1.
53. *Теренин А. Н.* Фотохимия красителей. М., 1947.
54. *Теренин А. Н.* Успехи физ. наук, 1951, **43**, 347.
55. *Теренин А. Н., Ермолаев В. Л.* Докл. АН СССР, 1952, **85**, 547.
56. *Умрихина А. В., Юсупова Г. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, **175**, 1967.
57. *Чибисов А. К.* Докл. АН СССР, 1965, **161**, 1417.
58. *Чибисов А. К., Карякин А. В., Зубрилина М. Е.* Докл. АН СССР, 1965, **161**, 483.
59. *Чибисов А. К., Карякин А. В., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967, **175**, 273.
60. *Brody S. S.* Science, **128**, 838, 1958.
61. *French C. S.* J. Gen. Physiol., **23**, 483, 1940.
62. *Garsia A., Vernon L., Mollenhawer H.* Biochemistry, 5, 2399, 1966.
63. *Holt A. S., Morley H. W.* J. Amer. Chem. Soc., 82, 500, 1960.
64. *Katz J. J., Closs G. L. et al.* J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3801, 1963.
65. *Linschitz H., Rennert J.* Nature, **169**, 193, 1952.
66. *Livingston R., Pariser R.* J. Amer. Chem. Soc., **71**, 1510, 1948.
67. *Livingston R. et al.* J. Amer. Chem. Soc., **71**, 1542, 1949.
68. *Livingston R., Ke Chun-lin.* J. Amer. Chem. Soc., **72**, 909, 1950.
69. *Loeffler J. K.* Carnegie Inst. Wash. Year Book **54**, 159, 1954—1955.
70. *Love B. B., Bannister T. T.* Biophys. J., 3, 99, 1963.
71. *Murty N. K., Rabinowitch E.* J. Chem. Phys., **41**, 602, 1964.
72. *Rabinowitch E., Weiss J.* Proc. Roy. Soc., **162**, 251, 1937.
73. *Seely G.* Photochemistry and Photobiology, **3**, 195, 1964.
74. *Seely G. R.* J. Phys. Chem., **69**, 1965, 1965.
75. *Seely G. R.* The chlorophylls. N. Y., 1966, p. 523.
76. *Shibata K.* J. Biochem. (Japan), **44**, 147, 1957.
77. *Takashima S.* Nature, **169**, 182, 1952.
78. *Terenin A. N.* [*Теренин А. Н.*]. Acta Phys. Chim. URSS, 1943, **18**, 210.
79. *Tollin G., Green G.* Biochim. et biophys. acta, **60**, 524, 1962.
80. *Vernon L. P.* Acta chem. scand., **15**, 1651, 1961.
81. *Wassink E. C., Katz E., Dorrenstein R.* Enzymologia, 7, 113, 1939.
82. *Wolf J. B., Price L.* Plant Physiol., 1956, **31**, 30.
83. *Yakushiji E., Uchino K., Sigimura Y., Schrateri J., Takamiya F.* Biochim. et biophys. acta, 75, 293, 1963.

ФОТОХИМИЯ

А. А. Красновский, Г. П. Брин

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ОКИСЛИТЕЛЕЙ

Ныне достоверно установлено [1], что кислород, выделяющийся при фотосинтезе растений, принадлежит молекулам воды. Таким образом, при фотосинтезе происходит фотосенсибилизированное хлорофиллом фотоокисление молекул воды, кислород которой выделяется в молекулярной форме, а водород (электрон) используется в цепи реакций, ведущих в конечном счете к восстановлению углекислоты. Изолированные хлоропласты и гомогенаты зеленых листьев растений способны к более простой реакции — фотохимическому выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением вводимых извне акцепторов электрона — соединений окисного железа, хинонов и других окислителей (реакция Хилла). Однако такая более простая реакция включает фотохимические и энзиматические стадии.

В растворах хлорофилла и других красителей до сих пор не удалось наблюдать фотоокисления воды. Изучение фотохимического окисления воды в простых системах представляет интерес в связи с моделированием отдельных реакций фотосинтеза.

Как известно, «прямой» фотолиз воды происходит лишь под действием короткого ультрафиолета (например, [2]). Выделение кислорода под действием более длинноволнового ультрафиолетового излучения удалось наблюдать в водных растворах ряда окислителей. В работах Франка и Шейбе [3] ультрафиолетовые полосы поглощения неорганических ионов в водных растворах интерпретировались как «спектры электронного переноса» между ионом и молекулами воды его гидратной оболочки. Эти представления были развиты в работе Фаркасов [4]. Фотохимические реакции в растворах электролитов рассмотрены в обзоре Даина [5]. В согласии с этими представлениями Вейсс [6] наблюдал выделение водорода при освещении УФ светом водных растворов двух-

валентного железа за счет элементарного восстановления молекулы воды.

При поглощении света катионами трехвалентного железа следовало ожидать «скрытого» процесса переноса электрона от молекулы воды гидратной оболочки к трехвалентному железу (элементарное окисление воды) с вероятным образованием гидроксильных радикалов. Действительно, Вейсс и Порре [7] наблюдали выделение кислорода при облучении растворов солей четырехвалентного церия ультрафиолетовым светом. Даин и Качан [8] обнаружили выделение кислорода при освещении водного раствора перхлората железа; они показали, что поверхность кварца способствует выделению кислорода в этой реакции.

Объясняя фотохимические реакции комплексных солей ферри- и ферроцианидов, Аспергер [9] указал на то, что экспериментальные данные соответствуют представлению о фотохимическом замещении CN^- в координационной сфере молекулой во далее возможен электронный перенос между координированными аддендами и центральным атомом железа с его элементарным фотоокислением.

Бальзани и Карасити [10, 11] нашли, что освещение водных растворов комплексных солей октацианидов вольфрама и молибдена линиями ртути 365 и 404 нм ведет к выделению кислорода с высоким квантовым выходом.

Более пятидесяти лет тому назад Мэтью и Деви [12] наблюдали выделение кислорода при освещении раствора перманганата калия; Райдил и Норриш [13] показали, что полоса поглощения перманганата калия при 313 нм ответственна за фоторазложение и что два кванта света используются в реакции. Циммерман [14], применяя тяжелый изотоп кислорода O^{18}, нашел, что выделяющийся кислород происходит из иона MnO_4, а не из молекулы воды, и фотохимический акт заключается во внутримолекулярном переносе электрона от кислорода к иону марганца. Качан и Шерстобоева [15] установили, что твердая поверхность ускоряет темновое и фотохимическое выделение кислорода в растворах перманганата калия.

Мы нашли, что многие из описанных реакций выделения кислорода могут быть сенсибилизированы к более длинноволновой области спектра при использовании в качестве фотокатализаторов электронных полупроводников: окиси цинка, двуокиси титана и вольфрамовой кислоты [16—18].

В этой статье дана сводка наших работ по изучению фотокаталитического действия окиси цинка, двуокиси титана и вольфрамовой кислоты на выделение кислорода в водных растворах окислителей. Нами также были измерены квантовые выходы и стехиометрия реакций.

Выделение и поглощение газа измеряли микроманометрическим методом Варбурга в стеклянных и кварцевых сосудах. При исполь-

зовании стеклянных сосудов фотоактивными являлись линии ртути 365 и 404 нм, а при применении кварцевых — также линии 265 и 313 нм. Ряд опытов проводили в кварцевых сосудах, вставленных в стеклянную чашку Петри, игравшую роль светофильтра, поглощающего короткую область ультрафиолетового излучения ртутнокварцевой лампы. Сосуды освещались со стороны дна лампой ПРК-4 в кварцевой муфте [17], погруженной в водяную ванну (20° С) прибора. Наибольшая интенсивность света лампы в области 250÷500 нм на уровне дна сосуда составляла $6 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. Интенсивность света варьировали с помощью калиброванных проволочных сеток.

Опыты проводили в атмосфере воздуха и азота. В последнем случае сосуды с реакционной смесью продували азотом, очищенным от следов кислорода в колонках со щелочным гидросульфитом.

Квантовый выход реакции определяли с помощью железооксалатного актинометра [19, 20], обладающего постоянной величиной квантового выхода в области 250÷500 нм. Раствор для актинометрии помещали в те же реакционные сосуды, в которых наблюдали изменение парциального давления кислорода в различных вариантах опытов.

В работе использовали разные образцы фотосенсибилизаторов — электронных полупроводников: окись цинка, цинковые белила муфельные, окись цинка люминофорная, двуокись титана и титановые белила со структурой анатаза, вольфрамовая кислота. Препараты соединений железа и перманганат калия — реактивные, х. ч.; *n*-бензохинон возгонялся непосредственно перед опытом.

Известно, что указанные фотокатализаторы обладают поглощением в близкой ультрафиолетовой части спектра. У окислов белого цвета — окиси цинка и двуокиси титана — длинноволновая граница поглощения лежит около 400 нм, а у желтой вольфрамовой кислоты — около 500 нм. В исследованной реакции окислители также поглощают в этой области спектра, поэтому во всех случаях сопоставлялась прямая фотохимическая реакция окислителя без сенсибилизатора и в его присутствии.

Чтобы судить о том, что выделяющийся газ действительно является кислородом, опыты проводили в атмосфере азота с раствором щелочного пирогаллола в боковом отводе манометрического сосуда. Если в присутствии щелочного пирогаллола выделяющийся газ поглощается, давление в сосуде не изменяется. Возможность выделения углекислого газа контролировали, помещая раствор NaOH в боковой отвод сосуда.

За ходом реакции можно было судить по скорости выделения кислорода (на прямолинейном участке кривой), а в опытах с соединениями трехвалентного железа — по количеству образовавшегося двухвалентного железа и ионов водорода.

В дальнейшем изложении термин «фотокатализатор» и «сенсибилизатор» употребляются как синонимы.

I. Фотохимия водных растворов окислителей

Соединения железа. При освещении растворов соединений трехвалентного железа (железоаммиачные квасцы) в стекле выделения кислорода не наблюдалось. Небольшое выделение газа было отмечено в кварце, что согласуется с данными Даина и Качана [8]. Присутствие кислорода воздуха не оказывает заметного действия на эту реакцию.

Освещение кислых (в 0.2 N HCl) растворов закисного железа (железо сернокислое) не приводит к выделению газа в стекле (табл. 1), тогда как в кварце наблюдается интенсивное выделение газа (водорода); в согласии с работами Вейсса [6], кислород воздуха подавляет этот процесс.

Таблица 1

Действие УФ света на растворы соединений железа
(Выделение газа в микролитрах за 30 мин., N_2 — в атмосфере азота, O_2 — на воздухе)

Условия опыта	Железоаммиачные квасцы (Fe^{+++}) 0.1 М		Железо сернокислое (Fe^{++}) 0.3 М	
	кварц	стекло	кварц	стекло
N_2	+20	0	+263	+10
O_2	0	0	+ 33	0

Примечание. Во всех таблицах выделение газа отмечено (+), поглощение — (—).

В водных растворах феррицианида при освещении ультрафиолетовым светом в присутствии азота не наблюдалось выделения газа ни в кварце, ни в стекле (табл. 2). В присутствии воздуха кислород поглощался с большой скоростью как в стекле, так и в кварце.

Таблица 2

Действие УФ света на растворы ферро- и феррицианидов в воде
(N_2 — в азоте, O_2 — на воздухе; в микролитрах за 30 мин.)

Условия опыта	Феррицианид, 0.01 М		Ферроцианид, 0.1 М	
	кварц	стекло	кварц	стекло
N_2	0	0	+ 5	0
O_2	—645	—250	—380	—50

В растворах ферроцианида в азоте выделения газа не наблюдалось, тогда как в присутствии воздуха в стекле происходило небольшое поглощение кислорода, в кварце — очень интенсивное.

На рис. 1 показаны изменения спектров поглощения водных растворов ферро- и феррицианидов до и после освещения УФ светом. Освещение в стеклянных сосудах мало изменяет спектр поглощения феррицианида и совсем не изменяет поглощения

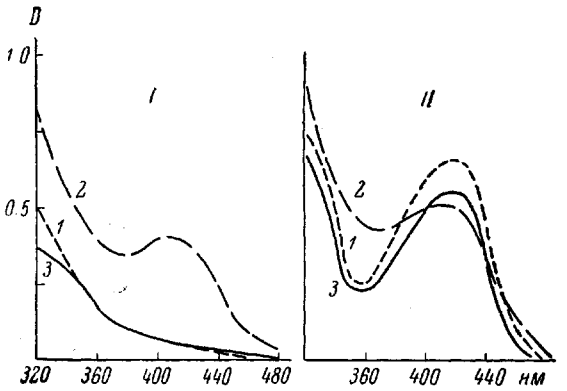


Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов (10^{-3} М) ферроцианида (*I*) и ($0.6 \cdot 10^{-3}$ М) феррицианида (*II*).

1 — до освещения, *2* — после освещения в кварце, *3* — после освещения в стекле.

ферроцианида, тогда как в кварцевых сосудах происходит значительное изменение их спектров поглощения. В растворе ферроцианида наблюдается появление максимума около 410 нм, характерного для окисленной формы. В растворе феррицианида этот максимум понижается, что указывает на частичное восстановление.

Поглощение кислорода при освещении растворов ферро- и феррицианидов в согласии с работой Аспергера [9] можно приписать следующей системе реакций.

1. Акт поглощения кванта света в комплексе $Fe^{+3}(CN)_6$ заключается в переносе электрона от адденда CN^- к центральному атому железа. При этом образуется Fe^{+2} и радикал CN, который может окисляться кислородом

$$Fe^{+3}(CN)_6 \xrightarrow{h\nu} Fe^{+2}(CN)_5 + CN \qquad CN + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow CNO.$$

2. В координационный комплекс двухвалентного железа входит молекула воды и происходит окисление комплекса кислородом, вероятно также активируемое светом,

$$Fe^{+2}(CN)_5 \cdot H_2O + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow Fe^{+3}(CN)_5 \cdot H_2O + \frac{1}{2}O_2^{=}.$$

3. В комплексе $Fe^{+3}(CN)_5 \cdot H_2O$ при поглощении кванта света происходит перенос электрона с последующим включением в комплекс второй молекулы воды,

$$Fe^{+3}(CN)_5 \cdot H_2O \xrightarrow{h\nu} \rightarrow Fe^{+2}(CN)_4 \cdot H_2O + CN.$$

По тому же механизму комплекс входят последующ молекулы с конечным образованием $Fe(OH)_3$ за счет подщелачивания среды при окислении Fe^{+2} и последовательного выхода CN^- из комплекса.

Таблица 3

Действие УФ света на водные растворы перманганата калия (0.03 М)

(Выделение газа в микролитрах за 21 мин.)

Условия опыта	Кварц	Стекло
O_2	+150	+30

П е р м а н г а н а т к а л и я. При освещении ультрафиолетовым светом водных растворов перманганата калия в стекле выделяется небольшое количество кислорода (табл. 3). В кварцевых сосудах это происходит со значительной скоростью, что согласуется с данными Циммермана [14], который нашел, что максимальный квантовый выход выделения кислорода наблюдается при 313 нм.

II. Фотосенсибилизация водных растворов окислителей

Ф о т о к а т а л и з а т о р — о к и с ь ц и н к а. Эти опыты были возможны лишь с феррицианидом, так как кислые водные растворы железоаммиачных квасцов реагируют с окисью цинка. Были исследованы разные образцы окиси цинка; х. ч. препарат Мерка оказался наиболее активным. Увеличение количества окиси цинка (от 0.005 до 0.5 г в 6 мл воды) ведет к увеличению скорости реакции. В условиях наших опытов оптимум реакции лежит при концентрации 0.01 М феррицианида.

На рис. 2 показана скорость выделения кислорода при освещении УФ светом растворов феррицианида в воде. Выделение газа измеряли в растворе феррицианида без окиси цинка. с окисью цинка и в присутствии щелочного пирогаллола в боковом отводе сосуда для поглощения кислорода (табл. 4).

Опыты показали, что в стекле и кварце под действием света, поглощенного окисью цинка, выделяется газ, который погло-

Таблица 4

Выделение кислорода из растворов феррицианида калия (0.01 М), сенсибилизированное окисью цинка
(0.3 г в 6 мл воды, в микролитрах за 30 мин.)

Условия опыта	Кварц	Стекло
N_2	+91	+90
O_2	+70	+89
N_2 + щелочной пирогаллол	— 8	0

щается пирогаллолом, но не поглощается щелочью. Таким образом выделяется кислород. Одновременно наблюдалось падение

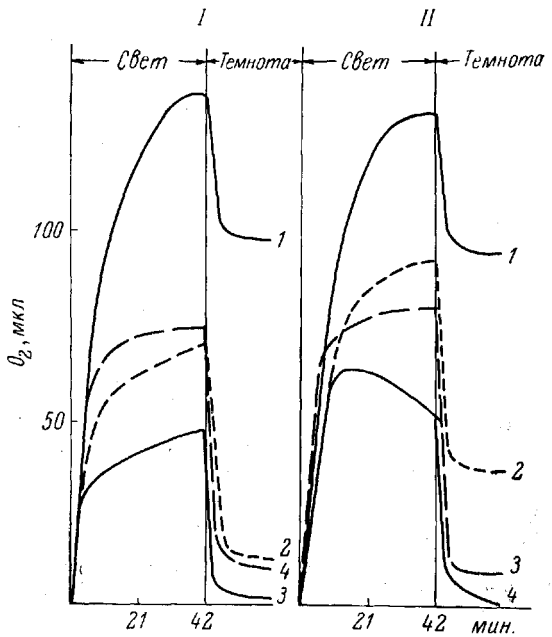


Рис. 2. Фотосенсибилизированные окисью цинка и двуокисью титана реакции выделения кислорода в водных растворах феррицианида.

I — в стекле, *II* — в кварце. *1* — окись цинка и феррицианид, *2* — двуокись титана и феррицианид, *3* — феррицианид, *4* — окись цинка и феррицианид; в боковом отводе сосуда щелочной пирогаллол.

максимума поглощения при 420 нм, характерного для феррицианида (рис. 3), что свидетельствует о его восстановлении.

Таблица 5

Выделение газа из растворов феррицианида и железоаммиачных квасцов, сенсибилизированное двуокисью титана
(0.3 г в 6 мл, в микролитрах за 30 мин.)

Условия опыта	Феррицианид, 0.01 М		Железоаммиачные квасцы, 0.1 М	
	кварц	стекло	кварц	стекло
N_2	+32	+ 12	+50	+37
O_2	—82	—165	+53	+37
N_2 + щелочной пирогаллол .	0	0	—10	0

Чтобы проверить наличие измеряемого манометрически нестехиометрического кислорода в окиси цинка, был поставлен следующий опыт: суспензию окиси цинка в воде помещали в сосуд, в боковом отводе которого была 10%-я серная кислота. После термостатирования кислоту приливали и следили за газообменом: в течение часа выделение газа отмечено не было.

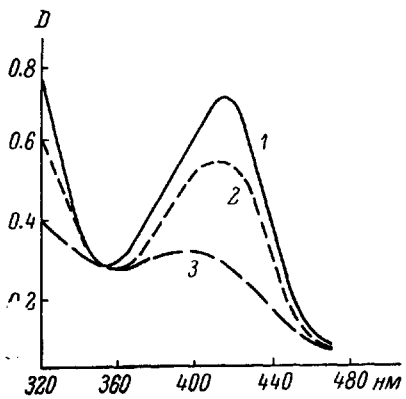


Рис. 3. Фотосенсибилизированное окисью цинка восстановление водного раствора ($0.6 \cdot 10^{-3}$ М) феррицианида в вакууме.

1 — спектр исходного раствора, *2* — после освещения в стекле, *3* — после освещения в кварце.

Фотокатализатор — двуокись титана. В этом случае можно было применять оба исследованных соединения железа, так как двуокись титана устойчива в кислых и основных средах. В опытах с феррицианидом, в отличие от окиси цинка, двуокись титана не приводила к выделению газа в стекле, в кварце наблюдалось весьма слабое выделение кислорода (табл. 5).

В случае железоаммиачных квасцов наблюдалось отчетливое фотокаталитическое действие двуокиси титана как в стекле, так и в кварце (рис. 4). В опытах с применением щелочного пирогаллола было показано, что выделяющийся газ — кислород.

В отличие от этой реакции введение двуокиси титана в раствор сернокислого железа в 0.2 М HCl не только не сенсибилизирует выделение водорода (в стекле и кварце), но тормозит эту реакцию, что связано с экранирующим действием фотокатализатора (рис. 5).

Фотокатализатор — вольфрамовая кислота. В этом случае опыты были проведены с железоаммиачными квасцами и с феррицианидом. В опытах с квасцами наблю-

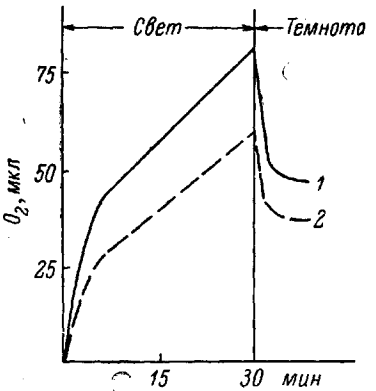


Рис. 4. Фотосенсибилизированное двуокисью титана восстановление раствора (0.1 М) железоаммиачных квасцов.

1 — в кварце, *2* — в стекле.

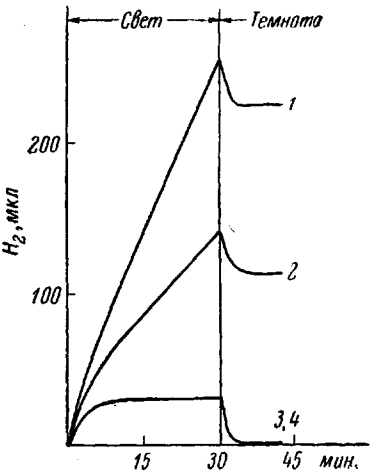


Рис. 5. Фотохимическое выделение водорода в растворе (0.3 М) сернокислого железа в 0.2 N HCl.

1 — без фотокатализатора в кварце,
2 — с двуокисью титана в кварце,
3 — без фотокатализатора в стекле,
4 — с двуокисью титана в стекле.

далось значительное выделение кислорода в стекле и кварце. В контрольных опытах с одними квасцами или с фотокатализатором без соли железа газовыделения в стекле не наблюдалось. В кварце, как было показано выше, слабое выделение газа наблюдалось в водном растворе трехвалентного железа.

Таблица 6

Выделение кислорода, сенсибилизированное вольфрамовой кислотой (0.3 г в 6 мл)

Условия опыта	Феррицианид, 0.01 М		Железоаммиачные квасцы, 0.1 М	
	кварц	стекло	кварц	стекло
N_2	+95	+70	+100	+100
O_2	+ 6	+27	+100	+ 84
N_2 + щелочной пирогаллол .	0	0	+ 15	+ 10

На рис. 6 и в табл. 6 показано, что выделение кислорода в стекле и кварце идет с одинаковой скоростью и щелочной пирогаллол поглощает выделяющийся газ.

В опытах с феррицианидом калия в присутствии азота наблюдалось выделение кислорода, несколько большее в кварце.

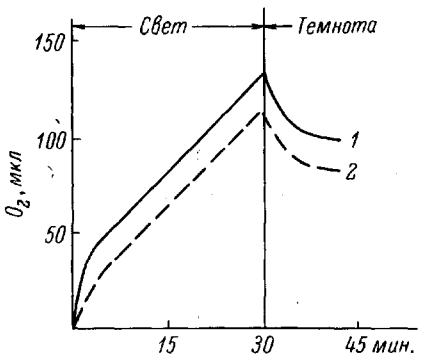


Рис. 6. Фотосенсибилизированное вольфрамовой кислотой (0.3 г) восстановление в растворе железоаммиачных квасцов (0.1 М).

1 — в кварце, *2* — в стекле.

Опыты показывают, что из трех примененных фотокатализаторов наибольшая активность наблюдалась в случае вольфрамовой кислоты.

III. Фотосенсибилизация выделения кислорода в растворах перманганата калия

Мы нашли, что введение окиси цинка, двуокиси титана в водные растворы перманганата калия сенсибилизирует реакцию выделения кислорода в сторону длинных волн в область собственного поглощения сенсибилизатора (до 400 нм).

Прямое фотохимическое выделение кислорода из растворов перманганата калия в стеклянных сосудах было незначительным, добавление сенсибилизаторов приводило к интенсивному выделению кислорода (рис. 7). В кварцевых сосудах реакция шла и в отсутствие фотокатализаторов, добавление которых значительно ускоряет реакцию (табл. 7).

Изменение pH среды в пределах от 4 до 10 мало влияет на прямое фотохимическое выделение кислорода. Однако на сен-

Таблица 7

Фотосенсибилизированное выделение кислорода в растворах перманганата калия
(В микролитрах за 21 мин.)

Компоненты реакции	Стекло	Кварц
$KMnO_4$	+ 30	+150
$KMnO_4$+окись цинка	+420	+450
$KMnO_4$+окись цинка+щелочной пирогаллол	+ 5	0
$KMnO_4$+двуокись титана	+100	+460
Окись цинка	— 5	— 20
Двуокись титана	0	— 10

сибилизированное окисью цинка и двуокисью титана выделение кислорода изменение pH среды влияет, что может быть связано с блокированием активных центров поверхности фотокатализаторов.

IV. Фотосенсибилизация в растворах *n*-бензохинона

При освещении водных растворов *n*-бензохинона в стеклянных и кварцевых сосудах в азоте мы не наблюдали прямого выделения кислорода. Применение окиси цинка или двуокиси титана в стеклянных сосудах с раствором хинона приводило к выделению газа при ультрафиолетовом освещении лишь в атмосфере азота. При этом значительная часть выделившегося газа поглощалась раствором щелочи, а на долю щелочного пирогаллола приходилось 20—30% от общего количества выделившегося газа (рис. 8). Таким образом, при фотореакции выделяется смесь газов, состоящая из углекислоты и кислорода в приблизительном отно-

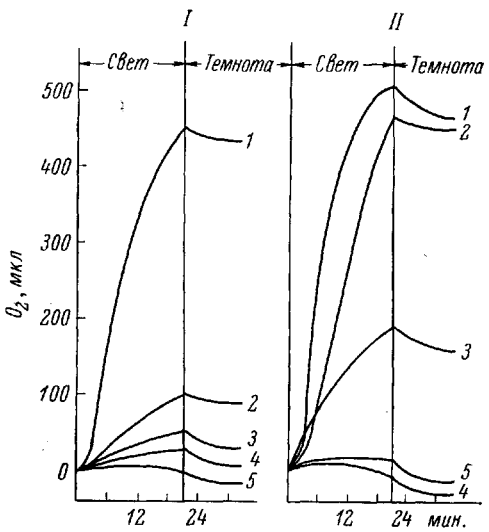


Рис. 7. Фотосенсибилизированное окисью цинка (0.03 г) и двуокисью титана (0.03 г) выделение кислорода из 0.03 М растворов перманганата калия в стекле (*I*) и кварце (*II*).

1 — перманганат калия и окись цинка, *2* — перманганат калия и двуокись титана, *3* — перманганат калия, *4* — окись цинка, *5* — двуокись титана.

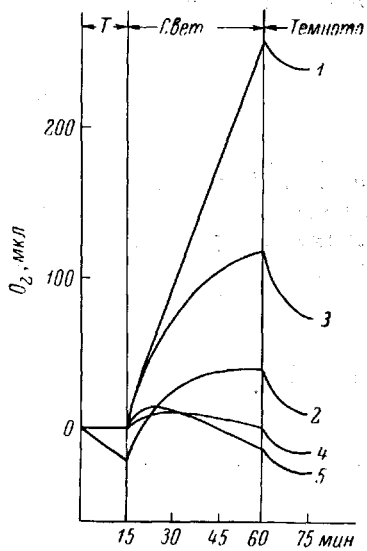


Рис. 8. Фотосенсибилизированное окисью цинка (0.3 г) выделение кислорода в растворах *n*-бензохинона (0.007 М) в стеклянных сосудах.

1 — хинон и окись цинка, *2* — хинон и окись цинка, в боковом отводе щелочной пирогаллол, *3* — хинон и окись цинка, в боковом отводе раствор КОН, *4* — хинон, *5* — окись цинка.

шении 2 : 1. В контрольных опытах с суспензией окиси цинка, водным раствором хинона или одними поглотительными растворами выделения газа не наблюдалось. Введение гидрохинона в раствор хинона подавляло выделение кислорода. В присутствии воздуха наблюдалось сенсибилизированное окисление хинона и гидрохинона в стекле и кварце.

Вероятно, при реакции без воздуха, первично образующиеся радикалы OH приводят к частичному деструктивному окислению хинона с конечным образованием углекислоты. Эта побочная реакция весьма эффективна и лишь меньшая часть радикалов OH успевает рекомбинировать с выделением кислорода на поверхности окиси цинка.

V. Фотокаталитическое окисление

Следовало выяснить, в какой мере исследованные фотокатализаторы способны сенсибилизировать реакции, сопровождающиеся не только выделением, но и поглощением кислорода. Мы широко применяли реакции окисления аскорбиновой кислоты кислородом воздуха и показали в 1946 г [21], что кристаллические фталоцианины в водных взвесях активно сенсибилизируют эту реакцию.

Таблица 8

Фотосенсибилизированное окисление аскорбиновой кислоты в присутствии фотокатализаторов
(В микролитрах за 30 мин.)

Фотокатализатор	Стекло		Кварц	
	темнота	свет	темнота	свет
Без сенсибилизатора	0	— 15	0	— 51
Фталоцианин меди	0	—102	0	—189
Окись цинка	—36	—183	—39	—411
Двуокись титана	—42	— 99	—30	—141
Вольфрамовая кислота	0	— 3	0	— 4

Фотосенсибилизированное окисление аскорбиновой кислоты измерялось в тех же манометрических сосудах, что и выделение кислорода. Обычно в опыт брали 0.3 г сенсибилизатора, 0.01 М аскорбиновой кислоты в 6 мл воды.

Из табл. 8 видно, что окись цинка и двуокись титана, так же как и фталоцианин меди, энергично сенсибилизируют окисление аскорбиновой кислоты, тогда как вольфрамовая кислота восстанавливается аскорбиновой кислотой, давая неактивный низший окисел синего цвета.

VI. Измерение квантового выхода реакций выделения кислорода

Квантовый выход реакции определяли с помощью железооксалатного актинометра [19, 20]. Интенсивность света изменяли, заключая манометрические сосуды в металлические сетки с раз-

Таблица 9

Квантовый выход выделения кислорода в системах фотокатализатор — соединение железа
(Интенсивность света $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек.)

Соединение железа	Фотокатализатор	Квантовый выход, γ·100	
		воздух	азот
Феррицианид	Окись цинка	0.60	1.00
	Двуокись титана	—	0.30
	Вольфрамовая кислота	0.42	0.74
Железоаммиачные квасцы	Двуокись титана	0.73	1.64
	Вольфрамовая кислота	1.90	3.10

ной плотностью. На рис. 9 показана зависимость скорости реакции от интенсивности света. Изученные реакции с железными солями достигают насыщения при $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2 · сек. В случае разложения перманганата калия светового насыщения наблюдать не удалось.

Измерения показали (табл. 9), что величина квантового выхода изученных реакций имеет порядок 10^{-2}; в азоте квантовый выход реакции выше, чем в присутствии воздуха. Наибольший квантовый выход выделения кислорода получен в системе, содержащей вольфрамовую кислоту и железоаммиачные квасцы.

Таблица 10

Квантовый выход фотокаталитического разложения перманганата калия 0.003 М
(Фотокатализатор — 0.03 г в 10 мл воды, интенсивность света $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. в стекле)

Фотокатализатор	Квантовый выход, γ·100
Без фотокатализатора	0.06
Двуокись титана . . .	0.20
Окись цинка	1.10

Результаты измерений приведены в табл. 10.

Таким образом, хотя эффективность сенсибилизированных реакций мала, но она значительно превышает эффективность прямых фотореакций, идущих в данной системе в более коротком

ультрафиолете в кварцевых сосудах. Наши измерения показали, что величина квантового выхода выделения кислорода в растворе железоаммиачных квасцов в кварце (без фотокатализаторов) не превышает 10^{-4}, а в случае феррицианида калия реакция практически не идет.

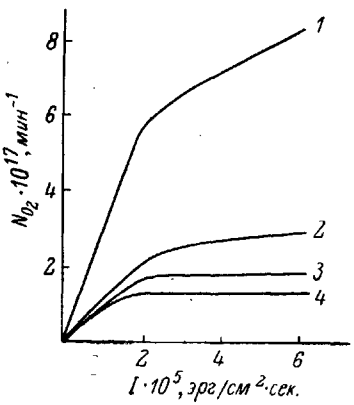


Рис. 9. Зависимость скорости выделения кислорода от интенсивности света в стеклянных сосудах.

Фотокатализаторы 0.2 г, *1* — железоаммиачные квасцы (0.005 М) и вольфрамовая кислота, *2* — железоаммиачные квасцы (0.025 М) и двуокись титана, *3* — феррицианид (0.005 М) и окись цинка, *4* — феррицианид (0.005 М) и вольфрамовая кислота.

VII. Стехиометрия и механизм реакций

Следовало ожидать, что реакция выделения кислорода в водных растворах соединений окисного железа идет согласно уравнению

$$Fe_2(SO_4)_3 + H_2O \xrightarrow{h\nu} \rightarrow 2FeSO_4 + \frac{1}{2}O_2 + H_2SO_4. \quad (I)$$

Стехиометрия измерялась для наиболее эффективной реакции, сенсибилизированной вольфрамовой кислотой (рис. 10). Задача сводилась к количественному определению выделенного кислорода, образовавшихся закисного железа и серной кислоты. Объем выделившегося кислорода измеряли на приборе Варбурга. Для определения закисного железа реакционные смеси, стоявшие в темноте и после освещения, отфильтровывали от взвешенных частиц вольфрамовой кислоты, подкисляли 0.1 N серной кислотой и титровали раствором перманганата калия. Разность титрования между опытами на свету и в темноте показывает количество образовавшегося закисного железа. Для определения кислоты проводилось потенциометрическое титрование в двух вариантах: раствор после светового опыта титровали 0.01 N NaOH, доводя pH до величины соответствующей pH в «темновом» опыте, и контрольную смесь, стоявшую в темноте, титровали 0.01 N H_2SO_4 с доведением pH до величины «светового» опыта. Результаты прямого и обратного титрования совпадали. Для того чтобы уменьшить ошибку определения, проводили длительный опыт (более 3 час.) с накоплением 0.47 мл O_2 (рис. 10 и табл. 11). Из табл. 11 видно хорошее соответствие аналитических определений стехиометрии реакции. Количество образованного в опыте двувалентного железа и серной кислоты в пределах ошибки измерения (±5%) соответствует приведенному выше уравнению.

Можно представить следующие вероятные механизмы изученных реакций.

1. При поглощении кванта света электроны полупроводника переходят в зону проводимости, что может приводить к образованию электронодонорных (—) и электроноакцепторных (+) центров на фазовой границе полупроводник—раствор. Ион гидроксила воды может отдавать электрон в «дырку», ион окисного железа или комплексный ион $Fe(CN)_6^{+3}$ — воспринимать электрон от электронодонорного центра

$$OH^- + (+) \longrightarrow \dot{O}H$$

$$Fe^{+3} + e \longrightarrow Fe^{+2}.$$

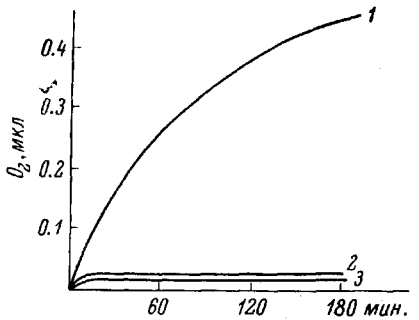


Рис. 10. Фотосенсибилизированное вольфрамовой кислотой (0.2 г) выделение кислорода в растворе (0.005 М) железоаммиачных квасцов в воде.

1 — железоаммиачные квасцы и вольфрамовая кислота, *2* — железоаммиачные квасцы, *3* — вольфрамовая кислота.

Возможность образования OH-радикалов в этих условиях была показана в опытах Корсуновского [22, 23] по фотосенсибилизированному гидроксилированию бензола в присутствии окиси цинка и двуокиси титана.

2. Первичным фотопроцессом может быть разложение WO_3 с выделением кислорода и образованием низшего окисла вольфрама (например, W_2O_5), реагирующего с окисным железом,

$$2WO_3 \xrightarrow{h\nu} W_2O_5 + \frac{1}{2} O_2,$$

$$W_2O_5 + Fe_2(SO_4)_3 + H_2O \longrightarrow 2WO_3 + 2FeSO_4 + H_2SO_4.$$

Суммарная реакция также соответствует уравнению (1).

Действительно, при освещении желтой вольфрамовой кислоты УФ светом в атмосфере азота или в присутствии воздуха наблюдается ее посинение, вероятно связанное с образованием W_2O_5. Однако измерить выделяющийся при этом кислород не удалось. Если после 60 мин. освещения суспензии 0.2 г вольфрамовой кислоты в 10 мл воды (в стекле) добавить раствор 0.05 г железоаммиачных квасцов, то обнаруживается Fe^{+2} в количестве 10^{-6} М по сравнению с контрольным опытом без освещения. Следует полагать, что при освещении вольфрамовой кислоты образуется низший окисел, способный восстанавливать в темноте окисное железо. Аналогичные опыты были поставлены с двуокисью титана. В этом случае обнаружены лишь следы закисного железа при реакции с железоаммиачными квасцами с суспензией двуокиси титана при освещении. Описанные результаты указывают

на большую вероятность второго механизма в случае реакций сенсибилизированных вольфрамовой кислотой. Элементарный механизм изученных реакций нуждается в дальнейшем исследовании.

Таблица 11

Фотохимическое выделение кислорода за 90 мин. освещения в опыте, и рассчитанное по титрованию Fe^{++} перманганатом калия (в микролитрах)
(0.3 г фотокатализатора, 0.05 М железоаммиачных квасцов, 0.005 М феррицианида. В азоте)

Условия опыта	В опыте	Рассчитано
Железоаммиачные квасцы + вольфрамовая кислота	353	336
Железоаммиачные квасцы + двуокись титана	151	180
Феррицианид + окись цинка	90	100

Заключение

Итак, балансовый процесс фотосенсибилизированной реакции

$$Fe^{+3} + \frac{1}{2} H_2O \longrightarrow Fe^{+2} + H^+ + \frac{1}{4} O_2$$

соответствует реакции Хилла с тем отличием, что в суспензии хлоропластов реакция идет в видимой области спектра в максимуме поглощения хлорофилла, тогда как в изученных нами моделях реакция сенсибилизированна к близкой ультрафиолетовой и сине-фиолетовой области спектра.

В изученных гетерогенных реакциях фотокатализатор (полупроводник) играет роль пигмента-сенсибилизатора, поглощающего свет, и катализатора, способствующего выделению кислорода и тем препятствующего течению обратных реакций первичных фотопродуктов.

Существенно, что изученные реакции сопровождаются некоторым превращением энергии кванта света в потенциальную химическую энергию. Величина E_0' системы Fe^{+3}/Fe^{+2} составляет около +0.6 в, а системы $Fe^{+3}(CN)_6/Fe^{+2}(CN)_6$ + 0.35 в. E_0' кислородного электрода равна 0.8 в. Таким образом, в этой системе за счет энергии света происходит «поднятие» электрона на +0.4 в, что соответствует (при конечном переносе двух электронов) в условиях равновесия 16 кал. на молекулу выделяющегося кислорода.

Возникает вопрос, действительно ли происходит фотосенсибилизированное окисление молекулы воды в изученных реакциях или, иначе говоря, каково происхождение выделяющегося молекулярного кислорода — из молекулы воды или из окисла фото-

катализатора. Окончательное решение вопроса, по-видимому, может быть достигнуто лишь в случае применения меченой тяжелым кислородом воды и изотопного анализа выделяющегося кислорода. Однако уже имеющиеся данные позволяют высказать следующие предположения.

Мы отмечали, что в случае вольфрамовой кислоты более вероятна первичная реакция фоторазложения окисла и вторичная реакция с водой; при достаточно длительном фотопроцессе можно достичь полной замены кислорода окисла на кислород воды и тогда применение меченой по кислороду воды уже не приведет к изменению изотопного состава кислорода, но реакция будет идти по-прежнему. Таким образом, при практически полном обмене кислорода катализатора на кислород воды теряет смысл постановка вопроса о происхождении выделяющегося кислорода. Кстати, как мы уже указывали, в случае двуокиси титана и окиси цинка не удалось наблюдать фотохимического выделения кислорода при разложении окисла и здесь возможны иные элементарные механизмы.

В случае выделения кислорода при фотосинтезе рассматриваются те же возможности — элементарный процесс отдачи электрона от молекулы воды или гидроксильного иона к акцептору, связанному с фотокаталитическим комплексом, включающим в себя молекулу хлорофилла, либо элементарное разложение фотокаталитического комплекса с выделением кислорода и темновой процесс взаимодействия молекулы воды или гидроксильного иона с восстановленным фотокаталитическим комплексом, содержащим хлорофилл и, возможно, цитохромы. Так как «кислородная емкость» фотокаталитического комплекса растений сравнительно невелика, изотопный состав выделяющегося кислорода будет всегда идентичен составу воды.

Таким образом, изученные системы небесполезны для моделирования возможных путей выделения кислорода при фотосинтезе. Надо полагать, что такие системы представляют известный интерес и для моделирования путей абиогенного образования кислорода в процессе добиологической эволюции. Как известно, первичная атмосфера земли имела восстановительный характер и образование кислорода и окисленных соединений земной коры связывают с появлением фотосинтетического кислорода; возможно, что некоторое количество кислорода могло образовываться и в «дофотосинтетический» период с участием распространенных компонентов земной коры, таких как окислы титана, обладающие значительным фотосенсибилизирующим действием.

Литература

1. Виноградов А. П., Кутюрин В. М., Тр. V МБК, М., 1961.
2. Теренин А. Н., Неуймин Г. Г., Acta Physicochim. URSS, 1935, 5, 465.
3. Franck J., Scheibe G., Z. Phys. Chem. A. 1928, 139, 22.

4. Farkas A., Farkas L., Trans. Farad. Soc., 1938, 34, 113.
5. Даин Б. Я., Успехи химии, 1946, 15, 539.
6. Weiss J., Nature, 1936, 137, 71.
7. Porret D., Weiss J., Nature, 1937, 139, 1019.
8. Даин Б. Я., Качан А. А., ДАН СССР, 1948, 61, 471.
9. Ašperger S., Trans. Farad. Soc., 1952, 48, 617.
10. Balzani V., Bertolyzza A., Carassiti V., Bull. Soc. chim. Belg., 1962, 71, 821.
11. Balzani V., Carassiti V., Ann. Chim. 1961, 51, 533; 1962, 52, 432.
12. Mathews J. H., Dewey L. H., J. Phys. Chem., 1913, 17, 211.
13. Rideal E., Norrish R., Proc. Roy. Soc. London, 1923, 103, 336.
14. Zimmerman G., J. Chem. Phys., 1955, 23, 825.
15. Качан А. А., Шерстобоева М. А., Ж. неорг. хим. 1958, 3, 1089.
16. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН СССР, 1961, 139, 142.
17. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН СССР, 1962, 147, 656.
18. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН СССР, 1966, 168, 1100.
19. Parker C., Proc. Roy. Soc. 1956, 235, 518.
20. Hatchard C., Parker C., Proc. Roy. Soc. 1953, 220, 104.
21. Красновский А. А., Брин Г. П., ДАН СССР, 1946, 53, 4
22. Корсуновский Г. А. Проблемы фотосинтеза. Изд. АН СС. М., 1959.
23. Корсуновский Г. А., ЖФХ, 1960, 34, 510.

В. Б. Евстигнеев

О ФОТОХИМИЧЕСКОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ С АКЦЕПТОРАМИ ЭЛЕКТРОНА

По наиболее распространенным современным представлениям фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на перенос электрона от воды или других доноров к углекислоте в процессе фотосинтеза связано со способностью этого пигмента к фотохимическому восприятию или отдаче электрона с образованием лабильных весьма реакционноспособных окисленных или восстановленных промежуточных соединений [1].

Подобные представления основаны прежде всего на экспериментальных данных, полученных в модельных системах с пигментом, выделенным из растения [2—4]. В настоящее время показано, что хлорофилл *in vitro* в молекулярно распределенном состоянии, в истинных растворах, а также в состоянии агрегации или адсорбции способен служить фотосенсибилизатором различных окислительно-восстановительных реакций [3, 5].

В соответствии с этими представлениями пигмент-сенсибилизатор, поглотивший свет и пришедший в богатое энергией возбужденное состояние (синглетное или триплетное), реагирует с одним из участников окислительно-восстановительной реакции, отдавая или принимая электрон. Получающаяся при этом весьма

Доклады Академии наук СССР
1970. Том 194, № 6

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
М. И. БЫСТРОВА, Ф. ЛАНГ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА ДО ХЛОРОФИЛЛА В РАСТВОРЕ

Известно, что протохлорофилл (протохлорофиллид) в растениях при освещении подвергается восстановлению, практически полностью переходя в хлорофилл (хлорофиллид). В гомогенатах этиолированных листьев фасоли также удалось наблюдать количественное превращение протохлорофиллида в хлорофиллид ([1]); однако нарушение естественного пигментно-белкового комплекса (при действии растворителей, нагревания и т. д.) приводило к потере способности к этому превращению, требующему, по-видимому, структурного соответствия молекул пигмента и донора водорода в пигментно-белковом комплексе ([2]). В последующих работах из этиолированных листьев был изолирован фотохимически активный пигментно-белковый комплекс ([3, 4]).

В модельных условиях фотохимического восстановления протохлорофиллового пигмента, выделенного из оболочек семян тыквы, доминирует лабильный восстановленный продукт, имеющий максимум поглощения около 480 мμ и регенерирующий в исходный пигмент при обратной реакции. Наряду с этим продуктом при проведении фотовосстановления в пиридиновых растворах наблюдалось образование малого количества устойчивого хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения в области 670—675 мμ и спектром флуоресценции в реакционной системе, близким к спектру хлорофилла а ([5–7]). Однако хлорофиллоподобный продукт не был полностью идентифицирован в указанных работах в силу низкого выхода реакции его образования. Известно ([8–10]), что при фотовосстановлении порфиринов и их цинковых комплексов образование хлоринов происходит с большим выходом. При фотовосстановлении протохлорофилла в растворе структура пигмента, по-видимому, создает ограничения стерического характера для количественного восстановления полуизолированных двойных связей в молекуле ([11]).

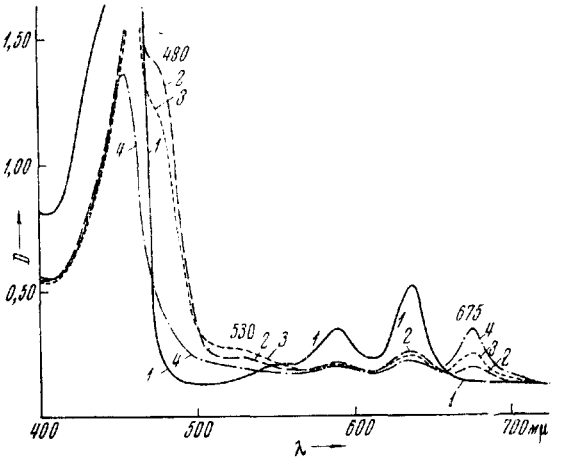


Рис. 1. Фотовосстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой (10^{-2} *M*) при 20° в пиридине, перегнанном с металлическим натрием. Спектры поглощения: *1* — исходный раствор; *2*—*4* — в ходе фотовосстановления, после освещения в течение 0,5—4 мин.

В настоящей работе описано необратимое фотовосстановление протохлорофилла по полуизолированной двойной связи в IV пиррольном кольце с выходом хлорофиллоподобного продукта, составляющим до 12% от исходного пигмента, и проведена идентификация этого продукта при по-

мощи тонкослойной хроматографии на целлюлозе и измерения спектров флуоресценции.

В качестве растворителя использовали пиридин (Союзглавреактив), перегнанный над металлическим натрием, в качестве восстановителя — аскорбиновую кислоту. Объектами исследования были протохлорофилл и 4-винилпротохлорофилл, выделяемые из оболочек семян тыквы (сорта Витаминная) по недавно описанному методу ([12]). Оба пигмента плохо разделяются при обычной процедуре хроматографии на сахарозе, поэтому в предыдущих работах исследовался главным образом 4-винилпротохлорофилл, содержащийся в семенах тыквы в преобладающем количестве. Собственно протохлорофилл и 4-винилпротохлорофилл, имеющий в 4-м положении вместо этильной группы винильную, весьма близки по спектральным свойствам ([13]); представляло интерес сравнение их фотохимического поведения.

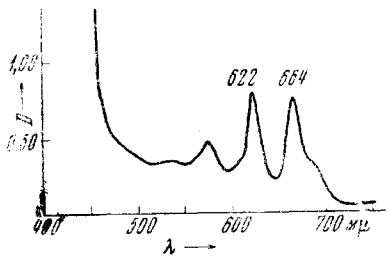


Рис. 2. Спектр поглощения раствора в серном эфире продуктов фотовосстановления протохлорофилла

Фотовосстановление осуществляли в трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений, при освещении светом 750-ваттной лампы накаливания через светофильтр ОС-13 (около $5 \cdot 10^{-5}$ эрг/см^2·сек) в условиях термостатирования при 20°. В ходе реакции регистрировали спектры поглощения на приборе СФ-10. После завершения фотовосстановления пигменты переводили из пиридина в серный эфир и хроматографировали на тонком слое целлюлозы из смеси гексана и ацетона в соотношении 20 : 80 (по объему). Спектры флуоресценции ацетоновых элюатов разных хроматографических фракций измеряли на установке, собранной на основе спектрографа ИСП-51, с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 и фотоумножителем ФЭУ-22 при возбуждении линиями ртути 365; 404; 436; 546 мμ.

В первые секунды освещения раствора протохлорофилла в описанных условиях его окраска становится оранжево-желтой; однако при выключении света быстро восстанавливается исходный зеленый цвет, и спектр поглощения регистрируется практически неизменным. Через 15—30 сек. освещения раствор становится розовато-желтым; в спектре поглощения обнаруживается максимум около 480 мμ, а также гораздо меньший по величине максимум около 530 мμ и небольшой — при 675 мμ. При записи спектра в темноте после освещения в течение 1—1,5 мин. наблюдается уменьшение максимума 530 мμ, а также рост поглощения при 675 мμ. После более продолжительного освещения в спектре отмечается падение максимумов 480 и 530 мμ и увеличение максимума 675 мμ, который после 3—4 мин. освещения достигает максимальной величины (рис. 1); дальнейшее действие света вызывает его медленное падение, частично обратимое в темноте.

У 4-винилпротохлорофилла в тех же условиях превращения протекают медленнее, чем у протохлорофилла, но общий ход фотореакции с образованием формы 675 мμ у обоих пигментов одинаков.

На рис. 2 представлен спектр поглощения продуктов фотовосстановления протохлорофилла в серном эфире. Максимум при 622 мμ — регенерированный после фотореакции исходный пигмент. Максимум около 664 мμ принадлежит образованному при фотовосстановлении устойчивому хлорофиллоподобному соединению. «Плечо» около 684 мμ принадлежит длинноволновой форме (с поглощением около 685 мμ в пиридине), которая сопутствует появлению хлорофиллоподобного соединения и образуется, по-видимому, как результат вторичных, темновых, превращений лабильных фотовосстановленных продуктов. При фотовосстановле-

нии винилпротохлорофилла наблюдается образование относительно большего количества этой формы, чем у протохлорофилла.

При хроматографическом разделении на тонком слое целлюлозы пигментной системы после реакции фотовосстановления наблюдается четыре фракции (см. рис. 3). Фракция *1* (стартовое пятно) содержит преимущественно длинноволновую восстановленную форму; в ацетоновом элюате этой фракции обнаруживается основной максимум флуоресценции около 695 мμ. Фракция 2 (R_f=0,25) состоит главным образом из протохлорофилла, регенерированного в обратной реакции, с двумя максимумами флуоресценции его ацетонового элюата — около 630 и 690 мμ. Фотовосстановление и обратный процесс регенерации лабильных фотовосстановленных форм сопряжен с феофитинизацией части пигмента, поэтому в числе других продуктов фотореакции на хроматограмме обнаруживается протофеофитин (фракция 4, R_f = = 0,55) с характерными для него основными максимумами флуоресценции около 653 и 715 мμ в ацетоне. Фракция 3 представляет собой образованное при фотовосстановлении протохлорофилла хлорофиллоподобное соединение с величиной R_f, очень близкой к величине R_f хлорофилла а в тех же условиях хроматографирования (0, 37). Сопоставление спектров флуоресценции ацетоновых растворов обоих пигментов (рис. 4) показало, что у продукта фотовосстановления протохлорофилла по сравнению с хлорофиллом а основной максимум флуоресценции сдвинут на 3—4 мμ в длинноволновую сторону, будучи близким к феофитину а. Эти спектральные отличия можно также объяснить иной конформацией образуемого пигмента, тогда как восстановление полуизолированной двойной связи в молекуле протохлорофилла не вызывает сомнения.

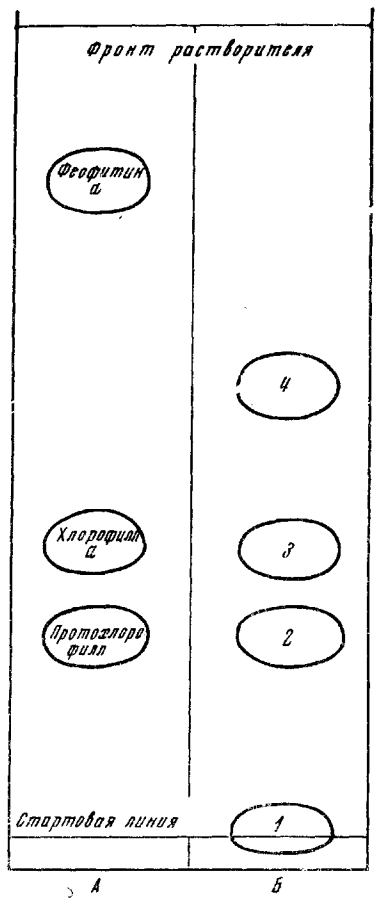


Рис. 3. Схема распределения фракций при хроматографическом разделении на тонком слое целлюлозы. *А* — смесь протохлорофилла, хлорофилла а и феофитина а; *Б* — пигментная система после реакции фотовосстановления протохлорофилла, объяснение в тексте

Используя известные значения молекулярных коэффициентов экстинкции, легко подсчитать, что в данных условиях превращается в хлорофиллоподобный продукт до 12% исходного пигмента.

Кроме протохлорофилла и винилпротохлорофилла, как показали наши опыты, к подобной реакции способен выделенный из этиолированных листьев протохлорофиллид, образующий устойчивый восстановленный продукт с максимумом поглощения при 672 мμ. У безмагниевых пигментов — протофеофитина и протофеофорбида — в тех же условиях восстановление полуизолированных двойных связей обнаружить не удалось. При фотовосстановлении протохлорофилла и винилпротохлорофилла концентрация аскорбиновой кислоты в пределах $1 \cdot 10^{-2} - 2 \cdot 10^{-2}$ *M* оказалась оптимальной для образования хлорофиллоподобного продукта. Уменьшение ее (до $0{,}3 \cdot 10^{-2}$ *M*) так же, как и увеличение (до $3 \cdot 10^{-2}$ *M*), уменьшает выход «продукта 675», вместе с тем повышая относительное

количество длинноволновой формы с поглощением около 695 мμ в пиридине. Вместо аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя может быть использован восстановленный бензилникотинамид, активный при фотовосстановлении протохлорофилла ([7]). На воздухе реакция не идет. Без экзогенного донора водорода в пиридине, перегнанном с натрием, восстановления полуизолированной двойной связи в молекуле протохлорофилла не происходит. В присутствии аскорбиновой кислоты выход хлорофиллоподобного продукта значительно уменьшается при добавлении в реакционную систему воды (5%), что приводит к смещению максимума поглощения исходного раствора протохлорофилла на 6—7 мμ в коротковолновую сторону. Появления хлорофиллоподобного продукта не удается наблюдать и в условиях освещения при —35°, когда образование формы 530 мμ также не происходит. Этот факт, а также наблюдаемая во многих опытах спектральная последовательность хода фотовосстановления позволили предположить, что образование хлорофиллоподобного продукта происходит из красной восстановленной формы хлорофилла (образуемой при фотовосстановлении протохлорофилла), крайне быстро регенерирующей в обратной реакции; пуск воздуха в раствор после кратковременного освещения приводил к ускорению образования хлорофиллоподобного продукта по сравнению с реакцией в вакууме. Таким образом, восстановление протохлорофилла в растворе протекает через ряд стадий; первым спектрально обнаруживаемым продуктом является желтая форма с максимумом поглощения около 480 мμ. Эта форма частично регенерирует в исходный пигмент (протохлорофилл и, вероятно, в протофеофитин), а частично подвергается дальнейшему восстановлению с образованием красной восстановленной формы хлорофилла (530 мμ), превращающейся затем в хлорофилл. Указанные превращения при 20° протекают очень быстро, поэтому их последовательность не всегда достаточно четко видна.

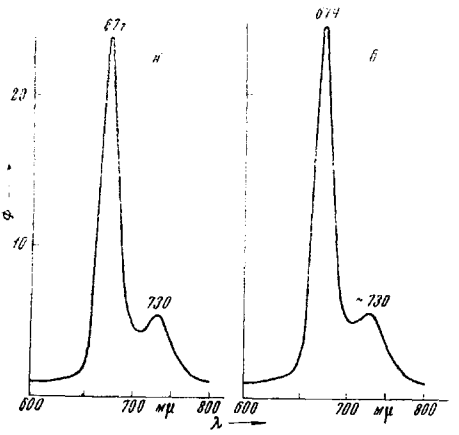


Рис. 4. Спектры флуоресценции растворов пигментов в ацетоне: *А* — хлорофилл а; *Б* — хлорофиллоподобный продукт, образующийся при фотовосстановлении протохлорофилла

Итак, установленная в работе возможность количественного фотовосстановления полуизолированных двойных связей в молекуле протохлорофилла в растворе позволит изучить эту реакцию в простой системе и сопоставить ее механизм с образованием хлорофилла в растении.

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

Поступило
17 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177 (1952). [2] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, Биохимия, 25, 168 (1960). [3] J. H. C. Smith, In: Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems, N.Y.— London, 1960, p. 257. [4] N. K. Boardman, Biochim. et biophys. acta, 62, 63 (1962). [5] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 66, 663 (1949). [6] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, Биохимия, 27, 958 (1962). [7] М. И. Быстрова, А. В. Умрихина, А. А. Красновский, Биохимия, 31, 83 (1966). [8] G. R. Seely, K. Talmadge, Photochem. Photobiol., 3, 195 (1964). [9] А. Н. Сидоров, ДАН, 158, 973, (1964). [10] А. В. Умрихина, Г. А. Юсупова, А. А. Красновский, ДАН, 175, 1400 (1967). [11] Т. Н. Годнев, С. Г. Галактионов, В. И. Раскин, ДАН, 181, 237 (1968). [12] C. Houssier, K. Sauer, Biochim. et biophys. acta, 172, 476 (1969). [13] C. Houssier, K. Sauer, Biochim. et biophys. acta, 172, 492 (1969).

Доклады Академии наук СССР
1970. Том 190, № 2

УДК 541.14+547.979.4 *БИОХИМИЯ*

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Н. Н. ДРОЗДОВА, Е. М. БОКУЧАВА

СТУПЕНЧАТОЕ ФОТООКИСЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА. СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОРМ

Изучая фотоокисление бактериохлорофилла, мы описали условия обратимой (одноэлектронной) фотореакции и необратимого фотоокисления, ведущего к образованию хлорофиллоподобного продукта ([1]). В данной работе найдены условия более глубокого фотоокисления с образованием протохлорофиллоподобных продуктов; наряду со спектрами поглощения измерены спектры флуоресценции промежуточных форм.

Условия обратимого фотоокисления пигментов *n*-бензохиноном описаны в наших предыдущих работах ([2, 3]). Необратимое окисление бактериохлорофилла проводили в толуоловых растворах в вакууме свежеприготовленным раствором *о*-бензохинона (10^{-4} *М*). Спектры флуоресценции измеряли при 20 и при —196° в прозрачном сосуде Дьюара при возбуждении линиями ртути 366 и 404 мμ.

Спектры флуоресценции промежуточных продуктов фотоокисления. Продукт фотоокисления хлорофилла а *n*-бензохиноном имеет максимум поглощения при 480 мμ и бактериохлорофилла — при 430 мμ, поэтому можно было ожидать появления флуоресценции этих соединений в сине-зеленой области спектра. Опыт проводили в спирт-глицериновом растворе пигмента с *n*-бензохиноном (10^{-3} *М*). Вначале записывали спектр флуоресценции системы пигмент — *n*-бензохинон при —196° (до проведения фотореакции), затем повышали температуру до —70° и освещали красным светом 2 мин.,— за это время проходило фотоокисление; сразу после освещения погружали трубку в жидкий азот, понижая температуру до —196° (чтобы остановить обратную реакцию) и опять записывали спектр флуоресценции. Во всех опытах как с бактериохлорофиллом, так и с хлорофиллом а после освещения наблюдалось обратимое уменьшение величины флуоресценции в главных максимумах (778 мμ — бактериохлорофилл и 671 мμ — хлорофилл а). Регенерация пигмента при обратной реакции (размораживание раствора) приводила к восстановлению первоначальной флуоресценции исходного пигмента.

В этих опытах не было обнаружено новых максимумов флуоресценции, которые можно было бы приписать продуктам фотоокисления. То, что ион-радикальные продукты «одноэлектронного» обратимого фотоокисления не обладают флуоресценцией, находится в соответствии с данными нашей лаборатории о том, что первичные ион-радикальные фотовосстановленные формы тетрапиррольных пигментов также не обладают люминесценцией ([4]). Следует указать, однако, что эти нефлуоресцирующие фотопродукты, тем не менее, фотохимически активируются под действием синего света ([5]), поэтому требует исследования возможность того, что их флуоресценция потушена избытком хинона более эффективно, чем у исходных пигментов. Флуоресценция устойчивых продуктов фотоокисления описана ниже.

Ступенчатое фотоокисление бактериохлорофилла *о*-бензохиноном. Скорость окисления бактериохлорофилла (10^{-5} *М*) *о*-бензохиноном зависит от концентрации окислителя; при концентрации

о-хинона $10^{-2}M$ при 20° реакция идет в темноте мгновенно с образованием хлорофиллоподобного продукта ([1], [6]), при уменьшении концентрации до 10^{-4} *М* реакция в темноте идет медленно и ускоряется при освещении. В этих опытах раствор *о*-хинона получали непосредственно перед реакцией в головке вакуумной трубки Тунберга при взаимодействии окиси серебра и пирокатехина, растворенного в толуоле. В вакууме приливали раствор *о*-хинона к раствору пигмента и записывали спектры поглощения и флуоресценции до и после 25-минутного освещения через светофильтр КС-19 ($\lambda > 700$ мμ). За это время весь бактериохлорофилл превращается в хлорофиллоподобный продукт, имеющий характерные максимумы поглощения при 685 и 435 мμ (рис. 1). Этот продукт обладает интенсивной флуоресценцией при 692 мμ, и, кроме того, регистрируется небольшой максимум при 641 мμ. В случае применения светофильтров с различным положением длинноволновой границы пропускания можно проследить ступенчатые переходы фотопродуктов. Так, после фотоокисления бактериохлорофилла при освещении близким и.-к. светом (светофильтр КС-19, $\lambda > 700$ мμ) в «продукт 685» (П-685) мы продолжали освещение через светофильтр КС-17 ($\lambda > 670$ мμ), т. е. в максимуме первого фотопродукта, и наблюдали дальнейшее изменение спектров поглощения и флуоресценции. При этом часть П-685 переходит в П-636; за 40 мин. освещения происходит уменьшение поглощения при 685 мμ, появление новой полосы поглощения при 636 мμ и увеличение поглощения в синей области спектра со сдвигом максимума до 443 мμ (рис. 1). Подобные изменения наблюдаются и в спектре флуоресценции: уменьшение интенсивности в максимуме при 692 мμ и увеличение при 641 мμ (рис. 2), соответствующее максимуму поглощения «продукта 636». Дальнейшее освещение через светофильтр КС-13 ($\lambda > 630$ мμ) не вызывает существенных изменений поглощения и флуоресценции последнего устойчивого продукта. Совокупность спектральных данных не оставляет сомнения в том, что П-636 является аналогом протохлорофилла, образованным при дальнейшем

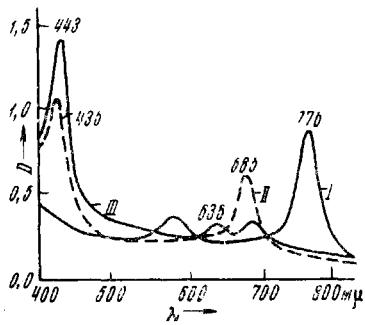


Рис. 1. Спектры поглощения при фотоокислении бактериохлорофилла *о*-бензохиноном в толуоле при 20°. Бактериохлорофилл 10^{-5} *М*, *о*-хинон 10^{-4} *М*. *I* — исходный спектр, *II* — после освещения через КС-19, *III*—после последующего освещения через КС-17

окислении хлорофиллоподобного П-685. Для сравнения мы проводили опыты по фотоокислению хлорофилла а (10^{-5} *М*) *о*-бензохиноном (10^{-4} *М*) при освещении красным светом (КС-17) при 20° в толуоле; при этом наблюдалось образование протохлорофиллоподобного продукта, имеющего максимум поглощения 626 мμ и соответствующий пик флуоресценции при 628 мμ. Возможно, что наряду с фотоокислением по месту полуизолированной связи идет окисление других группировок в молекуле пигмента. В табл. 1 приведены характерные максимумы поглощения и флу-

Таблица 1

	Бактериохлорофилл	1-й окисл. продукт — «хлорофилл»	2-й окисл. продукт — «протохлорофилл»	Хлорофилл а	Окисленный продукт — «протохлорофилл»
Максимумы поглощения, мμ	776	685	636	668	626
Максимумы флуоресценции, мμ	783	692	641	673	628

оресценции продуктов окисления бактериохлорофилла и хлорофилла а (*о*-хиноном в толуоле при 20°). Ранее была описана возможность образования протохлорофиллоподобного продукта при фотоокислении хлорофилла кислородом ([8]).

Действие восстановителей на окисленные формы бактериохлорофилла. Ранее в нашей лаборатории наблюдали, что добавление восстановителей к продуктам фотоокисления бактериохлорофилла кислородом ведет к частичной регенерации исходного пигмента ([6, 7]). Введение фенилгидразина после фотоокисления бактериохлорофилла до П-685 в наших условиях не приводит к регенерации пигмента в темно-

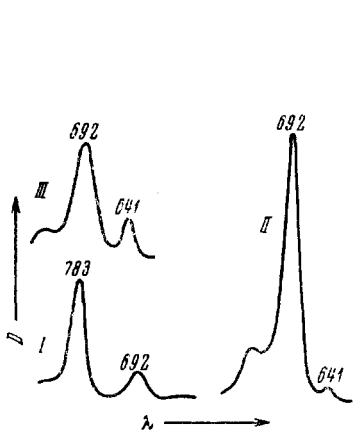


Рис. 2

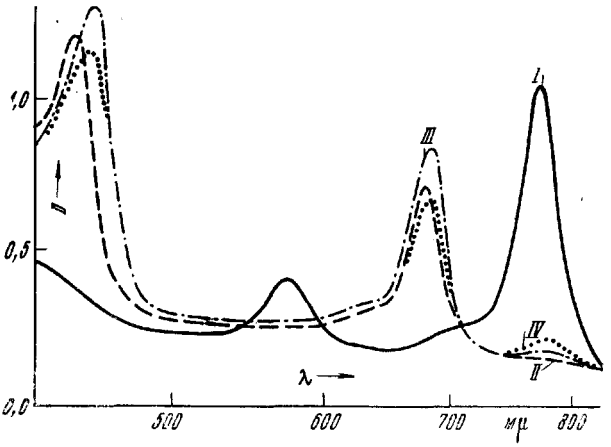


Рис. 3

Рис. 2. Спектры флуоресценции при фотоокислении бактериохлорофилла *о*-бензохиноном в толуоле при 20°. Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Действие аскорбиновой кислоты на окисленные формы бактериохлорофилла. *I* — исходный раствор, *II* — после освещения через КС-19, *III* — после добавления аскорбиновой кислоты и стояния в темноте, *IV* — после освещения с аскорбиновой кислотой в вакууме через интерференционный светофильтр (ИФ-675)

те; если освещать раствор после прибавления фенилгидразина красным светом в вакууме, то наблюдается уменьшение главного максимума пигмента при 685 мμ и увеличение поглощения в области 500—530 мμ, т. е. обычное образование красной фотовосстановленной формы хлорофилла; после выключения света и при пуске воздуха идет обратная реакция. Добавление к 4 мл раствора окисленного П-685 в толуоле 20 мг аскорбиновой кислоты в 2 мл пиридина приводит к увеличению поглощения в главном максимуме (до 10%) и незначительной регенерации бактериохлорофилла; стояние в темноте в течение 30 мин. не вызывает дальнейших изменений. Последующее освещение в вакууме красным светом приводит к уменьшению оптической плотности при 695 мμ и к дальнейшей регенерации бактериохлорофилла до 10% от исходного количества (рис. 3). Для сравнения подобный опыт проводили с хлорофиллом а. Добавление *о*-хинона и аскорбиновой кислоты и последующее освещение не привело к увеличению оптической плотности в области поглощения бактериохлорофилла; наблюдалось лишь обычное фотовосстановление хлорофилла с образованием «красной формы». Таким образом, продукты, образующиеся при фотоокислении бактериохлорофилла, отличаются по своим свойствам от хлорофилла а.

Итак, изложенный экспериментальный материал подтверждает, что при фотоокислении бактериохлорофилла *о*-бензохиноном наблюдается ступенчатое «двухэлектронное» фотоокисление до хлорофилло- и протохлорофиллоподобных продуктов; проведение же реакции в других условиях ведет к обратимому «одноэлектронному» фотопроцессу, что может быть выражено следующей схемой:

Обратимое фотоокисление:

$$\text{Бхл}^* + Q \rightleftarrows .\text{Бхл}^+ + .Q^-,$$
$$\text{«Хл»}^* + Q \rightleftarrows .\text{«X}^+\text{»} + .Q^-;$$

необратимое фотоокисление:

$$\text{Бхл}^* + Q \rightarrow \text{«Хл»} + QH_2,$$
$$\text{«Хл»}^* + Q \rightarrow \text{«Прото-Хл»} + QH_2,$$

где Q — окислитель (бензохинон).

Устойчивые продукты необратимого фотоокисления обладают характерными спектрами поглощения и люминесценции.

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

Поступило
12 VIII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова, ДАН, **177**, 1225 (1967). [2] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1378 (1963); **153**, 722 (1963). [3] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, **30**, 605 (1965). [4] Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, **6**, 392 (1961). [5] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **188**, № 6 (1969). [6] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). [7] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, И. М. Сапожникова, ДАН, **172**, 727 (1967). [8] И. И. Дилунг, Укр. хим. журн., **24**, в. 2, 202 (1958).

Доклады Академии наук СССР
1970. Том 194, № 4

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА

АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ФЛАВИНОВЫХ КОФЕРМЕНТОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЦИТОХРОМА С

В фотосинтезирующих организмах окислительно-восстановительное равновесие цитохромов изменяется под действием света, поглощенного хлорофиллом ([1], [2]); желательно изучение этого явления в более простых системах, так как взаимодействие возбужденного хлорофилла с цитохромами может быть связано с первичным преобразованием энергии света при фотосинтезе.

В предыдущих работах нашей лаборатории ([3–6]) была описана модельная система хлорофилл — цитохром, в которой под действием красного света, поглощенного хлорофиллом, наблюдалось фотосенсибилизированное восстановление цитохрома в анаэробных условиях и фотоокисление восстановленного цитохрома в присутствии кислорода воздуха.

Вернон и Шоу ([7]) нашли, что хлоропласты и хлорофилл в растворе детергентов фотосенсибилизируют восстановление цитохрома С; в присутствии экзогенных доноров водорода в опытах с хлоропластами флавинмононуклеотид (ФМН) и феназинметасульфат (ФМС) активировали эту систему.

В данной работе описано активирование модельной системы хлорофилл — цитохром рядом флавиновых соединений: рибофлавином, флавинмононуклеотидом, флавинадениндинуклеотидом (ФАД); испытывались также витамины B_1 (тиамин) и B_6 (пиридоксин) и феназинметасульфат.

Активирующее действие флавиновых коферментов в данной реакции не является специфичным: например, менадион (2-метил, 1,4-нафтохинон) чрезвычайно сильно активирует сенсибилизированное восстановление и окисление цитохрома С в концентрациях до 10^{-6} *M*, тогда как *p*-бензохинон и пиридиннуклеотиды в этих условиях были неактивны.

Обычная процедура опыта была следующей: в вакуумную трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, вводили раствор 2,3 мг цитохрома С («Reanal») в 3,5 мл фосфатного буфера 0,01 *M* pH 7,4. В случае применения детергента в головку трубки вводили 1 мл 5% раствора тритона Х-100, 0,5 мл водного раствора флавина и 0,25 мл спиртового раствора хлорофилла а ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*).

После откачивания воздуха раствор из головки приливали к раствору цитохрома в трубке, выдерживали 2 мин. в темноте, освещали 6 мин. конденсированным светом лампы накаливания 300 вт через красный светофильтр КС-13 при 20° (наибольшая интенсивность света 10^5 эрг/см^2·сек.). Затем пускали воздух в трубку и снова освещали красным светом. В процессе опыта проводили измерения спектров поглощения на регистрирующем спектрофотометре СФ-14 и СФ-4а.

Система хлорофилл — цитохром без детергента обладает весьма малой активностью ([3], [4]). Однако введение флавиновых коферментов приводит к увеличению эффекта. Например, реакция фотовосстановления ($+\Delta D \cdot 1000$ при 550 мμ за 15 мин.) характеризуется следующими данными:

Без флавинов	20	Рибофлавин	90
ФАД	40	ФМН	90

Активность рибофлавина и ФМН в концентрации $2{,}6 \cdot 10^{-5}$ *M* была приблизительно одинаковой, активность ФАД в этих условиях при той же концентрации была несколько ниже.

Система хлорофилл — цитохром в водном растворе тритона X-100 гораздо активнее, чем в водном растворе без детергента. Введение флавиновых коферментов приводит к еще большей активации сенсибилизированного восстановления и окисления. Активность рибофлавина, ФМН и ФАД в реакции фотовосстановления ($+\Delta D$) цитохрома была близкой; активация фотоокисления ($-\Delta D$) была несколько больше в случае рибофлавина ($\Delta D \cdot 1000$ при 550 мμ за 3 мин. освещения; см. также рис. 1):

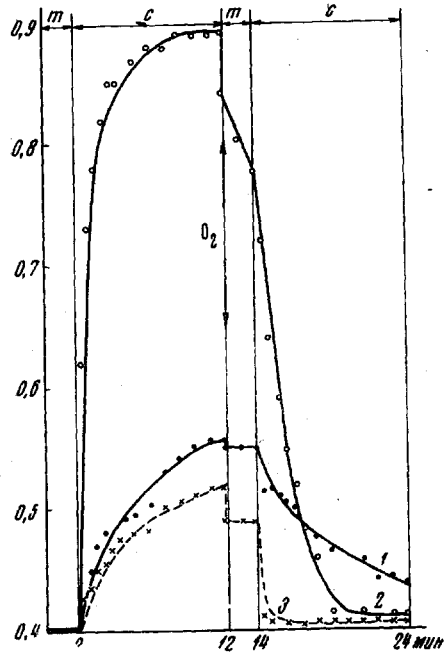


Рис. 1. Влияние рибофлавина и ФМС на фотовосстановление и фотоокисление цитохрома С, сенсибилизированное хлорофиллом в водной среде (1% тритона X-100) pH 7,4. *1* — хлорофилл + цитохром; *2* — то же + рибофлавин; *3* — то же (*1*) + ФМС. *т* — темнота, *с* — свет, $\downarrow O_2$ — пуск воздуха

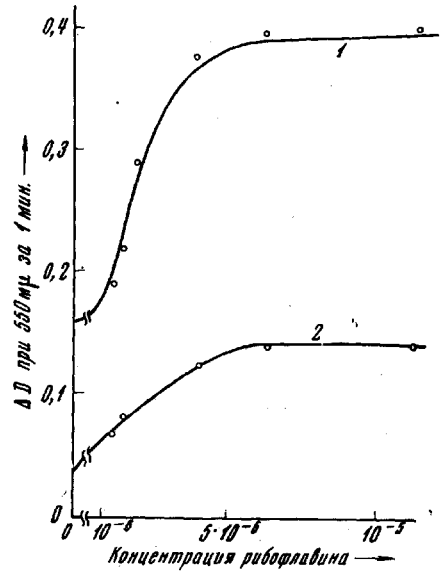


Рис. 2. Зависимость скорости сенсибилизированного хлорофиллом фотовосстановления (*1*) и фотоокисления (*2*) цитохрома *C* от концентрации рибофлавина (в водном растворе тритона X-100). Концентрация хлорофилла 10^{-5} *M*, красный свет $\lambda > 620$ мμ, $6 \cdot 10^4$ эрг/см²·сек.

Без флавинов	+115	— 30
Рибофлавин	+475	—275
ФМН	+470	—160
ФАД	+450	—120

Следует отметить, что флавиновые соединения и в темноте катализируют окисление кислородом восстановленного цитохрома, идущее, однако, с меньшей скоростью, чем при освещении.

Мы испытывали действие ФМС, который так же, как и флавины, является кофактором переноса электрона при фотофосфорилировании. В нашей системе ФМС ингибировал фотовосстановление цитохрома, но чрезвычайно сильно активировал фотоокисление восстановленного цитохрома. Использование в реакции других витаминов группы В, а именно B_1 и B_6, привело к следующим результатам. Витамин B_1 в концентрации от 10^{-6} до 10^{-3} *M* практически не влияет на реакцию. Витамин B_6 начиная от концентрации 10^{-4} *M* явно ингибирует фотосенсибилизированное восстановле-

ние цитохрома и активирует его окисление, т. е. действует подобно ФМС. Это действие витамина B_6 следует приписать его способности к обратимым окислительно-восстановительным превращениям.

Зависимость скорости фотосенсибилизированного восстановления и окисления цитохрома от концентрации рибофлавина при постоянной интенсивности света и pH 7,4 показана на рис. 2. Насыщение эффекта наблюдалось при концентрации рибофлавина $4—6 \cdot 10^{-6}$ *M*. Обычно опыты проводились при концентрации рибофлавина $2{,}6 \cdot 10^{-5}$ *M*, т. е. в области насыщения.

Зависимость скорости реакции восстановления и окисления от интенсивности света, которую изменяли при помощи нейтральных светофильтров, показана на рис. 3. Скорость реакции приблизительно пропорциональна логарифму интенсивности света, что исключает двухквантовый механизм процесса.

Зависимость реакции от pH изучалась в пределах от 4 до 10 в опытах с рибофлавином. Максимум активности реакции фотовосстановления наблюдался при pH 7—9, а максимум активности фотоокисления при pH 6—7.

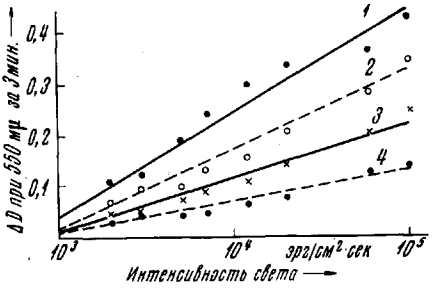


Рис. 3. Зависимость скорости фотовосстановления (*1, 3*) и фотоокисления (*2, 4*) цитохрома С, сенсибилизированного хлорофиллом, от интенсивности красного света (в водном растворе тритона X-100). *1, 2* — в присутствии рибофлавина; *3, 4* — без рибофлавина.

В работе Вернона ([8]) было показано, что рибофлавин при освещении в области собственного поглощения (максимум в сине-зеленой области спектра) способен к фотосенсибилизации окислительно-восстановительных превращений цитохрома С. В наших опытах реакция возбуждается красным светом, обычно через красные светофильтры КС-13 или КС-19. В области пропускания этих светофильтров рибофлавин не обладает поглощением. Однако в контрольных опытах, без хлорофилла, при освещении красным светом иногда наблюдался небольшой эффект фотосенсибилизации, обычно в 20—30 раз меньший, чем в присутствии хлорофилла. Опыты показали, что эффект обусловлен действием рассеянного дневного света, которое нельзя полностью исключить в данной процедуре фотохимического эксперимента.

Так, например, при стоянии системы рибофлавин — цитохром в растворе детергента в трубке Тунберга на дневном рассеянном свете пасмурным днем за 45 мин. оптическая плотность восстановленного цитохрома (при 550 мμ) увеличивается на 0,4; в полной темноте изменений цитохрома не наблюдается.

В контрольной процедуре, имитирующей весь процесс проведения реакции на установке, но без включения действующего света, наблюдалось малое (ΔD около 0,005) изменение цитохрома за счет влияния рассеянного дневного света. Окисление цитохрома идет и в темноте, но рассеянный свет ускоряет этот процесс.

Для того чтобы изучить влияние понижения температуры на скорость реакции, мы применяли систему, содержащую 75% глицерина. В этой среде спектрофотометрические измерения можно вести при —70°, среда остается прозрачной. При —70° в пределах точности измерений на спектрофотометре СФ-14 не удалось наблюдать фотосенсибилизированной реакции, тогда как при 20° реакция идет весьма активно. Эти данные указывают на наличие диффузионной стадии в механизме реакции. Если при низкой температуре имеет место быстрая обратимость первичных стадий, то примененная техника регистрации непригодна и требуются измерения при помощи дифференциальной или импульсной спектроскопии.

Возможен следующий механизм реакции. Опыты показывают, что флавины ускоряют как фотосенсибилизированное восстановление, так и окисление. Поэтому можно полагать, что флавиновые кофакторы включаются в качестве промежуточного переносчика электрона между звеньями хлорофилл — цитохром. Недавно описана ([9]) возможность образования комплекса хлорофилла с рибофлавином (с ФМН), с переносом электрона в этом комплексе под действием света, поглощенного хлорофиллом. Мы не смогли, однако, обнаружить полосы поглощения при 700 мμ в системе хлорофилл — рибофлавин в водном растворе детергента. Возможно, что в этих условиях стационарная концентрация комплекса очень мала из-за диссоциирующего действия детергента.

В свете результатов данной работы гипотетическую схему переноса электрона в изученной системе можно представить следующим образом:

Фотовосстановление	$АН \rightarrow Хл^* \rightarrow Фл \rightarrow$ Цитохром Fe^{3+}
Фотоокисление	Цитохром $Fe^{2+} \rightarrow Хл^* \rightarrow Фл \rightarrow O_2$
	Цитохром $Fe^{2+} \rightarrow Хл^* \rightarrow ФМС \rightarrow O_2$,

где $Хл^*$ — возбужденный светом хлорофилл, Фл — флавиновый кофермент, АН — донор водорода, ФМС — феназинметасульфат.

Положение промежуточного переносчика электрона — флавина в показанных на схеме звеньях модельной цепи переноса электрона требует дальнейшего исследования.

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

Поступило
8 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] R. Hill, Adv. in Enzymol., 12, 1 (1951). [2] H. Lundegardt, Physiol. plantarum, 7, 375 (1954). [3] А. А. Красновский, ДАН, 103, 288 (1955). [4] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, 1, 120 (1956). [5] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Биохимия, 22, 776 (1957). [6] А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, 185, 938 (1969). [7] L. P. Vernon, E. R. Shaw, Biochemistry, 4, 132 (1965). [8] L. P. Vernon, Biochim. et biophys. acta, 36, 177 (1959). [9] Shu-I-Tu, J. H. Wang, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 79 (1969).

Доклады Академии наук СССР
1970. Том 190, № 1

УДК 576.8.094.83+535.372

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Е. П. ФЕДЕНКО, Ф. ЛАНГ, Е. Н. КОНДРАТЬЕВА

СПЕКТРОФЛУОРОМЕТРИЯ ПИГМЕНТОВ ИСХОДНОГО ШТАММА И ПРОТОХЛОРОФИЛЬНЫХ МУТАНТОВ RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS

В настоящее время внимание исследователей привлекают последние этапы синтеза бактериохлорофилла — основного пигмента большинства пурпурных бактерий. До сих пор синтез бактериохлорофилла был установлен до стадии монометилового эфира Mg-2,4-дивинилфеопорфирина a_5, называемого бактериальным протохлорофиллидом. Этот пигмент был идентифицирован в культуральной жидкости мутантов Rhodopseudomonas spheroides и клеток данных бактерий, выращенных в присутствии 8-оксихинолина ([1–4]).

В нашей предыдущей работе было показано, что у четырех мутантов Rh. palustris (зеленых 1, 2, 3 и желтого) в заметном количестве присутствует пигмент протохлорофильной природы с максимумом поглощения в клетках при 632—650 мμ, а в ацетоновом растворе — при 625 мμ. Пятый мутант (желто-розовый) наряду с бактериохлорофиллом образует пигмент с максимумом поглощения in vivo при 667—669 мμ ([5]).

В настоящей работе предполагалось выяснить, находится ли протохлорофильный пигмент в клетках бактерий в фитольной или бесфитольной форме или в той и другой одновременно, как это имеет место у зеленых растений. Кроме того, следовало определить, не содержатся ли в клетках мутантов Rh. palustris другие пигменты — предшественники бактериохлорофилла.

С этой целью был использоваа метод тонкослойной хроматографии пигментов на целлюлозе MN ([6]) в системе растворителей гексан — ацетон (80 : 20) ([7]) с последующей спектрофлуорометрией элюатов пятен при комнатной температуре и температуре жидкого азота ([8]). Метод выращивания мутантов и исходного штамма Rh. palustris описан ранее ([5]).

Опыты показали, что протохлорофильный пигмент в клетках всех четырех мутантов Rh. palustris содержится в фитольной и в бесфитольной форме. Хроматографически чистый бактериальный протохлорофиллид из клеток зеленого мутанта 1 имеет такие же максимумы флуоресценции, как и протохлорофилл из оболочек семян тыквы (рис. 1, *I*). В клетках максимум флуоресценции пигмента находится при 637 мμ. Этот максимум обнаружен также в клетках желто-розового мутанта и исходного штамма Rh. palustris. Судя по хроматографическому поведению этого пигмента, в их клетках он также представлен фитольной и бесфитольной формой.

Последние наблюдения существенны, так как до сих пор в литературе отсутствовали данные о протохлорофильных пигментах в исходных штаммах пурпурных бактерий. Эти пигменты находятся в клетках в незначительных количествах и не могли быть обнаружены путем измерения спектров поглощения, а гораздо более чувствительный метод спектрофлуорометрии при изучении пигментов фотосинтезирующих бактерий не применялся. В зеленых листьях растений протохлорофильный пигмент также был обнаружен путем применения флуоресцентного метода ([9]).

По флуоресценции удалось обнаружить у Rh. palustris ряд других пигментов, которые ранее не выявлялись по спектрам поглощения.

В ацетоновых экстрактах всех пяти мутантов и исходного штамма обнаружен пигмент с максимумом флуоресценции около 590 мμ, видимо близкий к Mg-протопорфирину.

У трех зеленых и желтого мутантов неизменно присутствовал пигмент с максимумами флуоресценции в ацетоне при 645—647 и 712—714 мμ (рис. 1, *IIа*), характерными для протофеофитина а (рис. 1, *IIб*) ([10]). Судя по хроматографическому поведению, пигмент, выделенный из мутантов, представляет собой протофеофорбид.

В ацетоновых экстрактах пигментов пяти мутантов и исходного штамма Rh. palustris обнаружен максимум флуоресценции при 657—659 мμ (рис. 1, *III а*). Соответствующего максимума в клетках выявлено не было, однако это могло произойти из-

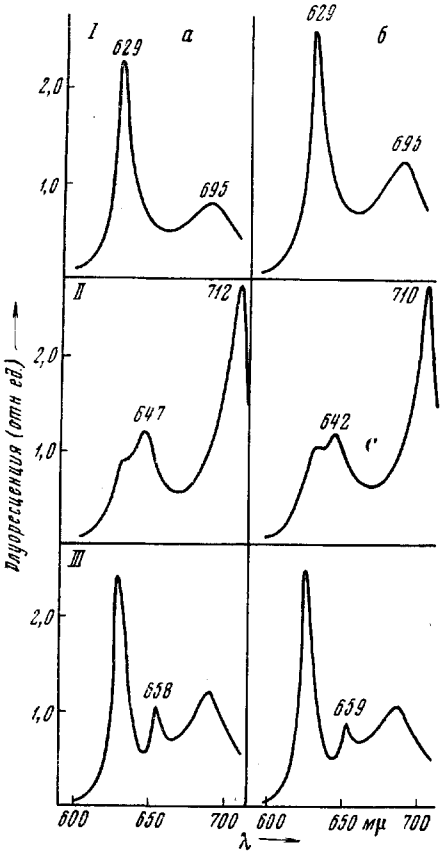


Рис. 1

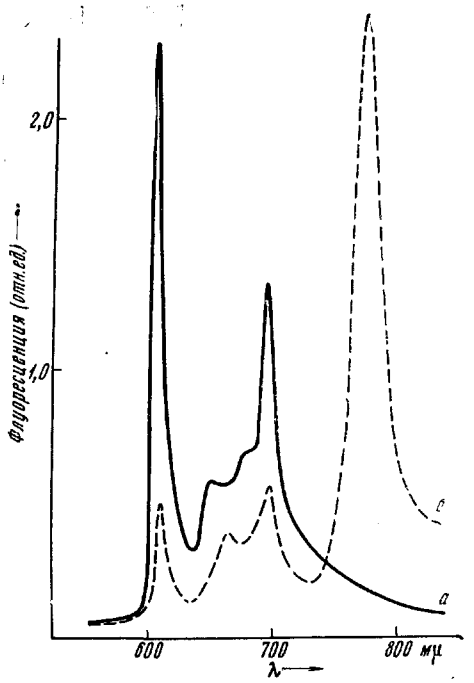


Рис. 2

Рис. 1. Спектры флуоресценции. *I* — хроматографически чистые протохлорофиллид из клеток зеленого мутанта 1 Rh. palustris (*а*) и протохлорофилл из оболочек семян тыквы (*б*); *II* — пигмент 647 из клеток зеленого мутанта 1 Rh. palustris (*а*) и протофеофитина а (*б*); *III* — пигменты 658 и 629 из клеток зеленого мутанта 1 Rh. palustris (*а*) и неочищенного экстракта пигментов из оболочек семян тыквы (*б*)

Рис. 2. Спектры флуоресценции экстрактов пигментов из клеток зеленого мутанта 3 (*а*) и исходного штамма Rh. palustris (*б*)

за более слабой флуоресценции его in vivo. Максимум флуоресценции при 659 мμ был характерен также для низкотемпературного спектра флуоресценции неочищенного экстракта пигментов из оболочек семян тыквы (рис. 1, *III б*).

В связи с этим уместно упомянуть о 2-дезвинил-2-оксиэтилфеофорбиде а (пигменте 658), выделенном Джонсом ([11]) из культуральной жидкости Rh. palustris, выращенного в присутствии 8-оксихинолина. Известно, что максимумы поглощения феофорбида и хлорофилла а отличаются на 7 мμ ([12]). Поэтому можно ожидать, что максимум поглощения 2-дезвинил-2-ок-

сиэтилхлорофиллида а должен находиться при 651 мμ, а максимум его флуоресценции, вероятно,— около 656—658 мμ. Возможно поэтому, что обнаруженный нами пигмент с максимумом флуоресценции при 657—659 мμ может иметь структуру 2-дезвинил-2-оксиэтилхлорофиллида а.

Что касается пигмента с максимумом поглощения in vivo при 667—669 мμ, образуемого желто-розовым мутантом, то максимум флуоресценции его в клетках находится при 680 мμ, а в ацетоне — при 674—675 мμ. Положение на хроматограмме говорит о том, что это — фитольная форма (в одном из опытов были обнаружены также следы бесфитольной формы). По этим свойствам пигмент 674 близок к хлорофиллу а. Удалось снять спектр поглощения его раствора, в котором была лишь небольшая примесь протохлорофилла. В спектре пигмента 674 обнаружены следующие максимумы поглощения в ацетоне: 404 (100%), 505 (32%), 536 (28%), 604 (15%) и 670 (41%) мμ. Те же максимумы поглощения обнаружены в спектре возбуждения люминесценции при 674 мμ. Однако этот набор максимумов поглощения не соответствует хлорофиллу а, феофитину а и феофорбиду а. Пигмент 674 есть не только у желто-розового мутанта, но также у исходного штамма Rh. palustris и в следовых количествах у зеленых мутантов 1 и 3.

Последний пигмент, обнаруженный нами у всех пяти мутантов и исходного штамма Rh. palustris, имел максимум флуоресценции в ацетоне около 700 мμ, а в клетках бактерий — при 706 мμ.

Наличие перечисленных пигментов (кроме феофорбида), а именно 629, 658; 674 и 700, не только у мутантных форм (см. рис. 2), но также у молодых культур исходного штамма Rh. palustris (в гораздо меньшем количестве) указывает на то, что они могут быть промежуточными продуктами при синтезе бактериохлорофилла. Если предположить, что биосинтез идет так же, как в случае хлорофилла,— от коротковолновых (более окисленных) к длинноволновым (более восстановленным) формам, то последовательность расположения обнаруженных пигментов на пути синтеза бактериохлорофилла может быть следующей: ...→ П-629 → П-658? → П-674 → → П-700 → ... → бактериохлорофилла.

П-629 является монометиловым или фитиловым эфиром Mg-2,4-дивинилфеопорфирина a_5; пигменту 658 только предположительно можно приписать структуру 2-дезвинил-2-оксиэтилхлорофиллида а.

Последние ступени синтеза бактериохлорофилла, по мнению Ласцеллс, включают последовательно пигменты 720 и 770 (бактериальный хлорофиллид), обозначенные по максимумам поглощения их в среде после центрифугирования ([4]). Пигменты порфириновой природы обнаружены также в культуральной жидкости перечисленных нами мутантов и значительно ранее, еще в 1951 г., у исходных штаммов пурпурных бактерий ([13]).

Названные пигменты найдены нами не только у мутантов и исходного штамма Rh. palustris, но и в клетках других фотосинтезирующих бактерий: Rhodospirillum rubrum (637; 680 и 706 мμ), Chromatium minutissimum (680 и 706 мμ), Ectothiordospira shaposhnikovi (680 мμ) и Chloropseudomonas ethylica (637? и 680 мμ) *.

Итак, фитольная и бесфитольная формы протохлорофильного пигмента обнаружены у пяти мутантов и в гораздо меньшем количестве у исходного штамма Rh. palustris. Кроме протохлорофилла, все мутанты и исходный штамм имеют хлорофиллоподобные соединения с максимумами флуоресценции в ацетоне при 658; 674 и 700 мμ. Предполагается, что эти соединения могут быть промежуточными продуктами в синтезе бактериохлорофилла.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 VII 1969

* В скобках приведены максимумы флуоресценции, обнаруженные in vivo.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] O. T. G. Jones, Biochem. J., **89**, 182 (1963). [2] J. Lascelles, Biochem. J., **100**, 175 (1966). [3] O. T. G. Jones, Phytochemistry, **6**, 1355 (1967). [4] J. Lascelles, T. Altschuler, Arch. Mikrobiol., **59**, 204 (1967). [5] Е. П. Феденко, Е. Н. Кондратьева, А. А. Красновский, Научн. докл. высш. школы, сер. биол. науки, **8**, 102 (1969). [6] M. F. Bacon, J. Chromatography, **17**, 322 (1965). [7] S. W. Jeffrey, Biochim. et biophys. acta, **126**, 271 (1968). [8] Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский, Биофизика, **7**, 578 (1962). [9] Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева, ДАН, **127**, 699 (1959). [10] C. S. French, Research in Photosynthesis, 1957. [11] O. G. Jones, Biochem. J., **91**, 572 (1964). [12] Т. Н. Годнев, Хлорофилл. Его строение и образование в растении, Минск, 1963, стр. 58. [13] К. К. Войновская, А. А. Красновский, Биохимия, **20**, 123 (1955).

Том 17, вып. 2 1970

МЕТОДИКА

METHODS

УДК 581.192.2.08+581.132

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕОФИТИНА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. Г. ШАПОШНИКОВА

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

Описан метод определения феофитина в высших растениях с помощью тонкослойной хроматографии и последующего измерения флуоресценции элюата пятен феофитина. Содержание феофитина в листьях, определенное этим методом, колеблется в пределах 1,5—2,3% от суммы хлорофиллов *a* и *b*.

Изучение образования феофитина в растениях представляет интерес в связи с тем, что феофитинизация может сопутствовать световому и темновому метаболизму хлорофилла. Например, феофитин образуется в процессе фотовосстановления хлорофилла и его аналогов [1—4].

При хроматографировании экстрактов из листьев высших растений и водорослей всегда обнаруживается некоторое количество феофитина. Однако до сих пор неясно, является ли феофитин продуктом обмена веществ, или это соединение образуется в процессе извлечения и анализа пигментов. В то же время имеются данные о том, что в особых условиях в клетках растений возможно накопление значительного количества феофитина. Так, Гринблатт и Шифф [5] обнаружили, что хлорофилл Euglena gracilis при затемнении культуры превращается в вещество, подобное феофитину. Шлык с сотр. [6] также наблюдали появление феофитина у перенесенных в темноту клеток эвглены и установили, что темновое образование феофитина является прижизненным процессом, так как повторное освещение вызывает возрастание удельной радиоактивности хлорофилла вследствие нового синтеза, а разрушение хлорофилла в мертвых клетках на свету проходит не через феофитин. Йенч [7], выращивая культуру Phaeodactylum tricornutum на свету, а затем затемняя ее, показал, что после 270 час. темноты хлорофилл полностью исчезает и в культуре остается только феофитин. При последующей экспозиции на свету снова увеличивается количество хлорофилла. При освещении фитопланктона, собранного на глубине 250 *м*, у которого свыше 75% пигментов составляет феофитин, также происходило накопление хлорофилла.

Кихара и Френкель [8] выделили из молодых клеток Rhodospirillum rubrum частицы, содержащие бактериофеофитин. Но эти частицы не обладали способностью осуществлять фотосинтетические реакции в отсутствие бактериохлорофилла. Гарсия, Вернон и Молленхауэр [9] при обработке тритоном X-100 хроматофоров R. rubrum также выделили частицы, содержащие бактериофеофитин. Эта фракция активно катализировала простые фотореакции. Авторы предполагают, что бактериофеофитин может образовываться под действием детергента из частиц, содержащих бактериохлорофилл.

Клейтон [10] обнаружил, что при продолжительной экспозиции на свету в анаэробных условиях бо́льшая часть бактериохлорофилла в клетках сине-зеленых мутантов Rhodopseudomonas spheroides превращается в бактериофеофитин, который участвует в процессах поставки энергии к активному центру цепи переноса электронов.

Для определения феофитина в растениях следовало применить метод, позволяющий измерять незначительные его количества. В работах Бэкона и Холден [11, 12] тонкослойная хроматография сопровождалась спектрофотометрическим измерением количества пигмента в элюатах пятен. По данным этих авторов, количество феофитина *a* составляет около 1% по отношению к хлорофиллу *a*.

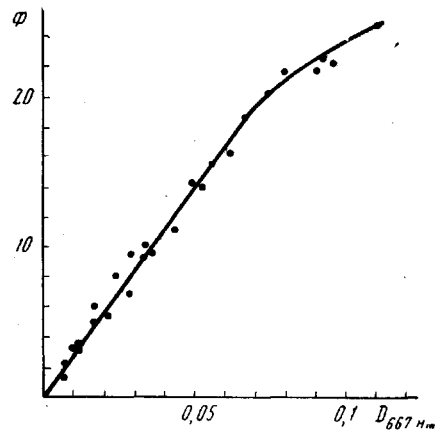
Задача настоящего исследования заключалась в использовании более чувствительного флуорометрического метода для определения феофитина в листьях растений.

Экстракцию пигментов проводили в холодной комнате при 3—5°. Свежие листья (обычно 2—3 *г*) растирали в ступке с холодным 100%-ным ацетоном (20—30 *мл*). Для предотвращения возможной феофитинизации в процессе выделения добавляли углекислый магний. Экстракт отжимали через полотно. Количественное извлечение пигментов не обязательно, так как содержание феофитина при анализе выражается в процентах к содержанию хлорофилла; это допустимо, если предположить, что хлорофилл и феофитин экстрагируются ацетоном одинаково. К ацетоновому экстракту добавляли серный эфир (10—15 *мл*), а затем 10%-ный водный раствор NaCl, настоенный на углекислом магнии (30—40 *мл*). При этом пигменты переходят в эфирный слой, который промывали четыре-пять раз 10%-ным NaCl. Эфирный раствор высушивали безводным сернокислым натрием и затем использовали для хроматографирования. Высушивание необходимо, так как, если в эфирном растворе остается вода, часть хлорофиллов при хроматографировании не продвигается с фронтом растворителя, а остается на линии нанесения. Содержание хлорофиллов в эфирном растворе измеряли спектрофотометрически при 647 *нм*, т. е. в изобестической точке поглощения хлорофиллов *a* и *b*.

Для разделения смеси пигментов был использован метод тонкослойной хроматографии на целлюлозе [11, 12], которую получали из хлопчатобумажной ваты [13]. Перед использованием целлюлозу промывали ацетоном для удаления флуоресцирующих примесей, мешающих определению. Обычно 1,5 *г* целлюлозы размешивали с 5—10 *мл* дистиллированной воды и наносили на стеклянную пластину размером 10×20 *см* таким образом, чтобы образовался равномерный слой, который 40 мин. высушивали при комнатной температуре, а затем 45 мин. при 105°. Растворы пигментов в эфире (10—50 *мкл*) наносили микропипеткой в виде полос или пятен на расстоянии 1,5 *см* от нижнего края пластины. Разделение проводили в темноте при комнатной температуре в смеси петролейного эфира (точка кипения 70—100°), ацетона и *н*-пропанола в соотношении 90 : 10 : 0,45 (по объему). Смесь добавляли в камеру за 20 мин. до помещения в нее пластины. После того как фронт растворителя продвигался до конца слоя целлюлозы, пластины вынимали и 1—2 мин. сушили на воздухе. Пятна хлорофилловых пигментов расположены в следующей последовательности (от пятна нанесения): хлорофилл *b*, хлорофилл *a*, феофитин *a*. Феофитин *b* на хроматограммах нами не был обнаружен, и во всех опытах определяли только феофитин *a*, идентифицированный по спектру поглощения после накопления в серии опытов.

Окраска зоны феофитина обычно не видна из-за малого его количества, поэтому положение пятна отмечали, возбуждая флуоресценцию ультрафиолетовыми линиями ртути (365,5 *нм*). Для этого использовали осветитель «Ультрасвет» (типа УМ-1) со светофильтром УФС-4. Пятно феофитина *a*, всегда хорошо отделяющееся от пятен других пигментов, снимали с пластины скальпелем и элюировали 5 *мл* ацетона; раствор можно отфильтровать через стеклянный фильтр или осторожно слить

ацетон после полного оседания целлюлозы. При этом нельзя употреблять бумажный фильтр, так как из бумаги экстрагируются флуоресцирующие вещества. Окраска элюата не видна глазом, но при возбуждении ультрафиолетом наблюдается красная флуоресценция, интенсивность которой измеряли с помощью специальной приставки к спектрофотометру СФ-4. Для измерений может быть использован любой тип флуорометра, обладающий фотоумножителем, чувствительным в красной области спектра. Флуоресценцию возбуждали ультрафиолетовыми и синими линиями ртути (365, 404, 440 *нм*) осветителя ОИ-18 через светофильтр ФС-1 (340—460 *нм*). Перед фотоэлементом спектрофотометра устанавливали красный светофильтр КС-15, пропускающий свет в области максимумов флуоресценции феофитина (673 и 720 *нм*). Во всех опытах вводили поправку на «скрещенность» светофильтров и светорассеяние чистого растворителя. В каждом опыте проводили также контрольное измерение флуоресценции элюата пятна целлюлозы, не содержащего феофитина. Величину оптической плотности феофитина в элюате рассчитывали с помощью калибровочной кривой, полученной в результате измерения флуоресценции ацетоновых растворов с разной концентрацией хроматографически чистого феофитина, обладающих известной величиной оптической плотности при 667 *нм*. Для растворов, оптическая плотность которых не превышала 0,05, зависимость между поглощением и флуоресценцией была линейна в наших условиях измерения (рисунок); такие растворы использовали в качестве стандарта. Величина отсчета флуорометра на рисунке дана в виде разности отсчета раствора феофитина и контрольного раствора.



Флуоресценция феофитина *а* в зависимости от его концентрации в ацетоновом растворе

Ф — интенсивность флуоресценции в относительных единицах — отсчет флуорометра, *Д* — оптическая плотность раствора

Расчет процентного содержания феофитина по отношению к количеству хлорофилла, нанесенному на хроматограмму, проводили по формуле

$$\%\ \text{феофитина от количества хлорофилла} = \frac{D_ф \cdot 37B \cdot 100}{D_х \cdot 57A} = 65\frac{D_ф B}{D_х A},$$

где $D_х$ — оптическая плотность эфирного раствора, наносимого на хроматограмму, при 647 *нм* в кювете 1 *см*; $D_ф$ — оптическая плотность ацетонового элюата феофитина *а* с хроматограммы при 667 *нм* в кювете 1 *см*, определенная путем сравнения с флуоресценцией стандартного раствора феофитина *а*; 37 — коэффициент удельной экстинкции суммы хлорофиллов *а* и *b* в изобестической точке при 647 *нм* [14]; 57 — коэффициент удельной экстинкции феофитина *а* при 667 *нм* [15]; *А* — количество эфирного раствора (*мл*), нанесенного на хроматограмму; *В* — количество ацетона (*мл*), которым элюировали феофитин с хроматограммы.

Известно, что при хроматографировании в неблагоприятных условиях часть хлорофиллов разрушается и при этом образуется феофитин (см., например, [11]). Следовало проверить, не превращается ли хлорофилл в феофитин при хроматографировании в наших условиях. Для этого был использован хроматографически чистый свежеприготовленный раствор хлорофилла *а*. Пятно хлорофилла *а* с хроматограммы элюировали серным эфиром и снова наносили на хроматограмму. Эту операцию повторяли дважды и каждый раз определяли количество образующегося феофитина. Это количество не превышало 0,5% по отношению к хлорофиллу. Это указывает либо на то, что процедура опыта сопровождается некото-

рой феофитинизацией, либо на то, что в равновесии с хлорофиллом всегда есть некоторое количество феофитина.

Мы проводили определение феофитина в листьях гороха, фасоли, кукурузы и тополя в течение двух вегетационных сезонов. Количество феофитина в листьях (по отношению к сумме хлорофиллов), по нашим данным, колеблется в пределах 1,5—2,3%. Нам не удалось пока получить отчетливых данных о влиянии режима освещения листьев и хлоропластов на содержание в них феофитина.

Вопрос о физиологической роли феофитина в растениях нуждается в углубленном исследовании. Возможно, что содержание феофитина в листьях может быть показателем физиологического состояния растения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Докл. АН СССР, **91**, 421, 1948.
2. Красновский А. А., Пакшина Е. В. Докл. АН СССР, **148**, 935, 1963.
3. Пакшина Е. В., Красновский А. А. Биохимия, **29**, 1132, 1964.
4. Пакшина Е. В., Быстрова М. И., Красновский А. А. Молек. биол., **1**, 154, 1967.
5. Grinblatt C. L., Schiff J. A. J. Protozool., **6**, 23, 1959.
6. Шлык А. А., Баранов А. А., Махтюк М. Д., Русак Э. Н. Биохимия, **32**, 50, 1967.
7. Yench C. S. Deep-Sea Res., **12**, 653, 1965.
8. Kihara T., Frenkel A. W. In: Bacterial Photosynthesis, p. 115, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1963.
9. Garcia A., Vernon L. P., Mollenhauer H. Biochem., **5**, 2408, 1966.
10. Clayton R. K. Biochim. et biophys. acta, **75**, 312, 1963; in: Brookhaven Symposia in Biol., № 19, 62, 1966.
11. Bacon M. F. J. Chromatogr., **17**, 322, 1965.
12. Bacon M. F., Holden M. Phytochem., **6**, 193, 1967.
13. Мадаева О. С., Рыжкова В. К. Мед. пром-сть СССР, **1**, 44, 1963.
14. Comar C. L., Zscheile F. P. Plant Physiol., **17**, 198, 1942.
15. Tan C. T., Francis F. J. J. Food Sci., **27**, 263, 1962.

Поступила в редакцию
25.VII.1969

A FLUOROMETRIC METHOD FOR ASSAY OF PHEOPHYTIN IN PLANT LEAVES

A. A. KRASNOVSKY, M. G. SHAPOSHNIKOVA

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

A method for assay of pheophytin in higher plants is described in which thin layer chromatography is employed with subsequent measurement of fluorescence of the pheophytin eluate spots. The amount of pheophytin in leaves determined by this method varied between 1.5 and 2.3% of the total amount of chlorophylls $a+b$.

ОБЪЯВЛЕНИЕ

Академия наук СССР, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова и Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева проводят Тимирязевские ежегодные чтения.

На очередном 31-м Тимирязевском чтении, которое состоится 3 июня 1970 г. в Московском университете, выступит академик Я. В. ПЕЙВЕ с докладом: «Микроэлементы и биологическая фиксация молекулярного азота».

Тимирязевская комиссия

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 4 1970 Вып. 6

УДК 577.45

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ХЛОРОФИЛЛОМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОРОДА

А. Н. ЛУГАНСКАЯ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследовали реакции фотосенсибилизированного хлорофиллом и его аналогами восстановления метилвиологена, сафранина и метилового красного тиомочевиной, цистеином и аскорбиновой кислотой в водных растворах детергентов. Обнаружено, что в присутствии кислорода реакция восстановления красителей тиомочевиной идет значительно глубже, чем в вакууме. Скорость реакции увеличивается с возрастанием pH. В присутствии кислорода тиомочевина обратимо восстанавливает хлорофилл, приводя к образованию красной восстановленной формы, чего не наблюдается в вакууме. Глубокое восстановление красителя — акцептора электрона и хлорофилла в присутствии воздуха происходит с участием долгоживущих активных восстановителей, полученных при фотосенсибилизированном окислении донора электрона кислородом воздуха. Эти вещества в темновом акте реакции восстанавливают метилвиологен и другие красители. Предложен механизм исследованных реакций.

Хлорофилл и его аналоги являются фотосенсибилизаторами многих окислительно-восстановительных реакций, протекающих в растворах. В органических растворителях сенсибилизация обычно протекает в гомогенной среде, в то время как в хлоропластах пигмент работает на поверхности раздела липопротеидного комплекса и водной среды, в которой находятся другие компоненты реакции. Одним из шагов на пути моделирования таких процессов является использование в качестве среды водных растворов поверхностно-активных веществ. Хлорофилл и его производные нерастворимы в воде, тогда как в водных растворах детергентов эти пигменты солюбилизируются, давая прозрачные растворы, обладающие интенсивной флуоресценцией. В нашей лаборатории еще в 1948 г. было установлено, что водные растворы хлорофилла, полученные при помощи детергентов, обладают активностью при фотосенсибилизированном окислении аскорбиновой кислоты [1]; более детально этот вопрос изучен в работе [2]: наиболее активными оказались водные растворы пигментов, полученные при помощи неионогенных детергентов.

Использование виологенов в качестве конечных акцепторов электрона в реакциях этого типа позволило построить модель первой фотохимической системы фотосинтеза с заменой ферредоксина метилвиологеном (эти вещества обладают близкой величиной E_0' [3]); было показано фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена тиомочевиной и цистеином в органических растворителях [4] и водных растворах детергентов твин-80 и тритон X-100 [5]. Следует отметить, что хлоропласты восстанавливают на свету практически весь введенный метилвиологен [6—10], тогда как в растворах детергентов такая степень

восстановления не достигалась. Например, в опытах Массини и Вурм [11] в растворе анионного детергента с применением в качестве донора электрона фенилгидразина восстанавливалось не более 3,5% метилвиологена.

Описанные выше реакции проводили в анаэробных условиях, поскольку известно, что кислород является сильным окислителем, отнимающим электрон от восстановленного акцептора. Однако в нашей работе [12] было замечено значительное повышение глубины сенсибилизированного хлорофиллом восстановления метилвиологена и других красителей тиомочевиной в присутствии кислорода воздуха. Это явление, обнаруженное в водном растворе хлорофилла с детергентом тритоном X-100 и в спирто-глицериновых растворах, мы объяснили образованием сильных восстановителей при фотосенсибилизированном хлорофиллом окислении тиомочевины кислородом воздуха. Описанные наблюдения могли быть связаны с новым механизмом сенсибилизации. Они заставили нас исследовать роль кислорода в фотосенсибилизированных реакциях восстановления метилвиологена и других красителей различными донорами электрона.

МЕТОДИКА

Хлорофиллы *a* и *b* выделяли из крапивы обычным методом с многократным хроматографическим разделением пигментов на сахарозе на последней стадии выделения. Феофитин *a* получали обработкой эфирного раствора хлорофилла *a* 0,2 н. HCl с последующим отмыванием водой от кислоты, сушкой над прокаленным сернокислым натрием и выпариванием растворителя.

Солюбилизация пигментов в водном 0,5%-ном растворе детергента тритона X-100 достигалась введением концентрированных растворов пигментов в этиловом спирте (~0,1 *мл*) в 5 *мл* буферного 0,5%-ного раствора тритона X-100. Обычно конечная концентрация пигмента составляла 10^{-5} *M*. Критическая концентрация мицеллообразования тритона X-100 равна 10^{-3} *M* [13]. При концентрации детергента 10^{-2} *M*, обычно используемой в наших опытах, заведомо достигается критическая концентрация мицеллообразования. В работе использовали боратно-щелочной буфер и буфер из борной кислоты — буры. Когда требовалось установить pH раствора выше или ниже предельных значений интервалов данных буферов, растворы подщелачивали 0,01 н. NaOH или подкисляли 0,01 н. HCl.

Реакцию изучали параллельно в аэробных и анаэробных условиях. В опытах на воздухе в трубку сразу помещали все компоненты реакции: водный раствор детергента с солюбилизированным пигментом, донор и акцептор электрона. Опыты с откачиванием воздуха проводили в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений. В трубку вносили раствор детергента с пигментом и донором электрона, в «головку» трубки — раствор акцептора электрона. После откачивания трубки в течение 5 *мин* раствор красителя из головки трубки приливали к раствору детергента с остальными компонентами реакции. Далее трубку освещали светом кинолампы 300 *вт* (интенсивность 10^5 *эрг/см²·сек*) через конденсор и светофильтр КС-13. При освещении растворы термостатировали при 20°. За течением сенсибилизированного процесса следили по изменению поглощения в спектрах абсорбции красителя и пигмента.

В исследованных фотосенсибилизированных реакциях восстановленные красители (виологен, сафранин и другие) легко окисляются кислородом с регенерацией исходного красителя. Поэтому при проведении реакции на воздухе необходимо избегать встряхивания, покачивания и толчков реакционной смеси. Иными словами, нужно по возможности предохранять раствор от диффузии кислорода из воздуха в реакционную среду. При измерении кинетики реакции трубку с реакционной смесью переносили из осветительной системы в спектрофотометр, и эту процедуру неоднократно повторяли, что, естественно, приводило к некоторым погрешностям из-за диффузии кислорода из воздуха.

В качестве доноров электрона использовали тиомочевину, цистеин и аскорбиновую кислоту; пигментами-сенсибилизаторами служили хлорофилл *a* и *b* и феофитин *a*; конечными акцепторами электрона были: метилвиологен, сафранин и метиловый красный.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Тиомочевина. В вакууме фотосенсибилизированное хлорофиллом и его аналогами восстановление метилвиологена тиомочевиной протекает весьма неглубоко и медленно. Проводя фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена тиомочевиной в присутствии

воздуха и без перемешивания раствора при pH 10, мы наблюдали, что освещаемая зона в трубке постепенно приобретала синюю окраску восстановленного метилвиологена (рис. 1). При взбалтывании синяя окраска исчезала вследствие окисления восстановленного метилвиологена кислородом воздуха; освещение без взбалтывания приводило к повтор-

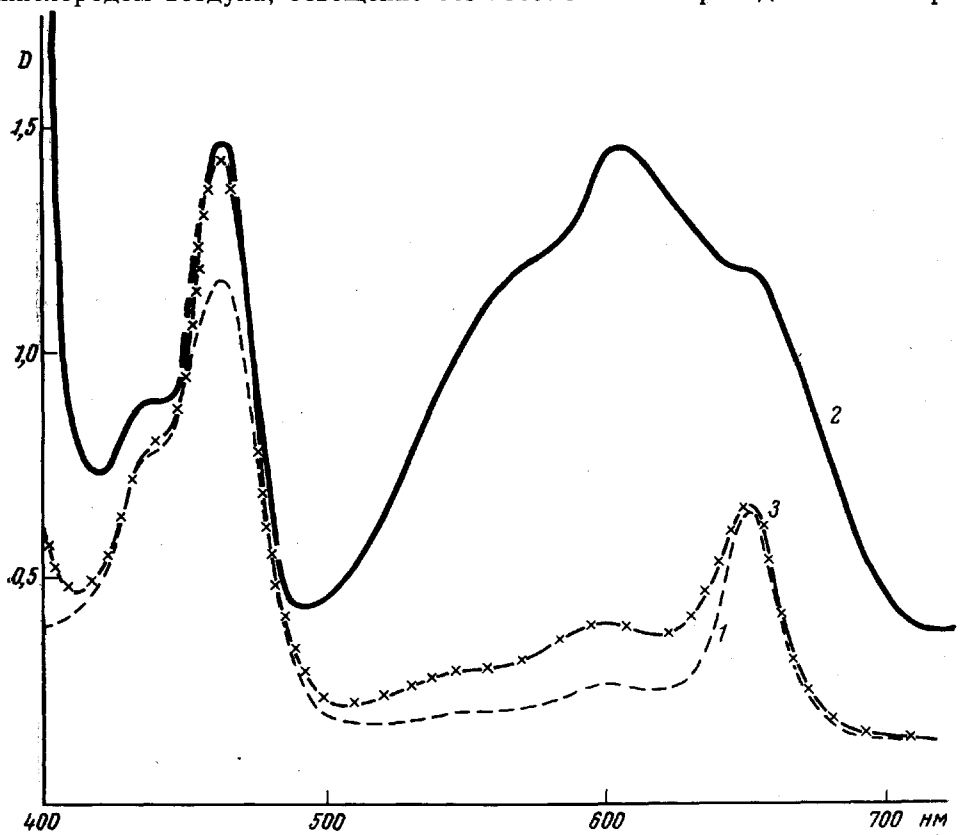


Рис. 1. Фотосенсибилизированное хлорофиллом *b* восстановление метилвиологена тиомочевиной в вакууме (*3*) и на воздухе (*2*)

5 *мл* хлорофилла в 0,5%-ном водном растворе тритона X-100; метилвиологен — 10^{-4} *М*, тиомочевина — 0,08 *М*. *1* — до освещения; *2*, *3* — после 25 *мин* освещения. Условия освещения здесь и на других рисунках: фильтр КС-13, 10^3 *эрг/см² · сек*

ному восстановлению акцептора. Этот цикл можно было повторять многократно. Те же явления наблюдались и в вязкой спирто-глицериновой среде (2 : 3). В спиртовом растворе из-за быстрой диффузии кислорода из воздуха в раствор реакция протекает хуже и спектрофотометрическая запись затруднена.

Трудно сомневаться в том, что в зоне освещения образуется бескислородная среда за счет энергично идущего сенсибилизированного восстановления кислорода тиомочевиной, протекающего с квантовым выходом, близким единице [14; 15]. Медленная диффузия кислорода через фазовую границу отстает от быстро идущей сенсибилизированной реакции окисления тиомочевины, и поэтому восстановление метилвиологена фактически протекает в анаэробных условиях. Однако возник вопрос, почему глубина реакции без откачивания воздуха была гораздо выше, чем в вакууме. Объясняя это явление, можно было предположить, что либо продукты фотохимического взаимодействия хлорофилла с тиомочевиной [14] являются более активными сенсибилизаторами, чем молекулы хлорофилла, либо при сенсибилизированном окислении тиомочевины кислородом воздуха образуется новый более активный донор электрона.

Производные хлорофилла *b*, образующиеся при реакции с тиомочевиной [16], окисляются под действием красного света медленнее, чем продукты хлорофилла *a*. Поэтому мы использовали именно хлорофилл *b* для исследования механизма процесса на воздухе.

После освещения раствора тиомочевины и хлорофилла *b* в присутствии воздуха пигменты извлекали диэтиловым эфиром, промывали водой, высушивали над Na_2SO_4 и переводили в спиртовый раствор, из

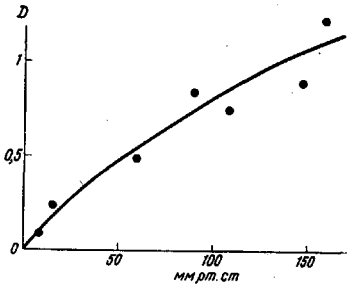


Рис. 2. Зависимость фотосенсибилизированного хлорофиллом *a* восстановления метилвиологена тиомочевиной в 0,5%-ном растворе тритона X-100 от парциального давления кислорода

Свет — красный; время освещения — 21 *мин*

которого далее солюбилизировались в водном растворе тритона X-100 как обычно. Мы нашли, что эти пигменты практически не отличаются по своей сенсибилизирующей активности от хлорофилла. Следовательно, первое предположение исключается.

Далее были разделены стадия фотохимического взаимодействия хлорофилла с тиомочевиной в присутствии воздуха и стадия восстановления метилвиологена в вакууме. Для этого вначале раствор тиомочевины с хлорофиллом освещали 20 *мин* красным светом на воздухе. Затем содержимое трубки откачивали масляным насосом и к уже откачанному раствору из головки трубки Тунберга в темноте добавляли раствор метилвиологена. При этом происходило быстрое посинение раствора, свидетельствующее о восстановлении акцептора. Таким образом, при сенсибилизированном окислении тиомочевины образуются долгоживущие активные восстановители, способные к темновому восстановлению метилвиологена. Эти восстановители сохраняются в вакууме в течение многих часов, но на воздухе окисляются и постепенно теряют способность к восстановлению метилвиологена.

К этой реакции были поставлены следующие контрольные опыты. При добавлении метилвиологена из головки трубки Тунберга к откаченному, но предварительно не освещенному в присутствии воздуха раствору хлорофилла с тиомочевиной, восстановления метилвиологена не наблюдается. Пребывание в течение 1 *час* в темноте также не приводит к восстановлению красителя. Освещение этой системы вызывало фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена в вакууме, которое, как отмечалось, протекает весьма неглубоко. Если в трубку впустить некоторое количество кислорода и после этого снова освещать раствор, глубина восстановления метилвиологена значительно увеличивается. На рис. 2 показана зависимость глубины фотосенсибилизированного хлорофиллом *a* восстановления метилвиологена тиомочевиной от парциального давления кислорода. Восстановление метилвиологена увеличивается с возрастанием количества кислорода в трубке.

После того как было установлено влияние кислорода на реакцию, приступили к сравнительному исследованию реакции с различными пигментами-сенсибилизаторами.

Хлорофилл a. Прежде всего исследовали влияние pH на восстановление в аэробной и анаэробной средах. Нижний предел значений pH, при котором удается измерить реакцию фотосенсибилизированного восстановления виологена, равен 8,5. В более кислых средах реакцию наблю-

дать не удается. С увеличением pH среды скорость реакции возрастает (рис. 3); при pH 12 наблюдается разрыв циклопентанонового кольца хлорофилла, о чем свидетельствует появление плеча в спектре поглощения пигмента при 645 *нм*. Хотя это явление и не мешало фотосенсибилизированному восстановлению виологена, мы не увеличивали pH раствора далее, поскольку известно, что сильнощелочные среды, кроме воздействия на пигмент, способствуют темновому восстановлению метилвиологена [17]. Ставили контрольные опыты по восстановлению метилвиологена в той же среде, но в отсутствие донора электрона. До pH 11 в вакууме не наблюдается повышение оптической плотности в максимуме поглощения восстановленного метилвиологена при 610 *нм*; при pH 12 это

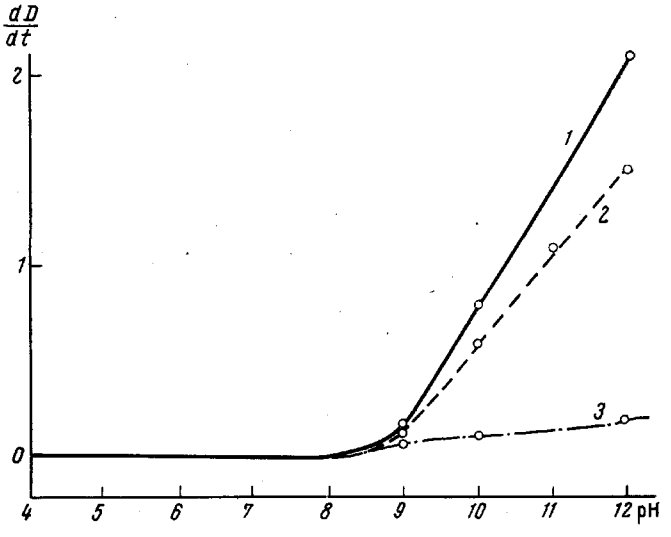


Рис. 3. Скорость восстановления метилвиологена тиомочевиной в зависимости от pH раствора на воздухе (*1*, *2*) и в вакууме (*3*)

Время освещения 1 *мин*. *1* — с хлорофиллом *а*; *2* — с феофитином *а*; *3* — с хлорофиллом *а*

повышение пренебрежимо мало по сравнению с наблюдаемым в присутствии тиомочевины. На воздухе без донора электрона при pH 12 наблюдается выцветание хлорофилла без восстановления метилвиологена.

Фотохимическое восстановление хлорофилла тиомочевиной ранее не отмечалось [16]. Мы также не обнаружили восстановления хлорофилла тиомочевиной в вакууме в диапазоне pH от 8 до 12. Однако в присутствии воздуха при значениях pH 8,5—12 наблюдается отчетливое фотовосстановление хлорофилла тиомочевиной с образованием красной формы с максимумом при 530 *нм*. Особенно четкая картина наблюдается при pH 10 (рис. 4).

Может возникнуть вопрос, не восстанавливается ли метилвиологен именно восстановленной формой хлорофилла. Последняя является весьма лабильным соединением, легко окисляющимся кислородом. В наших опытах наблюдение красной формы оказалось возможным потому, что кислород, находящийся в растворе детергента, локально расходуется в ходе сенсибилизированного окисления тиомочевины и не пополняется с достаточной скоростью путем диффузии из воздуха. Если пробирку с восстановленным хлорофиллом встряхнуть в присутствии воздуха, красная форма превращается в исходный пигмент (рис. 4, *3*). То же самое происходит и в процессе откачивания трубки Тунберга с восстановленной формой хлорофилла. До откачивания в трубке над раствором находится воздух. Во время откачивания трубку энергично

встряхивают, что способствует диффузии еще не откаченного кислорода в реакционную среду, где он успевает окислить восстановленный хлорофилл. Если после откачивания из головки прилить метилвиологен, то, хотя красной формы хлорофилла уже нет, наблюдается восстановление красителя. Этот опыт показывает, что восстановление метилвиологена осуществляется не через красную и тем более не через первичную восстановленную форму хлорофилла, поскольку первичная форма окисляется еще быстрее [18].

Следует отметить, что при восстановлении метилвиологена в вакууме при pH более щелочных, чем pH 9, наблюдается довольно значительный (3—4 *нм*) сдвиг красного максимума хлорофилла в коротковолновую

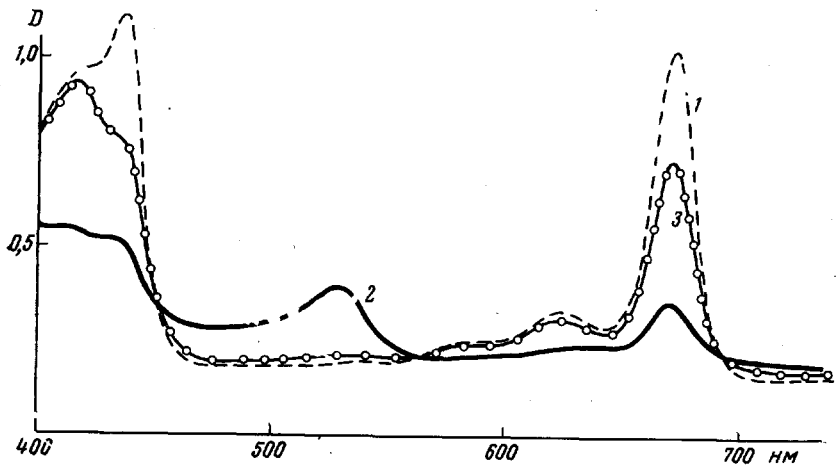


Рис. 4. Образование красной фотовосстановленной формы хлорофилла *а* при фотосенсибилизированном окислении тиомочевины кислородом воздуха в тритоне X-100

Освещение красным светом. *1* — до освещения; *2* — после 15 *мин* освещения; *3* — после взбалтывания с воздухом

сторону. При реакции на воздухе вплоть до pH 11 этот сдвиг не превышает 1 *нм*, и только при pH 12 наблюдается рост максимума при 645 *нм*, указывающий на разрыв циклопентанонового кольца молекулы хлорофилла. Выход фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена тиомочевиной в вакууме значительно ниже, чем квантовый выход фотосенсибилизированного окисления тиомочевины кислородом воздуха. В последнем случае молекула хлорофилла претерпевает значительно больше циклов превращения при переносе электрона от тиомочевины к кислороду; возможно, быстрая «обращаемость» хлорофилла на воздухе и является причиной защиты молекулы пигмента от действия щелочной среды.

Кроме метилвиологена мы испытывали и другие акцепторы электрона: сафранин, рибофлавин, метиловый красный. С этими красителями наблюдаются те же закономерности, что и с метилвиологеном (значительно большая глубина реакции на воздухе по сравнению с вакуумом и увеличение скорости восстановления на воздухе с повышением pH среды). После окончания восстановления сафранина, о чем говорит падение его максимума поглощения при 538 *нм*, начинает восстанавливаться пигмент-сенсибилизатор. Появление красной восстановленной формы хлорофилла только после восстановления красителя можно объяснить тем, что скорость восстановления пигмента ниже скорости восстановления акцептора новым восстановителем, получающимся из тиомочевины.

Хлорофилл b и феофитин a. Фотосенсибилизируемое этими пигментами восстановление метилвиологена в вакууме пренебрежимо мало по сравнению с восстановлением на воздухе. Кинетика восстановления метилвиологена в присутствии кислорода при различных pH среды представлена на рис. 5 (сенсибилизатор — хлорофилл *b*). С этим пигментом наблюдалась та же картина, что и с хлорофиллом *a*: значительно большая глубина восстановления метилвиологена тиомочевиной по сравнению с реакцией в вакууме, увеличение скорости реакции с возрастанием pH среды, такой же интервал значений pH (8,5—12), способствующий протеканию реакции на воздухе. Аналогичные данные получаются и при использовании феофитина *a*.

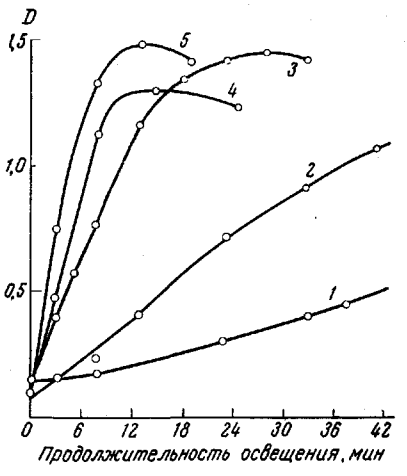


Рис. 5. Кинетика фотосенсибилизированного хлорофиллом *b* восстановления тиомочевиной метилвиологена на воздухе в водном растворе тритона X-100 при различных значениях pH

1—8,5; *2*—9; *3*—10; *4*—11; *5*—12

Красный максимум хлорофилла *b* при реакции в вакууме сдвигается на 3—4 *нм* в коротковолновую сторону, тогда как при реакции на воздухе длинноволновый максимум поглощения пигмента не меняет своего положения до pH 11 включительно. У феофитина же наблюдается сдвиг красного максимума поглощения в сторону коротких волн на 3—4 *нм* при реакции не только в вакууме, но и на воздухе.

С хлорофиллом *b* и феофитином *a* не удалось получить четких спектров поглощения восстановленных форм пигментов; наблюдались лишь обратимые изменения в длинноволновом максимуме поглощения после освещения раствора на воздухе и при последующем встряхивании.

Цистеин. Реакция восстановления метилвиологена цистеином, сенсибилизированная хлорофиллом *a*, протекает довольно глубоко как в вакууме, так и на воздухе. Конечная глубина восстановления метилвиологена в вакууме превышает глубину восстановления в присутствии воздуха. Интервал значений pH, где происходит восстановление, составляет 6,5—12 на воздухе и 5,5—12 в вакууме. На первый взгляд, восстановление метилвиологена на воздухе протекает по обычному механизму, без участия кислорода, лишь вначале он расходуется в реакции сенсибилизации из реакционной среды при окислении цистеина. Если это так, то следует ожидать более низкой скорости в первые минуты восстановления метилвиологена на воздухе (по сравнению со скоростью восстановления в вакууме), поскольку вначале необходимо было бы выбрать кислород из реакционной среды. Однако при кинетическом рассмотрении реакции обращает на себя внимание иное явление: скорость восстановления метилвиологена в присутствии воздуха в первые минуты освещения больше скорости реакции в условиях вакуума в интервале pH 7—12 (рис. 6). Это возможно только в том случае, если механизмы реакции на воздухе и в вакууме различны. Большая скорость реакции на воздухе позволяет предположить и в этом случае образование более сильных восстановителей при сенсибилизированном окислении цистеина кислородом воздуха.

При освещении хлорофилла с цистеином в вакууме при pH 7—9 красный максимум пигмента сдвигается в коротковолновую сторону на 5 *нм*, а при pH 10—12 необратимо образуется плечо при 640 *нм*, вероятно, за счет разрыва циклопентанонового кольца молекулы пигмента. На воздухе сдвиг красного максимума хлорофилла отсутствует. Восстановле-

ния пигмента цистеином в растворе детергента в вакууме наблюдать не удалось. На воздухе же хлорофилл *а* восстанавливается при pH 10—12. Таким образом, восстановление метилвиологена и самого сенсибилизатора протекает различно в анаэробных и аэробных условиях, что обусловливается, по-видимому, разными механизмами восстановления.

Восстановление сафранина наблюдается при pH 7—12 на воздухе и 6—12 в вакууме. Как и с метилвиологеном, в первые минуты освещения скорость реакции на воздухе больше скорости реакции в вакууме.

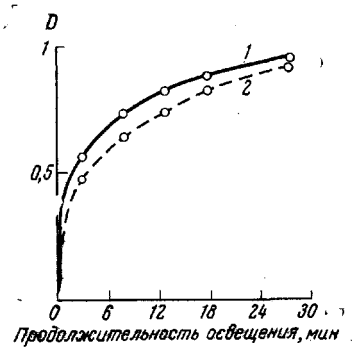


Рис. 6. Кинетика фотосенсибилизированного хлорофиллом *а* восстановления метилвиологена цистеином в водном растворе 0,5%-ного тритона X-100 (pH 12) на воздухе (*1*) и в вакууме (*2*)

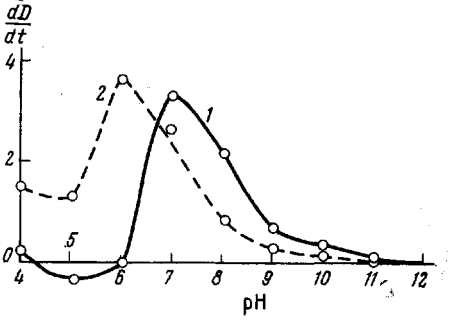


Рис. 7. Скорость фотосенсибилизированного хлорофиллом *а* восстановления метилового красного в 0,5%-ном тритоне X-100 в зависимости от pH

1 — на воздухе; *2* — в вакууме. Свет красный; время освещения — 2 *мин*

Область pH, в которой происходит восстановление метилового красного, сдвинута в сторону более кислых значений — реакция протекает при pH 4—11. Максимум скорости реакции в первые минуты освещения наблюдается при pH 7 на воздухе и при pH 6 в вакууме (рис. 7). В области щелочных pH восстановление метилового красного протекает на воздухе с большей скоростью, чем в вакууме. Резкое падение скорости сенсибилизированного восстановления метилового красного в присутствии воздуха в кислой среде может объясняться отсутствием сенсибилизированного окисления цистеина кислородом в этом районе pH. Напомним, что и в случае с тиомочевиной реакциям восстановления в присутствии воздуха способствовали щелочные среды. Следует учесть, что при этом увеличивается количество неактивной формы метилового красного. (Указанный краситель, как известно, существует в трех формах, кислотно-основное равновесие между которыми изменяется с изменением pH [19].) Вследствие этого оптимальной для протекания реакции сенсибилизированного восстановления метилового красного является область pH 6—8.

Зависимость скорости фотосенсибилизированного феофитином восстановления метилового красного различными восстановителями от pH среды в спиртовом растворе в вакууме изучали в работе [20]. В наших опытах зависимость скорости реакции от pH отличается от найденной в работе [20], что можно объяснить неодинаковым влиянием pH среды на электронодонорные свойства применяемых восстановителей. Следует, однако, отметить, что нас здесь интересует главным образом сравнительная характеристика механизма восстановления метилового красного цистеином в вакууме и на воздухе.

Обращает на себя внимание следующее явление. При pH 5 и 6 восстановление метилового красного сопровождается образованием плеча с

длинноволновой стороны красного максимума хлорофилла при 700 *нм* в вакууме и на воздухе. При реакции на воздухе при pH 5—6 и 9—11 и в вакууме при pH 9—11 отмечается индукционный период (1—2 *мин*), во время которого наблюдается значительное падение красного максимума хлорофилла. С началом восстановления акцептора длинноволновый максимум пигмента падает медленнее. Кроме того, реакция сопровождается смещением красного максимума поглощения хлорофилла на 4—6 *нм* в сторону коротких длин волн в области pH 4—8. Эти явления могут свидетельствовать об образовании комплекса хлорофилла с метиловым красным или цистеином [21]. При этом перенос электрона может происходить внутри молекулярного комплекса пигмента с соответствующими окислителем и восстановителем, существующими или до воздействия света [22], или возникающими после поглощения кванта света [23]. Последнее, вероятно, и имеет место при восстановлении метилового красного цистеином в растворе тритона X-100.

Замечательно в этой реакции то, что после того, как весь краситель сенсибилизированно восстановлен, хлорофилл подвергается фотовосстановлению много лучше, чем в отсутствие метилового красного. Спектрофотометрическое обнаружение красной формы пигмента возможно уже при pH 7—11, но особенно четкий спектр восстановленного хлорофилла наблюдается при pH 8. При встряхивании с воздухом розовая окраска раствора переходит в зеленую с регенерацией хлорофилла.

Аскорбиновая кислота. В наших условиях хлорофилл *а* практически не восстанавливает метилвиологен в присутствии аскорбиновой кислоты в вакууме вплоть до pH 12, где появляется слабая синяя окраска восстановленного метилвиологена. Это темновое восстановление обусловлено повышением окислительно-восстановительного потенциала аскорбиновой кислоты в этих условиях [24] и действием щелочи на метилвиологен [17]. На воздухе восстановления метилвиологена не наблюдалось.

Сафранин весьма слабо восстанавливался аскорбиновой кислотой, причем в вакууме достигалась бóльшая глубина фотосенсибилизированного восстановления, чем в присутствии воздуха.

Фотосенсибилизированное восстановление метилового красного наблюдалось в области pH 4—10. С увеличением pH скорость восстановления понижалась, а в кислом растворе она была так велика, что для изучения кинетики процесса пришлось применять нейтральные светофильтры. Реакция имеет индукционный период, который на воздухе больше, нежели в вакууме. При одном и том же pH скорость реакции в вакууме превышает скорость реакции в присутствии кислорода. Вслед за полным восстановлением красителя аскорбиновая кислота, подобно предыдущим донорам, обратимо восстанавливает пигмент, причем это восстановление в вакууме идет быстрее, чем на воздухе.

С аскорбиновой кислотой нам не удалось наблюдать эффект увеличения глубины и скорости фотосенсибилизированного восстановления красителей на воздухе по сравнению с реакциями в вакууме. В связи с этим следует указать на опыты Гуревича, в которых под действием молекулярного кислорода или перекиси водорода, в присутствии ионов Cu^{2+} или Fe^{2+} как катализаторов значительно ускоряется реакция восстановления *о*-динитробензола аскорбиновой кислотой [25; 26]. Это явление автор объяснил тем, что при активированном окислении донора (аскорбиновой кислоты) кислородом возникают свободные радикалы, которые с большей эффективностью восстанавливают акцептор, чем первоначальный восстановитель. Однако в наших опытах при фотосенсибилизированном хлорофиллом окислении аскорбиновой кислоты не удалось наблюдать восстановления метилвиологена и других красителей, хотя при фотовосстановлении хлорофилла было обнаружено образование радикала монодегидроаскорбиновой кислоты (AH_2^+) методом ЭПР [27].

Вероятно, эти радикалы являются значительно менее устойчивыми по сравнению с продуктами сенсибилизированного окисления тиомочевины и цистеина, и вследствие обратной реакции окисления $АН_2^+$ кислородом они не успевают прореагировать с акцептором электрона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно общепринятым представлениям [19; 28; 29], пигмент, поглотивший квант света и находящийся в синглетном или триплетном возбужденном состоянии, реагирует с одним из партнеров окислительно-восстановительной реакции, отдавая или принимая от него электрон, в результате чего образуется пара ион-радикалов. Далее ион-радикал пигмента вступает во взаимодействие с другим партнером реакции и превращается в исходный пигмент. В конечном итоге образуются восстановленный акцептор электрона, окисленный донор электрона и пигмент-сенсибилизатор, возвращенный в исходное состояние. Характер первичных фотохимических реакций пигмента, в частности, определяется рядом факторов: природой и кислотно-основным равновесием среды, способностью реагирующих веществ к комплексообразованию и пр.

Таким образом, хлорофиллу отводится роль непосредственного переносчика электронов от донора к акцептору независимо от типа первичной фотореакции возбужденной молекулы хлорофилла. Дальнейшая судьба продуктов фотопревращения акцепторов и доноров электрона до сих пор не привлекала достаточного внимания. Считалось, что в результате ряда последовательных превращений эти фотопродукты переходят в устойчивые соединения, не влияющие в дальнейшем на ход реакций, сенсибилизированных хлорофиллом и его аналогами. Результаты данной работы показывают возможность протекания фотосенсибилизированных реакций и по иному механизму, т. е. с участием продуктов фотоокисления акцептора электрона.

Было установлено, что восстановление метилвиологена и других красителей тиомочевиной в присутствии кислорода происходит за счет образования соединений, обладающих более сильными восстановительными свойствами, чем исходный донор электрона; активные соединения получаются в результате фотосенсибилизированного окисления тиомочевины кислородом воздуха. Эта реакция была изучена давно в работах Гаффрона и Варбурга [14; 15]. При исследовании сенсибилизированного протопорфиринами окисления тиомочевины кислородом Шенк и Вирт [30] идентифицировали в качестве конечных продуктов сульфиновые кислоты, которые далее могут окисляться кислородом до серной кислоты и цианамида; без сенсибилизатора при освещении ультрафиолетовым светом кислород окисляет тиомочевину до серной кислоты и цианамида. Возможно, какое-нибудь промежуточное соединение этой реакции или сама сульфиновая кислота и являются восстановителями в нашем случае. Восстановление красителей в присутствии кислорода только в щелочных средах указывает, что либо фотосенсибилизированное окисление донора кислородом не идет в кислых средах, либо щелочные среды способствуют стабилизации этих новообразованных восстановителей.

Исходя из изложенного, можно предположить следующий механизм исследованных реакций: возбужденная светом молекула хлорофилла, вероятно, в триплетном состоянии ($Хл^т$) первоначально реагирует с кислородом, образуя «мольоксид» хлорофилла ($ХлО_2$), который далее взаимодействует с донором электрона, давая продукт его фотосенсибилизированного окисления ($Д_{ox}$). Затем в темновом акте реакции $Д_{ox}$ реагирует с метилвиологеном, восстанавливая его в темновой реакции:

$$Хл \rightarrow Хл^т, \quad (1)$$

$$Хл^т + O_2 \rightarrow \cdot ХлО_2 \cdot, \quad (2)$$

$$\cdot \text{ХлО}_2 \cdot + \text{Д} \rightarrow \text{Хл} + \text{Д}_{ox}, \quad (3)$$

$$\text{Д}_{ox} + \text{МВ} \rightarrow \text{МВ}^- + \text{Д}_{ox}^+. \quad (4)$$

Мы не смогли получить прямых доказательств тому, что на воздухе реакция с цистеином протекает аналогично реакции с тиомочевиной (прямые опыты с разделением световой и темновой стадий процесса осуществить не удалось). Как уже отмечалось, вещества, получаемые при сенсибилизированном окислении цистеина кислородом, являются более лабильными, чем у тиомочевины, и быстрее окисляются кислородом. Однако более высокая скорость восстановления красителей в первые минуты освещения дает основание полагать, что и в случае цистеина мы имеем дело с появлением более сильных восстановителей, чем исходный донор. При этом наиболее вероятна параллельная работа двух механизмов — наряду с образованием более сильных восстановителей реакция может протекать по обычному механизму, согласно которому возбужденный хлорофилл может фотовосстанавливаться донором или фотоокисляться метилвиологеном. В этом случае в дополнение к реакциям, протекающим в присутствии кислорода (1)—(4), существует следующий набор возможных реакций:

$$\text{Хл}^т + \text{Д} \rightarrow \cdot \text{Хл}^- + \cdot \text{Д}^+, \quad (5)$$

$$\text{Хл}^т + \text{МВ} \rightarrow \cdot \text{Хл}^+ + \cdot \text{МВ}^-. \quad (6)$$

Далее ион-радикалы хлорофилла могут переносить электрон на акцептор или воспринимать электрон от донора:

$$\text{Хл}^- + \text{МВ} \rightarrow \text{Хл} + \text{МВ}^-, \quad (7)$$

$$\text{Хл}^+ + \text{Д} \rightarrow \text{Хл} + \text{Д}^+. \quad (8)$$

Следующие комбинации реакций ведут к затуханию реакции восстановления:

$$\text{Хл}^+ + \text{МВ}^- \rightarrow \text{Хл} + \text{МВ}, \quad (9)$$

$$\cdot \text{Хл}^- + \cdot \text{Д}^+ \rightarrow \text{Хл} + \text{МВ}, \quad (10)$$

$$\cdot \text{МВ}^- + \cdot \text{Д}^+ \rightarrow \text{МВ} + \text{Д}. \quad (11)$$

Существует конкуренция кислорода с метилвиологеном за электрон:

$$\text{Д}_{ox} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Д}_{ox} + \text{O}_2^-, \quad (12)$$

$$\text{МВ}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{МВ} + \text{O}_2^-. \quad (13)$$

И, наконец, хлорофилл восстанавливается новым восстановителем:

$$\text{Хл}^т + \text{Д}_{ox} \rightarrow \cdot \text{Хл}^- + \cdot \text{Д}_{ox}^-. \quad (14)$$

Кроме того, восстановление акцептора и пигмента может идти через комплексы пигмента с донором, акцептором и веществом, полученным при сенсибилизированном окислении донора кислородом. Результат конечной фотосенсибилизированной реакции зависит от сложного переплетения скоростей указанных выше реакций. Далее следует иметь в виду, что при фотохимических реакциях в детергентах пигменты и прочие компоненты реакции связаны с мицеллой детергента, тогда как доноры водорода и кислород поступают из водной фазы. Скорость реакции зависит от расположения молекул пигмента, донора и акцептора электрона по отношению друг к другу, что обусловлено, в свою очередь, мицеллообразующими и солюбилизирующими свойствами самого детергента [29]. Таким образом, реакция на воздухе имеет сложный характер, зависящий от многих факторов, одним из которых является диффузия кислорода из воздуха в объем растворителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР **63**, 163, 1948
2. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия **22**, 776, 1957
3. Kok B., Rurainski H. J., Owens O. V. H., Biochim. et biophys. acta **109**, 347, 1965.
4. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР **163**, 761, 1965
5. Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР **174**, 221, 1967
6. Zweig G., Avron M., Biochem. and Biophys. Res. Communs **19**, 397, 1965
7. Arnon D., Photosynthetic Mechanism of Green Plants, p. 195, «Intersciens», N. Y., 1963
8. Good N., Hill R., Arch. Biochem. and Biophys. **57**, 355, 1955
9. Black C. C., Biochim. et biophys. acta **120**, 332, 1966
10. Vernon L. P., Acta chem. Scand. **15**, 1651, 1962
11. Massini P., Voorn G., Biochim. et biophys. acta **153**, 589, 1968
11. Красновский А. А., Луганская А. Н., Докл. АН СССР **183**, 1441, 1968
13. Шенфельд Н., Неионогенные моющие средства, стр. 149, «Химия», М., 1965
14. Gaffron G., Ber. **60**, 755, 1927
15. Warburg O., Shochen V., Arch. Biochem. **21**, 363, 1949
16. Красновский А. А., Сапожникова И. М., Докл. АН СССР **169**, 695, 1966
17. Gorwin A. H., Arellano R. R., Chivvis A. B., Biochim. et biophys. acta **162**, 533, 1968
18. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР **114**, 1066, 1957
19. Seely G. R., in: The Chlorophylls, Acad. Press, N. Y., 1965
20. Евстигнеев В. Б., сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 66, «Наука», М., 1965.
21. Livingston R., Parieser R. L., J. Amer. Chem. Soc. **70**, 1510, 1948
22. Дилунг И. И., Карпитская В. Е., Докл. АН СССР **152**, 367, 1963
23. Красновский А. А., Успехи химии **29**, 736, 1960
24. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Биофизика **10**, 770, 1965
25. Гуревич А. А., Голосова Н. А., Докл. АН СССР **126**, 1125, 1959
26. Гуревич А. А., Докл. АН СССР **145**, 443, 1962
27. Бубнов Н. Н., Красновский А. А., Умрихина А. В., Цепалов В. Ф., Шляпинтох В. Я., Биофизика **5**, 121, 1960
28. Красновский А. А., сб.: Элементарные фотопроцессы в молекулах, стр. 213, «Наука», М.— Л., 1966
29. Евстигнеев В. Б., сб.: Элементарные фотопроцессы в молекулах, стр. 243, «Наука», М.— Л., 1966
30. Schenk G. O., Wirth H., Naturwiss. **40**, 141, 1953
31. Шинода К., Накагава Т., Тамамуси Б., Исемура Т., Физико-химические свойства поверхностно-активных веществ, «Мир», М., 1966

Поступила в редакцию
31.X 1969

STUDY OF THE MECHANISM OF CHLOROPHYLL-PHOTOSENSITIZED REDOX REACTION IN THE PRESENCE OF OXYGEN

A. N. LUGANSKAYA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

Chlorophyll-photosensitized redox reactions were studied in water-detergent solutions. Thiourea, cysteine and ascorbic acid were used as electron doners; methylviologen, safranine and methyl red — as acceptors of electrons. In the presence of oxygen (without stirring of the reaction mixture) the photosensitized reduction of dyes proceeds deeper than in anaerobic conditions. Active reductants were formed in the course of photosensitized oxidation of initial electron donors; these reductants are able to reduce electron acceptor dyes in the dark stage of the reaction. The hypothetic mechanism of reactions studied is proposed.

ХРАНЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ СТРУКТУР БЕЗ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ОСНОВНЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

Р. М. Бекина, А. А. Красновский

(Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва)

На протяжении последних лет внутриклеточные структуры как животного, так и растительного происхождения стали объектом интенсивных биохимических исследований. Значительные успехи в области биохимии фотосинтеза достигнуты в исследованиях с внутриклеточными фотосинтезирующими структурами.

В связи с широким использованием изолированных хлоропластов в качестве объекта для изучения фотосинтеза возник вопрос о возможности их сохранения. Не требуют специальных доказательств очевидные преимущества условий работы, при которых исследователь сможет располагать в любое время года достаточным количеством однородного биологического материала с постоянной биохимической активностью.

Такой распространенный способ консервации, как замораживание и хранение при низкой температуре, был применен к хлоропластам с целью сохранить их фотохимическую активность. В нашей лаборатории был использован метод хранения хлоропластов сахарной свеклы в виде суспензии в фосфатном буфере (pH 6.5), замороженной в жидком воздухе или жидком азоте [1, 2]. При таком способе хранения в течение 13 дней (более длительные сроки не исследовались) хлоропласты после размораживания обнаруживали такую же активность реакции Хилла, как и свежевыделенные структуры.

Дюан и Крогман [3] сообщили, что хлоропласты шпината полностью сохраняют в течение 1 мес. активность реакции Хилла и фотофосфорилирование, если суспензия хлоропластов в 0.4 М сахарозе быстро замораживалась и затем хранилась при —196°. Быстрое замораживание и оттаивание является, по данным авторов, обязательным условием сохранения активности, поэтому замораживание проводилось небольшими порциями (примерно 1 мл) в закрытом вращающемся цилиндре в смеси ацетона и сухого льда. Цилиндр с замерзшей в виде тонкой пленки суспензией хранился затем в жидком азоте. Аналогичным образом осуществлялось и размораживание: вращающийся цилиндр погружался на короткое время (5 сек.) в водяную баню с температурой 35°, и процедура повторялась несколько раз до полного оттаивания суспензии.

Многочисленные поиски оптимальных условий длительной консервации биологического материала, сохраняющего жизнеспособность, показали необходимость совместного использования низкой температуры и защитных веществ, предотвращающих повреждающее действие замораживания [4, 5]. При консервации различных тканей и органов холодом широко используются такие защитные вещества, как глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и др. [6, 7].

Пекер и Бернард [8] применили глицериновую среду для хранения хлоропластов шпината при —20°. Препарат хлоропластов при этой температуре сохраняет в течение некоторого периода основные фотохимические функции, в том числе фотофосфорилирование. Так, к концу недельного срока хранения активность фотофосфорилирования составляла 50% от исходной. Если в среде отсутствовал глицерин, то уже через 24 часа происходила полная потеря активности. Авторы показали также, что устойчивость различных фотохимических систем при хранении хлоропластов при —20° в глицериновой среде неодинакова. Наиболее лабиль-

ным оказался процесс фотохимического образования АТФ. Затем в порядке возрастания устойчивости идет процесс фотогидролиза АТФ, способность к конформационным изменениям и к фотовосстановлению НАДФ.

В настоящей работе исследовалась сохранность наиболее лабильной функции хлоропластов — фотосинтетического фосфорилирования, а также активность реакции Хилла при длительном хранении препаратов хлоропластов в водно-глицериновой среде при различном температурном режиме. В этих же условиях исследовалась сохранность фотофосфорилирующей функции хроматофоров, выделенных из фотосинтезирующих бактерий.

Хлоропласты изолировались из 10—14-дневных проростков гороха сорта Победитель. Горох выращивался в условиях водной культуры на калийной питательной смеси следующего состава (в %): $Ca(NO_3)_2$ — 0.005, KNO_3 — 0.03, CaH_2PO_4 — 0.008, $MgSO_4$ — 0.006, железо лимонно-аммиачное — 0.004, H_3BO_3 — 0.00002, $MnSO_4$ — 0.00003 [9]. Хлоропласты выделялись при охлаждении до 1—5° в 0.35 М растворе NaCl и 0.2 М трис-HCl буфере pH 7.8 (среда I) по несколько видоизмененному методу Уотлей и Арнона [10]. Кроме этой среды выделение проводилось по той же схеме в среде, которую применяли Пекер и Бернард [8]: 0.35 NaCl, 0.02 М ЭДТА и 0.4 М фосфатный буфер pH 7.5 (среда II). Обычно хлоропласты выделялись из 500 г проростков. Проростки растирались в фарфоровой ступке с 1100 мл измельчающей среды I (соотношение растворов NaCl и трис-HCl буфера 10 : 1) или 1000 мл среды II. Растертая масса отжималась через полотно, и фильтрат центрифугировался при 200 g 1 мин. Осадок отбрасывался, а из центрифугата хлоропласты осаждались при 1000 g в течение 7 мин. Осадок хлоропластов промывался один раз 500 мл 0.35 М NaCl или среды II и вновь осаждался при 1000 g 7 мин. Полученный таким образом осадок хлоропластов суспендировался в 9 объемах раствора, содержащего 50% глицерина, 0.125 М KCl и 0.02 М трис-HCl буфера pH 7.5 [8].

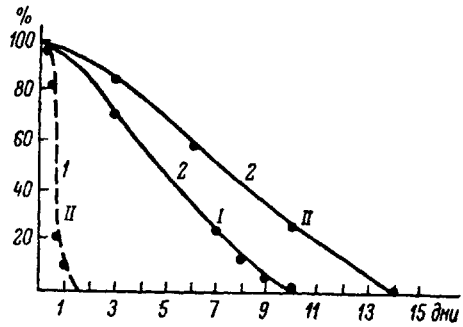
Препарат хроматофоров 6-дневной культуры *Rhodospirillum rubrum* был любезно предоставлен нам Е. Н. Кондратьевой и В. Самуиловым. Хроматофоры *R. rubrum* суспендировались так же, как и хлоропласты, в 9 объемах раствора, состав которого приведен выше.

Суспензия «глицериновых» хлоропластов хранилась при трех температурах: —20°, —79° (сухой лед) и —196° С (жидкий азот). Суспензия «глицериновых» хроматофоров хранилась только при —196°. В случае хранения при температуре —20 и —79° суспензия сразу же после получения разливалась небольшими порциями (1 мл) в пробирки и помещалась, соответственно, в холодильник или в сухой лед. Для хранения при —196° суспензия спускалась из пипетки в сосуд Дюара с жидким азотом, в котором она мгновенно застывала в виде небольших шариков. Перед опытом замерзшая суспензия структур (—79 и —196°) извлекалась из сосуда Дюара в необходимых количествах и размораживалась при комнатной температуре.

Реакция фотофосфорилирования проводилась в конических колбах емкостью 25 мл в водяном термостате при постоянном перемешивании проб. Для этой цели использовался аппарат Варбурга. При определении реакции фотофосфорилирования с хлоропластами инкубационная смесь содержала суспензию «глицериновых» хлоропластов, которая разводилась перед опытом 0.035 М раствором NaCl со следующими компонентами (в мкМ): трис-HCl буфер pH 7.6—7.8 — 40, АДФ-Na-соль — 5, K_2HPO_4 — 5, $MgCl_2$ — 2.5, аскорбат Na — 5, феназинметасульфат (ФМС) — 0.03. При работе с хроматофорами инкубационная смесь содержала суспензию «глицериновых» хроматофоров и следующие компоненты (в мкМ): трис-HCl буфер pH 7.6—7.8 — 40, K_2HPO_4 — 7.5, $MgCl_2$ — 5, аскорбат Na — 1,

NaF — 30, ФМС — 0.1, АТФ — 3, глюкоза — 50 и гексокиназа — 0.5 мг. Общий объем проб 1.5 мл. Продолжительность инкубации 20 мин. Температура инкубации 20°. Газовая фаза воздух. Источником света служила обычная лампа накаливания, вмонтированная в осветитель, который помещали на дно ванны. Освещенность примерно 15 тыс. лк на уровне дна колбы. Инкубация начиналась включением света, прекращалась — выключением света и добавлением 0.025 мл 50% трихлоруксусной кислоты.

О процессе фотофосфорилирования мы судили по разнице в убыли неорганического фосфора между темновыми и освещаемыми пробами. Неорганический фосфор определялся по методу М. Н. Кондрашовой с соавторами [11]. Реакция Хилла определялась по выделению O_2 (метод Варбурга) со свежевозгнанным *n*-бензохиноном. 5 мл инкубационной смеси содержали 0.15 мл «глицериновой» суспензии хлоропластов, 20 мкМ KCl, 3 мкМ трис-HCl буфера pH 7.5 и 1.5 мг бензохинона. Пробы освещались красным светом (фильтр КС-10). Интенсивность освещения 10^5 эрг/см^2·сек., температура инкубации 20°. Хлорофилл определялся по Арнону [12], бактериохлорофилл — в водной суспензии in vivo при 890 нм [13].



Активность фотофосфорилирования у «глицериновых» хлоропластов в период хранения при 0° (*1*) и при —20° (*2*).

I, *II* — соответствующие среды для выделения хлоропластов (см. методику).

Как показали опыты, устойчивость системы фотофосфорилирования у «глицериновых» хлоропластов при хранении в различном температурном режиме неодинакова. При —20° сохранить активность на постоянном уровне в течение продолжительного времени не удается, хотя в этих условиях инактивация происходит значительно медленнее, чем при более высокой температуре. Так, если при хранении хлоропластов при 0° полная потеря активности фотофосфорилирования происходит в течение 24—30 час., то при —20° — в течение 9—14 суток (см. рисунок). Эти данные близки к результатам Пекера и Бернарда [8] с хлоропластами шпината, которые нашли, что инактивация способности синтезировать АТФ на свету происходила в течение 2—3 недель хранения при —20° в зависимости от типа определяемой реакции.

При —20° не происходит замерзания глицериновой суспензии хлоропластов. Эта температура недостаточно низка, чтобы предотвратить инактивацию системы фотохимического образования АТФ. Из области криобиологии известно, что только низкая температура (от —80° и ниже) способна обеспечить сохранение биологического материала без потери функциональной активности после оттаивания [14]. Проверка двух низкотемпературных режимов (—79 и —196°) на сохранность фотофосфорилирующей функции «глицериновых» хлоропластов показала, что в этих условиях не наблюдается изменений активности системы фотохимического образования АТФ. Проверен 9-месячный срок хранения (см. таблицу).

Из этих данных следует, что температуры от —79 до —196° вполне достаточны для длительного сохранения фотофосфорилирующей активности хлоропластов в присутствии 50% глицерина. Следует еще раз подчеркнуть необходимость присутствия при этом защитных веществ, так как если замораживание проводить без глицерина, в среде I (см. мето-

Активность фотофосфорилирования и реакции Хилла при хранении «глицериновых» хлоропластов

Температура хранения	Среда для выделения хлоропластов	Поглощение $P_{неорг.}$, мкг/0.05 мг хлорофилла·пробу		Выделение O_2, мкг/0.14 мг хлорофилла·час	
		исходная величина	после 9 мес. хранения	исходная величина	после 7 мес. хранения
—79°	I	87	100	—	—
—196°	I	87	94	183.6	184.8
	II	130	122	—	—

дику) или в 0.035 М растворе NaCl, который обычно используется для суспендирования хлоропластов при определении фотофосфорилирования, то уже через сутки хранения при —196° происходит полная потеря активности. Приведенные данные свидетельствуют также о том, что состав среды, используемой для выделения хлоропластов, не сказывается существенным образом на устойчивости системы фотофосфорилирования в процессе хранения хлоропластов в глицериновой среде.

Полное сохранение системы фотохимического образования АТФ в хлоропластах в течение длительных сроков в применяемых нами условиях предполагает и полное сохранение функции свободного переноса e^- без сопряженного фосфорилирования. В таблице приведены также данные относительно активности реакции Хилла при хранении «глицериновых» хлоропластов. Проверен 7-месячный срок хранения, в течение которого никаких изменений активности не наблюдалось.

Бóльшая по сравнению с хлоропластами устойчивость фотосинтетического аппарата бактерий в процессе хранения становится очевидной из работ, где показано сохранение активности фотофосфорилирования в течение недели при хранении хроматофоров при 0° [15]. Как уже отмечалось, при 0° в хлоропластах полностью теряется активность фотофосфорилирования уже через 24 часа. Наши определения сохранности системы фотофосфорилирования у хроматофоров в процессе хранения при —196° ($2^1/_2$ мес.) показали, что активность фотофосфорилирования при длительном хранении хроматофоров в этих условиях не изменяется как в присутствии 50%-го глицерина, так и без него при замораживании хроматофоров в растворе 0.25 М сахарозы и 0.05 М трис-HCl буфере pH 8.0. Более длительные сроки хранения еще не изучались.

Таким образом, описанный метод хранения изолированных фотосинтезирующих структур без потери наиболее лабильной фотохимической функции — фотофосфорилирования — достаточно прост и удобен, не требует специального оборудования для замораживания препарата структур.

Для того чтобы обеспечить целостность систем переноса e^- в процессе хранения хлоропластов и сопряженного с ним образования АТФ, необходимо совместное применение низкой температуры (—79° и ниже) и защитных веществ (например, глицерина).

Литература

1. И. В. Верещинский, А. А. Красновский, Биохимия, *16*, 6, 1951.
2. И. В. Верещинский, Биохимия, *16*, 4, 1951.
3. W. C. Duane, D. W. Krogmann, Biochim. biophys. acta, *71*, 1, 1963.
4. Л. Рэ. Консервация жизни холодом. Медгиз, М., 1962.
5. О. Смит, в сб.: Клетка и температура среды. Изд. «Наука», М.—Л., 1964.
6. C. E. Huggings, Fed. proc., *24*, 2, p. III, 1965.
7. H. T. Meryman (ed.), Cryobiology, p. 85, Acad. Press, New York, 1966.
8. L. Packer, A. C. Barnard, Biochim. biophys. acta, *126*, 1, 1966.

9. А. А. Новоселов. Комнатное растениеводство методом водных культур. Учпедгиз, М., 1959.
10. F. R. Whatley, D. I. Arnon, in: Methods in enzymology, 6, Acad. Press, New York, 1963.
11. М. Н. Кондрашова, М. Н. Лесогорова, С. Э. Шноль, Биохимия, *30*, 3, 1965.
12. D. I. Arnon, Plant Physiol., *24*, 1, 1949.
13. R. Clayton, in: Bactrial photosynthesis. Antioch Press, Ochio, 1963.
14. B. F. Trump, D. E. Young, E. A. Arnold, R. E. Stowell, Fed. proc., *24*, 2, p. III, 1965.
15. J. W. Newton, in: Methods in enzymology, *5*, Acad. Press, New York, 1963.

STORAGE OF ISOLATED PHOTOSYNTHETICALY ACTIVE STRUCTURES WITHOUT CHANGES OF THEIR BASIC PHOTOCHEMICAL FUNCTIONS

R. M. Bekina, A. A. Krasnovsky

The stability of the most labile function of photosynthetic structures — photophosphorylation — was investigated during prolonged conservation of samples of isolated structures.

It was shown that for conservation of the electron transport system and of coupled ATP formation in chloroplast it is necessary to use low temperature (—79° C or below) and protective substances (glycerol).

Conservation of the photochemical system for synthesis of ATP could be attained at —196° in a medium containing 50% glycerol or without glycerol in a 0.25 M sucrose solution.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 18, вып. 2 1971 г.

УДК 581.1321.08

ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ КИСЛОРОДА ПРИ РЕАКЦИИ ХИЛЛА

Г. П. БРИН, З. Ш. АЛИЕВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Ордена Ленина Институт биохимии им А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Проведено сравнительное исследование скорости выделения кислорода в реакции Хилла амперометрическим методом и методом измерения хемилюминесценции люминола в стационарном потоке инертного газа.

Показано, что высокочувствительный хемилюминесцентный метод может быть применен для измерения скорости выделения кислорода в реакции Хилла. Небольшая инактивация суспензии хлоропластов в процессе продувания аргоном полностью компенсируется большой чувствительностью метода. Применение метода рационально для решения задач, требующих высокой чувствительности.

Исследование фотохимического выделения кислорода хлоропластами в присутствии экзогенных акцепторов электрона (реакция Хилла) широко применяется для решения разнообразных задач биохимии и физиологии растений.

Известны методы измерения фотохимической активности хлоропластов, основанные на определении количества восстановленного окислителя — акцептора электрона, количества выделившегося кислорода и в некоторых случаях по изменению pH в процессе реакции.

Наибольшее применение для измерения количества выделившегося кислорода получили микроманометрический метод Варбурга и амперометрический метод, основанный на измерении силы тока при восстановлении кислорода на платиновом электроде.

Недавно Бурр и Мазеролл [1] описали новый метод определения скорости выделения кислорода при фотосинтезе суспензии хлореллы, основанный на измерении хемилюминесценции люминола. Хемилюминесцентный метод значительно чувствительнее обычных модификаций метода Варбурга и амперометрического метода. По данным Бурра и Мазеролла, чувствительность метода достигает $5 \cdot 10^{-14}$ *M* кислорода в секунду, что на 3—4 порядка превосходит чувствительность обычно применяемых модификаций амперометрических и микроманометрических измерений.

В ряде исследовательских задач требуется измерение фотохимической активности хлоропластов с высокой чувствительностью. Это относится прежде всего к задачам «разборки» и обратной «сборки» хлоропласта, когда в процессе эксперимента могут необратимо повреждаться липопротеидные структуры.

Работая над этой проблемой [2], мы попытались использовать хемилюминесцентный метод для измерения скорости выделения кислорода при реакции Хилла. Следует отметить, что Бурр и Мазеролл описали методику лишь для измерения фотосинтеза хлореллы. Нужно было выяснить возможность применения этого метода для измерения фотохимической активности хлоропластов. Согласно процедуре эксперимента в этом случае кислород непрерывно выдувается из суспензии хлоропластов током аргона, и поэтому прежде всего следовало выяснить влияние процедуры продувки инертным газом на активность хлоропластов.

С этой целью мы сопоставили измерения скорости выделения кислорода при реакции Хилла с помощью хемилюминесцентного и амперометрического методов.

ОПИСАНИЕ УСТАНОВКИ

Мы воспроизвели с некоторыми изменениями установку Бурра и Мазеролла. На рис. 1 показана блок-схема установки. Регулируемый поток аргона (особой чистоты) поступает из баллона через реометр в ячейку *5*, которая служит для электролиза воды. Далее газ проходит через кювету *6*, в которой происходит фотохимическая реакция выделения

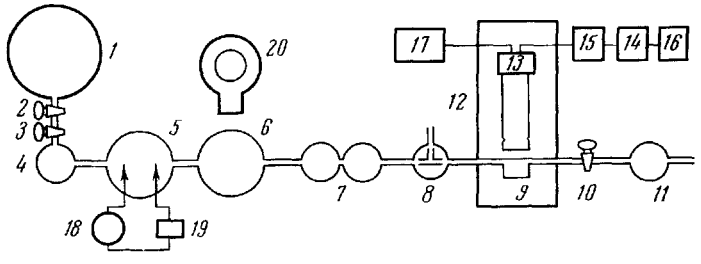


Рис. 1. Блок-схема люминометра

1 — баллон с аргоном, *2* — кран грубой регулировки, *3* — кран тонкой регулировки, *4* — реометр, *5* — ячейка с платиновыми электродами для электролиза воды, *6* — кювета для проведения фотохимических опытов, *7* — блок сушки газового потока, *8* — распределительный кран, *9* — кювета с раствором люминола, *10* — запирающий кран, *11* — водяной затвор, *12* — светонепроницаемый блок со шторкой, *13* — приемник излучения (ФЭУ-38), *14* — компенсатор сигнала (ИРН-54), *15* — усилитель (ЛПУ-01), *16* — самописец (ЭПП-09), *17* — источник постоянного высоковольтного напряжения (ВС-22), *18* — чувствительный гальванометр, *19* — батарея питания электролизной ячейки с делителем напряжения, *20* — источник света

кислорода. Аргон, содержащий кислород после пропускания через поглотители с диметилсульфоксидом *7*, поступает в кювету с люминолом *9*, после чего газ через водяной затвор уходит в атмосферу. Раствор люминола в диметилсульфоксиде в присутствии третичного бутоксида калия окисляется кислородом, уносимым током аргона. Максимум хемилюминесценции люминола лежит в области 480 *нм*. Это свечение регистрируется фотоумножителем (ФЭУ-38), сигнал с которого усиливается и подается на самописец ЭПП-09.

Зависимость световой эмиссии раствора люминола от концентрации кислорода линейна в пределах от 10^{-13} до 10^{-8} *М* кислорода в секунду. Обычный срок работы раствора люминола составляет около двух недель при чувствительности установки 10^{-13} *М* кислорода в секунду. Чувствительность можно изменять в несколько раз регулированием скорости потока инертного газа. При этом меняется время ответа, которое зависит от длины пути газа от реакционной кюветы до люминометра. На нашей установке это время составляло 1—3 мин.

Люминометр калибруется по кислороду путем электролиза воды, осуществляемого в ячейке *5*. На рис. 2 показана зависимость ответа люминометра от силы тока, проходящего через электролизную ячейку или, что то же самое, от скорости выделения электролитического кислорода в *М*/сек.

До и после серии опытов по измерению выделения кислорода хлоропластами в кювете *6* проводили электролиз воды с целью проверки и калибрации установки. Люминол обычно не терял способности к хемилюминесценции, и выделение кислорода записывалось прямой, параллельной уровню, обусловленному примесью кислорода в аргоне. На рис. 3 показана запись на самописце люминометра скорости выделения кислорода при электролизе (*А*) и опыта выделения кислорода хлоропласта

и при реакции Хилла (*Б*). В первые 2—3 мин. освещения скорость реакции Хилла достигает максимума, а затем постепенно снижается. При длительном освещении >15 мин. выделение кислорода хлоропластами прекращается.

Для сравнительного измерения выделения кислорода хлоропластами мы использовали амперометрический метод в модификации, описанной Гришиной, Беллом и Букиной [3] с электродом Кларка.

В этой установке платиновый точечный электрод и агаровый мостик, соединяющий приэлектродный слой с каломельным полуэлементом, вмонтированы в плексигласовую пробку, которая покрывается тефлоно-

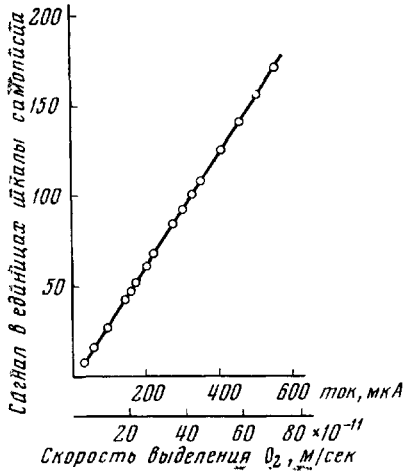


Рис. 2. Зависимость ответа люминометра от силы тока, проходящего через ячейку, или от скорости выделения кислорода при электролизе

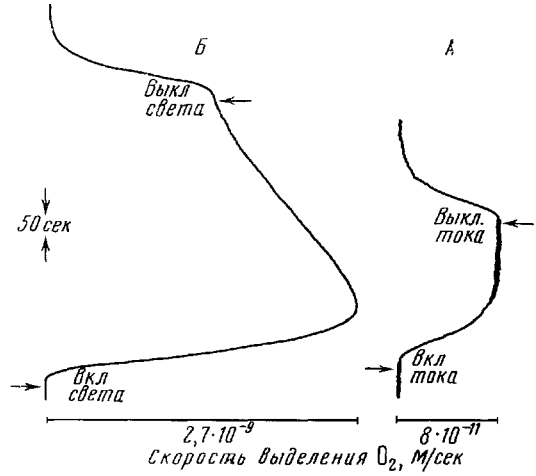


Рис. 3. Скорость выделения кислорода (*М/сек*) при электролизе (*А*) и при реакции Хилла (*Б*)

В опыт взято 3 *мл* суспензии хлоропластов в воде (содержащей 0,1 *мг/мл* хлорофилла) и 3 *мг* хинона. Запись на самописце люминометра

вой пленкой и ввинчивается в кювету. Напряжение на кювету подается с сухих батарей и регулируется потенциометром. Величина рабочего тока компенсируется потенциометром ЛПУ-0,1, а изменение тока при реакции регистрируется с помощью самописца ЭПП-09. Обычно опыты проводили при аэробных условиях в присутствии кислорода воздуха, растворенного в воде, но можно было создать и анаэробные условия, продувая суспензию хлоропластов перед измерением инертным газом.

Чувствительность данной модификации амперометрического метода в наших условиях приблизительно на порядок превышает чувствительность метода Варбурга.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ В АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Хлоропласты были выделены из проростков гороха обычными методами [4], с консервированием их в жидком азоте [5, 6]. Концентрация хлорофилла в суспензии хлоропластов составляла 10^{-4} *М*, хинона — $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *М*. Суспензию хлоропластов освещали в кювете прибора светом 500-ваттной киноламповы через светофильтр КС-10 и тепловой фильтр СЗС-14. Максимальная интенсивность света — 10^6 *эрг/см²·сек*. Для изменения интенсивности света использовали набор нейтральных фильтров.

Зависимость скорости выделения кислорода от интенсивности света показана на рис. 4. Измерения с помощью амперометрического метода проводили в присутствии кислорода воздуха, растворенного в водной суспензии хлоропластов. Для сравнения был поставлен опыт с той же

суспензией хлоропластов предварительно продутой 5 мин. аргоном, а затем воздухом. В этих опытах получены близкие световые кривые — кратковременная процедура продувания аргоном с последующим проведением опыта в аэробных условиях не ведет к инактивации суспензии.

Далее были сопоставлены опыты, проведенные в атмосфере аргона амперометрическим методом и на люминометре. Для этого суспензию хлоропластов в кювете амперометрического прибора продували аргоном, после чего в закрытой кювете измеряли выделение кислорода. В опытах на люминометре суспензию хлоропластов непрерывно продували аргоном и в этих условиях проводили освещение. В этих опытах (амперометрическим и люминометрическим методами) получены близкие световые кривые. Однако сравнение опытов, проведенных в аэробных и в анаэробных условиях, показало, что скорость выделения кислорода в анаэробных условиях примерно на 40 % ниже.

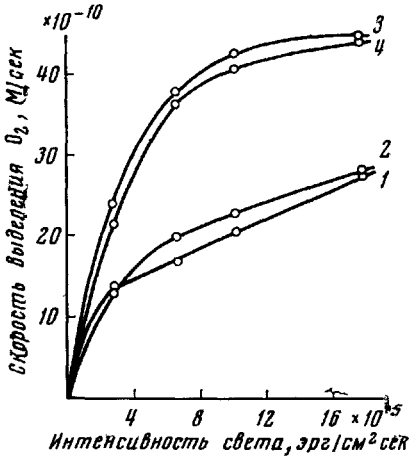


Рис 4

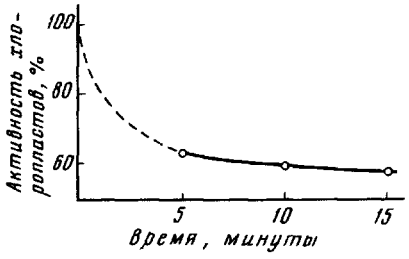


Рис. 5.

Рис. 4. Зависимость скорости выделения кислорода хлоропластами от интенсивности света в анаэробных (*1*, *2*) и в аэробных (*3*, *4*) условиях

1 — на люминометре, *2*, *3* — амперометрическим методом, *4* — амперометрическим методом после 5-минутного продувания суспензии аргоном

Рис. 5. Зависимость скорости выделения кислорода от времени продувания суспензии хлоропластов аргоном

На рис. 5 показано влияние длительности продувания суспензии хлоропластов аргоном на скорость выделения кислорода. При этом за 100%-ную активность принята скорость выделения кислорода, измеренная в аэробных условиях амперометрическим методом с использованием той же суспензии хлоропластов и той же интенсивности света, что и в опытах на люминометре. Суспензия хлоропластов теряет 40% активности при 5-минутном продувании ее аргоном. Дальнейшее продувание незначительно снижает скорость выделения кислорода.

Итак, хемилюминесцентный метод дает возможность измерения кислорода при реакции Хилла. Небольшая инактивация суспензии в процессе продувания аргоном полностью компенсируется большой чувствительностью метода. Однако из-за сравнительной сложности метода его нельзя рекомендовать для тривиальных опытов измерения фотохимической активности хлоропластов. Применение метода рационально лишь в случае решения задач, требующих высокой чувствительности.

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

1. Влияние предварительного нагревания хлоропластов на реакцию Хилла. В нашей лаборатории была исследована зависимость скорости выделения кислорода в реакции Хилла от предварительного нагревания хлоропластов амперометрическим методом [2]. Аналогичные опыты мы провели в анаэробных условиях с применением люминометра.

В описанных ранее нами опытах полное подавление реакции Хилла наблюдалось при нагревании водой суспензии хлоропластов до 50°. Применение люминометра дает возможность наблюдать выделение кислорода при нагревании до 53°. В присутствии глицерина (15%) увеличивается термостабильность хлоропластов — порог инактивации лежал уже при 56°.

В сообщении Эммета и Уокера [7] указано, что кратковременное (до 30 сек.) нагревание суспензии хлоропластов до 50° активирует реакцию Хилла, которая измерялась этими авторами амперометрическим методом. Мы провели такие же опыты на люминометре в анаэробных условиях при разных температурах предварительного нагревания хлоропластов. Оказалось, что инкубация суспензии при 40° в течение 5—15 сек. активирует реакцию Хилла на 20%. Инкубация при 35, 45 и 50° не вызывала активации.

2. Обратимая инактивация хлоропластов этиловым эфиром.

Ранее мы нашли [2], что инкубация суспензии хлоропластов с этиловым эфиром приводит к подавлению реакции Хилла. При этом наблюдается дезагрегация хлорофилла, максимум поглощения которого перемещается от 678 до 670 нм. После откачивания эфира из суспензии хлоропластов восстанавливается активность реакции Хилла и максимум поглощения хлорофилла обратимо возвращается к прежнему положению. В том случае, когда концентрация эфира превышает порог его растворимости, возрастает роль необратимых процессов инактивации. В наших опытах уже при 10% эфира реакция Хилла ингибировалась необратимо. В случае применения люминометрического метода, продувание суспензии аргоном ведет к удалению эфира, и в этом случае наблюдается частичное возвращение активности хлоропластов при 12—14% эфира, т. е. за порогом растворимости эфира в воде. Таким образом, с помощью люминометра можно наблюдать те эффекты, которые не удалось наблюдать при амперометрическом измерении кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burr A., Mauzerall D. Biochim. et biophys. acta, **153**, 614, 1968.
2. Красновский А. А., Брин Г. П. Докл. АН СССР, **179**, 726, 1968.
3. Гришина Г. С., Белл Д. Н., Букина Г. С. Физиол. растений, **13**, 737, 1966.
4. Сисакян Н. М., Филиппович И. И., Светайло Э. Н. Докл. АН СССР, **147**, 488, 1962.
5. Верещинский И. В., Красновский А. А. Биохимия, **16**, 621, 1951.
6. Бекина Р. М., Красновский А. А. Биохимия, **33**, 178, 1968.
7. Emmett I. M., Walker D. A. Biochim. et biophys. acta, **180**, 424, 1969.

Поступила в редакцию
7.IX.1970

OXYGEN EVOLUTION DURING HILL REACTION MEASURED BY THE CHEMOLUMINESCENCE TECHNIQUE

G. P. BRIN, Z. Sh. ALIEV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The rate of oxygen evolution in the Hill reaction was studied by the amperometric technique and by measuring the luminol chemoluminescence in a stationary flux of inert gas.

The highly sensitive chemoluminescence technique can be recommended for measuring the rate of oxygen evolution in the Hill reaction. A slight inactivation of the chloroplast suspension by argon is completely compensated by a high sensitivity of the method. The technique is especially valuable for the solution of problems requiring a high sensitivity.

Доклады Академии наук СССР
1971. Том 197, № 3

УДК 541.144.8

БИОХИМИЯ

Г. П. БРИН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Л. Ф. КОМАРОВА

ОБРАТИМОЕ НАРУШЕНИЕ РЕАКЦИИ ХИЛЛА ПРИ ДЕЙСТВИИ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА И МЕТАНОЛА НА ХЛОРОПЛАСТЫ

Одним из путей изучения стадий фотохимического выделения кислорода при фотосинтезе является «разборка» фотохимически активных структур хлоропластов на более простые компоненты и обратная «сборка» активной системы, способной к реакции Хилла.

Существенно найти условия восстановления реакции Хилла, нарушенной под влиянием различных воздействий, чтобы получить данные об условиях структурной организации систем, ответственных за реакцию выделения кислорода.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что органические растворители необратимо подавляют активность хлоропластов к реакции Хилла. Особенно сильным было действие пиридина ([1]). Мы нашли ([2]), что при действии этилового эфира на хлоропласты ингибирование реакции Хилла сопровождается дезагрегацией хлорофилла, максимум поглощения которого сдвигается в коротковолновую область спектра поглощения. Удаление эфира приводило к обратимому сдвигу максимума поглощения в длинноволновую область спектра, что свидетельствовало об обратимой самосборке агрегированных форм пигмента в структуре хлоропласта. Существенно, что при действии этилового эфира реакция Хилла подавляется, а после удаления эфира в вакууме активность хлоропластов возвращается к первоначальной величине ([2]).

Целью настоящего исследования было изучение обратимых нарушений активности хлоропластов в реакции Хилла при воздействии смешивающихся с водой растворителей, среди которых наиболее интересным было применение диметилсульфоксида, широко используемого для консервации тканей и органов. Мы испытали также действие метилового и этилового спирта.

Хлоропласты были выделены из проростков гороха обычными методами ([3]). В опытах использовались хлоропласты, консервированные в жидком азоте по методу, применяемому в нашей лаборатории ([4, 5]).

Активность хлоропластов оценивалась по скорости фотохимического выделения кислорода в присутствии *n*-бензохинона ($4{,}6 \cdot 10^{-3}$ мол/мл) как акцептора электрона амперометрическим методом, основанным на измерении силы тока при восстановлении кислорода на платиновом электроде ([6]).

Амперометрическую ячейку из плексигласа с суспензией хлоропластов (5 мл) освещали конденсированным светом киноламиы 300 вт через светофильтр КС-10 и 2-сантиметровый слой 0,5% водного раствора медного купороса. Интенсивность света 10^5 эрг/см^3·сек. Измерения спектров поглощения проводили на спектрофотометре СФ-14. Измерения спектров флуоресценции проводили на регистрирующем спектрофлуорометре. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутно-кварцевую лампу ДРШ-250. Активность хлоропластов выражали в процентах от скорости выделения кислорода суспензией хлоропластов без растворителя, что составляло 35 μмол. на 1 мг хлорофилла в час.

Для того чтобы испытать обратимость действия растворителей была применена следующая процедура опыта. К суспензии хлоропластов добавляли нужное количество растворителя — чтобы достичь нужной концентра-

ции. После инкубации добавляли смесь растворителя с водой в том же соотношении и измеряли скорость фотохимического выделения кислорода. В другом опыте после инкубации добавляли смесь растворителя с водой в таком соотношении, чтобы конечная концентрация растворителя составляла 10%, и снова измеряли выделение кислорода (см. табл. 1). Во всех опытах сохранялась постоянная концентрация хлоропластов, которые содержали 0,085 мг хлорофилла в 1 мл.

Действие диметилсульфоксида. При введении до 40% диметилсульфоксида (ДМС) в суспензию хлоропластов не наблюдается сни-

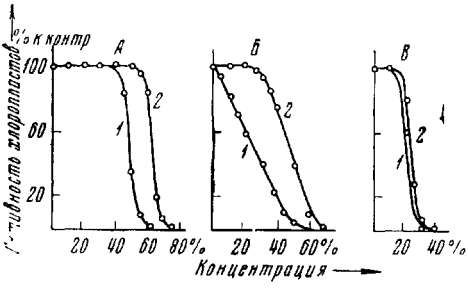


Рис. 1

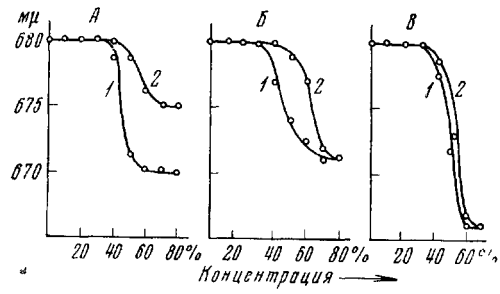


Рис. 2

Рис. 1. Влияние ДМС (*А*), метанола (*Б*) и этанола (*В*) на скорость выделения кислорода. Контроль без растворителя. *1* — к хлоропластам добавлено указанное количество растворителя, *2* — добавлено такое же количество растворителя, а затем после инкубации разбавлено до 10%

Рис. 2. Влияние ДМС (*А*), метанола (*Б*) и этанола (*В*) на положение максимума поглощения хлоропластов. *1* и *2* — то же, что на рис. 1

жения активности хлоропластов в реакции Хилла. Дальнейшее увеличение концентрации ДМС ведет к резкому снижению активности (рис. 1*А*), и при 60% ДМС наступает полное подавление активности. Для того чтобы исследовать обратимость действия растворителя, после инкубации суспензии хлоропластов с определенным количеством ДМС добавляли такую смесь ДМС с водой, чтобы конечная концентрация растворителя составляла 10%. Пример такого опыта приведен в табл. 1 (стрелка указывает изменение концентрации растворителя при разбавлении). При добавлении 60% ДМС

Таблица 1

Обратимое действие диметилсульфоксида и метанола на реакцию Хилла

№№ п. п.	Система	Концентрация, %		Световое выдел. O_2, μ моль/мг·час	
		ДМС	метанол	ДМС	метанол
1	0,1 мл хлоропластов и 4,9 мл воды	0	0	35	35
2	0,1 мл хлоропластов, 0,8 мл воды и 0,1 мл ДМС или метанола; инкубация 10 мин., добавлено 0,4 мл ДМС или метанола и 3,6 мл воды	10 → 10	10 → 10	35	35
3	0,1 мл хлоропластов, 0,3 мл воды и 0,6 мл ДМС или 0,4 мл воды и 0,5 мл метанола; инкубация 10 мин.; добавлено 2,4 мл ДМС и 1,6 мл воды или 2 мл метанола и 2 мл воды	60 → 60	50 → 50	0	0
4	0,2 мл хлоропластов, 0,6 мл воды и 1,2 мл ДМС; инкубация 10 мин.; добавлено 10 мл воды или 0,1 мл хлоропластов, 0,4 мл воды и 0,5 мл метанола; инкубация 10 мин.; добавлено 4 мл воды	60 → 10	50 → 10	30	14

реакция Хилла полностью подавлена, разбавление водой до 10% ДМС возвращает 85% активности При 55% ДМС реакция Хилла подавлена до 35% первоначальной активности, при разбавлении водой до 10% ДМС происходит полная реактивация хлоропластов (см. рис. 1*А*).

Измерение спектров поглощения показало (рис. 2*А* и рис. 3), что при введении до 40% ДМС в суспензию хлоропластов максимум поглощения хлорофилла сохраняется при 680 мμ. Дальнейшее увеличение концентрации ДМС приводит к дезагрегации — постепенному смещению максимума поглоще-

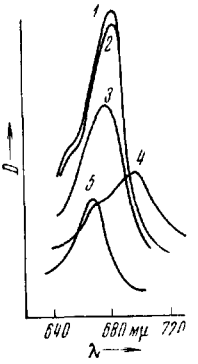


Рис. 3

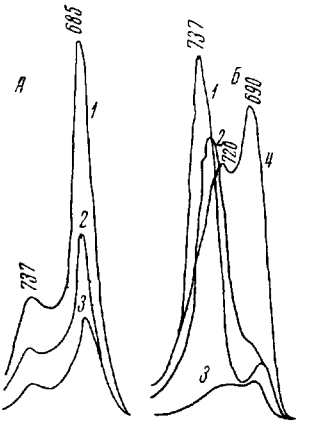


Рис. 4

Рис. 3 Спектры поглощения. *1* — суспензия хлоропластов в воде; *2* — после добавления 10% ДМС; *3* — после добавления 60% ДМС, с последующим разбавлением до 10%; *4* — после добавления 60% ДМС; *5* — после добавления 90% ДМС

Рис. 4 Спектры флуоресценции при комнатной температуре (*А*) и при температуре жидкого азота (*Б*). Воспроизведены записи на самописце флуорометра. *1* — при добавлении 10% ДМС; *2* — после добавления 60% ДМС с последующим разбавлением до 10%; *3* — после добавления 60% ДМС; *4* — то же, измерено при большей щели

ния в сторону коротких длин волн до 670 мμ. Разбавление водой до 10% ДМС смещает максимум поглощения в длинноволновую сторону спектра поглощения. Следует отметить, что ДМС вызывает структурную перестройку агрегатов хлорофилла, достигающего максимума поглощения при 695 мμ (рис. 3). Подобная перестройка хлорофилла в хлоропластах наблюдалась в нашей лаборатории при действии диоксана (1). При добавлении 60% ДМС наблюдается образование максимума при 695 мμ; разбавление водой до 10% ДМС приводит к перемещению максимума поглощения к 675 мμ. Образование агрегированной формы хлорофилла 695 мμ в хлоропластах коррелирует с полной потерей фотохимической активности. При 70% ДМС реакция Хилла необратимо подавляется, и смещение максимума поглощения хлорофилла так же необратимо.

Обратимым изменениям спектров поглощения соответствуют изменения спектров флуоресценции. На рис. 4 показан спектр флуоресценции хлоропластов, содержащих 10% ДМС, который соответствует спектру водной суспензии хлоропластов без ДМС при 20°. В случае замораживания до температуры жидкого азота в присутствии 10% ДМС интенсивность длинноволнового максимума флуоресценции выше, чем в опыте без ДМС. При добавлении 60% ДМС интенсивность флуоресценции резко снижается. При этом положение максимумов не изменяется (в случае измерения при 20°); измерение при температуре жидкого азота (—196°) показывает образование максимума при 720 мμ, соответствующего форме хлорофилла с погло-

щением при 695 мμ. После разбавления до 10% ДМС максимумы флуоресценции смещаются в длинноволновую сторону (измерение при — 196°).

Действие метилового спирта. Увеличение концентрации метанола приводит к постепенному снижению скорости выделения кислорода хлоропластами (рис. 1*Б*). При 25% метанола реакция подавлена наполовину, а при 50% метанола наступает полное ингибирование. Однако при доведении конечной концентрации метанола от 50 до 10% наблюдается возвращение до 40% активности (см. рис. 1*Б* и табл. 1). При 70% метанола наступает необратимое ингибирование.

При 50% метанола, когда реакция Хилла полностью подавлена, максимум поглощения смещается в коротковолновую сторону — от 680 до 673 мμ. При разбавлении водой до 10% метанола максимум поглощения перемещается в длинноволновую сторону, до 680 мμ (рис. 2*Б*), и суспензия снова приобретает активность. При 70% метанола максимум поглощения лежит при 665 мμ, и разбавление не изменяет положения максимума поглощения и не приводит к реактивации.

Необратимое действие этилового спирта. При введении в суспензию хлоропластов этилового спирта происходят необратимые изменения, глубина которых зависит от условий выращивания растений. Хлоропласты, выделенные из листьев гороха, выращенного зимой при искусственном освещении, чувствительны к меньшим концентрациям этанола, чем хлоропласты из листьев гороха, выращенного летом при естественном освещении. «Зимние» хлоропласты теряют активность при добавлении 5% этанола, тогда как у «летних» при 20% этанола сохраняется 70% активности (рис. 1*В*).

Этанол необратимо поражает хлоропласты. На рис. 1*В* показано влияние разных концентраций этанола на реакцию Хилла. Последующее разбавление водой до 10% этанола не приводит к реактивации подавленной активности. Измерение спектров поглощения (рис. 2*В*) показало ту же закономерность. Коротковолновое смещение максимума поглощения хлорофилла при действии этанола на хлоропласты необратимо при разбавлении.

Таким образом, изучение обратимого ингибирования реакции Хилла под действием диметилсульфоксида и метанола показывает возможность осторожной «разборки» и обратной «сборки» фотохимической системы, выделяющей кислород.

Вероятно, эти явления связаны с нарушением липоидной структуры мембран хлоропластов, в которые вмонтирован хлорофилл; молекулы растворителя, проникая туда, нарушают структурную организацию; вымывание растворителя водой приводит к самосборке активной структуры.

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

Поступило
18 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, **18**, 340 (1953). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **179**, 726 (1968). [3] Н. М. Сисакян, И. И. Филиппович, Э. Н. Светайло, ДАН, **147**, 488 (1962). [4] И. В. Верещинский, А. А. Красновский, Биохимия, **16**, 621 (1951). [5] Р. М. Бекина, А. А. Красновский, Биохимия, **33**, 178 (1968). [6] Г. С. Гришина, Л. Н. Белл, Г. С. Букина, Физиол. раст., **13**, 737 (1966).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 5 1971 Вып. 2

УДК 577.45

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАЗНЫХ ТИПОВ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА *а* И БАКТЕРИОВИРИДИНА

М. И. БЫСТРОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

В коллоидных растворах хлорофилла *а* и бактериовиридина, содержащих метиловый спирт, наблюдалось образование двух типов форм с различной степенью агрегации и основными максимумами поглощения 670—677 и 712—730 *ммк*. Проводилось сравнительное изучение фотохимических свойств — деструктивного фотоокисления и фотосенсибилизирующего действия — и термолабильности агрегированных форм указанных типов. Показано, что длинноволновые формы пигментов обладают более высокой скоростью фотоокисления по сравнению с менее агрегированными, коротковолновыми формами; различие скорости фотоокисления возрастает с повышением температуры (от 8 до 28°). Фоточувствительные длинноволновые формы хлорофилла *а* (712 и 720—725 *ммк*) термолабильны, переходя при нагревании (70° и выше) в формы с меньшей степенью агрегации. Длинноволновым формам бактериовиридина свойственна термостойкость. Разные типы агрегированных форм хлорофилла *а* и бактериовиридина обладают близкой фотосенсибилизирующей активностью в реакции восстановления метилового красного аскорбиновой кислотой с квантовым выходом около 1,5%.

Присутствие в фотосинтезирующих организмах агрегированных форм пигментов, выполняющих различные фотохимические функции при фотосинтезе и различающихся особенностями межмолекулярного взаимодействия, ставит вопрос о необходимости сравнительного исследования пигментных агрегатов разного типа в модельных системах. Такие системы позволяют не только воспроизводить спектральные особенности нативного состояния пигментов, но и получать формы, присутствие которых в фотосинтезирующих организмах может быть незначительным или скрытым от наблюдения из-за сильного перекрывания спектров большого набора разных форм [1—3].

Изучение фотохимических свойств разных типов агрегированных форм хлорофилла и его аналогов представляется важным, так как сведения по этому вопросу недостаточны по сравнению с результатами обширных исследований фотохимии «мономерных» форм пигментов в растворах (см., например, обзор [4]).

Хорошо известно, что хлорофилл и его аналоги в растворах подвергаются в присутствии кислорода деструктивному фотохимическому окислению — выцветанию. Агрегация, не снимая способности к фотоокислению, значительно увеличивает устойчивость к действию света. Главная масса пигментов фотосинтезирующих организмов в естественном состоянии устойчива к действию света, однако в листьях находится малая часть быстро выцветающей «мономерной» формы хлорофилла *а* [5].

При освещении монослоев и пленок хлорофилла *а* было отмечено преимущественное снижение длинноволнового поглощения, которое объяснено возможной фотодезагрегацией длинноволновых структур [1, 6]. Явление световой дезагрегации длинноволновых форм пигментов было обнаружено в листьях мутантов кукурузы и коллоидных

растворах феофитина по спектрам люминесценции и поглощения соответственно [7; 8]. В работе с твердыми пленками пигментов мы наблюдали у Mg-комплексов при 20° быстрое (в течение нескольких секунд) падение длинноволновой люминесценции (в области 750 *ммк*) под действием света в присутствии кислорода воздуха и избирательное выцветание в пленках хлорофилла *а* формы с поглощением около 700 *ммк* при более продолжительном освещении [3; 9].

Эти результаты свидетельствовали о фотохимической активности определенных типов агрегированных форм пигментов. Вопрос о том, как связана фотохимическая активность с типами агрегации пигментных молекул, требовал разрешения.

Сравнительное изучение фотосенсибилизирующего действия агрегированных форм разных типов ранее не проводилось. Однако уже давно в нашей лаборатории было показано, что способностью сенсибилизировать реакции окисления-восстановления различных соединений обладают не только молекулярно-дисперсные, «мономерные» формы хлорофилла и его аналогов, но и пигменты, находящиеся в агрегированном состоянии. Еще в 1946 г. [10] удалось наблюдать фотосенсибилизирующее действие кристаллического аналога хлорофилла — фталоцианина магния на реакцию окисления аскорбиновой кислоты кислородом. Затем была установлена фотосенсибилизирующая активность водных коллоидных растворов хлорофилла (максимум поглощения 670 *ммк*) при окислительно-восстановительных превращениях цитохромов [11], фотоокислении аскорбиновой кислоты кислородом [12] и азокрасителем метиловым красным [13]. У коллоидных растворов хлорофилла и его производных, полученных при помощи детергентов, обнаружены фотосенсибилизирующие свойства, которые детально были исследованы на примере фотосенсибилизированного окисления аскорбиновой кислоты [12] и восстановления метилвиологена [14; 15]. Коллоидные растворы бактериовиридина с максимумом поглощения 715—720 *ммк*, как и суспензии зеленых серных бактерий с более длинноволновым поглощением, обладают фотосенсибилизирующей активностью [16]. В ряде работ [17—20] было показано, что коагулированные коллоиды хлорофилла с максимумом поглощения около 680 ммк так же, как и адсорбаты пигмента, способны сенсибилизировать при освещении реакцию восстановления метилового красного аскорбиновой кислотой.

Данная работа посвящена сравнительному изучению способности к деструктивному фотохимическому окислению и фотосенсибилизирующему действию разных типов агрегированных форм хлорофилла *а* и бактериовиридина в системе вода — метиловый спирт, где удается получать два типа пигментных форм с различной степенью агрегации и двумя достаточно далеко отстоящими основными максимумами поглощения при 670—677 и 712—730 *ммк*.

МЕТОДИКА

Хлорофилл *а* выделяли из листьев крапивы методом, обычно используемым в нашей лаборатории, с конечной хроматографической очисткой.

Бактериовиридин выделяли из осажденных центрифугированием клеток *Chloropseudomonas ethylica* путем экстрагирования ацетоном, перевода пигментов в серный эфир, последующего испарения эфира и промывания сухого пигментного остатка петролейным эфиром до полного удаления каротиноидов и феофитина.

Концентрация пигментов в коллоидных растворах составляла обычно $1{,}5—2 \cdot 10^{-5}$ *М*. Коллоидные растворы получали разбавлением метаноловых растворов водой (до 5%-ного метилового спирта) или слабым раствором КОН (до 40%-ного метилового спирта). Раствор щелочи использовали для предотвращения феофитинизации, которая могла мешать образованию длинноволновых агрегированных структур при «созревании» коллоидных систем; в таких системах величина pH не превышала 8,5, поэтому гидролитического распада циклопентанонового кольца не происходило.

Использовали метиловый спирт, прокипяченный с прокаленной окисью кальция и затем перегнанный.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В воде с 5% метанола через несколько часов после получения коллоидного раствора вместе с феофитинизацией части пигмента образовывалось заметное количество формы с поглощением 712 *ммк* (рис. 1, *А*, кривая *1*). Подобную форму пигмента с максимумом 710—715 *ммк* мы наблюдали в твердых пленках при обработке их парами воды или метилового спирта [2; 21].

В большей части опытов использовали водно-спиртовые коллоидные растворы (40% метилового спирта). Через несколько часов «созревания» при 20° в спектре поглощения обнаруживался отчетливый максимум ~720 *ммк* (рис. 2, *Б*, *1* и 3, *А*). Хлорофилл *а* при этом не подвергался

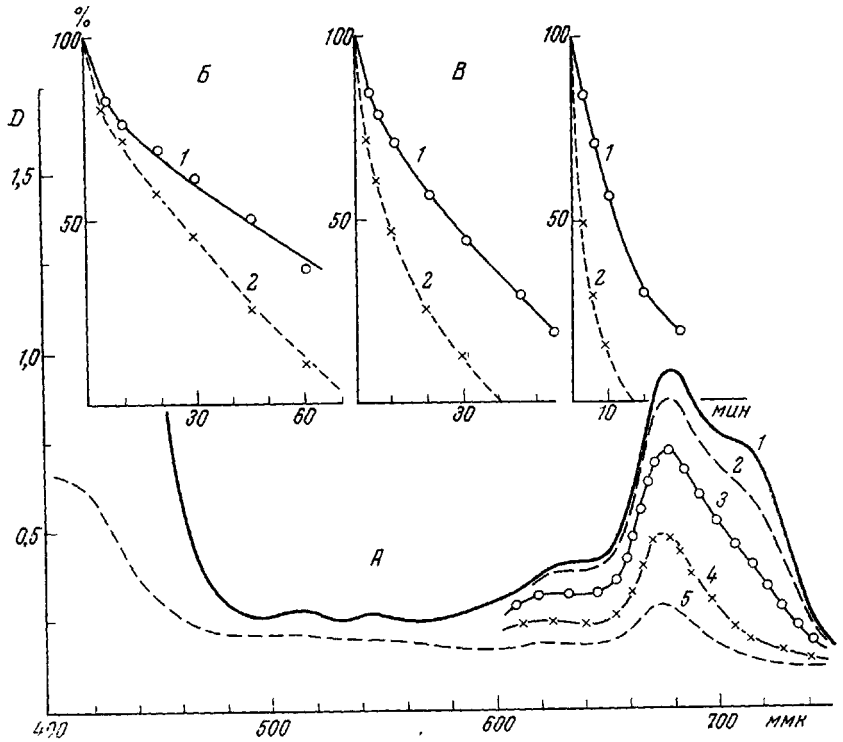


Рис. 1. Выцветание хлорофилла *а* в водно-метаноловом растворе (5% метанола)

А — спектрофотометрическая запись реакции при 19°: *1* — исходный раствор; *2—5* — по мере освещения в течение 3—60 *мин*. *Б*, *В*, *Г* — кинетика процесса для коротковолновой (*1*) и длинноволновой (*2*) форм при температурах 9, 19 и 29° соответственно

химическим изменениям. Элюат, полученный после полной дезагрегации агрегированных форм добавлением в систему 50% пиридина и последующего перевода пигментов в серный эфир, спектрально не отличался от раствора исходного препарата. Следует заметить, что присутствие феофитина препятствовало образованию формы 720 *ммк*. В коллоидном растворе смеси хлорофилла *а* и феофитина с 40% метанола даже через сутки после получения можно было наблюдать только один максимум при 672 *ммк*. Примеси, возможные даже в хроматографически чистых препаратах, влияют на агрегацию.

Бактериовиридин в коллоидном растворе (40% метанола) сразу же после получения обнаруживал два максимума в спектре поглощения —675—677 и 725—730 *ммк* (рис. 2 *В, 1* и 4, *А, 1*). Эти максимумы, как и в случае хлорофилла *а*, могут быть приписаны соответственно димерам и более высоко агрегированным структурам, вероятно, микрокристаллам пигмента [22].

Таким образом, коллоидные растворы представляли собой системы, содержащие соизмеримые количества агрегированных форм двух типов, что позволяло проводить их сравнительное изучение.

Деструктивное фотоокисление. Коллоидные растворы помещали в вакуумные трубки Тунберга, затем в течение 3 *мин* масляным насосом откачивали воздух и пускали кислород из газометра. Через 3—5 *мин*, достаточных для установления равновесия, образцы освещали лампой 750 *вт* через водный (тепловой) фильтр и конденсор (освещенность $6 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек*) в условиях термостатирования. Опыты проводили в трех интервалах температур: 8—10, 18—20 и 28—30°. По мере освещения

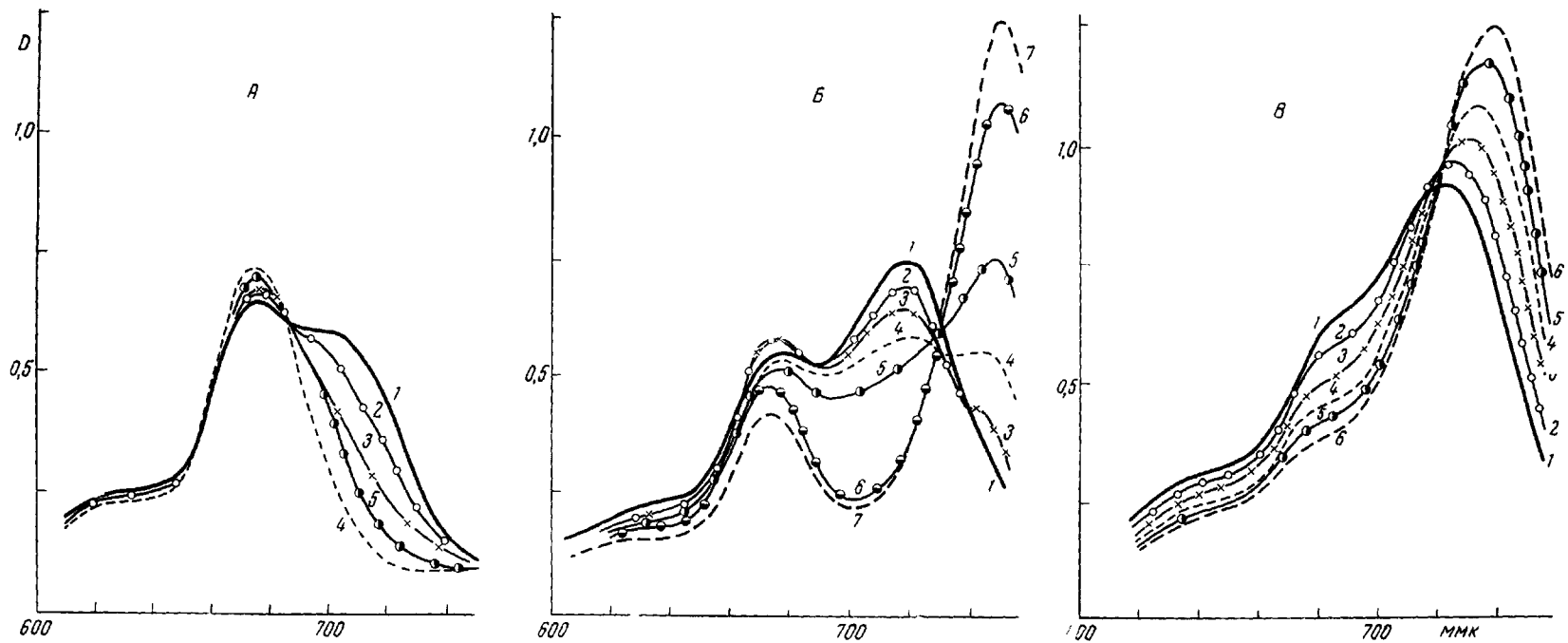


Рис. 2. Изменение поглощения коллоидных растворов пигментов под действием температуры

А — хлорофилл *а* в водно-метаноловом растворе (5% метанола). *1* — 20°; *2* — 65°; *3* — 80°; *4* — 90; *5* — снова 20°, Б — хлорофилл *а* в водно-метаноловом растворе (40% метанола). *1*—20°; *2*—*6* — по мере нагревания от 40 до 90°; *7* — снова 20°. *В* — бактериовиридин в водно-метаноловом растворе (40% метанола), разбавленном глицерином (1 : 1). *1*—20°; *2*—*5* — по мере нагревания от 50 до 90°; *6* — снова 20°

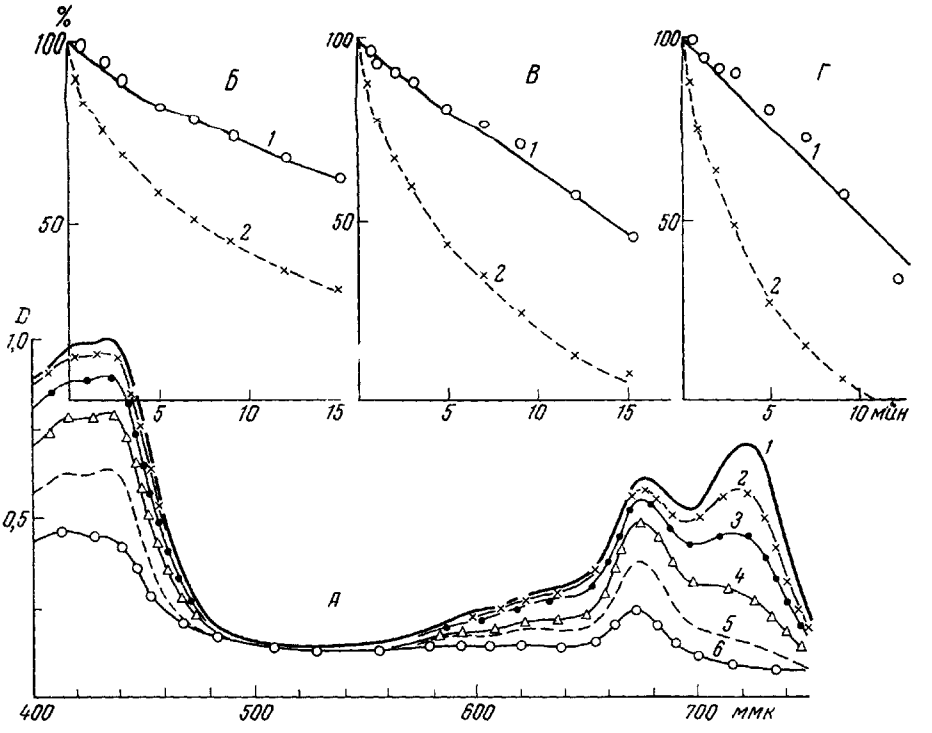


Рис. 3. Выцветание хлорофилла *а* в водно-метаноловом растворе (40% метанола)

А — спектрофотометрическая запись реакции при 18°: *1* — исходный раствор; *2—6* — по мере освещения в течение 1—18 *мин*. *Б, В, Г* — кинетика процесса для коротковолновой (*1*) и длинноволновой (*2*) форм при температуре 8, 18 и 28° соответственно

спектры поглощения регистрировали в спектрофотометре СФ-10. О скорости выцветания обеих форм пигментов судили по уменьшению оптической плотности в соответствующих максимумах. Результаты выражали в процентах от исходных величин. На рисунках по оси ординат откладывали количества пигментных форм, остающихся непревращенными в ходе реакции.

Хлорофилл а. Освещение коллоидных растворов хлорофилла *а* с 5% метанола, содержащих формы с максимумами поглощения 675 и 712 *ммк*, приводит к деструктивному окислению — выцветанию обеих пигментных форм. Скорость выцветания длинноволновой формы заметно выше, чем у коротковолновой формы. Время половинного разрушения указанных форм при 19° составляет 10—11 и 26—27 *мин* соответственно, что следует из усредненных результатов ряда опытов (см. рис. 1, где даны спектрофотометрическая запись типичного опыта по фотоокислению форм 675 и 712 *ммк* при 19° и кинетика процесса в трех интервалах температур). При 9° процесс протекает медленнее, причем скорость фотоокисления длинноволновой формы снижается в большей степени, чем скорость фотоокисления коротковолновой формы. Повышение температуры до 29° ускоряет выцветание обеих форм, при этом скорость процесса у длинноволновой формы возрастает в большей степени. Во всех случаях фотоокисление сопровождается коротковолновым смещением максимумов поглощения на 3—5 *ммк*.

Для выяснения возможной связи фоточувствительности формы «712» с ее термолабильностью коллоидные растворы нагревали от 20 до 95°, помещая их в прозрачный сосуд Дюара с водой требуемой температуры. По мере повышения температуры регистрировали спектры поглощения. Нагревание вызывало снижение длинноволнового максимума поглоще-

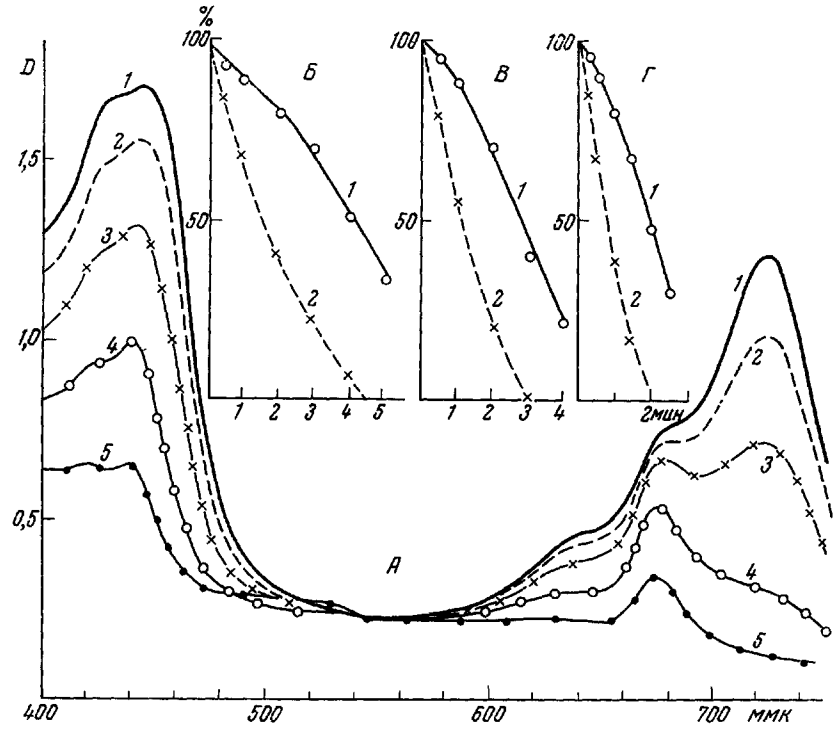


Рис. 4. Выцветание бактериовиридина в водно-метаноловом растворе (40% метанола)

А — спектрофотометрическая запись реакции при 18°: *1* — раствор до освещения; *2—5*— по мере освещения в течение 0,5—2,5 *мин*. *Б*, *В*, *Г* — кинетика процесса для коротковолновой (*1*) и длинноволновой (*2*) форм при температуре 8, 18 и 28° соответственно

ния и некоторое возрастание коротковолнового (см. рис. 2, *А*). Таким образом, фоточувствительная форма 712 более термолабильна. Действие температуры обратимо, и форма 712 снова образуется при охлаждении.

Освещение коллоидных растворов хлорофилла *а* (40% метанола), содержащих формы с максимумами поглощения ~673 и 720 *ммк*, вызывает выцветание обеих форм, которое в данном случае протекает гораздо быстрее, чем в предыдущих опытах с 5% метанола. Скорость фотоокисления длинноволновой формы выше, чем у коротковолновой. Время половинного разрушения коротковолновой и длинноволновой форм в системе с 40% метанола при температуре 18° составляет в среднем 10—11 и 5—6 *мин* соответственно (см. рис. 3, где представлены спектрофотометрическая запись типичного опыта по выцветанию при 18° и кинетика процесса при разной температуре). Понижение температуры до 8° замедляет скорость фотоокисления указанных форм, а повышение ее до 28° увеличивает интенсивность процесса.

Нагревание приводит к снижению поглощения при 720 *ммк*, сопровождающемуся ростом отчетливого, более длинноволнового максимума (~750 *ммк*). Этот эффект усиливается охлаждением раствора до 20° вслед за нагреванием до 90° (рис. 2, *Б*). Таким образом, фоточувствительной форме «720», как и форме «712», свойственна термолабильность. Следует отметить, что форма «750» образующаяся при нагревании, принадлежит химически неизмененному хлорофиллу *а*. Элюат, получающийся при добавлении в систему с формой 750 пиридина (50%), последующем переводе пигментов в эфир, обладает спектром поглощения, соответствующим спектру хлорофилла *а*.

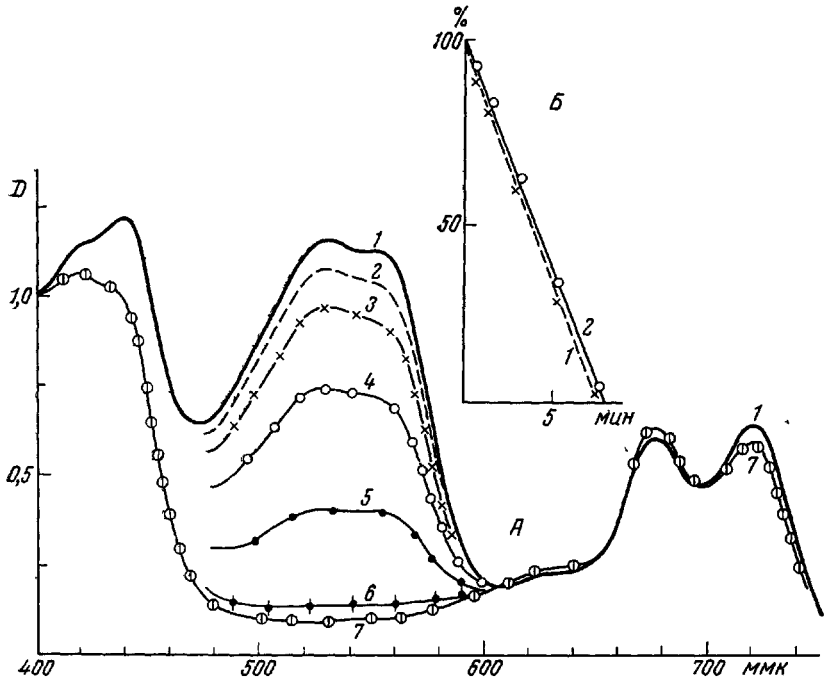


Рис. 5. Фотосенсибилизированное восстановление метилового красного в водно-коллоидном растворе хлорофилла *а*

А — спектрофотометрическая запись реакции при монохроматическом освещении (725 *ммк*). *1* — исходная система, *2—7* — в ходе фотореакции. *Б* — кинетика реакции при сенсибилизации формой 725 (*1*) и 675 *ммк* (*2*)

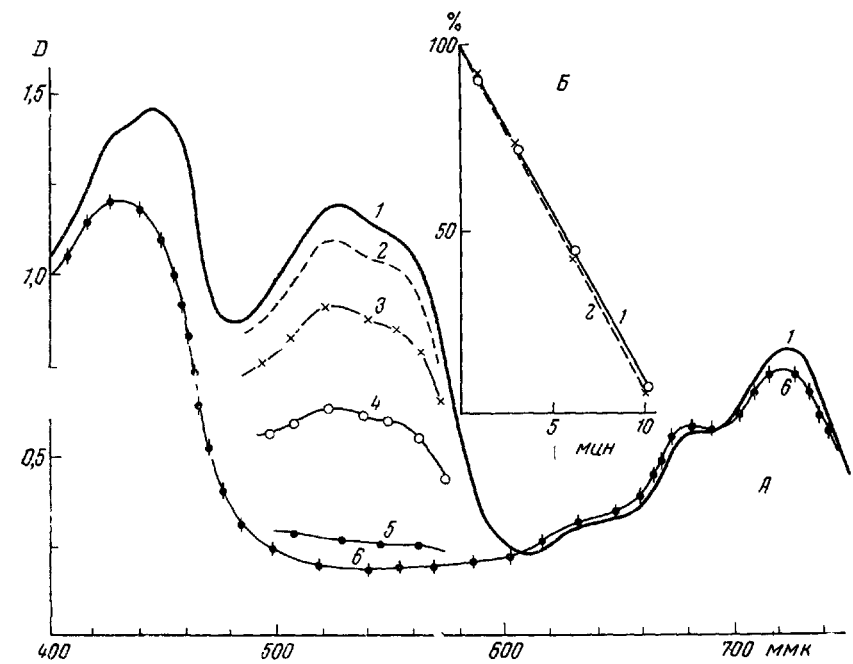


Рис. 6. Фотосенсибилизированное восстановление метилового красного в водно-коллоидном растворе бактериовиридина

А — спектрофотометрическая запись реакции при монохроматическом освещении (725 *ммк*): *1* — исходная система; *2—6* — в ходе фотореакции *Б* — кинетика реакции при сенсибилизации длинноволновой (*2*) и коротковолновой (*1*) формами

Бактериовиридин. Освещение коллоидных растворов бактериовиридина, содержащих формы с максимумами 675 и 730 *ммк*, приводит к выцветанию, которое протекает быстрее, чем фотоокисление хлорофилла *а* в подобных системах. Скорость фотоокисления длинноволновой формы бактериовиридина так же, как и у хлорофилла *а*, заметно превышает скорость выцветания коротковолновой формы. Время половинного разрушения двух форм составляет в среднем ~1 и ~3 *мин* соответственно. На рис. 4 дана спектрофотометрическая запись типичного опыта по фотоокислению бактериовиридина при 18° и кинетика процесса для двух форм при разной температуре. Обращает внимание тенденция к увеличению скорости реакции у коротковолновой формы в ходе фотоокисления. Как и у хлорофилла, фотоокисление сопровождается коротковолновым смещением максимумов поглощения на несколько миллимикрон.

При 70° и выше коллоидные растворы бактериовиридина коагулируют, поэтому для наблюдения за превращением форм под действием нагревания исходные растворы разбавляли в 2 раза глицерином, замедляющим коагуляцию (рис. 2, *В*). Отмечено, что нагревание снижает коротковолновый максимум поглощения и сдвигает длинноволновый в красную область спектра (до 736 *ммк*) вместе с возрастанием величины его оптической плотности. Охлаждение до 20° после нагревания до 90° усиливает эффект действия нагревания.

Таким образом, пигментные формы, отличающиеся по степени агрегации, проявляют и различную способность к деструктивному фотохимическому окислению. Длинноволновые формы хлорофилла *а* и бактериовиридина (710—730 *ммк*), по-видимому, обладающие кристаллической структурой обнаруживают бóльшую склонность к фотоокислению, чем формы с начальной степенью агрегации (672—677 *ммк*), имеющие, вероятно, структуру димеров. Вместе с тем следует помнить, что молекулярно-дисперсные, «мономерные» формы пигментов имеют неизмеримо более высокую скорость фотоокисления, чем агрегированные формы любого типа (таблица). Так, время половинного разрушения хлорофилла *а* и бактериовиридина в метаноле (максимумы поглощения ~665 и ~668 *ммк*) при 18° в аналогичных условиях освещения измеряется приблизительно полутора минутами и несколькими секундами соответственно. Различие в скорости выцветания у агрегированных форм обоих типов возрастает с повышением температуры, что вызывается, вероятно, увеличением диффузии растворенного кислорода и бóльшим его проникновением в структуру плотных агрегатов.

Время половинного разрушения разных форм пигментов при фотоокислении ($6 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек* при 18°)

Пигмент	Форма пигмента, *ммк*	Время половинного разрушения, *мин*
Хлорофилл *а*	Мономер, 665	1,5
	Агрегат, 673—675	10
	Агрегат, 720—725	5
Бактериовиридин	Мономер, 668	<0,1
	Агрегат, 675—678	3
	Агрегат, 725—730	1

В системах с хлорофиллом *а* фоточувствительные длинноволновые формы (712—725 *ммк*) при нагревании исчезают, давая начало заново образуемым формам с меньшей и бóльшей степенью агрегации. У бактериовиридина длинноволновым формам свойственна термостойкость, они не разрушаются при нагревании; образование более плотных агрегатов в этих условиях, по-видимому, протекает через «достройку» первоначальных, минуя стадию их предварительного распада на менее агрегированные формы (димеры и, возможно, мономеры), как в случае хлорофилла *а*. Основную роль в построении длинноволновых структур бактериовиридина, как показали измерения инфракрасных спектров [23],

играют межмолекулярные координационные связи кетогрупп циклопентанонового кольца и, возможно, гидроксиалкильных групп 1 пиррольного кольца с центральным атомом магния.

Контрольные опыты с освещением различных систем в вакууме показали практически полное отсутствие каких бы то ни было спектральных изменений даже при длительном действии света. Однако нельзя исключить возможность распада агрегированных структур в ходе самой реакции фотоокисления кислородом по аналогии с тем, что наблюдалось в работе [8] при освещении коллоидных растворов феофитина в аэробных условиях. На кинетике процесса выцветания каждой из пигментных форм, вероятно, сказывается и сенсибилизированное окисление, когда одна форма сенсибилизирует при освещении реакцию взаимодействия с кислородом другой формы. Фотосенсибилизирующая активность агрегированных форм при восстановлении метилового красного аскорбиновой кислотой (см. ниже) делает вероятным такое предположение.

Одной из вероятных причин повышенной фоточувствительности длинноволновых форм представляется интенсивное протекание процессов миграции энергии возбуждения с коротковолновых форм к длинноволновым, что установлено для различных модельных систем и листьев растений [1; 24]. В ряде опытов (см., например, опыты с бактериовиридином) была отмечена тенденция к увеличению скорости фотоокисления у коротковолновых форм в ходе реакции. Этот эффект можно объяснить предположением об уменьшении «стока» энергии с коротковолновых форм по мере выцветания длинноволновых. Однако кинетика разрушения каждой из форм определяется взаимодействием ряда факторов, среди которых немалая роль может принадлежать и структуре агрегатов.

Фотосенсибилизирующие свойства. Исследовали коллоидные растворы хлорофилла *а* и бактериовиридина (40% метанола), содержащие формы с поглощением 675—678 и 720—725 *ммк*. Существенно, что сравнение фотосенсибилизирующей активности разных форм пигмента можно было проводить в опытах с одной и той же системой, применяя освещение через интерференционные светофильтры с максимумами пропускания, соответствующими поглощению агрегированных форм. Использовали коллоидные растворы, имеющие равные или соизмеримые величины поглощения у каждой из двух форм. Фотосенсибилизирующую способность определяли по реакции восстановления метилового красного аскорбиновой кислотой. Опыты проводили по следующей схеме. В вакуумную трубку Тунберга помещали 1 *мг* аскорбиновой кислоты; 0,4 *мл* раствора метилового красного с концентрацией $3{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М* и 4,5 *мл* коллоидного раствора пигмента. Реакционную смесь эвакуировали в течение 3 *мин* масляным насосом. Оптическая плотность метилового красного при 525 *ммк* до начала фотореакции составляла ~ 1; pH системы (при измерении после фотореакции) был равен 4,5. Для сравнения фотосенсибилизирующей активности коротковолновой и длинноволновой форм с двумя порциями одного и того же коллоидного раствора проводили два опыта, освещая монохроматическим светом с длиной волны 675 и 725 *ммк*. Интенсивности обоих световых потоков выравнивали с помощью термостолбика. Фотореакции проводили при 18° в условиях термостатирования. В конце реакции систему освещали белым светом ($6 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек*) для полного обесцвечивания красителя. По мере освещения спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-10. Кинетику процесса оценивали по снижению величины оптической плотности метилового красного при 525 *ммк* в ходе реакции, откладывая по оси ординат содержание невосстановленного красителя (в %).

На рис. 5, *А* приведена спектрофотометрическая запись типичного опыта по фотовосстановлению метилового красного в коллоидном растворе хлорофилла *а* при освещении монохроматическим светом с длиной волны 725 *ммк*, поглощаемым длинноволновой формой пигмента. Погло-

щение сенсибилизирующей формы за время опыта существенно не изменялось. Метиловый красный обесцвечивался за 7—8 *мин* освещения. Кинетика процесса представлена на рис. 5, *Б*. От нее практически не отличается ход восстановления метилового красного при освещении светом с длиной волны 675 *ммк*, поглощаемым коротковолновой формой пигмента.

Спектрофотометрическая запись типичного опыта по фотовосстановлению метилового красного в коллоидном растворе бактериовиридина при освещении светом с длиной волны 725 *ммк* представлена на рис. 6, *А*. Кинетика процесса (рис. 6, *Б*, *2*) не отличается от хода той же фотореакции при освещении коротковолновым светом (рис. 6, *Б*, *1*).

Полученные результаты свидетельствуют, что длинноволновые формы хлорофилла *а* и бактериовиридина обладают фотосенсибилизирующей активностью, которая соответствует (у хлорофилла *а*) или соизмерима (у бактериовиридина) с активностью менее агрегированных, коротковолновых форм. Измеренный нами квантовый выход реакции сенсибилизированного восстановления метилового красного во всех вариантах опытов с хлорофиллом *а* и бактериовиридином составлял величину $\sim$0,015, которая приблизительно на порядок меньше, чем квантовый выход той же реакции в истинных растворах.

Опыты с хлорофиллом *а*, которые проводились на системах, содержащих равные количества агрегированных форм двух типов, доказывают фотосенсибилизирующее действие высоко агрегированных, длинноволновых форм пигмента и с бóльшей достоверностью, чем опыты с бактериовиридином, свидетельствуют о близкой активности форм с разной степенью агрегации. Таким образом, можно считать, что увеличение степени агрегации пигментных молекул не приводит к снижению их фотохимической активности, хотя фотосенсибилизирующее действие у молекулярно-дисперсных, «мономерных» форм пигментов гораздо выше, чем у агрегированных форм любого типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин Ф. Ф., в кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр. 96, «Наука», 1965.
2. Быстрова М. И., Красновский А. А., Мол. биол. **1**, 362, 1967
3. Быстрова М. И., Красновский А. А., Мол. биол. **2**, 847, 1968
4. Красновский А. А., в кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах, стр. 213, «Наука», 1966
5. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биофизика **12**, 240, 1967
6. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Докл. АН СССР **158**, 460, 1964
7. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А., Докл. АН СССР **183**, 711, 1968
8. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Докл. АН СССР **189**, 420, 1969
9. Красновский А. А., Быстрова М. И., Докл. АН СССР **182**, 211, 1968
10. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР **53**, 447, 1946
11. Красновский А. А., Докл. АН СССР **103**, 283, 1955
12. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия **22**, 776, 1957
13. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биохимия **23**, 760, 1958
14. Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР **174**, 221, 1967
15. Красновский А. А., Луганская А. А., Докл. АН СССР **183**, 1441, 1968
16. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР **127**, 913, 1959
17. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Биофизика **4**, 641, 1959
18. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Биофизика **5**, 599, 1960
19. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Биофизика **6**, 563, 1961
20. Серебровская К. Б., Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Опарин А. И., Биофизика **7**, 34, 1962
21. Красновский А. А., Быстрова М. И., Докл. АН СССР **174**, 480, 1967
22. Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф., Биофизика **12**, 845, 1967
23. Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н., Докл. АН СССР **189**, 885, 1969
24. Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Докл. АН СССР **175**, 1175, 1967

Поступила в редакцию
12.II 1970

THE PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF THE DIFFERENT AGGREGATED FORMS OF CHLOROPHYLL *a* AND BACTERIOVIRIDIN

M. I. BYSTROVA and A. A. KRASNOVSKII

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

In water colloidal solution of chlorophyll *a* and bacterioviridin the formation was observed of two types of aggregated pigment forms possessing the main absorption maxima at 670—677 and 712—730 *mμ*. Photooxidation and photosensitizing activity as well as termolability of these aggregates were studied. It has been shown that the longwave pigment forms exhibit the higher velocity of photooxidation as compared to the shortwave ones. The longwave forms of chlorophyll *a* (712 and 720—725 *mμ*) are converted into the shortwave less aggregated forms at heating at 70°, whereas the longwave forms of bacterioviridin are termostable. The longwave and the shortwave types of aggregated forms of chlorophyll *a* and bacterioviridin possess the same photosensitizing activity in the reaction of photoreduction of methyl red by ascorbic acid; the quantum yield is about 1.5%.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 5 1971 Вып. 3

УДК 577.45

ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФИКОЦИАНИНА

Л. Г. ЕРОХИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва
и биолого-почвенный факультет Московского государственного университета
им М. В. Ломоносова

Измерены спектры поглощения и флуоресценции растворов фикоцианина при температуре жидкого азота. Обнаружена структура спектра поглощения, указывающая на присутствие гексамерных (максимумы 580 и 635 *ммк*), тримерных (максимумы 650—660 *ммк*) и мономерных форм (максимум 605 *ммк*). При —196° обнаружено значительное увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с 20° без изменения положения максимумов. Исследовано влияние различных воздействий на спектры поглощения и флуоресценции растворов фикоцианина. Установлена корреляция между спектральными эффектами и диссоциацией фикоцианина на тримерные и мономерные субъединицы: при диссоциации фикоцианина на тримеры в спектре поглощения появляются максимумы 630 и 660—670 *ммк*, при диссоциации на мономеры — максимум 605 *ммк*. Сравнительное исследование эффекта тушения флуоресценции растворов фикоцианина показало возрастание эффекта тушения при денатурации. Фотохимическая активность нативных растворов фикоцианина незначительна: наблюдается ее значительное увеличение при денатурации нагреванием, мочевиной, детергентами и др.

Действие фикобилиновых пигментов (фикоэритрина и фикоцианина) как сенсибилизаторов фотосинтеза в красных и синезеленых водорослях тесно связано с особенностями их спектральных свойств. Ранее мы исследовали влияние денатурации на спектральные свойства, тушение флуоресценции и фотохимическую активность фикоэритрина [1—3]. Мы нашли, что денатурация ведет к значительному возрастанию фотосенсибилизирующего действия фикоцианина и фикоэритрина [4], что следует объяснить увеличением доступности хромофорных групп для взаимодействия с низкомолекулярными партнерами реакции.

В настоящей работе исследовали спектры поглощения и флуоресценции, а также эффекты тушения флуоресценции при воздействии различных денатурирующих агентов на растворы фикоцианина.

Условия диссоциации фикоцианина хорошо изучены [5—9], что позволяет сопоставить влияние диссоциации со спектральными свойствами этого белка. Предполагалось, что эти исследования позволят подойти к выяснению влияния структуры белка на природу межхромофорного взаимодействия в молекуле хромопротеида.

МЕТОДИКА

Фикоцианин выделяли из культуры синезеленой водоросли *A. nidulans*. Суспензию водорослей тщательно отмывали от культуральной среды 0,1 *М* фосфатным буфером при pH 6 2-кратным центрифугированием по 10 *мин* при 4000 *g*. Биомассу водорослей растирали на холоду с окисью алюминия, добавляли в смесь фосфатный буфер (соотношение объемов 1 : 4) и центрифугировали при 4000 *g* в течение 20 *мин*. Из надосадочной жидкости фикоцианин осаждали 40%-ным раствором насыщенного сернокислого аммония и диализовали при 4° против дистиллированной воды в течение суток Растворы после диализа центрифугировали в течение 30 *мин* при 4000 *g*. Затем фикоцианин отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-150 от фракций, содер-

жащих, вероятно, остатки мембранных компонентов и комплекс фикоцианин—хлорофилл. После этого растворы фикоцианина осаждали сернокислым аммонием и диализовали на холоду против дистиллированной воды.

Концентрированные растворы фикоцианина хранили в холодильнике под слоем толуола. Непосредственно перед опытом растворы фикоцианина в 0,1 *М* фосфатном буфере (pH 6) повторно очищали на колонке с сефадексом G-150.

Исследуя влияние pH среды, использовали цитратно-фосфатный буфер в пределах pH 2,5—8,9 и буфер 0,05 *М* Na_2HPO_4+0,05 *М* NaOH, для pH 9. При изучении температурной денатурации раствор нагревали в течение 10 *мин*, быстро охлаждали в течение 5 *мин* и проводили измерения.

Спектры поглощения и флуоресценции измеряли при комнатной температуре и температуре жидкого азота, в последнем случае готовили водно-глицериновые смеси в отношении 2 : 3. Поглощение измеряли на спектрофотометре СФ-10, флуоресценцию— на установке, описанной ранее [10].

При исследовании тушения флуоресценции готовили растворы с оптической плотностью в максимуме поглощения около 1,0, что соответствует концентрации пигмента 10^{-5} *М*. Флуоресценцию возбуждали светом лампы накаливания в области 600 *ммк*, выделяемой при помощи интерференционного светофильтра. В качестве тушителей использовали: окислители — *n*-бензохинон и кислород; восстановители — аскорбат натрия, тиомочевину и глютатион. Тушение выражали отношением начальной интенсивности флуоресценции (Φ_0) к интенсивности в присутствии тушителя (Φ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения и флуоресценции водных растворов фикоцианина. Работы, в которых применялось ультрацентрифугирование [7—9] и электронная микроскопия [11], показали, что в 0,1 *М* фосфатном буфере,

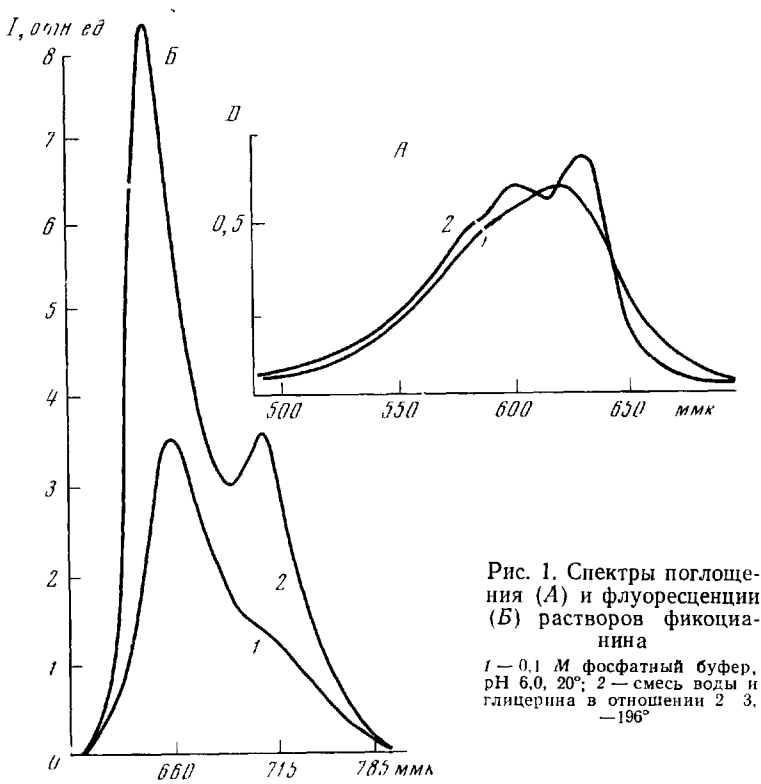


Рис. 1. Спектры поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) растворов фикоцианина

1 — 0,1 *М* фосфатный буфер, pH 6,0, 20°; *2* — смесь воды и глицерина в отношении 2 3, —196°

pH 6, при комнатной температуре растворы фикоцианина представляют собой смесь мономерных (3S), тримерных (7S) и гексамерных структур (11S) с явным преобладанием гексамеров (до 80%).

Спектр поглощения таких растворов фикоцианина при комнатной температуре имеет сложную несимметричную полосу поглощения 622 *ммк* и небольшое плечо в области 590 *ммк*. Наши опыты показали,

что при замораживании растворов до температуры жидкого азота в спектре поглощения появляется структура с максимумами 580—590, 605, 635 и 650 *ммк* (рис. 1).

Спектры флуоресценции фикоцианина и фикоэритрина сходны: два максимума (580 и 630 *ммк*) в спектре флуоресценции фикоэритрина и два (657 и 710 *ммк*) в спектре фикоцианина. Замораживание в жидком азоте вызывает увеличение интенсивности флуоресценции без изменения

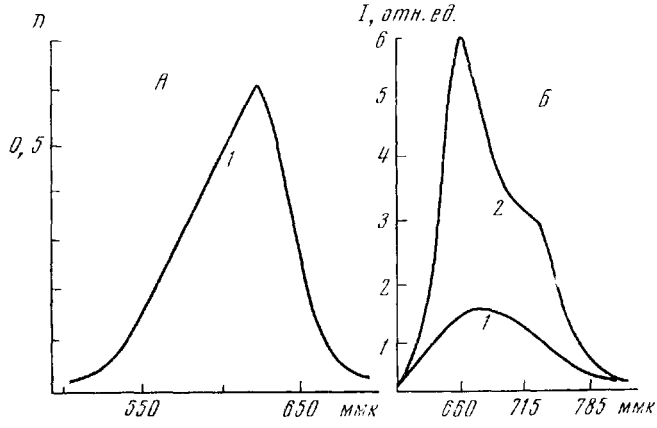


Рис. 2. Спектры поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) кристаллического фикоцианина
1 — 20°, *2* — при —196°

положения максимумов (см. рис. 1). Взвесь фикоцианина в 40%-ном растворе сернокислого аммония обладает слабой флуоресценцией в той же области спектра, в которой лежат максимумы флуоресценции растворов фикоцианина (рис. 2). При температуре жидкого азота интенсивность этой флуоресценции увеличивается без изменения в положении максимумов. Спектр поглощения взвеси фикоцианина не отличался от спектра поглощения растворов (рис. 2).

Таким образом, дальнейшая агрегация не приводит к изменениям в положении полос поглощения и люминесценции.

Так же как для растворов фикоэритрина [2], для растворов фикоцианина не наблюдается тушения флуоресценции кислородом и восстановителями — аскорбатом натрия и тиомочевиной. При использовании *n*-бензохинона эффект тушения обнаруживает зависимость от вязкости среды. Тушение флуоресценции растворов в вязкой, водно-глицериновой среде несколько выше тушения флуоресценции водными растворами (табл. 1). Замораживание водно-глицериновых смесей ведет к дальнейшему увеличению тушения, что характерно и для фикоэритрина. Подобная зави-

Таблица 1

Зависимость эффекта тушения флуоресценции Φ_0/Φ растворов фикоцианина до и после денатурации и растворов фикоцианобилина в амиловом спирте от различной концентрации (—lg *C*) молекул тушителей

Условия опытов	Бензохинон			Аскорбат			Тиомочевина			Глютатион		
	6	5	4	6	5	4	6	5	4	6	5	4
Фосфатный буфер, 20°	1,14	1,40	1,80									
Глицерин 60%-ный, 20°	1,35	1,70	2,10									
То же при—196°	1,45	1,95	2,5			Нет эффекта						
pH 4	1,14	1,40	1,80									
pH 8	1,3	1,60	2,20									
Мочевина 0,5 *M*	1,15	1,20	1,80	1,0	1,02	1,06	1,0	1,01	1,02	1,0	0,95	0,85
Нагревание при 50°	1,14	1,20	1,60			Нет эффекта				0,98	0,80	0,60
Фикоцианобилин	1,0	1,04	1,05			Нет эффекта						

симость наблюдалась в нашей лаборатории при исследовании тушения флуоресценции хлоропластов [12]. Эти эффекты можно объяснить стабилизацией комплекса в первом случае между фикобилинами и во втором — между пигмент-белково-липидными соединениями и молекулами тушителей. В отличие от этого в растворах хлорофилла происходит уменьшение эффекта тушения в вязкой среде и при низкой температуре, объясняющееся тем, что с увеличением вязкости затрудняется диффузия и уменьшается число столкновений возбужденных молекул хлорофилла с молекулами тушителей.

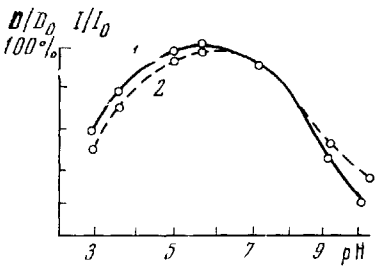


Рис. 3. Зависимость интенсивности максимумов поглощения (*1*) и флуоресценции фикоцианина (*2*) от pH раствора

Действие pH среды. Диссоциация фикоцианина на субъединицы при изменении pH среды была описана Сведбергом еще в 1929 г. [5]. При pH выше 9 фикоцианин необратимо диссоциирует на мономерные субъединицы. При подкислении среды ниже 4,0 преобладающими становятся тримерные субъединицы [7].

Мы исследовали спектры поглощения и флуоресценции растворов фикоцианина в пределах pH 2—10 при +20 и —196°. Полученные результаты в основном согласуются с известными данными [13]. В наших опытах положение основного максимума поглощения 622 *ммк* и флуоресценции не менялось практически в интервале pH 4—8, тогда как относительная их интенсивность достигала наибольшего значения при pH 5—6 (рис. 3). При pH ниже 4, т. е. в условиях диссоциации фикоцианина на тримеры, уменьшение основного максимума поглощения сопровождается появлением широкой полосы поглощения с максимумом 630 и 670 *ммк*. Кислые растворы, не флуоресцируют. При pH>6 происходит быстрое снижение оптической плотности и интенсивности флуоресценции. При pH> 9 появляется максимум поглощения 605 *ммк*; флуоресценция смещалась при этом до 647 *ммк*. В спектре поглощения водно-глицериновых растворов при pH 3 и 9 при температуре жидкого азота не наблюдается дополнительных максимумов.

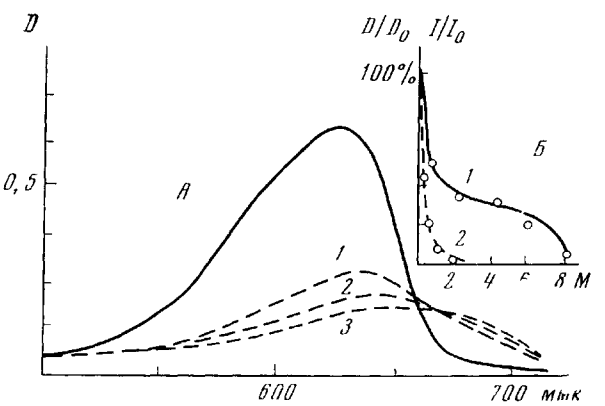


Рис. 4. Влияние мочевины на спектральные свойства фикоцианина

А — действие мочевины на спектры поглощения растворов фикоцианина. Сплошная кривая — раствор фикоцианина без мочевины; прерывистая — в мочевине; цифры у кривых — концентрация мочевины, *М*, *Б* — зависимость интенсивности максимумов поглощения 622 *ммк* (*1*) и флуоресценции (*2*) от концентрации мочевины

Изменение pH среды влияет и на величину эффекта тушения флуоресценции *n*-бензохиноном. При сравнительном исследовании эффекта тушения (pH 4 6; и 8) наблюдается увеличение эффекта тушения при pH 4 и 8 (табл. 1). Неизменность спектров поглощения при введении *n*-бензохинона до концентрации 10^{-4} *М* свидетельствует, что этот тушитель не оказывает воздействий на структуру фикоцианина. Увеличение

эффекта тушения флуоресценции при изменении pH среды наблюдалось нами и для фикоэритрина [2].

Действие мочевины. В присутствие мочевины наблюдалось увеличение количества тримерных структур [7]. Креспи и др. [14] отмечали смещение максимума 622 до 655 *ммк* в растворах 8 *М* мочевины при pH 5. В наших опытах мочевина вызывала резкое снижение основного максимума поглощения и флуоресценции фикоцианина при концентрации

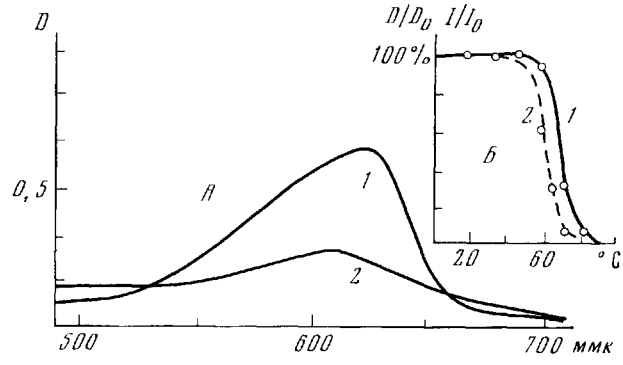


Рис. 5. Влияние тепловой денатурации на спектральные свойства фикоцианина

А — спектры поглощения растворов фикоцианина до (*1*) и после нагревания (2) при 70°; *Б* — зависимость интенсивности максимума поглощения (*1*) и максимума флуоресценции (2) от температуры

),5 *М* (рис. 4). Увеличение концентрации мочевины до 1 *М*, приводящей к диссоциации на тримеры, вызывает появление максимума 630 и 670 *ммк*. Флуоресценция исчезает в 2 *М* мочевине. Измерение спектров поглощения растворов фикоцианина в 1 *М* мочевине при —196° обнаруживает только максимумы 630 и 670 *ммк*. Существенно отметить, что 8 *М* мочевина вызывает также диссоциацию фикоэритрина на субъединицы, что было показано нами ранее [1].

Тушение флуоресценции растворов фикоцианина в 0,1 *М* мочевине *п*-бензохиноном незначительно превышает тушение нативного фикоцианина (см. табл. 1). Кислород также не тушит флуоресценцию фикоцианина, денатурированного 0,1 *М* мочевиной. В среде, содержащей аскорбат натрия и тиомочевину, наблюдается незначительный эффект (табл. 1), что соответствует опытам с фикоэритрином.

Действие нагревания. Лаворель [15] отметил, что постепенное нагревание растворов фикоцианинов до 60° не вызывает изменений в спектре поглощения. Флуоресценция более чувствительна к действию нагревания и резко уменьшается после нагревания выше 60°. Согласно наблюдениям Скотта и Бернса [7], при повышении температуры до 30—40° происходит увеличение содержания гексамерных форм.

В условиях наших опытов значение оптической плотности не меняется при нагревании до 60°. Снижение интенсивности флуоресценции наблюдается уже при 50°. Нагревание до 70° сопровождается резким снижением поглощения и появлением максимумов 605 и 670 *ммк*. Флуоресценция при этом исчезает (рис. 5). Относительную устойчивость к повышению температуры до 50—60° можно связать с тем, что происходит стабилизация гексамерных структур за счет усиления гидрофобного взаимодействия. Нагревание до более высоких температур приводит к диссоциации фикоцианина на мономерные субъединицы, о чем свидетельствует появление максимума 605 *ммк*. Тепловая денатурация фикоэритрина также приводит к диссоциации на субъединицы. Однако фикоэритрин более устойчив к действию нагревания; его диссоциация наступает лишь при 80—90°.

Эффект тушения флуоресценции растворов фикоцианина, нагретых до температуры 50°, под действием *п*-бензохинона ниже, чем у нативного белка. Однако после денатурации при 50° наблюдается некоторое тушение флуоресценции восстановителями—более сильное аскорбатом и менее значительное тиомочевиной (табл. 1). Изменений в спектрах поглощения

как нативного, так и денатурированного фикоцианина в присутствии указанных восстановителей не было обнаружено. Добавление глютатиона, практически не тушащего флуоресценцию фикоцианина, вызывает возгорание флуоресценции. Вероятно, при этом происходит взаимодействие глютатиона с хромофорными группами, на что указывает изменение спектров поглощения в присутствии этого восстановителя. Глютатион «восстанавливает» спектр поглощения после тепловой денатурации, что вызывает возгорание люминесценции. Аналогичное действие

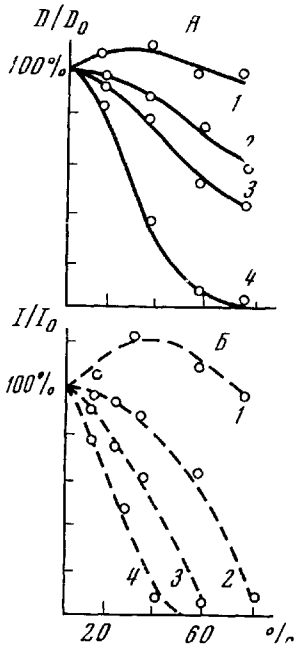


Рис. 6. Зависимость интенсивности максимума поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) растворов фикоцианина от концентрации растворителей

1 — глицерин, *2* — ацетон, *3* — спирт, *4* — диоксан

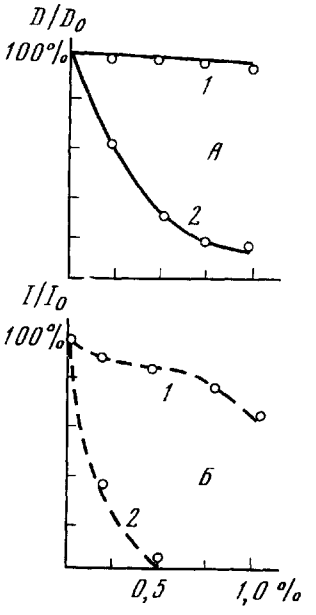


Рис. 7. Зависимость интенсивности максимума поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) от концентрации детергентов

1 — тритон Х-100, *2* — додецилсульфат натрия

глютатиона, приводящее к восстановлению спектров поглощения и к возбуждению флуоресценции, отмечено и для фикоэритрина.

Действие органических растворителей. Смещение поглощения в коротковолновую область (до 605 *ммк*) и резкое уменьшение оптической плотности наблюдаются при добавлении к раствору фикоцианина в фосфатном буфере (pH 6) диоксана (20%), этанола (40%) и ацетона (60%) (рис. 6). Максимум флуоресценции при этом смещается до 647 *ммк* и интенсивность его резко снижается. Появление максимума 605 *ммк* свидетельствует о диссоциации фикоцианина на мономерные субъединицы. В отличие от фикоцианина фикоэритрин более устойчив к действию органических растворителей. Нам не удалось наблюдать появление максимумов поглощения, характерных для субъединиц фикоэритрина, при добавлении к растворам этого хромопротеида органических растворителей.

Детергенты. Неионный детергент (тритон Х-100) в концентрации до 1% не вызывает существенных изменений в спектрах поглощений и флуоресценции. Не было обнаружено и увеличение эффекта тушения в этих условиях. Анионный детергент (додецилсульфат натрия) уже при концентрации 0,5% снижает оптическую плотность до 40—50% от исход-

ной величины (рис. 7) и в спектре поглощения появляются максимумы поглощения 630 и 670 *ммк*, характерные для тримеров. Это согласуется с опытами Бернса и др. [16], свидетельствующими о диссоциации фикоцианина на тримеры в растворах додецилсульфата натрия. В отличие от фикоцианина этот детергент не вызывает диссоциацию фикоэритрина на субъединицы.

Тиоловые реагенты. Фуджмори и Печчи [17] при действии на растворы фикоцианина (pH 5) *п*-хлорсульфоновой кислотой наблюдали появление в спектре поглощения максимумов 600 и 650 *ммк*. Ультрацентрифугирование растворов фикоцианина подтвердило его диссоциацию на субъединицы. После добавления к растворам фикоцианина *п*-хлормеркурибензоата (*п*-ХМБ) мы наблюдали появление размытой полосы поглощения в области 605—630 *ммк*, что, возможно, указывало на диссоциацию фикоцианина. Известно, что *п*-ХМБ вызывает диссоциацию и фикоэритрина [1]. Однако для диссоциации молекул фикоэритрина требуется более длительная инкубация растворов с *п*-ХМБ.

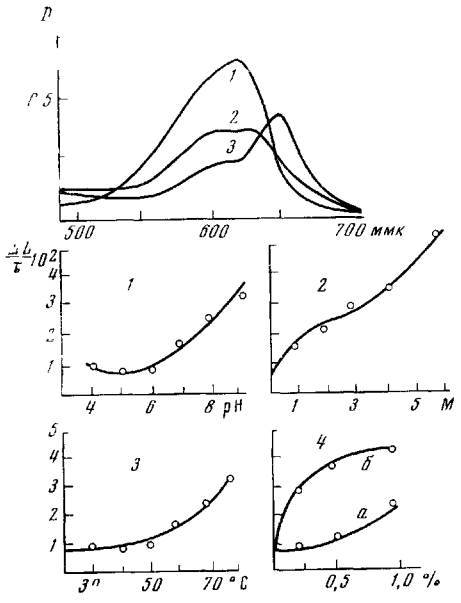


Рис. 8

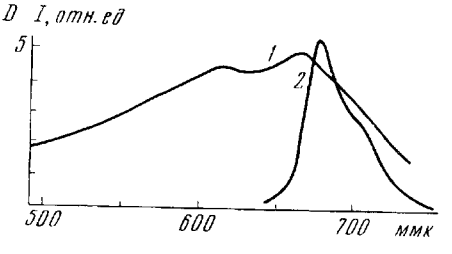


Рис. 9

Рис. 8. Влияние УФ-облучения на спектральные свойства фикоцианина

А — изменение спектров поглощения растворов фикоцианина при УФ-облучении (10 *мин*): *1* — 0,1 *М* фосфатный буфер, *2* — 0,5 *М* мочевина, *3* — 1%-ный додецилсульфат натрия. *Б* — увеличение скорости выцветания ($\Delta D/t$) растворов фикоцианина (время УФ-облучения 3 *мин*): *1* — при изменении pH; *2* — в присутствии мочевины; *3* — при нагревании; *4* — в присутствии детергентов: *а* — тритон Х-100; *б* — додецилсульфат натрия

Рис. 9. Спектры поглощения (*1*) и флуоресценции (*2*) растворов фикоцианобилина в амиловом спирте

Суммируя полученные данные по диссоциации фикоцианина и фикоэритрина, можно видеть различную их чувствительность к действиям денатурирующих агентов. Для диссоциации фикоэритрина требуются более жесткие условия денатурации: pH>10 или pH<3, 8 *М* мочевина, длительное воздействие *п*-ХМБ, нагревание до 80—90°. Структура фикоцианина более лабильна и явная диссоциация наступает при более мягких условиях воздействия: pH>9 или <4; 0,5 *М* мочевина; нагревание до 60—70°. Необходимо отметить, что в отличие от фикоцианина фикоэритрин не диссоциирует на субъединицы при добавлении органических растворителей (до 80%) и в растворах додецилсульфата натрия.

Действие УФ-облучения. На рис. 8 представлено изменение спектров поглощения нативных и денатурированных растворов фикоцианина при облучении в течение 10 *мин* светом лампы БУФ-30, т. е. главным образом резонансной линией ртути 257 *ммк*. При облучении нативных растворов существенных изменений в спектре поглощения не наблюдается. При облучении фикоцианина в 0,5 *М* мочевине появляются максимумы 605 и 630 *ммк*, в 1%-ном додецилсульфате натрия — 605 и 650 *ммк*. Очевидно, УФ-облучение способствует диссоциации тримеров на мономеры. Денатурирующее действие УФ-облучения для ряда белков описано в лите-

ратуре [18]. На рис. 8 представлена также зависимость скорости выцветания растворов фикоцианина за 3 *мин* облучения от различных условий денатурации. УФ-облучение денатурированных растворов фикоцианина ведет к резкому увеличению скорости деструктивного фотоокисления (см. рис. 8).

Спектральные свойства фикоцианобилина. Фикоцианобилин выделяли путем кислотного гидролиза фикоцианина в 10 н. HCl с последующей экстракцией амиловым спиртом. В спектре поглощения наблюдаются максимумы 605 и 670 *ммк*, описанные в литературе [19]. Растворы фикоцианобилина флуоресцируют с максимумом при 678 и 710 *ммк* (рис. 9). Эта флуоресценция также характерна и для растворов фикоэритробилина. При исследовании тушения флуоресценции растворов фикоцианобилина в амиловом спирте в качестве тушителей использовали кислород, *п*-бензохинон (10^{-6}—10^{-3} *М*) и тиомочевину (10^{-6}—10^{-3} *М*). Эти вещества не тушат флуоресценции фикоцианобилина. Тушение наблюдается при добавлении *п*-бензохинона в концентрации 10^{-3} *М* (табл. 1). Кислород практически не тушит флуоресценцию фикоцианобилина. В случае фикоэритробилина наблюдается та же картина. Результаты опытов по тушению флуоресценции фикобилиновых пигментов свидетельствуют о том, что молекулы окислителей сильнее тушат флуоресценцию хлорофилла и его аналогов в растворах [12].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Спектральные свойства фикобилиновых пигментов — поглощение и флуоресценция — обусловлены наличием хромофорных групп — фикоэритробилина и фикоцианобилина. Спектральные свойства фикобилинов в растворах отличны от их спектральных свойств в связанном с белком состоянии. Это явление рядом авторов объясняется влиянием структуры белка [1; 17; 20], либо связывается с образованием дополнительных водородных связей между хромофором и белком [21; 22].

Один из методов подхода к выяснению природы явления — исследование влияния денатурирующих воздействий на спектры поглощения и флуоресценции растворов фикобилинов. Опыты показывают, что такие спектральные эффекты, как исчезновение максимумов поглощения и флуоресценции и появление новых, обычно происходят в тех условиях денатурации, которые ведут к диссоциации пигментов (табл. 2). Наиболее отчетливо это явление видно у растворов фикоцианина, условия диссоциации которого на субъединицы достаточно хорошо изучены [5—8; [16]. Из данных табл. 2 прежде всего видна неспецифичность воздействия различных денатурирующих агентов, приводящих к сходным спектральным изменениям. Так, например, появление максимума 605 *ммк* наблю-

Таблица 2

Максимумы поглощения и флуоресценции растворов фикоцианина при различных условиях денатурации

Условия опытов	Максимумы поглощения, *ммк*	Максимумы флуоресценции, *ммк*	Характеристика белка, (s_{20W})
0,1 *М* фосфатный буфер, pH 6,0, 20°	590, 622	657, 710	3S, 7S [5—9]
Охлаждение, —196°	590, 605, 635, 650	657, 710	11S, 19S
pH<4	630, 670	647	3S, 7S [7]
pH>9,0	605		3S, 7S [5]
Мочевина 0,5 *М*	630, 670		3S, 7S [7]
Додецилсульфат натрия 0,5%-ный	630, 670		3S, 7S [7]
Нагревание, 70°	605, 670		3S, 7S [7]
Диоксан или этанол	605		
п-ХМБ	605, 670		3S [17]

дается как в условиях, приводящих к разрыву солевых и водородных связей (pH>9), так и при добавлении органических растворителей (диоксан и этанол до 20%), которые благоприятствуют образованию водородных связей, но ослабляют гидрофобные и ван-дер-ваальсовы силы. Максимум 605 *ммк* появляется также при нагревании до 70°, в результате которого ослабляются электростатические и водородные связи, и при обработке *п*-ХМБ, влияющим и на гидрофобное взаимодействие.

При воздействии на растворы фикоцианина 0,5 *М* мочевиной, небольшие концентрации которой снимают гидрофобные взаимодействия, но, как правило, не вызывают плавления водородных связей, а также при воздействии додецилсульфата натрия (до 1%), влияющего на гидрофобные связи и ослабляющего электростатическое равновесие белковой глобулы, в спектре поглощения появляются максимумы 630 и 670 *ммк*.

Совокупность полученных экспериментальных данных приводит к предположению, что наблюдаемые спектральные эффекты являются результатом диссоциации хромопротеида на субъединицы.

Диссоциация фикоцианина на мономерные субъединицы (при щелочных pH, нагревании и при добавлении органических растворителей) приводит к разобщению хромофорных групп, потере межхромофорного взаимодействия, что и вызывает исчезновение исходных максимумов поглощения и одновременно с этим появление максимума 605 *ммк*, характерного для «мономерного» хромофора. По аналогии с фикоэритрином можно предположить, что полосы поглощения нативного фикоцианина 590 и 622 *ммк* являются результатом межхромофорного взаимодействия и появляются вследствие расщепления полосы поглощения неагрегированного фикоцианобилина при 605 *ммк* [23].

При диссоциации фикоцианина на тримерные субъединицы (0,5 *М* мочевина, 0,5%-ный додецилсульфат натрия, кислые pH среды) в спектре поглощения наблюдаются максимумы 630 и 670 *ммк*. При этом типе диссоциации, вероятно, изменяется характер межхромофорного взаимодействия, что выражается в длинноволновом сдвиге полосы поглощения мономерного хромофора от 605 до 630 *ммк* [23]. Можно допустить также, что при диссоциации на тримеры появляется возможность циклизации хромофоров с образованием «квазипорфириновых» структур [24], что и обусловливает появление максимума 670 *ммк*.

Таким образом, максимумы, наблюдаемые в низкотемпературных спектрах поглощения, принадлежат гексамерным (580 и 635 *ммк*), тримерным (650—660 *ммк*) и мономерным субъединицам (605 *ммк*). Эти результаты совпадают с данными электронной микроскопии [11] и ультрацентрифугирования [9], показавшими одновременное присутствие в растворах фикоцианина трех типов субъединиц.

Длинноволновый сдвиг полосы поглощения 622 до 635 *ммк* и резкое увеличение флуоресценции при замораживании растворов до температуры жидкого азота может рассматриваться как подтверждение явления межхромофорного взаимодействия.

Уменьшение оптической плотности и интенсивности флуоресценции при мягких условиях воздействия (изменение pH среды в пределах 4—8; 0,5 *М* мочевина, нагревание до 70°; 0,5%-ный тритон X-100; органические растворители в концентрации меньше 20%) объясняется ослаблением межхромофорного взаимодействия, вызванного разобщением хромофоров в результате разворачивания белковой глобулы. Наблюдаемое при этом возрастание эффекта тушения флуоресценции объясняется увеличивающейся доступностью хромофорных групп для действия тушителей.

Опыты по фотоокислению растворов фикоцианина при УФ-облучении свидетельствуют, что нативные хромопротеиды обладают слабой фотохимической активностью, которая возрастает при денатурации: жесткие условия денатурации вызывают значительное увеличение скорости фотоокисления.

ЛИТЕРАТУРА

1 Ерохина Л Г, Красновский А А Мол биол **2**, 550, 1968
2 Красновский А А, Ерохина Л Г Докл АН СССР **183**, 2, 470, 1968
3 Красновский А А, Ерохина Л Г Докл АН СССР **186**, 957, 1969
4 Красновский А А, Ерохина Л Г Докл АН СССР **193**, 6, 1970
5 Swedberg T, Katzura i T, J Amer Chem Soc **51**, 3573, 1929
6 Hattori A, Crespi H, Katz J, Biochemistry **4**, 1225, 1965
7 Scott E, Berns D, Biochemistry **4**, 2597, 1965
8 Berns D, Morgenstern A, Biochemistry **5**, 2965, 1966
9 Jeffrey P, Biopolymers **5**, 791, 1967
10 Ерохин Ю Е, Красновский А А, Биофизика **4**, 392, 1961
11 Berns D, Edwards M, Arch Biochem and Biophys **110**, 511, 1965
12 Дроздова Н Н, Красновский А А, Мол биол **1**, 395, 1967
13 Евстигнеев В Б, Бекасова О Д Мол биол **2**, 788, 1968
14 Crespi H, Smith U, Katz J, Biochemistry **7**, 2232, 1968
15 Lavorel J, J Chim phys 1007, 1962
16 Berns D, Scott E, O'Relly X X, Science **145**, 1054, 1964
17 Fujimori E, Pecci T, Biochemistry **5**, 3500, 1966
18 Жоли М Физическая химия денатурации белков, стр 26, «Мир», М, 1968
19 Евстигнеев В Б, Бекасова О Д, Мол биол **3**, 32, 1969
20 Nolan D, O'hEocha C, Biochemistry **1**, 39p, 1967
21 Carra P, O'hEocha C, Carrol D, Biochemistry **3** 43, 1964
22 O'hEocha C, Biochemistry **2**, 375, 1963
23 Теренин А Н, Фотоника молекул красителей, стр 182, «Наука», Л, 1968
24 Crespi H, Boncer L, Norman C, Katz J, J Amer Chem Soc **89**, 3342, 1967

Поступила в редакцию
6 IV 1970

THE EFFECT OF DENATURING AGENTS ON THE ABSORPTION AND FLUORESCENCE SPECTRA OF PHYCOCYANIN

L G EROKHINA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow and Biological Department of the Moscow State University, USSR

The low temperature (—196°) absorption spectra of C-phycocyanin (isolated from a blue green alga *Anacystis nidulans*) was studied The absorption maxima at 580—590 605, 635 and 650—660 *mμ* were found The structure of low-temperature absorption spectra reflects the presence of hexamers with absorption maxima at 580 and 635 *mμ* trimer with those at 650—660 *mμ* and monomer with an absorption maximum at 605 *mμ* At low temperature the fluorescence increases The action of various agents (pH, urea organic solvents, detergents and thiols) on the absorption and fluorescence was studied The correlation between the spectral effects and dissociation of phycocyanin was obser ved The investigation of the fluorescence quenching by oxidants shows the increase of the quenching effects in the course of chromoproteid denaturation The photochemical activity of the native phycocyanin was small, the denaturation caused a drastic increase in photosensitizing activity

Доклады Академии наук СССР
1971. Том 201, № 5

УДК 581.132

БИОХИМИЯ

Н. В. КАРАПЕТЯН, В. В. КЛИМОВ, И. Н. КРАХМАЛЕВА
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИНДУКЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ И ХРОМАТОФОРОВ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

При освещении зеленых листьев наблюдаются сложные по кинетике изменения флуоресценции (ΔФ), известные под названием индукции флуоресценции ([1], [2]). Быстрые ΔФ зеленых листьев можно связать с окислительно-восстановительными превращениями вещества Q, которое в окисленном состоянии тушит флуоресценцию (Ф) хлорофилла ([3]). Работами ряда авторов показано, что отдельные компоненты сложной кинетической кривой индукции Ф обусловлены взаимодействием первичного акцептора Q фотосистемы 2 с донорной частью этой же фотосистемы и с фотосистемой 1 через цепь переноса электрона ([4–6]).

Нами было показано ([6]), что промежуточный спад $I—D$ в кинетике ΔФ ([7]), а также уменьшение Ф при освещении светом 1 ($\lambda > 710$ мμ; $1{,}2 \cdot 10^6$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) листа в анаэробных условиях наиболее отчетливо проявляются при частичном подавлении активности фотосистемы 2. В то же время эти изменения не наблюдаются при воздействии факторов, прерывающих поток электронов между фотосистемами. Спад $I—D$ у листьев особенно четко обнаруживается при удалении кислорода ([4, 6, 8]).

При освещении хлоропластов, в отличие от листьев, всегда наблюдалось лишь усиление Ф без сложных переходных явлений. На хлоропластах не удается обнаружить окислительное действие фотосистемы 1 на ΔФ даже при удалении кислорода. У пурпурных бактерий и изолированных хроматофоров также обнаружено лишь быстрое усиление Ф ([9–11]), пропорциональное фотовыцветанию П870 в отсутствие экзогенных восстановителей в среде ([9]).

Как уже указывалось, действие фотосистемы 1 на ΔФ наиболее отчетливо обнаруживается при удалении кислорода, приводящем к частичному накоплению QH в «темноте» ([6]). В то же время удаление кислорода не оказывает существенного влияния на кинетику ΔФ хлоропластов. По-видимому, более простая кинетика ΔФ хлоропластов по сравнению с листьями связана с нарушением регуляции реакций восстановления и окисления Q в первую секунду освещения. Подобные нарушения могут быть объяснены не только лучшим доступом кислорода к изолированным хлоропластам, но и потерей эндогенных восстановителей и повреждением определенных структур при выделении хлоропластов. Можно предположить, что присутствие восстановителей, изменяющих состояние первичного донора и первичного акцептора фотосистемы 2 и переносчиков электрона между фотосистемами, окажет существенное влияние на кинетику ΔФ хлоропластов.

В связи с этим мы исследовали кинетику ΔФ хлоропластов в присутствии восстановителей (дитионит). Опыты проводили на хлоропластах гороха, выделенных по методу ([12]). При введении дитионита в виде щелочного раствора pH среды хлоропластов оставалась постоянной. Измерение фотоиндуцированных ΔФ проводили на двухлучевой установке, описанной нами ранее ([13]). Монохроматический свет слабой интенсивности (480 мμ, 5 эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) возбуждал Ф объекта, выход которой изменялся под действием интенсивного освещения ($> 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$).

В опытах вначале регистрировали исходную Ф объекта $\lambda > 670$ мμ, а затем ее изменения при освещении (рис. 1, *1*). Величина Ф на ΔФ на рисунках дана в относительных единицах.

Без дитионита, когда Ф хлоропластов мала по величине и постоянна по времени, освещение интенсивным светом 2 (600—700 мμ; $1{,}5 \cdot 10^5$ эрг·$\cdot см^{-2} \cdot сек^{-1}$) вызывает быстрое усиление Ф (рис. 1, *1*). При добавлении в темноте дитионита (0,1—0,3 мг/мл) происходит длящееся многие минуты медленное возрастание Ф, обусловленное, по-видимому, химическим восстановлением *Q*. Освещение хлоропластов интенсивным светом 2 сразу после добавления дитионита вызывает увеличение Ф, которое меньше ΔФ в отсутствие дитионита на величину темнового роста Ф. При освещении слабым светом 2 через несколько минут после добавления дитионита уже наблюдаются сложные переходные явления, характерные для листьев: начальное усиление Ф, промежуточный спад и последующее усиление Ф (рис. 1, *2*, *3*). Выключение света вызывает падение Ф ниже исходного уровня. Подобные же эффекты мы ранее наблюдали при освещении слабым светом 2 листа в анаэробных условиях или при использовании фонового света 2 ([6]). Таким образом, при освещении слабым светом 2 хлоропластов в восстановительных условиях проявляется действие фотосистемы 1 (частично поглощающей свет 2), благодаря чему на хлоропластах удается наблюдать сложные ΔФ, характерные для листьев.

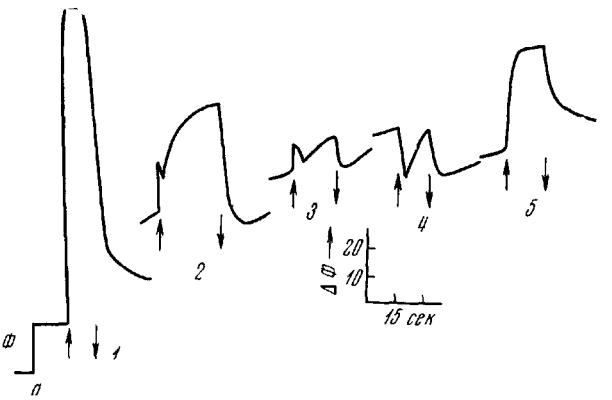


Рис. 1. Кинетика ΔФ при освещении хлоропластов: *1* — светом 2 в отсутствие дитионита (показан исходный уровень Ф), *2*—*5* в присутствии дитионита, *2* — слабый свет 2 (3% от максимальной интенсивности), *3* — слабый свет 2 (1,5%), *4* — свет 1, *5* — свет 1 в присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ *М* диурона. Образец содержал 2 мл суспензии хлоропластов в 0,02 *М* трис-буфере (pH 7,5), содержание хлорофилла 0,01 мг/мл. *а* — момент включения измерительного света. Стрелками вверх и вниз обозначены соответственно включение и выключение действующего света

При освещении светом 1 хлоропластов в присутствии дитионита наблюдается уменьшение Ф, обусловленное действием фотосистемы 1; последующее увеличение Ф на свету вызвано, очевидно, действием фотосистемы 2 (рис. 1, *4*). В присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ *М* диурона (рис. 1, *5*) или добавлении более чем 0,02% тритона X-100 освещение светом 1 хлоропластов в восстановительных условиях вызывает уже не уменьшение, а увеличение Ф, т. е. при нарушении взаимодействия фотосистем происходит лишь восстановление *Q* фотосистемой 2, частично поглощающей свет 1. В восстановительных условиях освещение как светом 1, так и светом 2 фракции хлоропластов, обогащенных фотосистемой 2, вызывает только усиление Ф. Таким образом, фотоиндуцированные переходные явления Ф хлоропластов в присутствии дитионита также могут быть объяснены взаимодействием фотосистем 2 и 1 через цепь переноса электрона.

В определенных условиях освещение светом $\lambda > 670$ мμ, $1{,}9 \cdot 10^6$ эрг·$\cdot см^{-2} \cdot сек^{-1}$ хлоропластов в присутствии дитионита при pH 6,7 можно наблюдать сложную кинетику ΔФ с такими же временными параметрами, как и при освещении листа в анаэробных условиях. Добавление диурона вызывает исчезновение промежуточного спада и резко ускоряет подъем Ф до максимального уровня. Кинетические кривые, зарегистрированные на

хлоропластах осциллографически, в точности подобны кривым, ранее измеренным на листе в анаэробных условиях. Свет 1 вызывает быстрое уменьшение Ф, которое исчезает при добавлении диурона.

Характер кинетики ΔФ хлоропластов существенно зависит от количества восстановителя и pH среды. В присутствии больших количеств дитионита (1 мг/мл и более) наблюдается темновое увеличение Ф, а освещение хлоропластов интенсивным светом вызывает переходные явления, отличные от таковых в слабо восстановительных условиях (рис. 2). В кинетике ΔФ, вызываемых светом 2, проявляется медленный спад (рис. 2, *2*), частично необратимый в темноте (рис. 2, *3*). В течение времени по мере увеличения темнового уровня Ф световой спад более выражен, а выключение света ведет к падению Ф ниже исходного уровня (рис. 2, *3*, *4*). При достижении максимального уровня Ф равного Ф + ΔФ, освещение вызывает не увеличение, а уменьшение Ф (рис. 2, *5*—*8*). Скорость светового уменьшения Ф и обратного процесса зависят от длины волны, интенсивности, длительности освещения и от pH суспензии хлоропластов. При pH 7,5 длительное освещение интенсивным светом 2 вызывает значительное уменьшение Ф, почти необратимое в темноте (рис. 2, *5*), тогда как при pH 6,7 уменьшение Ф менее выражено, но более обратимо (рис. 2, *6*). Наоборот свет 1 при pH 7,5 вызывает лишь небольшое сложное по кинетике уменьшение Ф (рис. 2, *7*), а при pH 6,7 наблюдается значительное уменьшение Ф (рис. 2, *8*). Действие света 1 полностью обратимо.

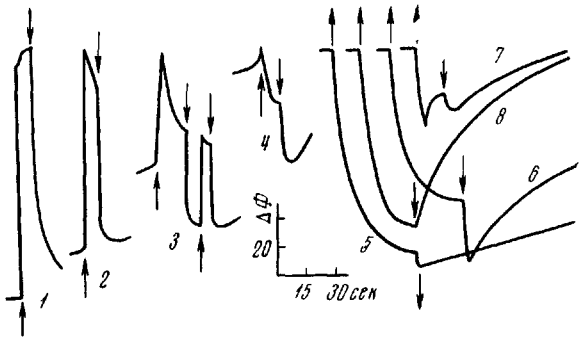


Рис. 2. Кинетика ΔФ хлоропластов без дитионита (*1*) и в присутствии 1 мг/мл дитионита (*2*—*8*). *2*—*4* получены при освещении светом 2 хлоропластов при pH 7.5 через разное время после добавления дитионита (т. е. при разных уровнях исходной Ф), *5*—*8* после достижения $Ф_{макс}$, *5* — свет 2 (pH 7,5), *6* — свет 2 (pH 6,7), *7* — свет 1 (pH 7,5), *8* — свет 1 (pH 6,7). Характеристику образца см. в подписи к рис. 1

Возникает вопрос о природе процессов, обусловливающих уменьшение Ф в сильно восстановительных условиях. Можно было бы ожидать, что когда первичные донор и акцептор и переносчики электрона полностью восстановлены, то ΔФ будет определяться хлорофиллом фотосистемы 1. Однако, эти ΔФ обусловлены фотосистемой 2, так как наблюдаются только на частицах хлоропластов, обогащенных фотосистемой 2. Уменьшение Ф, наблюдаемое при освещении хлоропластов светом 1, не наблюдается в присутствии диурона и может быть связано с окислительным действием фотосистемы 1, которое проявляется и в восстановительных условиях. Уменьшение ф от света 2 не полностью обратимо в темноте и происходит в присутствии диурона. Очевидно, уменьшение Ф в этом случае частично может быть вызвано восстановительной фотодеструкцией активного центра фотосистемы 2.

Сложная кинетика ΔФ (индукция флуоресценции) наблюдается также при освещении пурпурных бактерий Chromatium minutissimum или изолированных хроматофоров в восстановительных условиях. При добавлении дитионита происходит постепенное возрастание Ф, на фоне которого световые ΔФ обнаруживают сложную кинетику (рис. 3, *2*—*4*). После темнового увеличения Ф до максимальной величины освещение вызывает уменьшение Ф, неполно обратимое в темноте (рис. 3, *5*). Различная зависимость световых увеличений и уменьшений Ф от интенсивности освещения, температуры и термоинактивации указывает на то, что эти изменения обус-

ловлены различными процессами. По-видимому, у бактерий, как и у фотосистемы 2 растений, основным фактором, определяющим величину переменной флуоресценции, является окислительно-восстановительное состояние первичного акцептора электрона; фотоиндуцированное или химическое восстановление акцептора вызывает возрастание выхода флуоресценции.

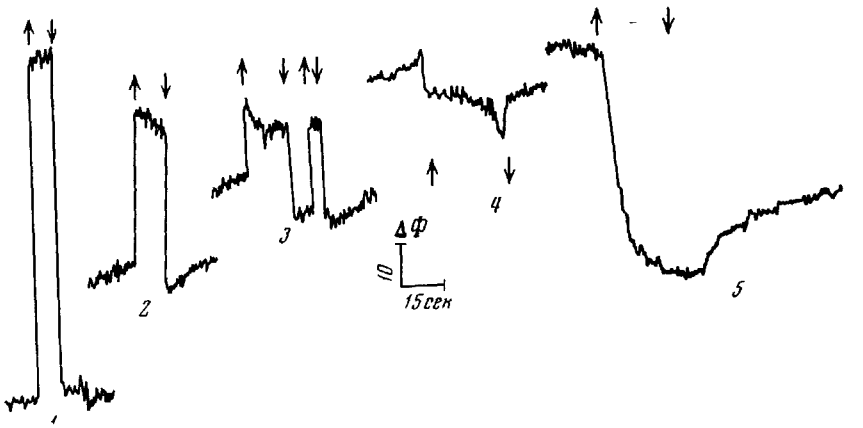


Рис. 3. Кинетика ΔΦ при освещении суспензии пурпурных бактерий Chromatium minutissimum без дитионита (*1*) и после добавления 1 мг/мл дитионита (*2—4*), *5* — после достижения $\Phi_{макс}$. Возбуждающий Ф свет 790 мμ, измеряемая Ф $\lambda > 870$ мμ. Образец содержал 2 мл суспензии бактерий в 0,05 *M* трис-буфере (pH 7,5) содержание бактериохлорофилла 0,03 мг/мл

Фотоиндуцированное уменьшение Ф бактерий и хроматофоров в восстановительных условиях может быть также связано с фотодеструкцией активного центра.

При сравнении кинетики фотоиндуцированного уменьшения Ф хлоропластов и хроматофоров следует подчеркнуть, что уменьшение Ф в восстановительных условиях наблюдается только у объектов, у которых в отсутствие восстановителя обнаруживаются значительные световые ΔΦ, что, по-видимому, связано с активностью реакционного центра фотосистемы.

Таким образом, у хлоропластов, а также у пурпурных бактерий и выделенных из них хроматофоров в восстановительных условиях обнаружены сложные по кинетике ΔΦ, сходные с теми, которые наблюдаются у интактных листьев, что позволяет исследовать механизм индукции флуоресценции с использованием изолированных структур.

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

Поступило
6 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] H. Kautsky, A. Hirsch, Naturwiss., **19**, 964 (1931). [2] H. Kautsky, N. Appel, H. Amann, Biochem. Zs., **332**, 277 (1960). [3] L. N. M. Duysens, H. E. Sweers, In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokio, 1963, p. 353. [4] J. C. Munday jr., Govindjee, Biophys. J., **9**, 1 (1969). [5] T. T. Bannister, G. Rice, Biochim. et biophys. acta, **165**, 555 (1968). [6] Н. В. Карапетян, В. В. Климов и др., Физиол. раст., **18**, 507 (1971). [7] P. Joliot, J. Lavorel, Bull. Soc. chim. biol., **46**, 1607 (1964). [8] H. Kautsky, U. Frank, Biochem. Zs., **315**, 176 (1943). [9] W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens, Nature, **127**, 355 (1963). [10] Н. В. Карапетян, А. А. Красновский, В сборн. Биохимия автотрофных микроорганизмов, Тр. МОИП, **24**, **1966**, стр. 94. [11] R. K. Clayton, Photochem. Photobiol., **5**, 807 (1966). [12] F. R. Whatley, D. I. Arnon, In: Methods in Enzymology, **6**, 1963, p. 308. [13] Н. В. Карапетян, В. В. Климов, Физиол. раст., **18**, 223 (1971).

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 18, вып. 3 1971 г.

УДК 581(132 1+174 1)

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Н. В. КАРАПЕТЯН, В. В. КЛИМОВ, Ф. ЛАНГ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им А Н Баха Академии наук СССР, Московский университет им М В Ломоносова

Исследовали изменения выхода флуоресценции $\lambda>710$ *нм* в течение первой секунды освещения листьев кукурузы в анаэробных условиях Измерения проводили с использованием двух лучей свет слабой интенсивности (650 *нм*, 50 *эрг/см²·сек*) возбуждал флуоресценцию, выход которой изменялся при освещении интенсивным светом ($>10^5$ *эрг/см²·сек*) Освещение листьев светом, поглощаемым преимущественно фотосистемой 2, вызывало усиление флуоресценции до максимального стационарного уровня, тогда как при освещении листьев делаким красным светом, поглощаемым фотосистемой 1, наблюдалось уменьшение выхода флуоресценции Измерена кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции в зависимости от различных факторов, влияющих на функционирование фотосинтетическои цепи переноса Показано, что промежуточный спад I — D в кинетике усиления флуоресценции при освещении светом 2 и уменьшение флуоресценции в результате освещения светом 1 более выражены в условиях уменьшения активности фотосистемы 2 и не проявляются при нарушении взаимодействия двух фотореакций Предполагается, что оба эти явления обусловлены одним и тем же процессом — окислительным действием фотосистемы 1 через цепь переноса электрона на первичный акцептор фотосистемы 2

При освещении зеленых листьев и водорослей после периода темноты выход флуоресценции хлорофилла не сразу достигает постоянного уровня, претерпевая сложные переходные явления Вначале наблюдается усиление флуоресценции до максимального уровня, после которого следует уменьшение до стационарного значения [1] При быстрой регистрации этих изменений обнаруживается сложная кинетика увеличения флуоресценции: быстрое усиление флуоресценции сменяется небольшим спадом, после чего происходит медленное возрастание флуоресценции до максимальной интенсивности [2]. Для разных этапов кинетики изменения флуоресценции были предложены обозначения, ставшие общепринятыми: нулевой уровень O, быстрыи подъем до I, небольшой спад до D, медленный подъем до P и медленный спад до стационарного уровня S [3, 12]

Переходные явления флуоресценции, известные под названием индукции флуоресценции, обнаружили Каутский и Гирш еще в 1931 г [1], однако эти эффекты удалось объяснить лишь после появления и обоснования гипотезы двух последовательных фотореакций в фотосинтезе растений [4, 5], схематически изображаемых как:

$$H_2O \rightarrow Z \rightarrow X\underset{\uparrow h\nu_2}{\Pi_2} - Q \rightarrow A \rightarrow \underset{\uparrow h\nu_1}{\Pi 700} \rightarrow X \rightarrow НАДФ$$

Две фотореакции сенсибилизируются двумя различными пигментными системами. Формы хлорофилла *a*, сенсибилизирующие фотореакцию 2, обозначаются как хлорофилл a_2, а сенсибилизирующие фотореакцию 1 — как хлорофилл a_1 Соответственно свет, поглощаемый пигментной систе-

мой 2, обозначается как свет 2, а поглощаемый пигментнои системой 1— как свет 1.

Хлорофиллы обеих пигментных систем способны к флуоресценции [6] Однако данные, полученные в последние годы, позволили установить, что индукция флуоресценции (переменная часть флуоресценции) определяется хлорофиллом a_2. На это указывают совпадение спектра действия фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции со спектром поглощения пигментной системы 2 [7], а также антипараллелизм кинетики увеличения выхода флуоресценции и скорости выделения кислорода в период индукции, объясняемый конкуренцией этих процессов в использовании энергии возбуждения хлорофилла [8, 9].

Было найдено, что флуоресценция зеленых растений увеличивается при освещении светом 2 и уменьшается при освещении светом 1 [6, 10, 11] По предположению Дейзенса и Свирса [6], выход флуоресценции определяется степенью восстановленности первичного акцептора электронов фотореакции 2 (Q), который в окисленном состоянии тушит флуоресценцию хлорофилла a_2, это соединение функционирует в цепи переноса электрона между двумя фотореакциями С точки зрения этих представлений, усиление флуоресценции O→P при освещении светом 2 приписывается восстановлению Q в QH, а последующее уменьшение флуоресценции P→S окислению QH фотосистемой 1 [6].

Определенные трудности возникают при объяснении промежуточного спада I — D в кинетике усиления флуоресценции до максимального уровня P Предполагается, что действием фотосистемы 1 обусловлен именно этот спад I — D [12]. Таким образом, действию фотосистемы 1 приписываются разные участки кривой индукции флуоресценции.

Для выяснения природы процессов, обусловливающих индукционные явления и в особенности промежуточный спад I — D, мы исследовали зависимость кинетики фотоиндуцированных изменений флуоресценции листьев кукурузы от различных факторов, влияющих на функционирование фотосинтетической цепи переноса электрона. В качестве таких факторов использовали интенсивность и спектральный состав действующего света, температуру, термо- и фотоинактивацию, фотосинтетические яды (диурон) и др Измерения кинетики изменений флуоресценции проводили в анаэробных условиях. Как было показано [12] в условиях пониженного содержания кислорода индукционные явления характеризуются более простой кинетикой, что облегчает интерпретацию отдельных участков кинетической кривой.

МЕТОДИКА

Опыты проводили с 5—10-дневными листьями проростков кукурузы, выращенных при 500 *лк* Лист, зажатый между двумя прозрачными пластинками, помещали в трубку Тунберга с плоскопараллельными стенками Для проведения опытов в условиях резко пониженного содержания кислорода из трубки Тунберга с помощью форвакуумного насоса эвакуировали воздух до 10^{-2} *мм* рт ст или же образец в трубке Тунберга продували газообразным азотом.

Кинетику фотоиндуцированных изменений флуоресценции регистрировали с помощью двухлучевой установки, описанной ранее [13]. Один из лучей (650 *нм*, 50 *эрг/см²·сек*) возбуждал флуоресценцию объекта, которая изменялась при освещении интенсивным действующим светом С помощью фосфороскопа лучи были разделены во времени время освещения объекта измерительным или деиствующим светом (и темновой интервал между ними) составляли 2,5 *мсек*, а темновой интервал между двумя последовательными вспышками действующего или измерительного света — 10 *мсек*

Освещение объекта осуществлялось светом от киноламиы мощностью 750 *вт* В качестве действующего света использовали область 600—700 *нм*, которая эффективнее поглощается фотосистемой 2 (свет 2), или область $\lambda>710$ *нм*, где в основном поглощает фотосистема 1 (свет 1) Спектральную область 600—700 *нм* выделяли с помощью стеклянного светофильтра КС-11 и 1%-ного раствора $CuSO_4$ (слои 5 *см*) $Ig=1{,}5\cdot10^5$ *эрг/см²·сек* Для выделения области $\lambda>710$ *нм* использовали комбинацию светофильтров КС-19+СЗС-19 и 5-сантиметровый слой воды, $Ig=1{,}7\cdot10^6$ *эрг/см²·сек*

Флуоресценция объекта $\lambda>710$ *нм* выделялась с помощью комбинации стеклянных светофильтров КС-19+СЗС-19, помещенных перед фотоумножителем ФЭУ-38 Использо-

вание дополнительной модуляции измерительного света с частотой 4,3 *кгц* и усиление только высокочастотной компоненты сигнала позволило исключить регистрацию послесвечения объекта от действующего света и измерять только флуоресценцию, возбуждаемую измерительным лучом, и изменения выхода этой флуоресценции [13].

В связи с разделением измерительного и действующего лучей во времени мы не могли измерять очень быстрые (*мсек*) изменения фотоиндуцированных изменений флуоресценции. Наша установка позволяла осциллографически регистрировать увеличение выхода флуоресценции с постоянной времени 0,01 сек. и уменьшение флуоресценции с постоянной времени 0,1 сек. Но использование двухлучевого метода дало нам возможность сравнивать исходный уровень флуоресценции, возбуждаемый светом слабой интенсивности (когда фотосинтез не имеет места или протекает с очень малой скоростью) и изменения флуоресценции, обусловленные «запусканием» фотосинтетических реакций. В опытах вначале регистрировали исходный, «темновой» уровень флуоресценции Ф, возбуждаемый измерительным светом. Изменения выхода флуоресценции ΔФ под действием интенсивного освещения измеряли относительно исходного уровня флуоресценции. На рисунках представлены осциллограммы кинетики изменений выхода флуоресценции при освещении зеленого листа кукурузы в анаэробных условиях. Каждая серия измерена на одном и том же листе, Ф и ΔФ приведены в относительных единицах. Величины Ф указаны в подписях к рисункам, а величины ΔФ соответствуют количеству делений оси ординат с учетом сдвига нулевой линии каждой осциллограммы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Аэробные условия. При освещении действующим светом 2 зеленого листа кукурузы, находящегося в аэробных условиях в темноте (на лист падает только измерительный свет), наблюдалась типичная картина индукции флуоресценции (рис. 1, *А*): быстрый подъем O — I, спад I — D, медленный подъем D — P и спад до стационарного уровня S. После выключения освещения изменение флуоресценции было полностью обратимо. Приведенная кривая индукции была воспроизводима, если измерения проводили через длительный темновой промежуток (не менее 5 мин. при 20°). При освещении листьев светом 1 в аэробных условиях никаких изменений флуоресценции не наблюдалось (см. рис. 1, *Б*).

Анаэробные условия. Исключение кислорода при эвакуации трубки с образцом вызывало возрастание исходного уровня флуоресценции на 20—25%, а характер световых изменений флуоресценции при освещении светом 2 значительно изменялся: наблюдалось возрастание величины быстрого подъема O — I, более выраженный спад I — D и исчезновение медленного уменьшения флуоресценции до стационарного уровня S, т. е. P=S (см. рис. 1, *А*, кривая *2*). При выключении света изменения флуоресценции были обратимы, но медленнее, чем в аэробных условиях. Сходная кинетика изменений флуоресценции наблюдалась при создании анаэробных условий продуванием объекта газообразным азотом.

Освещение листьев в анаэробых условиях светом 1 (см. рис. 1, *Б*, кривая *2*) приводило к быстрому обратимому уменьшению выхода флуоресценции (в дальнейшем термином уменьшение флуоресценции мы будем обозначить падение выхода флуоресценции при освещении листьев в анаэробых условиях светом 1). Величина уменьшения флуоресценции составляла 20—25% от исходного уровня флуоресценции, т. е. равнялась величине роста исходной флуоресценции при создании анаэробных условий Следует отметить, что уменьшение выхода флуоресценции, вызаваемое светом 1, наблюдалось также в аэробных условиях, если освещение светом 1 производилось при одновременном освещении листа слабым светом 2 (фоновое освещение), который был включен ранее света 1 и вызвал небольшое (на 10—20%) превышение исходного уровня флуоресценции. При переходе от анаэробных условий к аэробным условиям освещение листа светом 2 или 1 вызывало эффекты, наблюдавшиеся ранее для листа в аэробных условиях (см рис. 1, *А*).

Фотоиндуцированное увеличение и уменьшение выхода флуоресценции $\lambda > 710$ *нм* (как и флуоресценции при 685 *нм*) обусловлено, по-видимому, действием двух разных фотосистем, поскольку они вызываются светом разного спектрального состава. Согласно представлениям Дей-

зенса и Свирса [6], увеличение выхода флуоресценции при освещении светом 2 или создании анаэробных условий может быть вызвано восстановлением первичного акцептора Q фотосистемы 2, а уменьшение выхода флуоресценции при освещении светом 1 — окислением QH фотосистемой 1.

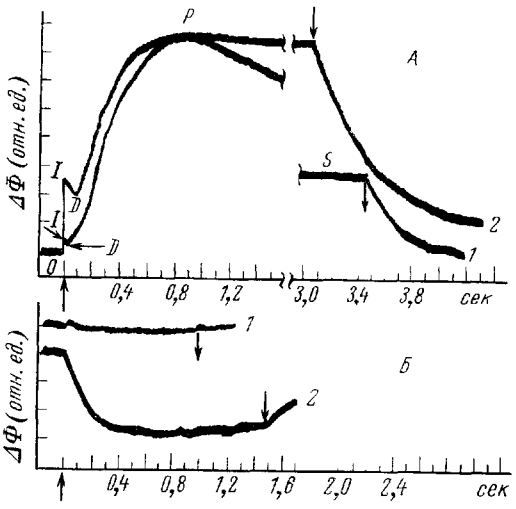


Рис. 1. Кинетика изменений выхода флуоресценции ($\Delta\Phi$) листа кукурузы при освещении действующим светом 2 ($А$) и светом 1 ($Б$)

1 — аэробные условия (Ф=5), *2* — анаэробные условия (Ф=8)

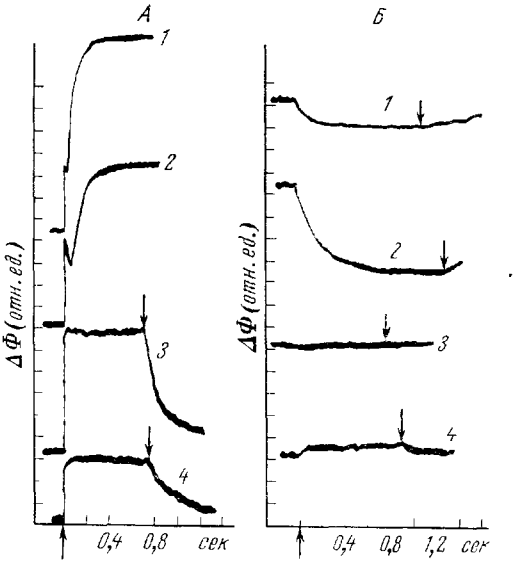


Рис. 2. Температурная зависимость кинетики изменений выхода флуоресценции листа кукурузы в анаэробных условиях при освещении светом 2 ($А$) и светом 1 ($Б$)

1—20° (Ф=5,5), *2*—2° (Ф=8), *3*— —3° (Ф=9), *4*— —20° (Ф=9,5)

Влияние температуры. Если в окислении QH фотосистемой 1 принимают участие температурнозависимые реакции, то при понижении температуры фотоиндуцированное уменьшение флуоресценции не должно наблюдаться. Действительно, при освещении светом 1 листа в анаэробных условиях при —3° не происходит никаких изменений флуоресценции, а при —10° обнаруживается даже небольшое увеличение выхода флуоресценции (рис. 2, *Б*, кривые *3*, *4*). Наличие QH до интенсивного освещения является необходимым условием для проявления действия фотосистемы 1. Поскольку при пониженных температурах происходит накопление QH, на что указывает повышенный «темновой» уровень флуоресценции, то можно думать, что отсутствие изменений флуоресценции при освещении светом 1 при —3° обусловлено блокированием температурнозависимых реакций.

Вызываемое светом 2 увеличение выхода флуоресценции при пониженных температурах сохранялось, но его кинетика упрощалась — наблюдался лишь быстрый подъем до стационарного уровня без промежуточного спада I—D (см. рис. 2, *А*, кривые *3*, *4*). В темноте эффект был быстро обратим и на одном объекте мог наблюдаться многократно При температуре выше —3° фотоиндуцированные уменьшения флуоресценции сохранялись, причем при 2° они достигали максимальной величины (см. рис. 2, кривые *2*).

Влияние 3 (3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (диурона). В наших опытах наблюдалась сходная зависимость фотоиндуцированных изменений флуоресценции при понижении температуры ниже 0° и при добавлении диурона, который блокирует перенос электро-

нов от первичного акцепора фотосистемы 2 [14]. Уже в первые минуты добавления $2 \cdot 10^{-6}$ *М* диурона в «темноте» в трубку Тунберга с водой, где находился лист в анаэробных условиях, на кривой, регистрируемой при освещении светом 2, наблюдалось увеличение максимума I и уменьшение величины спада I — D. Через 15—20 мин. инкубации, необходимой

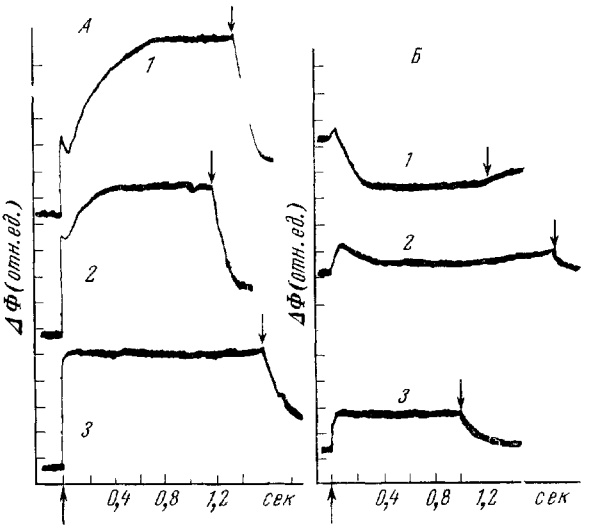


Рис. 3. Кинетика изменений выхода флуоресценции в присутствии диурона, вызываемых светом 2 (*А*) и светом 1 (*Б*)

1—перед добавлением диурона (Ф=6), *2* — через 5 мин после добавления $2 \cdot 10^{-6}$ *М* диурона (Ф=7), *3*— после 20 мин инкубации листа в $2 \cdot 10^{-6}$ *М* растворе диурона (Ф=7,5)

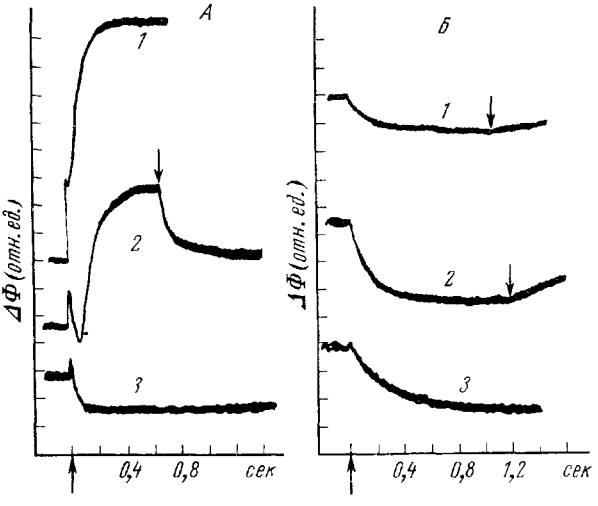


Рис. 4 Действие термоинактивации на кинетику изменений выхода флуоресценции, вызываемых светом 2 (*А*) и светом 1 (*Б*)

1— до нагревания (Ф=5,5), *2*— после 15 мин нагревания при 50° (Ф=7), *3* — после 5 мин нагревания при 50° (Ф=7)

для проникновения диурона в лист, наблюдался лишь быстрый подъем флуоресценции до стационарного уровня P без переходных явлений (рис. 3, *А*, кривая *3*). В то же время при освещении светом 1 листа в присутствии диурона вместо уменьшения флуоресценции происходило ее увеличение (см. рис. 3, *Б*, кривые *2*, *3*) По-видимому, это обусловлено тем, что свет $\lambda > 710$ *нм* помимо фотосистемы 1 частично возбуждает также фотосистему 2, действие которой при таком освещении проявляется лишь в условиях отсутствия оттока электронов, обусловливаемого фотосистемой 1.

Таким образом, при добавлении диурона как и при понижении температуры не происходит уменьшения флуоресценции, вызываемого светом 1, и отсутствует обычно наблюдаемый спад I — D на индукционной кривой, регистрируемой при освещении светом 2.

Действие термо- и фотоингибирования. Как известно, освещение зеленых растений интенсивным видимым светом или нагрева-

ние инактивируют в большей степени фотосистему 2 [15, 16] Как и следовало ожидать, кратковременное (1,5 мин) нагревание листьев при 50° приводило к уменьшению вызываемых светом 2 положительных изменений флуоресценции, в то же время усиливался спад I — D (рис 4, *А*) и вызываемые светом 1 отрицательные изменения флуоресценции (рис 4, *А*) и вызываемые светом 1 отрицательные изменения флуоресценции (рис 4, *Б*, кривая *2*) В результате более длительного нагрева

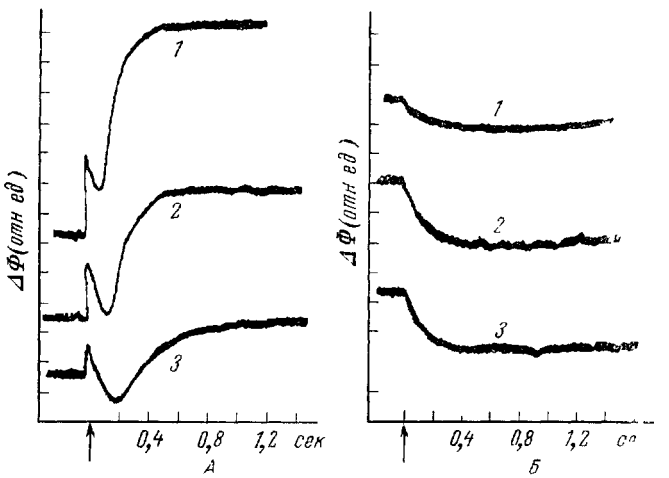


Рис 5 Действие фотоингибирования на кинетику изменении выхода флуоресценции при освещении светом 2 (*А*) и светом 1 (*Б*)

1 — до фотоингибирования (Ф=4) *2* — после 5 мин фотоингибирования (Ф=5) *3* — после 20 мин Фото ингибирования (Ф=6 5)

ния (5 мин , 50°) происходило полное исчезновение фотоиндуцированного увеличения флуоресценции освещение и светом 1 и светом 2 вызывало уменьшение выхода флуоресценции (см рис 4, кривая *3*) «Темновой» уровень флуоресценции после термоинактивации увеличивался на 25—30%

Сходное действие на фотоиндуцированные изменения флуоресценции оказывало фотоингибирование (рис 5) — освещение листьев в течение нескольких минут в анаэробных условиях интенсивным «белым светом (Ig=4 10^6 *эрг/см² сек*) Следует отметить, что при термо- и фотоингибировании листьев повреждалась именно система переноса электрона, а не формы хлорофилла *а*, так как в низкотемпературных спектрах флуоресценции листьев после воздействия указанных факторов не наблюдалось никаких изменений

Зависимость от интенсивности действующего света Активность фотосистемы 1 насыщается при гораздо меньших интенсивностях действующего света, чем активность фотосистемы 2 [17] Поэтому влияние фотосистемы 1 на выход флуоресценции при освещении светом 600—700 *нм* должно особенно отчетливо проявляться при понижении интенсивности действующего света На рис 6 представлены кинетические кривые, измеренные при освещении светом 2 разной интенсивности листьев, находящихся в анаэробных условиях Как видно из кривых, при ослаблении интенсивности действующего света спад I — D замедлялся и становился более глубоким, тогда как подъем D — P замедлялся и уменьшался по величине При значительном понижении интенсивности действующего света 2 наблюдалось только некоторое уменьшение флуоресценции (см рис 6, кривая *5*)

Действие кратковременного освещения Сложная кинетика индукции флуоресценции в первую секунду освещения листа све-

том 2 указывает на наличие по крайней мере двух процессов, вызывающих различные по знаку изменения флуоресценции. Поэтому следовало измерить начальную кинетику изменений выхода флуоресценции при кратковременном освещении

Если действующий свет 2 выключался на спаде I — D или в момент достижения минимума D, то в «темноте» выход флуоресценции уменьшался до уровня ниже исходного (рис 7, *А*, кривые *1*, *2*) Кинетика этого

Рис 6 Влияние интенсивности действующего света 2 на кинетику изменений выхода флуоресценции листа кукурузы в анаэробных условиях (Ф=5)

1 — 100% действующего света 400—700 *нм* (10^6 *эрг/см сек*) *2* — 30% *3*—10% *4*—3% *5* — 0 3%

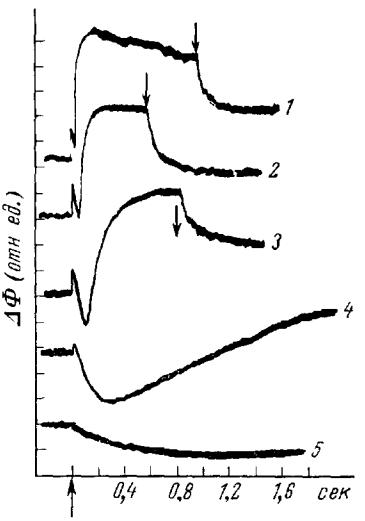


Рис 6

Рис 7 Кинетика темнового спада изменений выхода флуоресценции листа кукурузы в анаэробных условиях

А — после освещения действующим светом различной длительности (*1—4*) после освещения светом 2 при —3° (5) и в присутствии 2 10^{-6} *М* диурона (*6*) Длительность освещения *1*, *5* *6* — 0 05 сек, *2* — 0,1 сек *3* — 0 2 сек *4* — 0 5 сек Величины исходного уровня флуоресценции *1*, *2*, *3* *4* — Ф — =5 5, *5* — Ф=9, *6* — Ф=7,5

Б — после освещения действующим светом 2 при фоновом освещении светом 1 (*1*, *2*) и светом 2 (*3*, *4*, *5*) Величины исходной флуоресценции *1*, *2* — Ф=5 5 *3* *4*, *5* — Ф=6

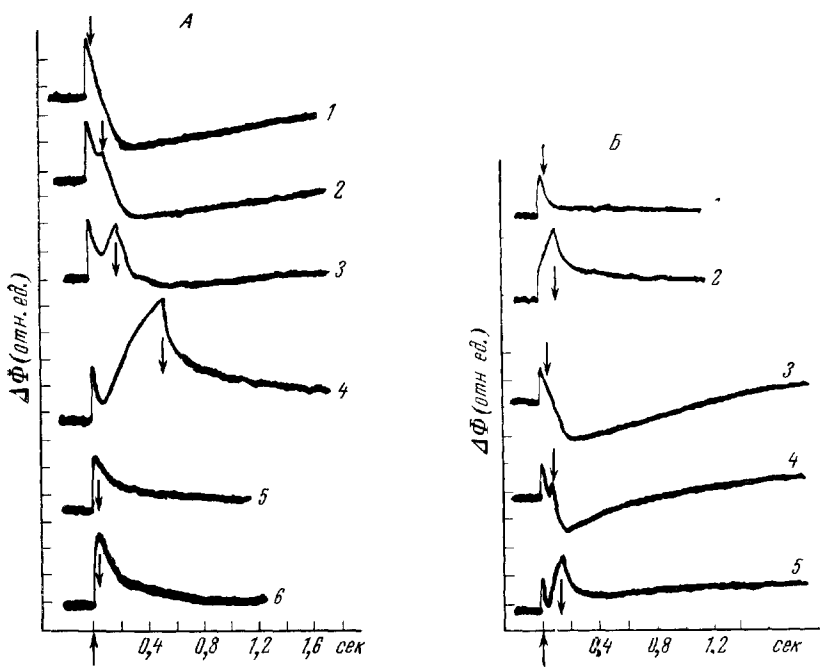


Рис 7

уменьшения очень сходна с кинетикой уменьшения флуоресценции, вызываемого светом 1. Если же свет выключался на подъеме D — P, то переход за нулевой уровень в темноте был гораздо меньше по величине (см рис 7, *А*, кривая *3*) или же не наблюдался совсем (рис 7, *А*, кривая *4*) Можно полагать, что уменьшение флуоресценции ниже исходного

уровня после кратковременного освещения обусловлено теми же процессами, которые ответственны за спад I — D и вызываемое светом 1 уменьшение флуоресценции. На это указывает тот факт, что переход флуоресценции за нулевой уровень после кратковременного освещения светом 2 больше по величине в условиях, при которых более выражены спад I — D и вызываемое светом 1 уменьшение флуоресценции, т. е. в условиях отсутствия кислорода, после термо- и фотоингибирования. Переход флуоресценции через нулевой уровень после кратковременного освещения светом 2 не имеет места в условиях, когда спад I — D и уменьшение флуоресценции при освещении светом 1 не наблюдались, т. е. при пониженных температурах (см. рис. 7, *А*, кривая *5*) и в присутствии диурона (см. рис. 7, *А*, кривая *6*).

При фоновом освещении, вызывавшем изменение исходной флуоресценции, переход за нулевой уровень, как и спад I — D, наблюдались только при использовании фонового освещения светом 2 (см. рис. 7, *Б*, кривые *3, 4, 5*), но не наблюдались при фоновом освещении светом 1 (см. рис. 7, *Б*, кривые *1, 2*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно гипотезе фотосинтетической единицы, молекула хлорофилла в активном центре, образующая комплекс с донором и первичным акцептором, в результате освещения претерпевает обратимые окислительно-восстановительные превращения, участвуя в переносе электрона по фотосинтетической цепи. Предполагается, что активный центр фотосистемы 1 представляет собой комплекс цитохрома *f*, П700 и первичного низкопотенциального акцептора X неизвестной природы. Активный центр фотосистемы 2 состоит из донора Z, молекулы хлорофилла *a* в особом состоянии и первичного акцептора Q: природа Z и Q неизвестна. Функционирование активного центра сопровождается изменением поглощения или флуоресценции. О функционировании фотосистемы 1 судят по изменениям поглощения при 700 *нм*, приписываемым фотоокислению П700, тогда как на функционирование фотосистемы 2 указывает фотоиндуцированное изменение флуоресценции, определяемое состоянием первичного акцептора [6]. Эта точка зрения является общепринятой, и полученные нами результаты будут рассмотрены на основании этих представлений.

Наблюдаемые нами фотоиндуцированные изменения выхода длинноволновой флуоресценции $\lambda > 710$ *мн*, возбуждаемой монохроматическим светом 650 *нм*, обусловлены, очевидно, теми же процессами, которые вызывают изменения флуоресценции при 685 *нм*, относимые за счет хлорофилла a_2 [6]. На это указывают форма и временные параметры кинетики изменений флуоресценции $\lambda > 710$ *нм*, регистрируемой при освещении светом 2 в анаэробных условиях, зависимость знака изменений выхода длинноволновой флуоресценции от спектрального состава действующего света, действия диурона и др. Следовательно, хотя длинноволновая флуоресценция обусловлена хлорофиллами обеих пигментных систем, за переменную часть флуоресценции $\lambda > 710$ *нм* ответствен хлорофилл a_2.

Несмотря на использование двухлучевого метода для измерения фотоиндуцированных изменений флуоресценции, мы имели возможность регистрировать достаточно подробную кинетику изменений выхода флуоресценции за десятые доли секунды освещения объекта. Это позволило нам наблюдать в кинетике усиления флуоресценции промежуточный максимум I и спад I — D, заметные лишь при быстрой регистрации индукции флуоресценции по однолучевой схеме [2, 18]. Но именно благодаря использованию двухлучевого метода мы могли сравнивать величины исходной (Ф) и переменной (ΔФ) флуоресценции в различных условиях, что позволило нам на основании сравнения этих величин судить о природе процессов, обуславливающих спад I — D при освещении светом 2

и уменьшение флуоресценции при освещении светом 1. Проведение опытов в анаэробных условиях облегчило интерпретацию полученных данных, так как кинетика индукции флуоресценции в этих условиях упрощена — отсутствует фаза P — S. Все это дало нам возможность предположить, что спад I — D обусловлен теми же процессами, которые ответственны за уменьшение флуоресценции при освещении светом 1, т. е. оба процесса можно отнести за счет окисления QH фотосистемой 1 через цепь фотосинтетического переноса электрона. Наши данные, полученные с использованием двухлучевого метода регистрации индукции флуоресценции зеленого листа кукурузы, подтверждают данные Мунди и Говинджи [12], полученные на суспензиях водорослей с использованием однолучевого метода измерения, и указывают на то, что действие фотосистемы 1 в индукции флуоресценции проявляется достаточно быстро — уже в первую 0,1 сек. освещения, вызывая промежуточный спад I — D.

Основным доказательством в пользу утверждения того, что спад I — D при освещении светом 2 и уменьшении флуоресценции при освещении светом 1 обусловлены одними и теми же процессами, является сходство условий для проявления этих эффектов. Оба эффекта наблюдаются в том случае, если исходный уровень флуоресценции несколько повышен, что приписывается накоплению Q в восстановленной форме до освещения объекта действующим светом. В пользу этого свидетельствует усиление спада I — D и проявление уменьшения флуоресценции: в анаэробных условиях, при фоновом освещении светом 2, при понижении температуры до 0°, при фото- и термоингибировании Спад I — D и уменьшение флуоресценции не обнаруживаются в аэробных условиях, а также в анаэробных условиях при фоновом освещении светом 1, когда, как предполагается, не имеет место накопление QH до освещения объекта действующим светом.

Однако наличие восстановленного в «темноте» Q является необходимым, но не достаточным условием для проявления спада I — D и уменьшения флуоресценции. На это указывает исчезновение обоих эффектов в условиях повышенного темнового уровня флуоресценции (при —20° или в присутствии диурона), обусловленное, по-видимому, блокированием температурнозависимых реакций цепи фотосинтетического переноса электрона. С другой стороны, спад I — D представляет собой фотосенсибилизированный процесс, так как скорость спада замедляется при понижении интенсивности действующего света. К такому же выводу ранее пришли Каутский и др. [2] на основании замедления спада при прерывистом освещении.

Спад I — D, который сменяется подъемом D — P,— участок кривой, наиболее полно отражающий «антагонистическое» действие двух фотореакций на окислительно-восстановительное состояние Q. Подавление активности фотосистемы 2 сразу же приводит к преобладающему действию фотосистемы 1. На индукционной кривой это выражается в ослаблении увеличения флуоресценции D — P и усилении спада флуоресценции I — D. После термоинактивации даже при освещении светом 2 наблюдается лишь уменьшение выхода флуоресценции, т. е. эффективен только свет, поглощаемый фотосистемой 1 (в противоположность эффекту, наблюдаемому в присутствии диурона или при понижении температуры ниже —3°). Тот факт, что спад I — D хотя и замедляется, но становится более глубоким при понижении интенсивности действующего света, является дополнительным указанием в пользу того, что за этот спад ответственна фотосистема 1.

Подъем D — P есть результат быстрого ослабления окислительного действия фотосистемы 1, на что указывают данные опытов с применением освещения объекта светом 2 разной длительности. Действительно, скорость фотореакции 1 во время фазы I — D, по-видимому, так высока, что

количество образующегося при этом окислителя A (см. схему) достаточно для окисления QH, образованного как на свету, так и в «темноте». Поэтому при выключении действующего света на спаде I — D наблюдается переход флуоресценции через нулевой уровень. Выключение действующего света на подъеме D — P не сопровождается таким переходом из-за недостатка окислителя, образуемого фотореакцией 1. Как предполагают Каутский и др. [2], а также Мунди и Говинджи [12], замедление скорости фотореакции 1 на подъеме D — P обусловлено истощением запаса акцептора X фотореакции 1.

Неясна причина исчезновения спада P — S при пониженном содержании кислорода Поскольку спад P — S наблюдается только в присутствии кислорода и CO_2, можно предположить, что кислород взаимодействует с промежуточным соединением, участвующим в восстановлении CO_2 Это соединение, окисляясь кислородом, опосредованно окисляет первичный акцептор X фотосистемы 1, а затем и QH, вызывая уменьшение флуоресценции. При понижении содержания кислорода в среде уменьшения флуоресценции P — S не происходит, так как не имеет места окисление X В пользу подобного механизма действия кислорода на кинетику индукции флуоресценции указывают также данные по зависимости кинетики индукции флуоресценции от метилвиологена [12]. Можно полагать, что отсутствие стадии P — S в кинетике фотоиндуцированного усиления флуоресценции хлоропластов вызвано нарушением регуляции реакций восстановления и окисления первичного акцептора Q в первую секунду освещения

Таким образом, начальную часть кривой индукции флуоресценции в анаэробных условиях можно представить как результат наложения двух процессов: усиления флуоресценции за счет восстановления *Q* фотосистемой 2 и уменьшения флуоресценции при окислении QH фотосистемой 1 через цепь переносчиков. По-видимому, в первый момент освещения в связи с «запаздыванием» окислительного действия фотосистемы 1, опосредованного темновыми реакциями, происходит быстрое восстановление Q (подъем O — I). Спад I — D обусловлен действием фотосистемы 1, наиболее проявляющимся при наличии образованного в «темноте» QH — субстрата для фотореакции 1. Подъем D — P следует объяснить восстановлением Q фотосистемой 2 вследствие быстрого истощения резерва окислителей, образуемых действием фотосистемы 1.

ЛИТЕРАТУРА

1 Kautsky H, Hirsch A Naturwissenschaften, **19**, 964, 1931
2 Kautsky H, Appel W, Amann H Biochem Z, **332**, 277, 1960
3 Lavorel J Biochim et biophys acta, **60**, 510, 1962
4 Hill R, Bendall F Nature, **186**, 136, 1960
5 Duysens L N M, Amesz J, Kamp B M Nature, **190**, 510, 1961
6 Duysens L N M, Sweers H E In Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, p 353, Tokyo Press, 1963
7. Butler W. L, Bishop N I Ln Photosynthetic Mechanisms in Green Plants, p 91, Washington, 1963
8 Joliot P Biochim et biophys acta, **102**, 135, 1965
9 Bannister T T, Rice G Biochim et biophys acta, **165**, 555, 1968
10 Butler W L Biochim et biophys acta, **64**, 309, 1962
11 Govindjee R, Ishimura N, Cederstrand C, Rabinowich E Arch Biochem and Biophys, **89**, 322, 1960
12 Mundy J C, Govindjee R Biophys J, **9**, 1, 1969
13 Карапетян Н. В., Климов В В Физиол растений, **18**, 233, 1971
14 Gingras G, Lemasson C Biochem et biophys acta, **109**, 67, 1965
15 Murata N, Nishimura M, Takamiya A Biochim et biophys acta, **112**, 213, 1966
16 Kok B, Gassner E B, Rurainsky H J Photochem Photobiol, **4**, 215, 1965
17 French S S, Fork D C Carnegie Inst of Washington, Year Book, **60**, 351, 1961
18 Delosme R Biochim et biophys acta, **143**, 108, 1967

Поступила в редакцию
13 XI 1970

A STUDY ON THE FLUORESCENCE INDUCTION IN MAIZE LEAVES IN ANAEROBIOSIS

N V KARAPETYAN, V V KLIMOV, F LANG, A A KRASNOVSKII

A N Bach Institute of Biochemistry USSR Academy of Sciences and M V Lomonosov Moscow State University, Moscow

Changes of fluorescence $\lambda > 710$ nm during the first second of the illumination were studied in maize leaves in anaerobiosis The measurements were recorded using two light beams the one with a low intensity (650 nm, 50 erg/cm^2 sec) excited fluorescence which yield changed during the strong illumination ($>10^6$ erg/cm^2 sec) The leaves, illuminated by light adsorbed preferentially by the photosystem 2, caused an increase of fluorescence up to the maximal steady state value while the illumination by far red light, absorbed by the photosystem 1, brought about a decrease of the fluorescence yield The time course of light induced changes of the fluorescence yield was measured as a function of different factors affecting functioning of the photosynthetic electron transport chain An intermediate decrease I — D in the time course of the increased fluorescence, induced by light 2, and a decrease of fluorescence, brought about by light 2, were shown to be more prominent under conditions of the reduced activity of the photosystem 2 and to be absent when the interaction of two photoreactions was interfered with Both effects are suggested to be due to the same process the oxidative action of the photo-2 *via* the electron transport chain

ДЕЙСТВИЕ ИНАКТИВИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА СИГНАЛ ЭПР И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИМИНОКСИЛЬНОГО РАДИКАЛА В ХРОМАТОФОРАХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

Н. В. КАРАПЕТЯН, В. К. КОЛЬТОВЕР, И. Н. КРАХМАЛЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва,
Институт химической физики АН СССР, Москва

Исследовали действие инактивирующих факторов на световой сигнал ЭПР хроматофоров Chromatium и их фотохимическую активность. Показано, что световой сигнал ЭПР хроматофоров и индуцированные светом изменения поглощения при 890 *ммк* обнаруживают сходную зависимость от температуры термоинактивации и концентрации детергента Тритона Х-100. Константа скорости восстановления использованного экзогенного акцептора (иминоксильного радикала), обладающего характерным спектром ЭПР, коррелирует со световым сигналом ЭПР хроматофоров. Начальное усиление светового сигнала ЭПР хроматофоров связано, по видимому, с подавлением их фотосинтетической активности, а последующее его уменьшение и исчезновение — с нарушением активного центра.

Общепринято представление, что в ходе первичных процессов фотосинтеза происходит образование сильных окислителей и восстановителей. В образовании этих соединений участвует небольшое количество молекул хлорофилла в активном центре, тогда как значительная масса пигмента служит для поглощения квантов света и передачи их активному центру. О превращениях молекул хлорофилла в активном центре можно судить в основном по фотоиндуцированным изменениям поглощения или флуоресценции пигментов или по фотоиндуцированному сигналу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Особенно перспективны сравнительные исследования этих параметров [1, 2].

До последнего времени не существует единого мнения о природе молекул, обусловливающих световой сигнал ЭПР. Для выяснения этого вопроса некоторые исследователи использовали стабильные радикалы, имеющие характерный сигнал ЭПР [3, 4]. Для получения дополнительной информации о молекулах, ответственных за сигнал ЭПР пурпурных бактерий, мы исследовали зависимость фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий Chromatium minutissimum или выделенных хроматофоров от различных факторов (температурная инактивация, действие детергентов) а также взаимодействие хроматофоров с иминоксильным радикалом. Данные по действию указанных факторов на фотоиндуцированные изменения поглощения бактерий опубликованы ранее [5, 6]. Интерес к иминоксильным радикалам объясняется не только их электронакцепторными свойствами, но и возможностью использования иминоксильных радикалов в качестве парамагнитных зондов в исследованиях молекулярной организации электронпереносящих систем [7].

Методика. Культуру бактерии Chromatium minutissimum выращивали на модифицированной среде Ларсена в анаэробных условиях в люминостате (1000 *лк*) при 30° [8]. В экспериментах использовали 5—6 дневные культуры бактерий или экстракты хроматофоров, выделенные из бактерий. Клетки разрушали 3 *мин* озвучиванием в УЗ-дезинтеграторе MSE (20 *кгц*, 500 *вт*), полученную суспензию центрифугировали при 11 000 *g* в течение 1 часа при 4°, супернатант представлял собой экстракт хроматофоров. Для исследования действия температурной инактивации на световой сигнал ЭПР клетки бактерий (или экстракт хроматофоров) нагревали при постоянном перемешивании в пробирке, помещенной в ультратермостат, в течение одной или более минут, считая с момента установления необходимой температуры в суспензии. Для исследования действия детергентов на сигнал ЭПР к суспензии хроматофоров добавляли соответствующие количества Тритона Х-100. Как правило, при измерении светового сигнала ЭПР концентрация бактериохлорофилла была в 15 раз выше, чем в исследованиях световых изменений поглощения, т. е. составляла 0.3 *мМ*.

Измерение сигналов ЭПР проводили на радиоспектрометре ЭПР-2 Института химической физики АН СССР. Ампула с образцом освещалась непосредственно в резонаторе светом лампы ДКСШ-1000 через водный тепловой фильтр и светофильтр ОС-14 ($\lambda > 570$ *ммк*), интенсивность действующего света $\sim 10^5$ *эрг/см² сек*. В работе использовали иминоксильный радикал 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил, синтезированный в лаборатории Э. Г. Розанцева в Институте химической физики АН СССР по методу [9]. В клеточные препараты радикал вводили из водных растворов, конечная концентрация радикала в среде была 10^{-4} *М*. Кинетику восстановления радикала изучали, наблюдая убыль радикала в среде, т. е. уменьшение интегральной интенсивности спектра ЭПР относительно сигнала ЭПР внутреннего стандарта Mn^{++} в решетке MgO.

Результаты. При освещении суспензии клеток Chromatium в соответствии с литературными данными [10] наблюдался сигнал ЭПР с $g = 2{,}003$ и шириной ~ 11 *гс*

(рис 1, *Б*) После термоинактивации образца сигнал вначале увеличивался, а затем полностью исчезал (рис 2, *б*) Максимальную величину сигнала ЭПР, как и в случае фотоиндуцированных изменений поглощения при 890 *ммк* (рис 2, *а*), наблюдали при 60°, а исчезновение сигнала — при 90° Длительность нагревания не изменяла ход зависимости интенсивности сигнала от температуры нагревания При термоинактивации хроматофоров зависимость была аналогичной (рис 3, *а*) В результате добавления к хроматофорам малых концентрации Тритона X-100 после начального усиления сигнала ЭПР, также наблюдали его уменьшение с увеличением концентрации детергента (рис 3, *б*) Таким образом, и в этом опыте поведение сигнала ЭПР обнаруживает полное сходство с поведением фотоиндуцированных изменений поглощения при 890 *ммк* в зависимости от концентрации детергента [6] Конечно, точное сравнение этих данных затруднено различием условий, в которых проводились измерения (интенсивность действующего света, плотность образца) Но даже при таком относительном сравнении сходство в поведении светового сигнала ЭПР и световых изменений поглощения при 890 *ммк* очевидно

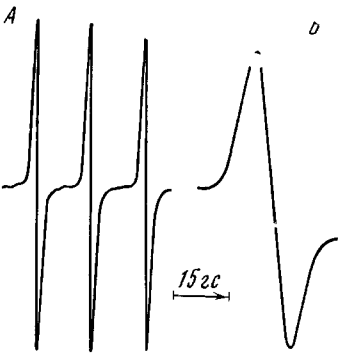


Рис 1 *А* — сигнал ЭПР иминоксильного радикала (10^{-4} *М*) в суспензии хроматофоров Chromatium в темноте, *Б* — световой сигнал ЭПР клеток Chromatium

Следует отметить поразительную устойчивость к действию нагревания светового сигнала ЭПР хроматофоров как и фотоиндуцированных изменений поглощения при 890 *ммк* Длительность нагревания хроматофоров (от 1 до 10 *мин*) не сказывалась на ходе кривой зависимости величины сигнала от температуры предварительного нагревания Сигнал наблюдался даже при нагревании в течение 10 *мин* при 60°, но исчезал после 1 *мин* нагревания при 90° Интересно, что такую же устойчивость проявляет световой сигнал ЭПР, обусловленный первой фотосистемой растений [3]

На основании сравнения зависимости поведения светового сигнала ЭПР и изменении поглощения при 890 *ммк* от исследованных факторов можно предположить, что сигнал ЭПР обусловлен, по видимому радикалом, образующимся в агрегате молекул

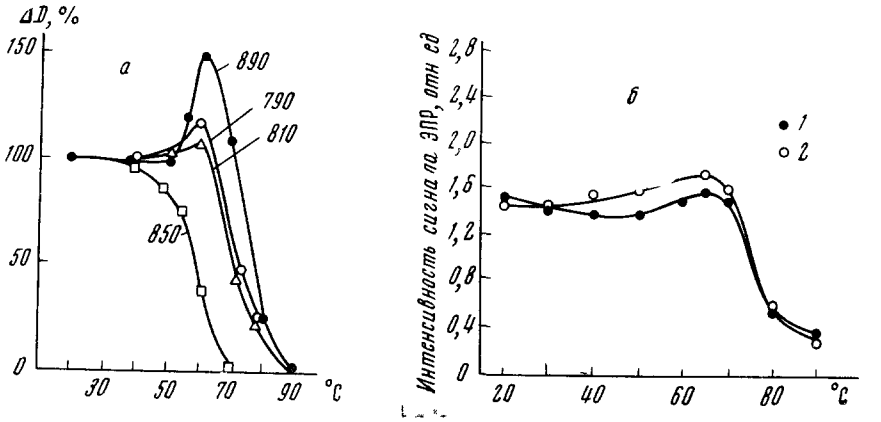


Рис 2 Зависимость фотоиндуцированных изменений поглощения хроматофоров Chromatium при разных длинах волн (*а*) и светового сигнала ЭПР клеток Chromatium от температурной инактивации (*б*) *1* — 1 *мин* инактивации, *2* — 3 *мин* инактивации

бактериохлорофилла в активном центре, обозначаемом $П_{890+}$ Как было показано ранее по включению C^{14}-ацетата [4, 5], температурная инактивация приводила к подавлению фотосинтетической активности, что обусловливало накопление $П_{890-}$ В наших опытах начальное усиление светового сигнала ЭПР может быть обусловлено инактивацией определенных ферментных систем Температурная инактивация, как и действие малых концентраций детергента, может вызывать также разобщение фотофосфорилирования [11], ведущее к подавлению фотосинтетической активности Последующее уменьшение величины сигнала ЭПР связано, очевидно, с деструктивным нарушением активного центра

Следовало сравнить действие инактивирующих факторов на световой сигнал ЭПР хроматофоров и на фотохимическую активность хроматофоров С этой целью исследовали фотовосстановление экзогенного акцептора, в качестве которого использовали

иминоксильный радикал, имеющий характерный спектр ЭПР (рис. 1, *А*). В наших препаратах мы не наблюдали заметного темнового восстановления радикала. Однако на свету происходило весьма быстрое уменьшение интенсивности его сигнала ЭПР вследствие восстановления радикала в двузамещенный гидроксиламин [7]. Типичная кине-

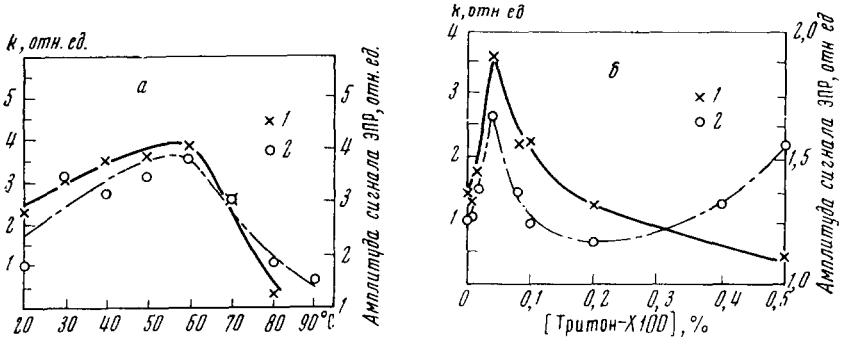


Рис. 3. Зависимость светового сигнала ЭПР (*1*) и скорости фотовосстановления иминоксильного радикала (*2*) хроматофорами Chromatium от температурной инактивации (*а*) и от действия малых концентраций детергента Тритона X-100 (*б*)

тическая кривая восстановления иминоксильного радикала хроматофорами Chromatium представлена на рис. 4. Медленное протекание реакции вызвано, по-видимому, тем, что лимитирующей стадией является диффузия радикала из среды в хроматофоры. С повышением концентрации детергента до 0,04% скорость восстановления радикала возрастает, но при дальнейшем увеличении концентрации до 0,2% падает ниже первоначальной скорости. При больших концентрациях детергента (>1%) скорость реакции резко возрастает в связи с тем, что в фотохимической реакции участвуют солюбилизированные детергентом молекулы бактериохлорофилла.

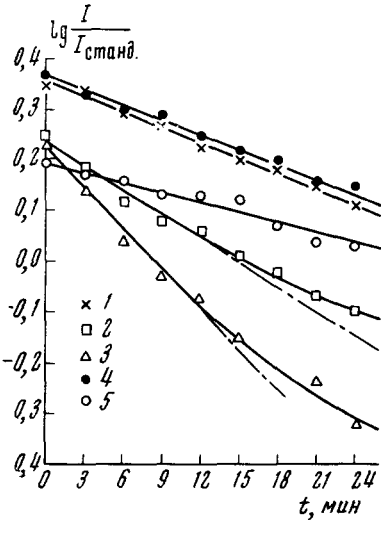


Рис. 4. Кинетические кривые фотовосстановления иминоксильного радикала хроматофорами Chromatium при различных концентрациях детергента Тритона X-100

1 — в отсутствие детергента, *2*—0,02%, *3*—0,04%, *4*—0,1%, *5*—0,2% Тритона X-100

Из рис. 4 следует, что начальный участок кинетической кривой приблизительно подчиняется уравнению реакции первого порядка по радикалу и соответствующую константу скорости можно принять за меру интенсивности восстановления радикала. Однако с увеличением времени реакции кинетическая кривая усложняется, отклоняясь от первого порядка под влиянием реакции окисления восстановленного двузамещенного гидроксиламина кислородом воздуха, растворенным в суспензии [7].

Как видно из рис. 3, *а* и *б*, при температурной инактивации и действии малых концентраций детергента Тритона X-100 наблюдается корреляция между интенсивностью светового сигнала ЭПР хроматофоров и скоростью восстановления иминоксильного радикала, т. е. чем выше сигнал ЭПР хроматофоров, тем больше скорость восстановления радикала, который, по-видимому, восстанавливается первичным акцептором фотосистемы хроматофоров.

Таким образом, при нарушении структуры фотосинтетического аппарата, ведущем к нарушению активного центра, исчезают фотоиндуцированные изменения поглощения при 890 *ммк*, световой сигнал ЭПР бактерий (и хроматофоров) и способность хроматофоров к восстановлению иминоксильного радикала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruby R. H., Kuntz J. D., Calvin M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **51**, 515, 1964.
2. Loach P. A., Secura D. L., Photochem. Photobiol., **6**, 381, 1967.
3. Corker G. S., Clain M. P., Calvin M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **56**, 1365, 1966.

4. Cost K., Bolton J. R., Frenkel W., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **57**, 868, 1967.
5. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **171**, 1201, 1966.
6. Karapetyan N. V., In «Progress in Photosynthesys», Tübingen, **2**, 778, 1969.
7. Кольтовер В. К., Кутлахмамедов Ю. А., Сухоруков Б. И., Докл. АН СССР, **181**, 730, 1968.
8. Кондратьева Е. Н., Фотосинтезирующие бактерии, стр. 26, Изд-во АН СССР, 1963.
9. Розанцев Э. Г., Изв. АН СССР. Сер. хим., **12**, 21, 1964.
10. Androes G. M., Singleton M. F., Calvin M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **48**, 1022, 1962.
11. Horio T., Yamashita J., Biochim. et biophys. acta, **88**, 237, 1964.

Поступила в редакцию
19.VI.1970

EFFECT OF INACTIVATING FACTORS ON ESR SIGNAL AND REDUCTION OF IMINOXYL RADICAL IN CHROMATOPHORES OF PURPLE BACTERIA

N. V. KARAPETYAN, V. K. KOLTOVER, I. N. KRAKHMALEVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Acad. Sci. USSR, Institute of Chemical Physics, Acad. Sci. USSR, Moscow

The action of inactivating factors on light induced ESR signal of Chromatium chromatophores and thier photochemical activity was investigated. The ESR signal and light induced absorption changes at 890 nm show the same dependence on temperature of short-term heating and Triton X-100 concentrations. The rate constant of reduction of exogenous electron acceptor used (iminoxyl radical) having special ESR spectrum is in correlation with light induced ESR signal of chromatophores. Initial increase of ESR signal of chromatophores appears to be due to the unhibition of their photosynthetic activity, subsequent decrease and disappearance are due to the disturbance of the active centre.

Доклады Академии наук СССР
1971. Том 199, № 4

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН, З. Ш. АЛИЕВ

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ *n*-БЕНЗОХИНОНА

Изолированные хлоропласты способны к осуществлению реакции Хилла; мы нашли ([1–4]), что реакции такого типа удается моделировать в водных растворах окислителей с использованием неорганических полупроводников (окиси цинка, двуокиси титана или вольфрамовой кислоты), играющих роль фотосенсибилизаторов. Такие реакции возбуждаются близкой ультрафиолетовой областью спектра, где расположена длинноволновая граница поглощения испытанных полупроводников, и сопровождаются «запасанием» энергии света в продуктах реакции. Квантовый выход реакции достигал 1% ([3]).

Использованные полупроводники играют роль фотосенсибилизаторов и фотокатализаторов, на поверхности которых, по-видимому, происходит рекомбинация первичных продуктов фотоокисления воды.

Мы изучали ранее реакции такого типа, измеряя количество выделившегося кислорода с помощью микроманометрического метода Варбурга, применяя освещение сосудов ртутно-кварцевой лампой. В качестве акцепторов электрона использовали соединения окисного железа (ионы Fe^{3+} и $Fe(CN)_6^{3+}$); балансовая фотохимическая реакция соответствовала уравнению:

$$2Fe^{3+} + H_2O \rightarrow 2Fe^{2+} + 2H^+ + {}^1/_2O_2.$$

Применяя водный раствор *n*-бензохинона в качестве акцептора электрона мы нашли ([1, 4]), что в этом случае большая часть *n*-бензохинона подвергается фотоокислению с образованием углекислоты, что происходит наряду с выделением кислорода. Эта реакция была менее эффективна по сравнению с системами, содержащими соединения окисного железа и для изучения этой реакции желательно было применение более чувствительного метода измерения кислорода.

В данной работе мы определяли выделение кислорода с помощью весьма чувствительного метода измерения хемилюминесценции люминола, описанного в работе ([5]), который мы воспроизвели с незначительными изменениями ([6]).

Сущность метода состоит в том, что стационарный поток инертного газа (аргон высокой чистоты) барботирует через стеклянную или кварцевую кювету, где происходит фотохимическая реакция (рис. 1). Выделяющийся при этом кислород транспортируется потоком аргона в блок регистрации кислорода, который содержит раствор люминола и бутоксида калия в диметилсульфоксиде. Перед блоком регистрации газовая смесь осушается и освобождается от углекислоты. Окисление люминола кислородом, содержащимся в газовом потоке, сопровождается хемилюминесценцией, которая регистрируется фотоумножителем. Калибрация прибора осуществляется с помощью электролитической ячейки. Таким образом непосредственно измеряется скорость выделения кислорода.

Термостатируемая (+20°) реакционная кювета освещалась светом ртутно-кварцевой лампы СВД-120А (осветитель ОИ-18). Максимальная интенсивность ультрафиолетового и видимого излучения лампы в плоскости кюветы составляла $4 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек. Барботирование газа через кюве-

ту обеспечивало постоянство оптической плотности во всем объеме реакционной смеси, содержащей суспензию нерастворимого в воде фотокатализатора.

В работе применялась окись цинка (Merck pro anal); разные образцы окиси цинка (муфельные цинковые белила и др.) были также активны, двуокись титана и вольфрамовая кислота (Schering Kahlbaum.). *n*-Бензохинон возогнан непосредственно перед опытом.

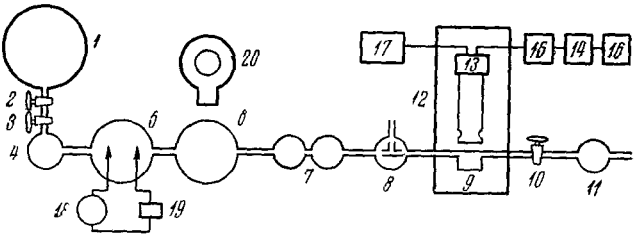


Рис. 1. Блок-схема люминометра. *1* — баллон с аргоном, *2* — кран грубой регулировки, *3* — кран тонкой регулировки, *4* — реометр, *5* — ячейка с платиновыми электродами для электролиза воды, *6* — кювета для проведения фотохимических опытов, *7* — блок осушки газового потока, *8* — распределительный кран, *9* — кювета с раствором люминола, *10* — запирающий кран, *11* — водяной затвор, *12* — светонепроницаемый блок со шторкой, *13* — приемник светоизлучения (ФЭУ-38), *14* — компенсатор сигнала (ИРН-54), *15* — усилитель (ЛПУ-01), *16* — самописец (ЭПП-09), *17* — источник постоянного высоковольтного напряжения (ВС-22), *18* — чувствительный гальванометр, *19* — батарея питания электролизной ячейки с делителем напряжения, *20* — источник света

Табл. 1 показывает скорость выделения кислорода в изученных системах. Существенно то, что в контрольных опытах освещение хинона в воде или водной суспензии сенсибилизатора не приводит к выделению измеримого данным методом количества кислорода, тогда как в системах, содержащих сенсибилизатор и водный раствор хинона, наблюдается выде-

Таблица 1

Скорость выделения (мол/л·сек$\times 10^{11}$) кислорода в водных 10^{-4} *M* растворах *n*-бензохинона в присутствии фотосенсибилизаторов (10 мг/мл)

Системы	В стекле	В кварце
Окись цинка	0,0	0,0
n-Бензохинон	0,0	0,0
Окись цинка и *n*-бензохинон	87,7	23,7
Двуокись титана	0,0	0,0
Двуокись титана и *n*-бензохинон	4,4	8,3
Вольфрамовая кислота	0,0	0,0
Вольфрамовая кислота и *n*-бензохинон	0,7	1,7
Окись алюминия	0,0	0,0
Окись алюминия и *n*-бензохинон	0,0	0,0
Кварц	0,0	0,0
Кварц и *n*-бензохинон	0,0	0,0

ление кислорода в стеклянных сосудах (где действует главным образом линия ртути 365 мμ) и в кварцевых (пропускающих также линии ртути 313 и 256 мμ).

Из табл. 1 видно, что наиболее активно реакция идет с окисью цинка; меньший эффект в кварцевом сосуде следует объяснить усилением фотодеструкции хинона.

Более подробно нами была изучена реакция с окисью цинка в стеклянных сосудах. При данной геометрии сосуда и способе освещения зависимость от интенсивности света показана на рис. 2. Насыщение достигается при интенсивности света более, чем $4 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек.

Зависимость скорости реакции от концентрации хинона показала насыщение при 0,3 мг хинона в мл, т. е. при 10^{-4} M (рис. 3). По-видимому, избыток хинона, поглощающего в близком ультрафиолете, оказывает экранирующее действие.

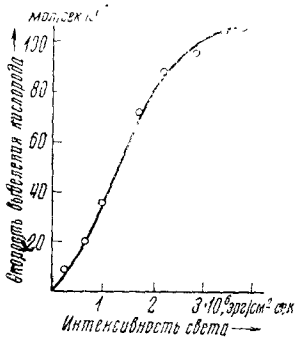


Рис. 2

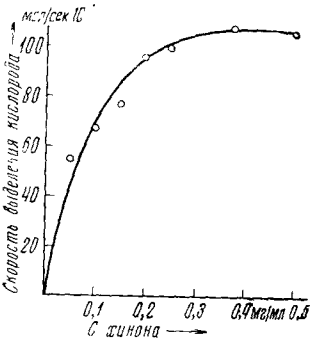


Рис. 3

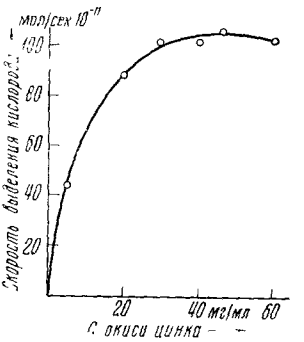


Рис. 4

Рис. 2. Зависимость скорости выделения кислорода от интенсивности света (50 мг окиси цинка, 1,5 мг хинона, 3 мл воды)

Рис. 3. Зависимость скорости выделения кислорода от концентрации хинона (50 мг окиси цинка, 3 мл воды, интенсивность света $4 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек)

Рис. 4. Зависимость скорости выделения кислорода от концентрации окиси цинка (1,5 мг хинона, 3 мл воды, интенсивность света $4 \cdot 10^6$ эрг/см^2·сек)

И наконец, зависимость от количества окиси цинка во взвеси при постоянном количестве хинона показала насыщение при 20 мг сенсибилизатора в 1 мл раствора (рис. 4).

При небольшом подкислении водной суспензии сенсибилизатора наблюдается активация скорости выделения кислорода, тогда как увеличение pH снижает активность (табл. 2). Это явление следует объяснить увеличением окислительного потенциала хинона в кислой среде или блокированием активных центров сенсибилизатора ионами гидроксила.

Таблица 2

Влияние pH на скорость фотосенсибилизированного выделения (мол/л·сек$\times 10^{11}$) кислорода в водных 10^{-4} M растворах n-бензохинона при количестве сенсибилизатора 10 мг/мл. Опыты в стеклянных сосудах

Сенсибилизатор	pH 6,5	pH 7,5	pH 9,0
Окись цинка	192,9	87,9	25,3
Двуокись титана	5,9	4,4	2,8
Вольфрамовая кислота	1,0	0,7	1,0

Квантовый выход реакции выделения кислорода с окисью цинка в воде, определенный с помощью железо-оксалатного актинометра, достигает 0,05%, что более чем на порядок ниже, чем в реакциях, где в качестве акцепторов электрона использовались соединения окисного железа ([3]).

При рассмотрении механизма реакции следует привлечь данные Пущейко и Теренина ([7]), показавших, что адсорбция паров n-бензохинона

на окиси цинка ведет к стойкому увеличению фотопроводимости (фото-э.д.с.). Авторы выдвигают предположение, что при адсорбции электроноакцепторных молекул на окиси цинка появляются поверхностные уровни прилипания электронов проводимости.

Механизм реакции можно представить следующим образом. При поглощении кванта света полупроводником электрон переходит в зону проводимости. Молекулы воды и хинона адсорбированы на разных активных центрах поверхности полупроводника. Адсорбированный хинон принимает электрон с образованием семихинона, дисмутирующего до гидрохинона:

$$\text{хинон} + e \xrightarrow{H^+} \text{семихинон} \xrightarrow{\text{дисмутация}} \text{гидрохинон} + \text{хинон}.$$

С другой стороны электрон молекулы воды или гидроксил-иона восполняет электронный дефект кристаллической решетки полупроводника с последующей рекомбинацией ОН радикалов и выделением кислорода:

$$OH^- + (+) \rightarrow OH \xrightarrow{\text{рекомбинация}} H_2O + O_2.$$

Суммарная реакция такова:

$$\text{хинон} + H_2O \rightarrow \text{гидрохинон} + {}^1/_2O_2.$$

Однако может быть рассмотрен другой механизм реакции: раствор *n*-бензохинона достаточно хорошо поглощает свет в близком ультрафиолете (365 мμ). При освещении может идти обратный элементарный процесс с участием возбужденной молекулы хинона:

$$\text{хинон}^* + H_2O \rightleftharpoons \text{семихинон} + H_2O^+, \text{ либо}$$
$$\text{хинон}^* + OH^- \rightleftharpoons \text{семихинон} + OH^.$$

При этом выделение кислорода не наблюдается из-за быстрой обратной реакции; наличие поверхности фотокатализатора может способствовать рекомбинации H_2O^+ или радикала ОН и тем направлять реакцию вправо. В случае этого механизма может быть активна также каталитическая поверхность, не поглощающая в близком ультрафиолете. Так в работе ([8]) было показано, что твердая поверхность (кварц) ускоряет фотохимическое выделение кислорода из растворов перхлората железа; в работе ([9]) — из растворов перманганата калия.

В нашем случае кварц и окись алюминия, не обладающие фотосенсибилизирующей способностью, были неактивны и поэтому следует считать более вероятной первую схему реакции, основанную на представлении об участии полупроводника-фотосенсибилизатора в процессе фотохимического переноса электрона.

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

Поступило
2 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **139**, 142 (1961). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **147**, 656 (1962). [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **168**, 1100 (1966). [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин, Сборн. Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 161. [5] A. Burr, D. Mauzerall, Biochim. et biophys. acta, **153**, 614 (1968). [6] Г. П. Брин, З. Ш. Алиев, А. А. Красновский, Физиол. раст., **18**, 455 (1971). [7] Е. К. Пуцейко, А. Н. Теренин, Сборн. Элементарные явления в катализе и адсорбции, Изд. АН СССР, 1955, стр. 61. [8] Б. Я. Даин, А. А. Качан, ДАН, **61**, 471 (1948). [9] А. А. Качан, М. А. Шерстобоева, ЖНХ, **3**, 1089 (1958).

Доклады Академии наук СССР
1971. Том 201, № 6

УДК 581.19

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. И. БЫСТРОВА, Ф. ЛАНГ

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗНЫХ ФОРМ ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ В ТВЕРДЫХ ПЛЕНКАХ И В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ, ОБРАБОТАННЫХ δ-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

В нашей лаборатории было показано, что при самосборке агрегированных форм хлорофилла и его аналогов в твердых пленках наблюдаются те же типы молекулярной упаковки пигментов, что и в живых фотосинтезирующих организмах (см. обзор 1). Настоящая работа посвящена изучению самосборки агрегированных форм протохлорофилловых пигментов.

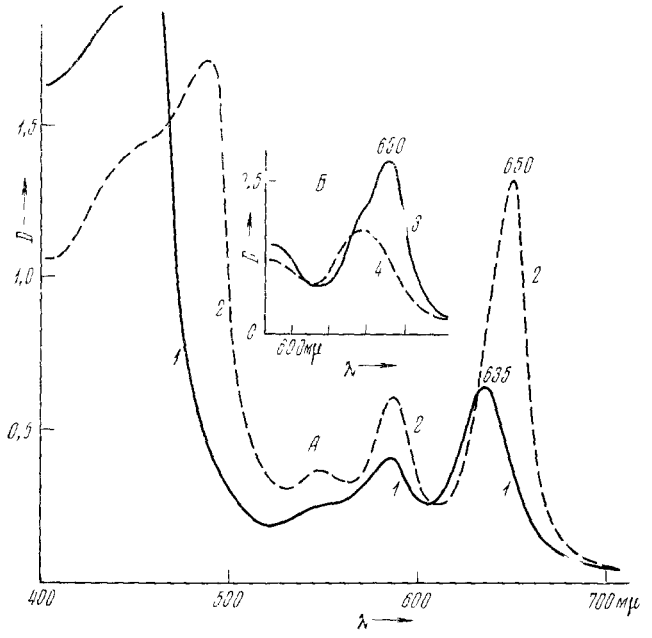


Рис. 1. Спектры поглощения пленок винилпротохлорофилла. *А* — исходная (*1*) и после обработки парами метанола при 20° в течение 20 мин. (*2*); *Б* — после обработки парами серного эфира при 20° в течение 30 мин. (*3*) и та же пленка при 90° (*4*)

Образование агрегированной формы «635» в твердых пленках протохлорофилла (точнее 4-винилпротохлорофилла), выделенного из оболочек семян тыквы, наблюдалось еще в 1953 г. ([2]). Спектры люминесценции таких пленок, измеренные при 20° в вакууме, обнаруживали максимумы около 705 мμ и в области 750—760 мμ ([3]). Обработка пленок парами аммиака приводила к образованию формы с максимумом поглощения около 645 мμ ([4]). В работе ([5]) было показано образование максимума 655 мμ в спектре поглощения растворов протохлорофиллида в неполярных растворителях, наблюдаемое через несколько часов после растворения пигмента и обратимое в присутствии полярных примесей.

Протохлорофилл и 4-винилпротохлорофилл в четыреххлористом углероде, по данным ([6]), обнаруживают в инфракрасной области спектра появление «агрегационного» максимума при 1668 $см^{-1}$. Это свидетельствует об участии координационных связей C=O ... Mg в агрегации протохлорфилловых пигментов, механизм которой, по-видимому, сходен с механизмом агрегации хлорофилла а. Однако у протохлорофилловых пигментов до сих пор не наблюдалось образования высокоагрегированных форм, соответствующих длинноволновым кристаллическим структурам хлорофилла а.

В данной работе нас интересовала возможность моделирования различного типа форм протохлорофилловых пигментов в твердых пленках и в этиолированных листьях, обработанных δ-аминолевулиновой кислотой (АЛК) с целью накопления в них пигмента.

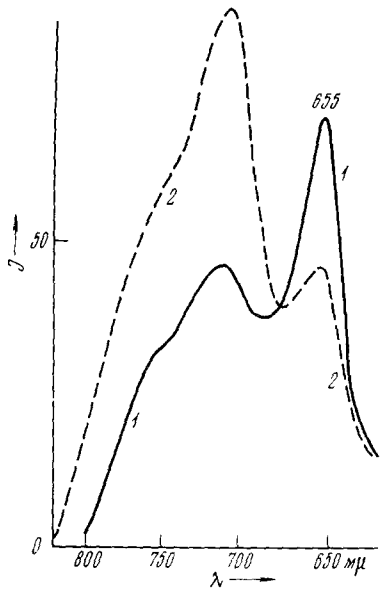


Рис. 2. Спектры люминесценции пленки протохлорофилла с максимумом поглощения 650 мμ при 20°. *1* — при первоначальной регистрации в вакууме, *2* — после освещения возбуждающим светом в течение 3 мин.

Для получения пленок использовали 4-винилпротохлорофилл и протохлорофилл, выделяемые из внутренних оболочек семян тыквы (сорта «Столовая») по методике ([6]). Пленки получали из эфирных растворов пигментов, как описано ранее ([3], [4]). При обработке пленок парами метанола, ацетона или серного эфира растворитель помещали в боковой отвод трубки Тунберга; по мере выдерживания образцов в парах растворителя (при 20°) регистрировали спектры поглощения на приборе СФ-10.

В опытах с АЛК этиолированные листья 7—8 дневных проростков кукурузы выдерживали 24 часа в темноте при 26° в 0,01 *М* растворе АЛК в фосфатном буфере с pH 7, 2, после чего регистрировали спектры люминесценции при —196° ([3]).

Получены следующие результаты.

При испарении в вакууме эфира из эфирного раствора протохлорофилла или 4-винилпротохлорофилла в большинстве случаев получаются пленки пигмента с максимумом поглощения ~635 мμ ([3], [4]). Мы нашли, что в присутствии паров органических растворителей происходит перестройка структуры пленок с образованием отчетливого максимума при 650 мμ, доминирующего в спектре. Наиболее эффективное действие оказывал метиловый спирт (рис. 1*А*).

Пары серного эфира и ацетона при действии на пленки винилпротохлорофилла (в течение 20—45 мин. при 20°) также вызывают образование максимума 650 мμ.Общий вид спектра, соотношение высот максимумов 650 и 635 мμ не постоянны в разных вариантах опытов; во многих случаях у пленок можно было наблюдать спектры поглощения, соответствующие спектрам интактных этиолированных листьев (рис. 1*Б*, *3*).

Протохлорофилл и протохлорофиллид не отличаются от винилпротохлорофилла по способности к образованию формы 650 мμ. У некоторых образцов протохлорофилла эту форму удавалось наблюдать в спектрах поглощения исходных пленок без какой-либо дополнительной обработки. Форма «650» сохраняется в пленках после длительного (более 2 час.) эвакуирования вакуумным насосом. При нагревании до 90° основное количество формы «650» исчезает, и максимум 635 мμ становится основным в спектре (рис. 1*Б*, *4*).

Пленки пигментов, поглощающие при 650 мμ, обладают при комнатной температуре заметной люминесценцией с отчетливым максимумом при

655 мμ и двумя другими — около 710 и 755 мμ (рис. 2). Максимум 655 мμ быстро падает под действием возбуждающего света, в то время как интенсивность длинноволновой люминесценции с максимумом ~710 мμ значительно возрастает: после освещения в течение 1—2 мин. максимум 710 мμ становится основным в спектре (рис. 2). Возможно, что этот эффект связан с фотоокислением формы «650» остаточным кислородом, уменьшением его тушащего действия и возгоранием в результате этого длинноволновой люминесценции.

Спектры люминесценции пленок (в спектре поглощения которых доминирует форма 650 мμ) при первоначальной регистрации в вакууме при комнатной температуре, во многом напоминают низкотемпературные

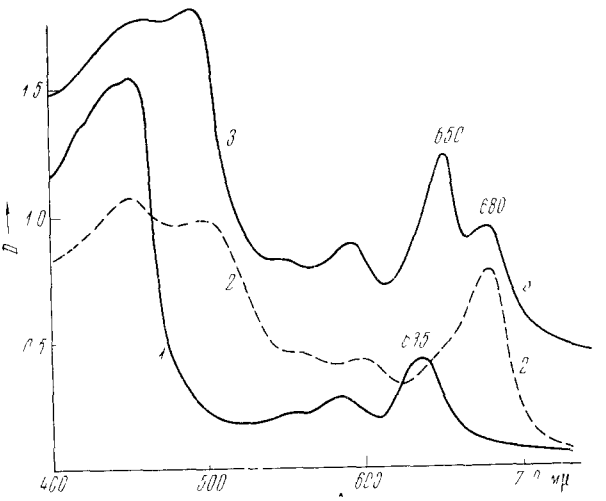


Рис. 3. Образование формы 675—680 мμ в пленках протохлорофилловых пигментов. Спектры поглощения. *1* — исходная пленка винилпротохлорофилла, *2* — после обработки парами ацетона в течение 1 часа, *3* — пленка протохлорофилла после обработки парами ацетона в течение 2 час.

спектры неосвещенных этиолированных листьев. Вместе с тем относительная величина максимума 655 мμ в листьях выше, чем в пленках. Этот максимум люминесценции в листьях практически не заметен при комнатной температуре, что обусловлено высокой квантовой эффективностью фотопревращения предшественника хлорофилла (хлорофиллида). В пленках же форма 650 мμ не подвергается фотовосстановлению, поэтому обнаруживает заметную люминесценцию при комнатной температуре.

В пленках винилпротохлорофилла и протохлорофилла при обработке парами ацетона или серного эфира (при 20°) можно наблюдать образование формы с максимумом поглощения 675—680 мμ. Эта форма отчетливо обнаруживается в спектре вслед за начальным образованием формы «650» в указанных условиях. После обработки разных образцов пленок пигментов парами растворителя в течение 1—2 час. получаются спектры поглощения, различающиеся соотношением основных максимумов. Наиболее типичные варианты представлены на рис. 3, *2, 3*.

В спектрах люминесценции пленок с формой 675—680 мμ, измеряемых в вакууме, проявляется максимум 685—690 мμ, соответствующий флуоресценции основной поглощающей формы, а также более длинноволновые максимумы — около 710 и 760 мμ. Последние два максимума свойственны спектрам люминесценции пленок любого типа независимо от положения и формы основного максимума поглощения. При освещении в присутствии воздуха обнаруживается резкое падение их интенсивности, что согласуется

с нашими прежними результатами по свойствам магниевых комплексов ([3], [7]).

Получение различных спектральных форм в пленках определяется спонтанно протекающим пигмент-пигментным взаимодействием, в котором существенную роль могут играть молекулы связанной воды, содержащейся, по всей вероятности, в используемых нами препаратах пигментов. Пары органических растворителей, по-видимому, расшатывают жесткую структуру пленок, создавая благоприятные условия для межмолекулярного взаимодействия с образованием агрегированных форм различного типа.

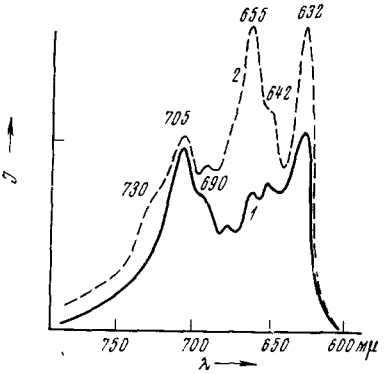


Рис. 4. Спектры люминесценции этиолированных листьев кукурузы при —196° после обработки δ-аминолевулиновой кислотой. *1*, *2* — разные листья

Формы «635» и «650» по спектральным свойствам соответствуют формам протохлорофилловых пигментов в листьях. Форма «650» в пленках, как и в естественном состоянии, отличается термолабильностью, форме «635» свойственна термостойкость. Указанные формы могут быть получены и в пленках бесфитольного аналога протохлорофилла — протохлорофиллида, выделенного из этиолированных листьев.

Протохлорофиллид в составе этиолированных листьев под действием экзогенной АЛК ([8]) образует главным образом формы, поглощающие в области 628—630 и 635—637 мμ, которые обнаруживаются в низкотемпературных спектрах люминесценции листьев в виде максимумов около 632 и 642 мμ соответственно (рис. 4). Их соотношение у разных листьев даже одного и того же возраста варьирует в довольно широких пределах. Кроме указанных максимумов, в спектрах люминесценции этиолированных листьев, обработанных АЛК, как и в пленках, всегда проявляются компоненты 655, ~675, 685—690, ~705 и ~730 мμ. Из них последние три могут принадлежать квазикристаллическим структурам протохлорофиллида, вторично образуемым на пропластидных мембранах в условиях многократно усиливающегося биосинтеза пигмента. Эти структуры могут соответствовать наблюдаемым в твердых пленках протохлорофилловых пигментов.

Описанные эксперименты указывают на то, что в проявлении спектральных свойств естественного протохлорофиллид-белкового комплекса может играть роль междумолекулярное взаимодействие протохлорофилловых пигментов ([9]).

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

Поступило
9 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, В сборн. Функциональная биохимия клеточных структур, «Наука», 1970, стр. 15. [2] А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, К. К. Войновская, ДАН, 92, 1201 (1953). [3] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 2, 847 (1968). [4] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, там же, 1, 362, 1967. [5] C. J. Seliskar, B. Ke, Biochim. et biophys. acta, 153, 685 (1968). [6] C. Houssier, K. Sauer, Biochim. et biophys. acta, 172, 476 (1969). [7] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, ДАН, 182, 211 (1968). [8] M. Gassman, L. Bogorad, Plant Physiol., 42, 781 (1967). [9] L. I. Fradkin, A. A. Shlyk, L. M. Kalinina, Photosynthetica, 3 (4), 326 (1969).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 5 1971 Вып. 3

УДК 577.45

ОБРАЗОВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА И ФОРМИРОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ В ЗЕЛЕНЕЮЩИХ ЛИСТЬЯХ НОРМАЛЬНЫХ И МУТАНТНЫХ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ

Ф. ЛАНГ, Л. М. ВОРОБЬЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследовали взаимосвязь между низкотемпературными спектрами флуоресценции, количественным соотношением хлорофилловых пигментов и формированием структуры хлоропластов в процессе зеленения на свету низкой интенсивности нормальных и мутантных по каротиноидам этиолированных листьев кукурузы. В низкотемпературных спектрах флуоресценции нормальных и мутантных листьев максимум при 635 *ммк* определяется протохлорофиллом, 655 *ммк* — протохлорофиллидом, 672 *ммк* — хлорофиллом *а* и 686 *ммк* — хлорофиллидом. У мутантов протохлорофиллид и протохлорофилл быстро превращаются под действием света, в то время как в нормальных листьях быстрого превращения протохлорофилла не наблюдается. Фитолизация хлорофиллида в мутантах начинается на более ранних стадиях зеленения и идет с большей скоростью, чем в нормальных листьях. Исследование ультраструктуры хлоропластов показало, что в этиолированных мутантах, как и в нормальных листьях, пропластиды содержат проламеллярное тело. После 3—6 *час* освещения в нормальных и мутантных хлоропластах образуются концентрические ламеллы, после 24 *час* у нормальных растений формируются граны, отсутствующие на этой стадии зеленения у мутантов. При длительном освещении в хлоропластах мутантов происходит образование гран, отличающихся по размерам и структуре от гран нормальных листьев. У мутантных растений обнаружено разнообразие структур хлоропластов. При зеленении этиолированных проростков на свету низкой интенсивности не наблюдается корреляции между стадиями биосинтеза хлорофилла и формированием структуры хлоропластов.

Зеленение этиолированных растений сопровождается сложными изменениями спектров поглощения и флуоресценции, которые вызываются изменениями предшественников молекулы хлорофилла под действием света [1; 2]. Накопляющийся в этиолированных листьях протохлорофиллид при освещении претерпевает фотовосстановление и превращается в хлорофиллид, который путем темновой реакции фитолизируется и в результате образуется вначале мономерный, а потом агрегированный хлорофилл [3—5]. Этим химическим превращениям соответствуют следующие изменения в спектре флуоресценции (*ммк*): 655→690→680→686→730 [1; 2; 6]. В последнее время помимо трансформации формы 655→690 удалось наблюдать фотопревращение формы 635 в пигмент, флуоресцирующий при 680 *ммк* [6; 7].

Несмотря на то что процесс зеленения был исследован многими авторами, вопрос об идентификации продуктов, ответственных за различные максимумы в спектрах поглощения и флуоресценции, требует дальнейшего исследования, так как спектральные изменения вызываются не только химическими изменениями предшественников, но и изменениями в состоянии молекул пигментов [8—11]. Зависящий от света синтез хлорофилла, как известно, имеет не менее трех стадий: быстрое образование хлорофиллида и хлорофилла путем фотохимического превращения на-

копившегося в темноте протохлорофиллида; индукционный период синтеза хлорофилла; быстрое накопление хлорофилла [12].

Свет вызывает и регулирует биосинтез хлорофилла, а также действует на формирование фотосинтетического аппарата. Несколько лет назад была установлена корреляция между структурной организацией хлоропластов и синтезом хлорофилла [12—14]. При помощи флуоресцентного микроскопа было показано, что протохлорофиллид находится в проламеллярном теле протопластид, представляющем собой комплекс трубочек, расположенных в форме решетки [15]. При фотопревращении протохлорофиллида структура проламеллярного тела изменяется и из системы трубочек образуются пузырьки. Для превращения трубочек под действием света необходима энергия $\sim 10^4$ *эрг/см*^{2}. Предполагается, что первичным акцептором энергии является протохлорофиллид [16]. Фотохимическое превращение протохлорофиллида вызывает перестройку пузырьков и образование концентрических ламелл. Формирование гран происходит в период быстрого накопления хлорофилла [12].

Действие генетических факторов на формирование фотосинтетического аппарата исследовалось в мутантных растениях [17—19]. Существуют мутанты, у которых синтез фотосинтетических пигментов и формирование хлоропластов блокированы на определенных стадиях [16; 20]. Такие мутанты являются хорошими объектами для изучения промежуточных стадий образования фотосинтетического аппарата и биосинтеза пигментов. Ранее нами был исследован процесс зеленения в светочувствительных пигментных мутантах кукурузы по спектрам флуоресценции и было показано, что у мутантов спектральная картина превращения пигментов на первых стадиях зеленения не отличается от нормальных растений, различия наблюдались лишь в конце процесса зеленения. Их можно объяснить различной упаковкой молекул хлорофилла в агрегированных структурах [21; 22].

В данной работе была сделана попытка химически идентифицировать вещества, ответственные за различные максимумы флуоресценции при процессе зеленения, и выяснить корреляцию между структурной организацией хлоропластов и различными стадиями синтеза хлорофилла при низкой интенсивности света.

МЕТОДИКА

Для исследования процесса зеленения использовали этиолированные и зеленеющие листья нормальных растений кукурузы, а также листья ζ-каротинового и ликопинового мутантов, описанных ранее [20]. В ζ-каротиновом мутанте каротиноиды представлены только ζ-каротином, в ликопиновом — только ликопином. Мутанты не могут расти в обычных условиях освещения вследствие особой фотолабильности пигментов [23].

Этиолированные растения выращивали в темноте при 28°. Десятидневные проростки освещали светом 25 *лк*, фиксировали жидким азотом (—196°) и экстрагировали ацетоном в присутствии углекислого магния. Ацетоновый экстракт выпаривали и пигменты снова растворяли в малом количестве ацетона. Концентрированный экстракт хроматографировали с помощью тонкослойной хроматографии на целлюлозе. Разделение пигментов производили смесью гексан — ацетон (80 : 20) в темноте. Положение хлорофилловых пигментов на хроматограммах определяли по флуоресценции, возбуждаемой линией ртути 365 *ммк*. После проявления хроматограмм пигменты, этерифицированные фитолом (протохлорофилл и хлорофилл *а*), хорошо отделялись друг от друга и от бесфитольных пигментов. В наших условиях разделения R_f хлорофилла *а* был равен 0,61, протохлорофилла — 0,44, хлорофиллида *а* — 0,14, протохлорофиллида — 0,08. Хлорофилл *b* на хроматограммах располагался в том же месте, что и протохлорофилл, но в момент появления значительных количеств хлорофилла *b* протохлорофилл в листьях не обнаруживался, что видно по спектрам флуоресценции пигментных фракций на этой стадии зеленения. Разделенные фракции немедленно соскабливали с пластинок и элюировали ацетоном. Концентрацию протохлорофилловых и хлорофилловых пигментов определяли на флуорометре типа ФАС-1М. Спектры флуоресценции фракций и листьев измеряли в спектрофлуорометре при низкой (—196°) и комнатной температуре. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутно-кварцевую лампу ДРШ-250 со светофильтрами ЗС-3 и ФС-6, пропускающими линии ртути 365 и 404 *ммк*.

Для электронно-микроскопических исследований этиолированные и зеленеющие листья фиксировали 2%-ным $KMnO_4$ в 0,1 *М* фосфатном буфере (pH 7,5) при 20° в течение 1,5 *час*. После фиксации обезвоженный материал помещали в аралдит (Дур-

купан АСМ Флука). Срезы делали автоматическим ультрамикротомом (Рейхерт ОМУ-2). Материал исследовали в электронном микроскопе типа УЭМВ-100Б, ускоряющие напряжение 75 *кв*. Снимки были сделаны в Институте сравнительной анатомии Будапештского университета им. Этвэша Лоранда при участии Я. Ковача.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В этиолированных листьях тонкослойной хроматографией удалось обнаружить четыре пигмента (таблица). Главным пигментом по количеству как в нормальных, так и в мутантных листьях являлся протохлорофиллид. Кроме бесфитольного предшественника хлорофилла присутствовал и протохлорофилл, но его содержалось в 3—6 раз меньше, чем протохлорофиллида. Известно, что у высших растений превращение протохлорофиллида происходит только на свету. Несмотря на то, что проростки при выращивании и экстракции пигментов не подвергали действию света, они содержали в небольшом количестве хлорофиллид *а* и хлорофилл *а*. Количество хлорофиллида *а* мы не смогли определить из-за его малого содержания, однако на присутствие этого пигмента указывал максимум в спектрах флуоресценции ацетоновых фракций этиолированных листьев после хроматографии. Общее количество хлорофилловых пигментов в нормальных этиолированных растениях и мутантах примерно одинаково, однако наблюдались значительные различия в соотношении протохлорофиллида и протохлорофилла. В нормальных листьях отношение бесфитольной формы пигмента к фитольной обычно равно 6 : 1, в то время как в мутантах 2—3 : 1.

Содержание (10^{-9} *моль/г*) хлорофилловых пигментов в этиолированных нормальных и мутантных листьях кукурузы

Пигмент	Нормальный	Ликопиновый	ζ-Каротиновый
Протохлорофиллид	4,82±0,74	3,54±0,81	4,05±0,70
Хлорофиллид	Следы	Следы	Следы
Протохлорофилл	0,80±0,15	1,33±0,24	1,80±0,33
Хлорофилл *а*	0,16±0,06	0,17±0,07	0,10±0,05
Сумма:	5,78±0,86	5,04±0,94	5,95±1,03

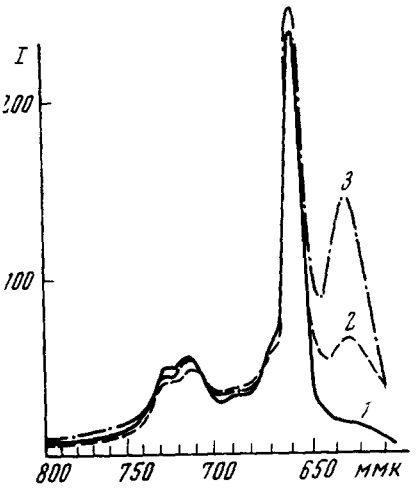


Рис. 1. Низкотемпературные (—196°) спектры флуоресценции этиолированных нормальных и мутантных листьев кукурузы

1 — нормальный; *2* — ликопиновый; *3* — ζ-каротиновый

Изучали также флуоресценцию нормальных и мутантных листьев этиолированных (рис. 1) и зеленеющих проростков при —196°. Главный пик у этиолированных листьев располагался при 655 *ммк*, значительный максимум наблюдался при 635 *ммк*, «плечо» — при 674 *ммк* и небольшие максимумы при 686, 712 и 725 *ммк*. Анализ пигментов показал корреляцию между отношением протохлорофиллида и протохлорофилла и высотой максимумов при 655 и 635 *ммк*. В ζ-каротиновых листьях, в которых концентрация протохло-

рофилла относительно большая, высота пика при 635 *ммк* значительна. В нормальных проростках небольшое содержание протохлорофилла характеризуется малым максимумом при 635 *ммк*.

Изменение содержания пигментов в нормальных зеленеющих листьях в зависимости от времени освещения показано на рис. 2. Как видно, концентрация протохлорофиллида под действием света сильно уменьшается,

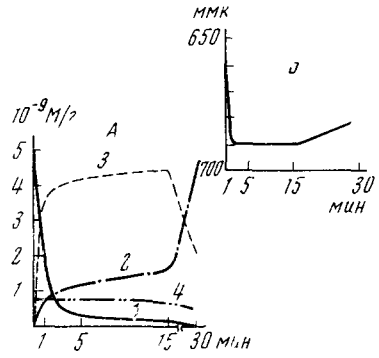


Рис. 2

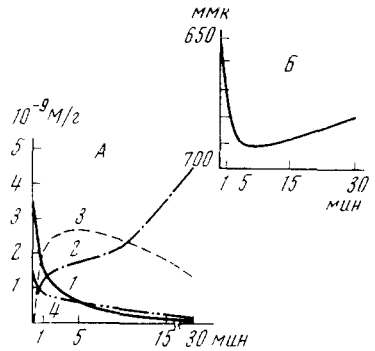


Рис. 3

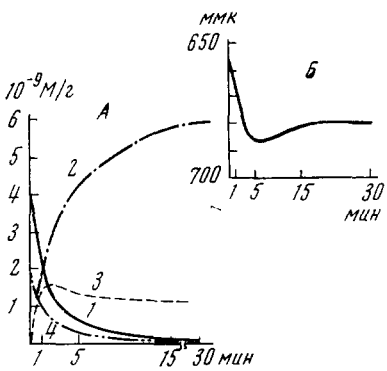


Рис. 4

Рис. 2. Изменение содержания пигментов (*А*) и положения главного максимума флуоресценции (*Б*) в нормальных зеленеющих листьях

1 — протохлорофиллид; *2* — хлорофилл *а*; *3* — хлорофиллид; *4* — протохлорофилл

Рис. 3. Изменение содержания пигментов (*А*) и положения главного максимума флуоресценции (*Б*) в зеленеющих ликопиновых листьях

1 — протохлорофиллид; *2* — хлорофилл *а*; *3* — хлорофиллид; *4* — протохлорофилл

Рис. 4. Изменение содержания пигментов (*А*) и положения главного максимума флуоресценции (*Б*) в зеленеющих ζ-каротиновых листьях

1 — протохлорофиллид; *2* — хлорофилл *а*; *3* — хлорофиллид; *4* — протохлорофилл

и примерно за 1 *мин* половина его количества превращается в хлорофиллид. Наблюдается соответствие между уменьшением концентрации протохлорофиллида и увеличением количества хлорофиллида. Это фотохимическое превращение осуществляется практически за 5 *мин*.

В то время как протохлорофиллид при освещении быстро исчезает, количество протохлорофилла не изменяется. Убыль протохлорофилла заметна только после 30 *мин* освещения. Содержание хлорофилла *а* в начале освещения медленно растет, но после 2—3 *мин* стабилизируется. После 5 *мин* зеленения в нормальных листьях в течение 10—15 *мин* не происходит взаимопревращения пигментов и создается стационарное состояние, при котором отношение всех четырех пигментов не изменяется и главным пигментом по количеству является хлорофиллид *а*.

По мере изменения количества протохлорофиллида и хлорофиллида при освещении в спектре низкотемпературной флуоресценции происходит понижение максимума при 655 *ммк* и возрастание флуоресценции при 690 *ммк*. После 15 *мин* освещения в результате фитолизации хлорофиллида наблюдается сильное увеличение количества хлорофилла *а* и одновременное уменьшение содержания хлорофиллида. При этом максимум флуоресценции при 690 *ммк* перемещается к 680 *ммк*, что соответствует флуоресценции хлорофилла *а*. Хотя общее количество хлорофил-

ловых пигментов во время индукционного периода не изменяется, освещение вызывает характерные изменения пигментов, накопившихся в этиолированных листьях.

Изменения концентрации хлорофилловых пигментов в зеленеющих ликопиновых листьях изображены на рис. 3. В ликопиновых проростках также наблюдается быстрое фотохимическое превращение протохлорофиллида, но этот процесс происходит медленнее, чем в нормальных листьях. Кроме превращения протохлорофиллида 655, в этом мутанте наблюдалась фототрансформация и протохлорофилла 635. За 15 *мин* количество протохлорофилла уменьшается на 20% от исходного количества. Так как протохлорофиллид и протохлорофилл подвергаются превращению, то в начале освещения и хлорофиллид *а* и хлорофилл *а* образуются параллельно и с большой скоростью. Действие хлорофиллазы на соотношение бесфитольных и фитольных пигментов в ликопиновом мутанте наблюдается раньше, чем в нормальных листьях, когда фотохимическая реакция еще не кончилась. Поэтому в ликопиновых мутантах стационарная фаза превращения пигментов практически не наблюдается

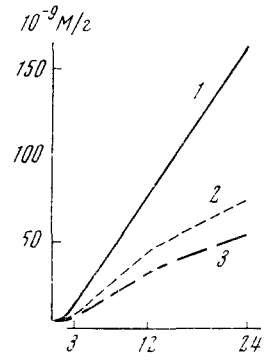


Рис. 5 Изменение общего количества хлорофиллов при зеленении нормальных и мутантных листьев кукурузы

1 — нормальный, *2* — ликопиновый, *3* — ζ каротиновый

В первые минуты освещения в ликопиновом мутанте помимо хлорофиллида *а* в значительном количестве присутствует и хлорофилл *а*. В спектрах низкотемпературной флуоресценции в это время кроме пика при 690 *ммк* наблюдается большое плечо при 680 *ммк*. Исходя из количественного соотношения пигментов, можно сказать, что плечо при 680 *ммк* соответствует хлорофиллу *а*. Перемещение максимума 690 к 680 *ммк* при зеленении ликопинового мутанта происходит раньше, чем у нормальных листьев, и совпадает с фитолизацией хлорофиллида *а*. В этом отношении получена полная корреляция между результатом пигментного анализа и спектром флуоресценции зеленеющих листьев.

Изменения концентрации пигментов в ζ-каротиновых зеленеющих листьях при освещении показаны на рис 4. У этого мутанта особенно хорошо видно фотопревращение протохлорофилла в хлорофилл *а*. Так как в этиолированных ζ-каротиновых листьях относительно много протохлорофилла, уже в первые минуты освещения образуется значительное количество хлорофилла *а*. Кроме этого, хлорофиллид *а* под действием хлорофиллазы в ζ-каротиновых хлоропластах фитолизируется особенно быстро. Так, уже после 1 *мин* освещения отношение хлорофиллида *а* к хлорофиллу становится равным 1 : 1, в то время как в нормальных листьях это соотношение примерно равнялось 4 : 1. Максимум флуоресценции после 1 *мин* освещения находится между 690 и 680 *ммк* и быстро перемещается к 680 *ммк* по мере дальнейшего накопления хлорофилла *а*.

В обоих мутантах удалось показать быстрое фотопревращение протохлорофилла, которое в нормальных листьях на этой стадии зеленения не удается заметить. Фитолизация хлорофиллида в мутантах происходит быстрее, чем в нормальных листьях кукурузы [23].

Изменение общего количества хлорофилла при зеленении нормальных и мутантных листьев показано на рис. 5. В соответствии с литературными данными [12] общее количество хлорофилловых пигментов в начале освещения нормальных и мутантных растений не изменяется, обнаруживается индукционный период, длительность которого около 3 *час*. После 3 *час* освещения в хлоропластах наблюдается заметное образование хлорофилла, 12-часовое освещение приводит к значительному на-

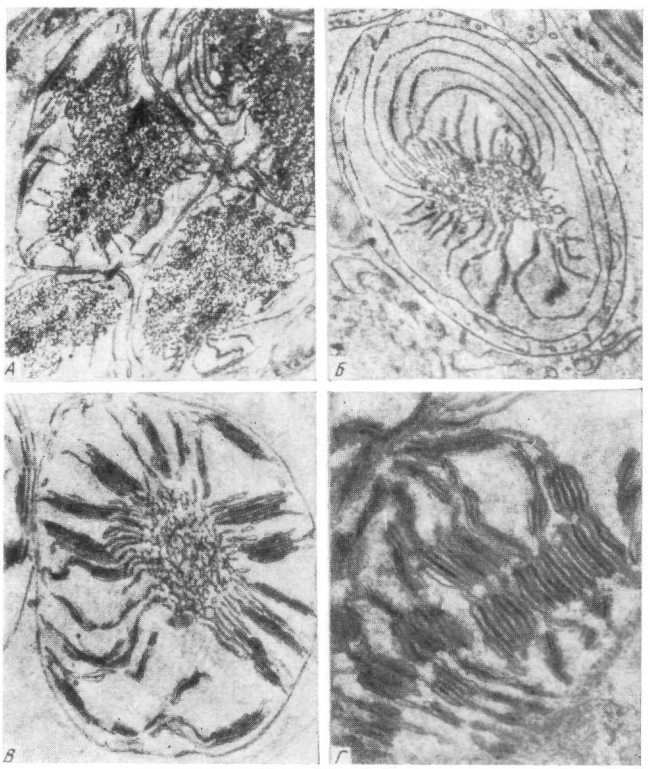


Рис. 6. Структура хлоропластов в зеленеющих нормальных листьях кукурузы

А — этиолированный, × 22 000; *Б* — 3 *час* освещения, × 20 000; *В* — 24 *час* освещения, × 28 000; *Г* — выращивание на свету, × 50 000

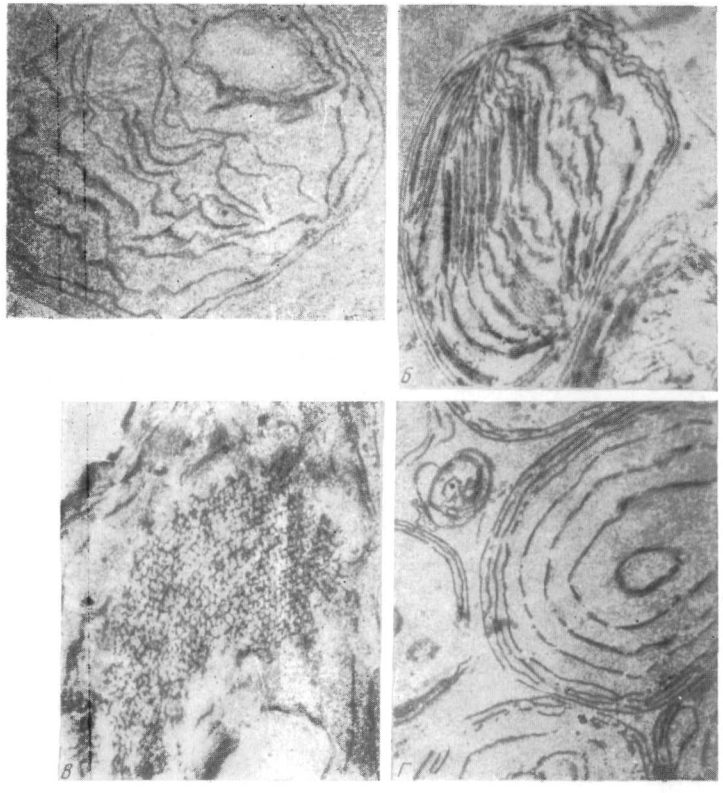


Рис. 7. Структура хлоропластов в зеленеющих листьях мутантов кукурузы

Ликопиновый мутант: *А* — 24 *час* освещения этиолированного листа, ×20 000; *Б* — выращивание на свету, ×25 000, ζ-Каротиновый мутант: *В* — этиолированный, ×30 000; *Г* — 12 час освещения, ×25 000

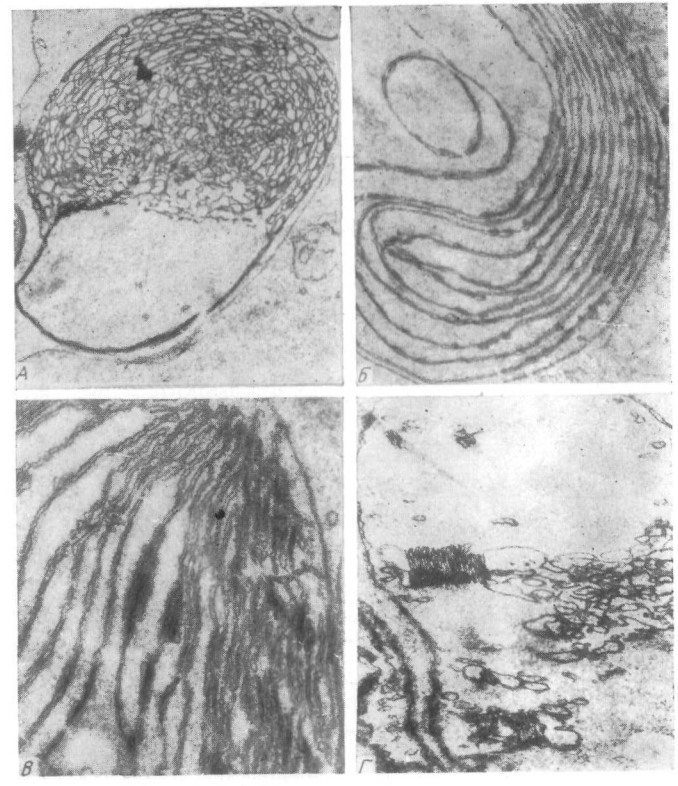


Рис. 8. Структура хлоропластов в зеленеющих ζ-каротиновых листьях кукурузы

А — 24 *час* освещения, ×20 000; *Б* — выращивание на свету, ×82 000; *В* — то же, × 40 000; *Г* — то же, × 28 000

коплению пигмента. После 24 *час* освещения в нормальных листьях образование хлорофилла идет с большой скоростью, тогда как в мутантах на этом этапе зеленения накопление пигментов замедляется. В мутантах концентрация хлорофилла в 2,5—3 раза меньше, чем в нормальных растениях.

Электронно-микроскопическая картина хлоропластов в этиолированных и зеленеющих нормальных листьях показана на рис. 6. В соответствии с литературными данными в этиолированных листьях пропластиды содержат только проламеллярное тело и зачатки ламелл [12; 13]. Под действием 3-часового освещения проламеллярное тело пропластид распадается и пузырьки перестраиваются в зачатки ламелл, которые радиально вырастают из проламеллярного тела и образуют концентрические ламеллы. После 12 *час* освещения листьев в пластидах сохраняется концентрическая ламеллярная система. Пластиды, освещенные 24 *час*, уже содержат ламеллы гран, хотя еще видны остатки проламеллярного тела. В листьях, выращенных на свету (25 *лк*), пластиды полностью организованы и граны в них обладают 4—12 слоями.

Пластиды в зеленеющих листьях ликопинового мутанта представлены на рис. 7. Пропластиды в этом мутанте похожи на нормальные, в них тоже наблюдается проламеллярное тело, но зачатки ламелл не видны. При освещении структурная организация хлоропластов протекает так же, как и в нормальных растениях, но граны образуются позже. В листьях, освещенных 24 *час*, граны в пластидах еще не наблюдаются. В зеленых ликопиновых листьях, выращенных на свету, пластиды содержат ламеллы стромы и гран. Структура гран в этих хлоропластах отличается от нормальных: они длинные и их толщина не более 3—4 ламелл. Иногда несколько гран расположены одна под другой, образуя целый ряд, но после 3—4 ламелл всегда видны перерывы.

На рис. 7 и 8 изображены хлоропласты ζ-каротинового мутанта в процессе зеленения. ζ-Каротиновые пропластиды тоже содержат проламеллярное тело. После освещения пластиды этого мутанта отличаются большим разнообразием строения. В ряде случаев процесс развития начинается так, как в нормальных пластидах, и из проламеллярного тела образуются концентрические ламеллы. Однако часто при освещении проламмелярное тело распадается, но ламеллы не образуются, а формируется беспорядочная пенистая структура. При выращивании на свету (25 *лк*) ζ-каротиновые растения имеют зеленые листья, однако организация хлоропластов в них в большинстве случаев блокируется после формирования концентрических ламелл. Иногда концентрические ламеллы агрегируют, и образуется параллельная ламеллярная система, в которой ламеллы не так близки друг к другу, как в нормальных гранах. Другой тип хлоропластов в зеленых ζ-каротиновых листьях ближе к нормальным; в них кроме ламелл стромы появляются и ламеллы гран. Однако число таких хлоропластов очень невелико. В этом мутанте обнаруживаются также хлоропласты, которые содержат необыкновенные граны, их толщина может достигать 20 ламелл, но длина ламелл, образующих граны, невелика. Особенно интересно, что в этих случаях кроме таких гран в пластиде нет других ламелл, а видны только большие пузырьки, сформированные из проламеллярного тела.

Исследование показало, что на свету в обоих мутантах образуются граны с аномальной структурой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследований синтеза хлорофилла и формирования хлоропластов дают возможность подробнее сравнить связь между спектром флуоресценции зеленеющих листьев, синтезом хлорофилла и образованием структуры хлоропластов. Так, в нормальных и мутантных листьях

наблюдается корреляция между высотой пика при 635 *ммк* в спектре флуоресценции и концентрацией протохлорофилла. Таким образом, в согласии с предыдущими работами [4], пик низкотемпературой флуоресценции при 635 *ммк* соответствует протохлорофиллу, а при 655 *ммк*— протохлорофиллиду. Однако надо отметить, что это имеет место только в случае интактных листьев. Известно, что в гомогенатах этиолированных листьев форма 655 переходит в форму 635 [8]. Подобное явление наблюдается при многократном замораживании и размораживании листьев [14]. Так как такие действия вызывают обычно дезагрегацию пигментов, было высказано предположение, что форма 655 является агрегированной формой протохлорофиллида [24], которая при дезагрегации переходит в мономерную форму [14]. Обработка этиолированных листьев δ-аминолевулиновой кислотой тоже вызывает накопление формы 635, которая, по-видимому, соответствует неактивному протохлорофиллиду [25].

Таким образом, форма 635 может соответствовать протохлорофиллиду и протохлорофиллу, но в нашем случае в интактных листьях максимум при 635 *ммк* соответствует протохлорофиллу, который в мутантных листьях оказался активным и при освещении превращался в хлорофилл.

При освещении этиолированных листьев нам не удалось обнаружить промежуточные продукты фотопревращения протохлорофиллида в хлорофиллид. Однако на основе изучения низкотемпературных спектров флуоресценции [2] предполагалось наличие этих продуктов в этиолированных листьях.

Хотя нам удалось показать фотопревращение протохлорофилла в хлорофилл *а* в мутантах, однако в процессе зеленения нормальных листьев последние стадии биосинтеза хлорофилла осуществляются прежде всего через протохлорофиллид и хлорофиллид.

Длинноволновый максимум агрегированного хлорофилла в нормальных листьях появляется после 3 *час* освещения [22], когда концентрация хлорофилла еще невелика. Это говорит в пользу того, что хлорофилл синтезируется не гомогенно на поверхности ламелл, а в виде маленьких островков. Таким образом, местами концентрация хлорофилла может достигать величины, достаточной для образования агрегатов.

Ранее отмечалось, что превращение протохлорофиллида вызывает образование пузырьков из трубочек [13]. При фотопревращении протохлорофиллида, как показали Годнев и др. [26], не существует светового порога, т. е. при любой интенсивности света происходит фотопревращение пигментов. Так как был показан световой порог при трансформации трубочек, можно было выбрать такую интенсивность света, когда фотопревращение протохлорофиллида не сопровождалось бы такими структурными изменениями [12]. Таким образом, при освещении эти процессы идут параллельно и превращение протохлорофиллида не вызывает непосредственную трансформацию трубочек в пузырьки. Однако не исключается предположение, что первичным акцептором света для превращения трубочек является протохлорофиллид, тем более что спектры действия фотопревращения обоих очень близки [12].

При высокой интенсивности света проламеллярное тело быстро исчезает и образуются концентрические ламеллы. Образование концентрических ламелл объясняли тем, что единицы, присутствующие в пропластидах, перестраиваются под действием света [27]. Предполагалось также, что этот процесс связан с превращением протохлорофиллида и не связан с фитолизацией хлорофиллида, которая является медленным процессом [28].

При низкой интенсивности света не наблюдается непосредственной связи между превращением протохлорофиллида и формированием концентрических ламелл. В нашем случае, например, протохлорофиллид

превращается практически за 15 *мин* а образование концентрических ламелл начинается только после 3-часового освещения.

В работе Вэттштэйна [18] было показано, что образование концентрических ламелл связано с перемещением максимума поглощения 684 к 672 *ммк*, которое, по литературным данным, соответствует фитолизации хлорофиллида В противоположность этому другие авторы показали, что в концентрической ламеллярной системе при низкой интенсивности света хлорофилл находится в бесфитольной форме [28].

В исследованных нами объектах фитолизация полностью происходит еще до формирования концентрических ламелл Это можно объяснить тем, что низкая интенсивность света, примененная нами, быстро превращает протохлорофиллид, а для фитолизации световая энергия не нужна При высокой интенсивности света быстрое образование хлорофилла и формирование гран обычно происходят одновременно [18] Однако при освещении этиолированных листьев в присутствии сахара светом низкой интенсивности высокое содержание хлорофилла не сопровождается формированием гран даже в полностью развитых хлоропластах [27]. Корреляция между структурными превращениями хлоропластов и образованием хлорофилла наблюдается только при высокой интенсивности света, когда интенсивность не является лимитирующим фактором для образования структур

Приносим глубокую благодарность Я. Ковачу за помощь в приготовлении образцов и в работе с электронным микроскопом.

ЛИТЕРАТУРА

1 Литвин Ф Ф, Красновский А А, Докл АН СССР **117**, 106, 1957
2 Литвин Ф Ф, в кн Биохимия и биофизика фотосинтеза, стр 96, «Наука», М, 1965
3 Красновский А А, Быстрова М И, Биохимия **25**, 168, 1960
4 Красновский А А, Быстрова М И, Сорокина А Д, Докл АН СССР **136**, 1227, 1961
5 Shlyk A A, Kaler V L, Vlasenok L I, Gaponenko V I, Photochem and Photobiol **2**, 129, 1963
6 Ланг Ф, Воробьева Л М, Красновский А А, Докл АН СССР **183**, 711, 1968
7 Годнев Т Н, Акулович Н К, Орловская К И, Раскин В И, Докл АН СССР **179**, 465, 1968
8 Красновский А А, Кособуцкая Л М, Докл АН СССР **85**, 177, 1952
9 Литвин Ф Ф, Рихирева Г Т, Красновский А А, Биофизика **7**, 578, 1962
10 Воробьева Л М, Быстрова М И, Красновский А А, Биохимия **28**, 524, 1963
11 Литвин Ф Ф, Гуляев Б А, Докл АН СССР **169**, 1187, 1966
12 Virgin H I, Kahn A, Wettstein D von, Photochem and Photobiol **2**, 83, 1963
13 Klein S, Bryan G, Bogorad L, J Cell Biol **22**, 433, 1964
14 Butler W L, Briggs W R, Biochim et biophys acta **112**, 45, 1966
15 Boardman N K, Anderson J M, Australian J Biol Sci **17**, 86, 1964
16 Eriksson G, Kahn A, Walles B, Wettstein D von, Ber Dtsch Bot Ges **74**, 221, 1961
17 Granick S, The Cell, vol 2, p 489, Acad Press, N Y — L 1961
18 Wettstein D von, Harvesting the sun Photosynthesis in plant life, p 153, Acad Press, N Y — L 1967
19 Gyurjan I, Rokován J N, Faludi-Dániel Á, Progress in Photosynthesis Research, H Metzner, Ed, Tubingen, vol 1, p 63, 1969
20 Faludi Daniel A, Lang F Nagy A, Faludi B, Acta agron Acad sci hung **16**, 1, 1967
21 Faludi Dániel A, Láng F, Fradkin L I, Biochemistry of Chloroplasts, vol 1, p 269, Acad Press, L — N Y, 1966
22 Ланг Ф, Воробьева Л М, Красновский А А, Биохимия **34**, 257, 1969
23 Shlyk A A, Fradkin L I, Savchenko G E, Faludi Daniel A, Photosynthetica **1**, 241, 1967
24 Fradkin L I, Shlyk A A, Kalinina L M Faludi Daniel A, Photosynthetica **3**, 326, 1969

25. Klein S., Bogorad L., J. Cell Biol. **22**, 443, 1964
26. Годнев Т. Н., Акулович Н. К., Раскин В. И., Домаш В. И., Studia Biophys. **5**, 25, 1967
27. Eilam Y., Klein S., J. Cell Biol. **14**, 169, 1962
28. Klein S., Nature **196**, 992, 1962

Поступила в редакцию
13.I 1970

CHLOROPHYLL SYNTHESIS AND FORMATION OF CHLOROPLASTS IN GREENING NORMAL AND MUTANT MAIZE LEAVES

F. LÁNG, L. M. VOROBJEVA and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, USSR, Moscow

The interrelations between fluorescence spectra, quantity of chlorophyll pigments and development of chloroplast structure were studied in normal and carotenoid mutant maize leaves during the greening process at low light intensity (25 *lux*). In the fluorescence spectra of normal and mutant leaves recorded at low temperature (77° K) maxima at 635 *mμ*, corresponds to protochlorophyll at 655 *mμ* to protochlorophyllide at 672 *mμ* to chlrophyll *a*, and at 686 *mμ* to chlorophyllide. Light exposure produced fast photoconversion of protochlorophyllide and protochlorophyll in the etiolated mutant leaves, at this very time in the normal leaves no marked phototransformation of protochlorophyll has been observed. Phytolization of chlorophyllide in the mutants starts at earlier stages of greening and proceeds with a higher velocity than in the normal maize plants. Investigation of the chloroplast structure at different stages of greening process showed that the proplastids contained prolamellar body both in etiolated normal and mutant leaves. After 3—6 hours illumination in normal and mutant platstids formation of circular lamellar system has been observed. 24 hours light exposure produced a grana formation in the normal chloroplasts, at this very time in the mutants no grana production has been found. By continuous illumination the mutant chloroplasts also formed grana, but the structure of these grana differed from the normal ones. The mutant chloroplasts are characterized with strong heterogeneity. At low light intensity the correlation was not found between the chlorophyll synthesis and the formation of chloroplast structure in greening leaves which was described in the experiments at hight intensity by other authors.

Доклады Академии наук СССР
1971. Том 199, № 5

УДК 577.3.1

БИОФИЗИКА

А. А. КРАСНОВСКИЙ мл., В. А. ШУВАЛОВ, Ф. Ф. ЛИТВИН,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ И ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ

Триплетным возбужденным состояниям хлорофилла и его аналогов посвящены многочисленные исследования; в частности, изучены замедленная флуоресценция ([1–3]) и фосфоресценция ([4–6]) ряда пигментов. Однако протохлорофилл оказался вне круга этих работ. Между тем изучение триплетных молекул этого пигмента представляет интерес для выяснения механизма биосинтеза хлорофилла и бактериохлорофилла. Целью настоящей работы явилось исследование триплетных состояний протохлорофилла и протофеофитина по фосфоресценции и замедленной флуоресценции пигментов в растворе.

Установка с фосфороскопом ([3]) позволяла измерять интенсивность, длительность послесвечения ($\tau \geqslant \geqslant 10^{-4}$ сек) и флуоресценцию образцов при возбуждении импульсами ксеноновой лампы-вспышки ИСШ-100-3 (продолжительность импульса 10^{-6} сек., энергия 0,5 дж.). Спектры возбуждения измерялись с помощью монохроматора (относительное отверстие 1 : 3), спектры послесвечения — с набором интерференционных светофильтров (полуширина полосы 10—15 мμ). В качестве приемника света использован специально отобранный фотоумножитель ФЭУ-38, чувствительный в области 400—1000 мμ.

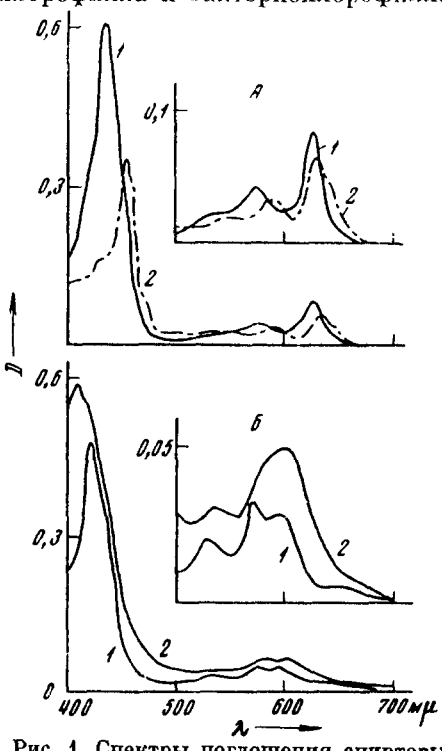


Рис. 1. Спектры поглощения спиртовых растворов ($2 \cdot 10^{-6}$ *М*) 4-винилпротохлорофилла (*А*) и 4-винилпротофеофитина (*Б*) при +20° (*1*) и —196° (*2*)

Выделенный из семян тыквы 4-винилпротохлорофилл ([7]) был дополнительно освобожден от следов протофеофитина на колонке с целлюлозой. 4-Винилпротофеофитин получен путем обработки эфирного раствора протохлорофилла 10% HCl. В качестве растворителя служил перегнанный этанол («ректификат» или «абсолютный»). Использовались растворы пигментов ($2 \cdot 10^{-6}$ *М*) в кварцевых вакуумных трубках после откачивания воздуха вакуумным диффузионным насосом ($5 \cdot 10^{-5}$ мм рт. ст.). Откачивание производилось по обычной методике при пятикратном замораживании — размораживании.

Замедленная флуоресценция. В эвакуированных растворах пигментов при +20° обнаружено послесвечение с $\tau = 10^{-4}$—10^{-3} сек. (табл. 1). Спектры возбуждения свечения совпадают со спектрами погло-

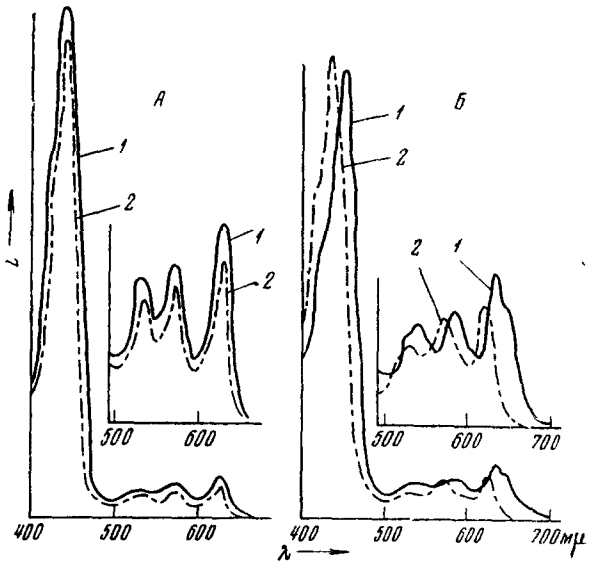


Рис. 2. Сравнение спектров возбуждения флуоресценции (*1*) и послесвечения (*2*) растворов 4-винилпротохлорофилла при +20° (*А*) и —196° (*Б*). Сравниваемые спектры измерены на одном и том же образце; поправка на интенсивность возбуждающего света не вводилась (максимум излучения лампы в области 400—500 мμ). Флуоресценцию регистрировали через светофильтры ФС-7 и КС-19 ($\lambda \geqslant 740$ мμ), фосфоресценцию — через ИКС-1 ($\lambda \geqslant 800$ мμ), замедленную флуоресценцию через КС-11 ($\lambda \geqslant 600$ мμ). Спектральная ширина щелей монохроматора при измерении фосфоресценции 9 мμ, при прочих измерениях 3 мμ

щения и возбуждения флуоресценции (рис. 1—3, табл. 2); спектры излучения совпадают со спектрами флуоресценции (рис. 4, табл. 2). В присутствии воздуха свечение исчезает.

Зависимость интенсивности послесвечения L от интенсивности возбуждающего света I близка к линейной. Отклонения от линейности наблюдались у протохлорофилла при высоких интенсивностях возбуждения (при $I \geqslant \geqslant 0{,}1 \cdot I_{max}$, $L \sim I^{1,2}$).

Зависимость L от температуры для протохлорофилла описывается уравнением Аррениуса с энергией активации $E_e = 8{,}5$ ккал/моль. Однако в растворах протофеофитина изменение температуры от —70 до +50° вызывало незначительное изменение L, соответствующее E_e не более 1 ккал/мол (табл. 1). Следует указать, что длительное освещение растворов протофеофитина приводило к необратимым изменениям спектров поглощения, вероятно, обусловленным фотореакцией между пигментом и этанолом (усиливалось поглощение в области 600—620 и 440 мμ); в растворах протохлорофилла подобный эффект не наблюдался.

Таблица 1

Количественные характеристики триплетных состояний молекул пигментов

Пигмент	τ, сек.		φ_e/φ_f	φ_p/φ_e	E_e	ΔE	E_T
	+20	—196°			ккал/моль		
4-Винил-протохлорофилл	10^{-3}	$4\cdot10^{-3}$	10^{-4}	3	8,5±0,5	8,0	37
4-Винил-протофеофитин	$4\cdot10^{-4}$	$2\cdot10^{-3}$	$2\cdot10^{-3}$	20	$\leqslant 1$	9,4	34

Примечание. φ_e, φ_f и φ_p — квантовые выходы замедленной флуоресценции и флуоресценции при +20° и фосфоресценции при —196°; E_T — энергия, соответствующая коротковолновому максимуму фосфоресценции.

Совокупность данных позволяет предположить, что свечение протохлорофилла является замедленной флуоресценцией, возникающей в результате термоиндуцированного $T - S$-перехода (E-тип по классификации Паркера ([1], [2])). Свечение протофеофитина, учитывая аномально низкую E_e и описанную фотореакцию, можно рассматривать также, как фотохемилюминесценцию, сопровождающую рекомбинацию радикалов, образовавшихся при реакции триплетных молекул пигмента с растворителем. Однако

измерения показали, что послесвечение протофеофитина наблюдается в разных растворителях (этаноле, диэтиловом эфире и в адсорбированном состоянии на бумаге) и во всех случаях характеризуется низкой величиной E_a. В связи с этим более вероятно, что люминесценция протофеофитина также является замедленной флуоресценцией E-типа.

Фосфоресценция пигментов обнаружена при —196° как в эвакуированных растворах, так и в присутствии воздуха. τ фосфоресценции в 4—5 раз больше τ замедленной флуоресценции. Выход фосфоресценции протофеофитина примерно в 5 раз выше выхода фосфоресценции протохлорофилла. Максимумы спектров излучения расположены в инфракрасной области (рис. 4, табл. 2).

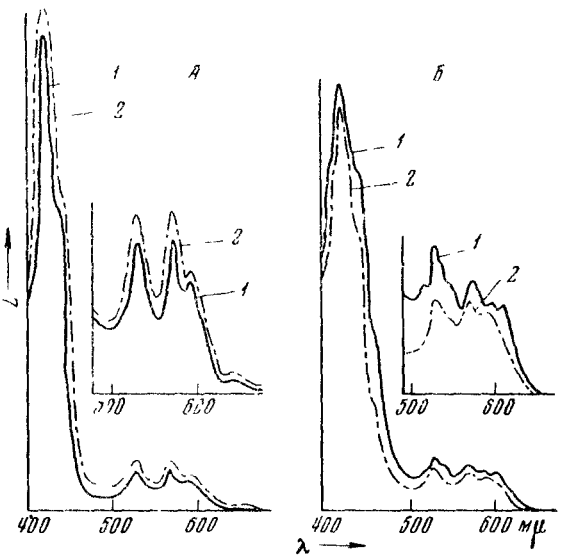


Рис. 3. Сравнение спектров возбуждения флуоресценции (*1*) и послесвечения (*2*) растворов 4-винилпротофеофитина при +20 (*А*) и —196° (*Б*). Спектральная ширина щелей монохроматора 3 мμ, прочие условия как на рис. 2

Форма спектров возбуждения фосфоресценции приближается к форме спектров поглощения и возбуждения флуоресценции, измеренных при +20°, и резко отличается от аналогичных спектров замороженных растворов. Как следует из рис. 1—3, эффект обусловлен тем, что замораживание вызывает значительные обратимые изменения в спектрах поглощения и возбуждения флуоресценции. При этом для протохлорофилла характерен сдвиг главных максимумов на 5—15 мμ в длинноволновую сторону (табл. 2) и появление плеч при 440, 462, 475, 627 и 646 мμ на спадах синего и красного максимумов. У протофеофитина наблюдался сдвиг синего максимума поглощения до 408 мμ и сглаживание структуры спектра; положение основных максимумов возбуждения флуоресценции оставалось таким же, как и при +20°, но появлялся ряд новых плеч при 408, 440, 460, 520, 540 и 608 мμ. В спектрах возбуждения фосфоресценции протофеофитина описанные плечи также появлялись, но выражены значительно слабее. Спектр возбуждения фосфоресценции протохлорофилла в пределах ошибки измерений совпадает со спектрами поглощения и возбуждения флуоресценции при +20° (рис. 1—3, табл. 2).

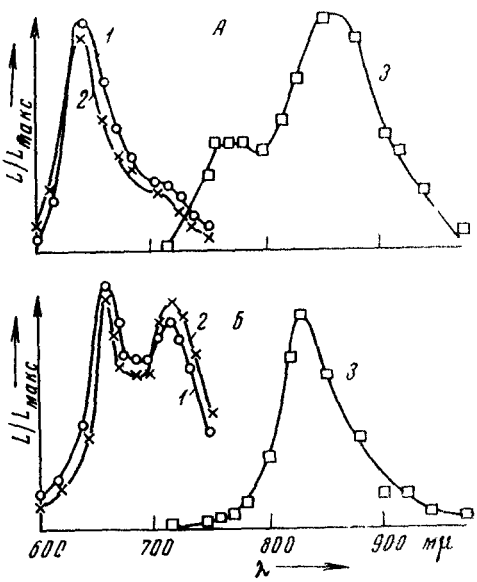


Рис. 4. Сравнение спектров флуоресценции (*1*) и послесвечения (*2*, *3*) 4-винилпротохлорофилла (*А*) и 4-винилпротофеофитина (*Б*) при +20° (*1*, *2*) и —196° (*3*). Измерено с использованием интерференционных светофильтров

Описанные факты получают простое объяснение, если предположить, что замораживание вызывает образование нескольких форм пигмента, возможно сольватов или агрегатов, в разной степени способных к флуоресценции и фосфоресценции. При этом наиболее интенсивно фосфоресцирует форма пигмента, преобладающая в растворе при 20° и являющаяся сольватированным мономером.

Таблица 2*

Положение главных максимумов спектров возбуждения люминесценции, поглощения и излучения пигментов (мμ)

Пигмент	Поглощение	Флуоресценция		Послесвечение	
		возбуждение	излучение	возбуждение	излучение
4-Винил-протохлорофилл	440	441		441	
	456	456	638	442	640
	540	540	637	538	770
	550	548		538	
	578	577		577	
	591	590	690	577	700
	630	630	690	630	870
	637	637		629	
4-Винил-протофеофитин	422	423		423	
	408	421	662	421	660
	530	530	660	530	840
	540	530		531	
	572	572		572	
	577	574	713	571	720
	595	591	712	593	—
	600	595		593	

Примечание. Ошибка в определении максимумов излучения послесвечения 10 мμ, прочих максимумов 2мμ.

* Над чертой +20°, под чертой —196°.

Количественные характеристики послесвечения сопоставлены в табл. 1. Выход замедленной флуоресценции и фосфоресценции значительно ниже выхода флуоресценции, причем отношение φ_e / φ_f по порядку величины совпадает с аналогичным параметром замедленной флуоресценции хлорофиллов a и b ([1], [2]). Обращает на себя внимание, что энергия активации замедленной флуоресценции протохлорофилла совпадает с разностью энергий (ΔE), соответствующей спектральному интервалу между коротковолновыми максимумами флуоресценции и фосфоресценции, тогда как для протофеофитина такое совпадение отсутствует, хотя принято считать, что оба параметра характеризуют одну и ту же величину — энергию синглет-триплетного расщепления ([1], [2]). Предварительные измерения показали, что $\Delta E \approx E_e$ для растворов хлорофиллов a, b, их феофитинов, но для протопорфирина и его цинкового комплекса E_e заметно меньше ΔE. Наблюдаемое несоответствие между энергетическими параметрами можно объяснить исходя из фотохимической природы свечения или предположив наличие эффективной миграции энергии в замороженных растворах с триплетного уровня коротковолновой формы пигмента на длинноволновую. Нам представляется более вероятным, что в молекулах протофеофитина и протопорфирина в результате излучательного $T \rightarrow S$-перехода наиболее интенсивно заселяется вибрационный подуровень основного состояния, т. е. величина кванта фосфоресценции уменьшается из-за растраты энергии в тепло. Это означало бы, что равновесная конфигурация указанных молекул в триплетном состоянии соответствует бо́льшим межъядерным расстояниям, чем в основном и возбужденном синглетном состояниях.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 IV 1971

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] C. A. Parker, T. A. Joyce, Nature, 210, 701 (1966). [2] C. A. Parker, I. A. Joyce, Photochem. and Photobiol., 6, 395 (1967). [3] В. А. Шувалов, А. А. Красновский, Молек. биол, 5, № 5 (1971). [4] M. Calvin, J. Dorought, J. Am. Chem. Soc., 70, 696 (1948). [5] I. S. Singh, R. S. Becker, J. Am. Chem. Soc., 82, 2083 (1960). [6] R. S. Becker, I. Allison, J. Phys. Chem., 67, 2662 (1963). [7] C. Housier, K. Sauer, Biochem. et biophys. acta, 172, 476 (1969).

УДК 577.12

ИЗУЧЕНИЕ ФОТООКИСЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ ДЕТЕРГЕНТА ТРИТОН Х-100

М. Г. ШАПОШНИКОВА, Н. Н. ДРОЗДОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Изучали кинетику необратимого фотоокисления хлорофилла *а* кислородом воздуха в водном растворе тритона Х-100 и в органических растворителях. Исследовали зависимость скорости реакции от концентрации детергента, от природы растворителя, pH среды, от парциального давления кислорода и спектрального состава света. Изучали также зависимость между скоростью фотоокисления и эффектом тушения флуоресценции хлорофилла кислородом. Проводили сравнение фотохимического взаимодействия хлорофилла с кислородом в присутствии доноров и акцепторов электрона. Показано, что скорость фотоокисления хлорофилла в тритоне значительно превышает скорость окисления в органических растворителях, что, возможно, объясняется структурной организацией молекул пигмента в мицеллах детергента. Хлорофилл в растворе тритона находится преимущественно в мономерной форме.

Различия, наблюдаемые между спектральными и фотохимическими свойствами хлорофилла в растворе и в клетках фотосинтезирующих организмов, заставляют изучать модели, имеющие свойства, близкие к свойствам естественных форм пигментов. К числу таких систем относятся растворы хлорофилла, полученные с помощью детергентов. В нашей лаборатории было показано, что такие растворы обладают большой фотохимической активностью, сравнимой с активностью хлорофилла в истинных растворах [1]. В водных растворах различных детергентов — нейтральных, анионо- и катионоактивных — было детально изучено фотосенсибилизирующее действие хлорофилла и его аналогов [2—7]. Эти исследования позволили сделать вывод о том, что хлорофилл в мицеллах детергента находится преимущественно в мономерной форме, чем и объясняется его высокая активность. Шлык с сотр. показали [8], что в листьях, инфильтрированных детергентами (тритоном Х-100 или додецилсульфатом натрия), наблюдается лабилизация молекул хлорофиллов *а* и *b*, что приводит к усилению выцветания хлорофиллов под действием света.

Хлорофилл хорошо солюбилизируется в растворе тритона при концентрации выше критической концентрации мицеллообразования. Предполагается, что молекулы хлорофилла ориентированы в мицеллах детергента таким образом, что порфириновое кольцо находится в водной среде, а гидрофобная часть молекулы защищена тритоном от молекул воды. В водных растворах тритона хлорофилл находится в сольватированной и флуоресцирующей форме [9, 10].

В настоящей работе мы исследовали необратимое фотоокисление хлорофилла *а* кислородом в водных растворах тритона Х-100. Чтобы выявить специфику свойств водных растворов детергента, реакцию фотоокисления хлорофилла проводили также в органических растворителях: в этиловом спирте, ацетоне и в вязкой спирто-глицериновой среде.

При освещении растворов хлорофилла на воздухе происходит реакция возбужденной молекулы пигмента в триплетном состоянии с кисло-

родом. В результате образуется первичная лабильная перекись (мольоксид) пигмента [11, 12]. Связанное с фотоокислением выцветание хлорофилла можно рассматривать как результат окислительной деструкции, проходящей через образование ряда промежуточных продуктов [13, 14]. При фотохимическом окислении хлорофилла кислородом наряду с основными продуктами необратимого окисления образуется некоторое количество продуктов, способных при взаимодействии с восстановителями регенерировать исходный пигмент [11].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали хлорофилл *а* и феофитин *а*, полученные из сухих листьев крапивы обычным методом хроматографического разделения на колонках из сахарозы. 0,1 *мл* ацетонового раствора пигмента добавляли к 4,9 *мл* детергента или изучаемого растворителя. Концентрация пигмента обычно составляла $\sim 10^{-5}$ *М*. О скорости реакции взаимодействия пигмента с кислородом судили по изменению оптической плотности (*D*) в красном максимуме поглощения хлорофилла при освещении через определенные интервалы времени. Растворы освещали красным светом кинолампы 300 *вт* через конденсор и светофильтр КС-11 ($3 \cdot 10^6$ *эрг/см²·сек*) при постоянной температуре (21°). При освещении растворов синим светом использовали осветитель ОИ-18 (линии возбуждения ртутной лампы 404 440 *ммк*) с фильтрами ФС-1 и БС-8 ($4 \cdot 10^5$ *эрг/см·сек*). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-14, спектры флуоресценции — на флуориметре [15]. Для возбуждения флуоресценции использовали лампу ДРШ-250 со светофильтрами ЭС-3 и ФС-6, выделяющими линии ртути 366 и 404 *ммк*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние концентрации детергента. Для определения оптимальных условий реакции необратимого фотоокисления хлорофилла в растворе тритона исследовали зависимость скорости реакции от концентрации детергента. В наших опытах содержание тритона в растворе увеличивалось от 0,01 до 1%. Было обнаружено, что в интервале 0,01—0,1% скорость реакции значительно возрастает, а затем остается постоянной, несмотря на увеличение концентрации детергента до 1% (рис. 1).

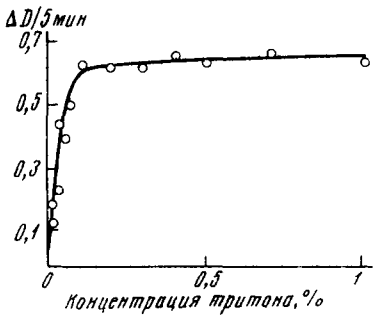


Рис. 1 Зависимость скорости фотоокисления хлорофилла *а* от концентрации тритона X-100

Ранее в нашей лаборатории было показано, что скорость фотоокисления аскорбиновой кислоты, сенсибилизированного хлорофиллом, возрастает при увеличении концентрации нейтрального детергента эмульфора до 0,6% [2]. Зависимость фотохимической активности хлорофилла от концентрации тритона X-100 в реакции сенсибилизированного восстановления метилоранжа была исследована в работе Массини и Вурна [7]. При изучении зависимости необратимого фотоокисления хлорофилла кислородом от концентрации тритона в растворе мы получили результаты, сходные с данными этих авторов.

Критическая концентрация мицеллообразования тритона X-100 равна 0,32 *мМ* ($\sim$0,02%-ный раствор), а минимальная концентрация, при которой происходит полная солюбилизация хлорофилла,— 0,67 *мМ* ($\sim$0,05%-ный раствор) [7]. В наших опытах значительное увеличение скорости фотоокисления хлорофилла наблюдалось именно в этих пределах концентрации тритона. В 0,1%-ном растворе детергента реакция протекала с максимальной скоростью, которая затем сохранялась, несмотря на увеличение концентрации детергента до 1%. Возможно, это объясняется тем, что активность поверхностно-активных веществ выше критической концентрации мицеллообразования практически постоян-

на [16]. Во всех дальнейших опытах мы использовали 0,5%-ный раствор тритона.

Спектры поглощения и флуоресценции хлорофилла *а* в 0,5%-ном растворе тритона представлены на рис. 2. Для сравнения приведены спектры хлорофилла в этиловом спирте и в смеси спирта с глицерином. Хлорофилл в детергенте сохраняет структуру спектра спиртового раствора, т. е. в мицеллярном растворе тритона хлорофилл находится в мономерной форме. Красный максимум поглощения хлорофилла в детергенте сдви-

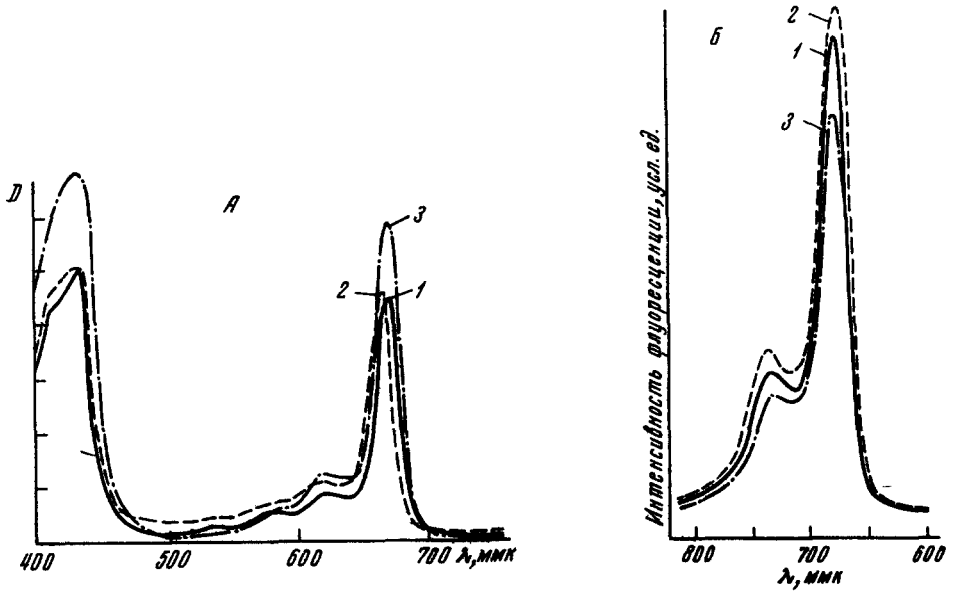


Рис. 2. Спектры поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) хлорофилла *а* при 20°

1 — в 0,5%-ном растворе тритона; *2* — в этиловом спирте; *3* — в смеси спирта (30%) с глицерином (70%)

нут к 669 *ммк* по сравнению со спиртовым раствором (665 *ммк*) и со спирто-глицериновой смесью (667 *ммк*). Максимум флуоресценции хлорофилла в тритоне также несколько смещен в длинноволновую часть спектра (680 *ммк*). Наличие яркой красной флуоресценции раствора хлорофилла в тритоне также свидетельствует о том, что пигмент находится в мономерной форме.

Влияние растворителя. Было исследовано фотоокисление хлорофилла кислородом в органических растворителях. Ниже представлены результаты этих опытов; скорость фотоокисления выражена как изменение оптической плотности в главном максимуме поглощения хлорофилла *а* за 5 *мин* ($\Delta D/5$ *мин* · 1000).

0,5%-ный тритон	650
Ацетон	100
Спирт	110
Спирт + глицерин:	
10% глицерина	130
20% »	170
50% »	390
70% »	660

В ацетоне и в спирте скорость окисления незначительна по сравнению со скоростью реакции в растворе тритона. Можно было предположить, что разница в скорости окисления связана с различной растворимостью кислорода. Однако растворимость кислорода ($\alpha_{20°C}$) в ацетоне (0,216) и в спирте (0,143) значительно больше, чем в воде (0,031). Очевидно,

увеличение фотохимической активности хлорофилла в присутствии детергента связано с гетерогенностью среды и с определенной организацией молекул пигмента в мицеллах детергента. При проведении реакции в смеси спирта с глицерином скорость реакции зависит от процентного содержания глицерина. Наиболее быстро окисление хлорофилла происходит в смеси, содержащей 70% глицерина,— в этом случае скорость реакции соизмерима со скоростью окисления в тритоне. Возможно, что окислению хлорофилла способствует вязкая среда, что отмечалось в работах нашей лаборатории [17, 18]. Ускорение окисления в вязких средах указывает на возможность предреакционного связывания хлорофилла с кислородом [14].

Влияние pH. Было показано [17], что свойства хлорофилла в «зеленых растворах» из листьев свеклы и в коллоидных водно-глицериновых растворах изменяются в зависимости от величины pH — в более кислых средах фотовыцветание хлорофилла уменьшалось.

При изучении действия pH на необратимое фотоокисление хлорофилла в тритоне нами были использованы $^1/_{15}$ *M* фосфатные буферы (величина pH от 4,7 до 8,7) и боратно-щелочные буферы (0,05 *M* борат и 0,1 *M* NaOH в разных соотношениях, pH от 9,2 до 12,0). При проведении реакции в спирте разные значения pH получали добавлением разбавленных растворов соляной кислоты (от 10^{-4} до 10^{-5} н.). Изменение pH в широком интервале (от 4 до 12) существенно не влияло на скорость фотоокисления хлорофилла в тритоне. При увеличении кислотности среды происходило незначительное образование феофитина, который в тритоне не окислялся. В спирте мы также не наблюдали изменения скорости реакции в зависимости от pH.

Маклеем было показано [19], что pH не влияет на растворимость и точку помутнения (расслоение фаз) неионогенных детергентов оксиполиэтиленового типа, но общая концентрация электролитов оказывает существенное влияние на процесс. Посторонние добавки могут влиять на растворимость детергента в воде, или проникая в мицеллу и изменяя ее структуру, или растворяясь в водной фазе и изменяя среду, окружающую мицеллы. В случае применения сильных электролитов происходит изменение среды в мицеллярном растворе, зависящее от ионной силы добавляемых солей. В наших опытах ионная сила применяемых буферов была приблизительно одинаковой и связь пигмента с детергентом не нарушалась. Очевидно, поэтому скорость фотоокисления хлорофилла была постоянной, несмотря на изменения pH. Возможно, также имеет значение и разница в концентрации водородных ионов на поверхности мицелл и в самом растворе детергента [5].

В отличие от необратимого фотоокисления кислородом, при обратимом окислении хлорофилла *a* хиноном в растворе этанола при кислых pH равновесие смещается в сторону образования окисленных продуктов [20]. По-видимому, это объясняется тем, что окислительный потенциал самого хинона увеличивается с возрастанием концентрации водородных ионов в среде.

Зависимость от парциального давления кислорода. При изучении необратимого фотовыцветания хлорофилла в метаноле было показано [21], что скорость реакции увеличивается с возрастанием парциального давления кислорода в окружающей атмосфере. Скорость этой реакции имеет предел насыщения кислородом.

В наших опытах в раствор хлорофилла в вакууме вводили определенный объем воздуха из расчета, чтобы парциальное давление кислорода каждый раз возрастало на 0,002 *атм*, а затем проводили реакцию фотоокисления. Как видно из рис. 3, для начала реакции фотоокисления хлорофилла в детергенте и в спирто-глицериновом растворе достаточно незначительного парциального давления кислорода (0,002 *атм*). С увеличением количества кислорода скорость реакции резко возрастала и

уже при парциальном давлении кислорода, равном 0,02 *атм*, реакция в тритоне шла с той же скоростью, что и на воздухе. В смеси спирта с глицерином насыщение реакции происходило при несколько большем парциальном давлении кислорода.

Фотоокисление и тушение флуоресценции кислородом. Эффект тушения флуоресценции пигментов связывают с обратимым фотохимическим взаимодействием возбужденной молекулы пигмента с тушителем. Было показано [22], что этот эффект не зависит от структуры пигмента или его состояния и не связан со скоростью фотохимического окисления. Тушение флуоресценции кислородом не сопровождается образованием

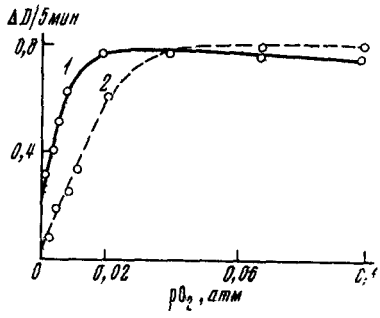


Рис. 3. Зависимость скорости фотоокисления хлорофилла *а* от парциального давления кислорода

1 — 0,5%-ный раствор тритона; *2* — смесь спирта (30%) с глицерином (70%)

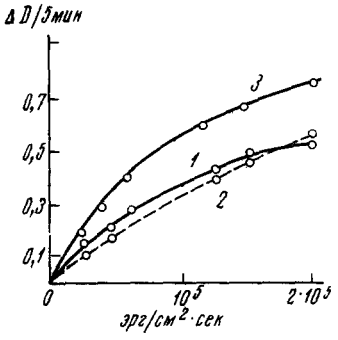


Рис. 4. Действие красного и синего света разной интенсивности на фотоокисление хлорофилла *а* в спирто-глицериновом растворе

1 — красный свет; *2* — синий свет; *3* — красный + синий свет

стабильного продукта присоединения — фотооксида, а ограничивается кратковременным взаимодействием возбужденной молекулы пигмента с кислородом.

Мы изучали эффект тушения флуоресценции кислородом в растворах хлорофилла в спирте и в тритоне. Сначала измеряли интенсивность флуоресценции в вакууме, а затем вводили в раствор определенный объем воздуха (как в опытах по изучению влияния парциального давления кислорода). Немедленно после впуска воздуха снова измеряли интенсивность флуоресценции. Тушения флуоресценции при низком парциальном давлении кислорода не удалось измерить. Эффект наблюдали только после пропускания кислорода через раствор хлорофилла. Величину тушения выражали отношением начальной интенсивности флуоресценции в вакууме к интенсивности в присутствии тушителя. Для спиртовых растворов это отношение составляло 1,3, для растворов в тритоне 1,1. После удаления воздуха величина интенсивности флуоресценции возвращалась к исходному значению.

Тот факт, что насыщение необратимого фотоокисления хлорофилла происходит при низком парциальном давлении кислорода, а тушения флуоресценции при этом не наблюдается, соответствует представлениям о том, что кислород реагирует с длительно живущей возбужденной формой хлорофилла.

Действие красного и синего света. В нашей лаборатории было показано [23], что при обратимом окислении хлорофилла хинонами синий свет тормозит реакцию, что свидетельствует о световой активации фотоокисленных форм пигмента. Интересно было выяснить, не происходит ли торможения реакции и при фотохимическом взаимодействии хлорофилла с кислородом за счет активизации первичных продуктов взаимодействия синим светом с регенерацией исходного пигмента. Действие света разных

длин волн было изучено на растворах хлорофилла в спирте, в ацетоне, в детергенте и в смеси спирта (30%) с глицерином (70%). Растворы освещали красным (фильтры КС-11 и НС-2) и синим светом равной интенсивности ($4 \cdot 10^5$ *эрг/см²·сек*). Интенсивность света изменяли с помощью нейтральных светофильтров (процент пропускания от 75 до 13). Независимо от того, в каком растворителе проходила реакция, нам не удалось обнаружить различия в действии красного и синего света на реакцию окисления хлорофилла кислородом. Скорость реакции была одинаковой при возбуждении и красного, и синего максимумов пигмента. При обратимом фотоокислении хлорофилла хинонами происходит накопление промежуточных продуктов, которые активируются под действием синего света с регенерацией исходного пигмента. В случае необратимого фотоокисления хлорофилла кислородом концентрация лабильных промежуточных продуктов, очевидно, настолько мала, что активирующего действия синего света обнаружить не удалось.

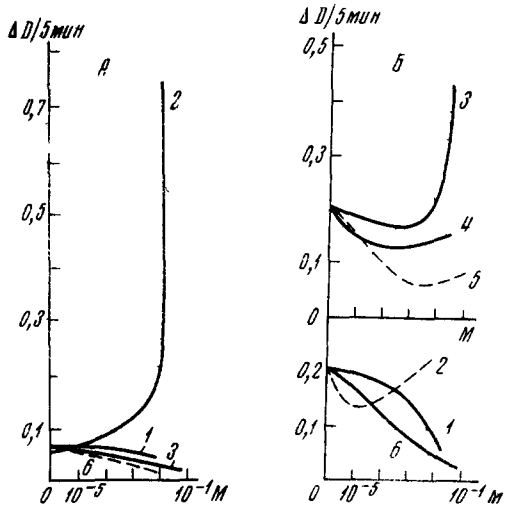


Рис. 5. Зависимость фотоокисления хлорофилла *а* от концентрации доноров и акцепторов электрона

А — в спирте, *Б* — в 0,5%-ном растворе тритона; *1* — гидрохинон; *2* — тиомочевина; *3* — аскробиновая кислота, *4* — аскорбиновая кислота в буфере; *5* — аскорбат натрия; *6* — *п*-бензохинон

Скорость фотоокисления зависела от интенсивности и красного, и синего света. При одновременном освещении растворов хлорофилла красным и синим светом наблюдалась аддитивность в их действии при интенсивностях до $6 \cdot 10^4$ *эрг/см²·сек*. С увеличением интенсивности света происходило насыщение реакции (рис. 4).

Действие восстановителей и окислителей. Возбужденная молекула хлорофилла может отдавать или принимать электрон в зависимости от природы и концентрации участвующих в реакции доноров или акцепторов. Мы изучали влияние различных доноров и акцепторов электрона на реакцию фотоокисления хлорофилла *а* в присутствии кислорода. В этих опытах в качестве доноров использовали гидрохинон, тиомочевину, аскорбат натрия, аскорбиновую кислоту и глютатион с конечной концентрацией от 10^{-5} до $5 \cdot 10^{-2}$ *М*. Опыты проводили в спирте и в растворе тритона. Увеличение концентрации гидрохинона и аскорбиновой кислоты в спиртовом растворе хлорофилла подавляло реакцию фотоокисления; в присутствии тиомочевины скорость реакции возрастала, особенно при концентрации, равной 10^{-2} *М* (рис. 5, *А*). Ускорение окисления хлорофилла в присутствии тиомочевины согласуется с результатами, полученными ранее в нашей лаборатории. Предполагается, что сначала происходит фотореакция хлорофилла с кислородом с образованием мольоксида пигмента, который затем реагирует с тиомочевиной или с продуктами ее фотосенсибилизированного окисления [4, 24]. Подобное катализирующее действие на фотохимическое взаимодействие хлорофилла *а* с кислородом оказывает метилвиологен в спиртовом растворе при pH 4 [20]. Возможно, что метилвиологен облегчает перенос электрона от активируемой светом молекулы пигмента к кислороду.

Увеличение концентрации гидрохинона, тиомочевины и аскорбата натрия в растворе тритона замедляло реакцию фотоокисления хлоро-

филла. Аскорбиновая кислота в небольших концентрациях также несколько замедляла реакцию, но при концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ *M* скорость значительно возрастала (рис. 5, *Б*). При увеличении концентрации аскорбиновой кислоты в детергенте от 10^{-5} до $5 \cdot 10^{-2}$ *M* pH раствора изменялся от 5,4 до 2,7. Кислая реакция среды приводила к темновой феофитинизации хлорофилла. Возможно, что изменения оптической плотности, наблюдаемые при освещении раствора хлорофилла в присутствии большого количества аскорбиновой кислоты, обусловлены фотореакцией феофитина. Поскольку фотоокисления феофитина в растворе тритона не происходит, очевидно, имело место его фотовосстановление. Чтобы убедиться в правильности этого предположения, были поставлены опыты с феофитином *а* и аскорбиновой кислотой в тех же концентрациях. В присутствии кислорода при малых концентрациях аскорбиновой кислоты скорость реакции не изменялась. При концентрации 10^{-3} *M* и выше наблюдалось заметное ускорение реакции. В отсутствие кислорода реакция проходила при эквимолярных концентрациях аскорбиновой кислоты, а при бо́льших концентрациях реакция шла почти с той же скоростью, что и на воздухе. Спектр продукта, образующегося при этой реакции, соответствует спектру первичной фотовосстановленной формы феофитина *а* [25]. В темноте происходила регенерация пигмента, но скорость обратной реакции была различной в зависимости от того, проводилась ли прямая реакция в вакууме или в присутствии кислорода: при проведении прямой реакции на воздухе практически полная регенерация пигмента в темноте происходила за 4 часа, тогда как при проведении прямой реакции в вакууме значительная регенерация феофитина наблюдалась только после впуска воздуха. Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что изменение оптической плотности в красном максимуме при взаимодействии хлорофилла с кислородом в присутствии большого количества аскорбиновой кислоты происходит не за счет окисления хлорофилла, а за счет фотовосстановления образующегося феофитина. Этот вывод подтверждается и тем, что в опытах, проведенных с хлорофиллом и аскорбиновой кислотой в буферных растворах (pH 6,7—7,5), наблюдалось торможение реакции фотоокисления. Применение глютатиона в качестве донора электрона не оказывало существенного влияния на скорость фотоокисления хлорофилла в тритоне ни в присутствии кислорода, ни в вакууме. При концентрации глютатиона 10^{-2} *M* также наблюдалось темновое образование феофитина.

При изучении действия окислителей на реакцию фотоокисления хлорофилла кислородом использовали *n*-бензохинон в конечной концентрации от 10^{-5} до 10^{-2} *M*. При освещении хлорофилла в спирте и в тритоне в присутствии эквимолярного количества хинона не происходило значительного изменения скорости фотоокисления. С увеличением концентрации окислителя наблюдалось заметное ингибирование фотореакции. Сходные результаты были получены при изучении окисления в системе пигмент — хинон — кислород [20, 26]. При значительном превышении концентрации хинона над концентрацией хлорофилла окислитель начинает оказывать ингибирующее действие, вероятно, вследствие тушения возбужденных молекул пигмента большими количествами хинона.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все примененные окислители и восстановители замедляют реакцию необратимого фотоокисления хлорофилла кислородом в растворе тритона. Тормозящее действие доноров и акцепторов электрона, использованных в наших опытах, может быть следствием или первичного взаимодействия возбужденного хлорофилла с добавленными веществами, что препятствует реакции хлорофилла с кислородом, или первичного взаимодействия хлорофилла с кислородом, когда окисление хлорофилла имеет место, но при реакции с посторонним донором электрона происходит процесс регенерации пигмента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР, **63**, 163, 1948
2. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия, **22**, 776, 1967
3. Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **174**, 221, 1967
4. Красновский А. А., Луганская А. Н., Докл. АН СССР, **183**, 1441, 1968
5. Hertogs M., Wessels J. S. C., Biochim. et biophys. acta, **109**, 610, 1965
6. Massini P., Voorn G. Photochem. Photobiol., **6**, 851, 1967
7. Massini P., Voorn G., Biochim. et biophys. acta, **153**, 589, 1968
8. Шлык А. А. и др., Докл. АН СССР, **188**, 1189, 1969
9. Hochapfel A., Journeaux R., Viovy R., J. chim. phys., **66**, 1467, 1969
10. Journeaux R., Hochapfel A., Viovy R., J. chim. phys., **66**, 1474, 1969
11. Красновский А. А., Докл. АН СССР, **58**, 617, 1947; **58**, 835, 1947
12. Красновский А. А. мл., Литвин Ф. Ф., Мол. биол., **1**, 699, 1967
13. Дилунг И. И., Укр. хим. ж., **24**, 202, 1958
14. Дилунг И. И., Карпитская В. Е., Докл. АН СССР, **152**, 367, 1963
15. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика, **6**, 392, 1961
16. Шинода К. и др., Коллоидные поверхностно-активные вещества, «Мир», М., 1966
17. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Биохимия, **21**, 126, 1956
18. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, **30**, 605, 1965
19. Maclay W. N., J. Colloid. Sci., **11**, 272, 1956
20. Евстигнеев В. Б., в сб.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, стр. 264, «Наука», М., 1967
21. Livingston R., in: Photosynthesis in Plants, p. 179, Iowa State College Press, Ames. Iowa, 1949
22. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Мол. биол., **1**, 395, 1967
23. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР, **188**, 1384, 1969
24. Красновский А. А., Сапожникова И. М., Докл. АН СССР, **169**, 695, 1966
25. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **96**, 1201, 1951
26. Smith J. R. L., Calvin M., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 4500, 1966

Поступила в редакцию
25.V.1970

INVESTIGATION OF CHLOROPHYLL PHOTOOXIDATION IN AQUEOUS SOLUTIONS OF DETERGENT TRITON X-100

M. G. SHAPOSNIKOVA, N. N. DROZDOVA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Spectrophotometric method was employed to study kinetics of irreversible photooxidation of chlorophyll *a* by air oxygen in aqueous solution of Triton X-100 and in organic solvents. Investigation was made of dependence of reaction rate on detergent concentration, on the nature of solvents, pH of medium, partial pressure of oxygen and spectral pattern of the light. Also dependence was investigated between the rate of photooxidation and effect of chlorophyll fluorescence quenching by oxygen. Comparison was made of photochemical interaction of chlorophyll with oxygen in presence of donors and acceptors of electrons. It is shown that rate of photooxidation of chlorophyll in Triton considerably exceeds that of oxidation in organic solvents which might be accounted for by structural organization of pigment molecules in detergents micells. In Triton solutions, chlorophyll exists mainly in monomeric form.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 5 1971 Вып. 5

УДК 581.132

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЦИНК ПОРФИРИНОВ В МИКРООРГАНИЗМАХ И РАСТЕНИЯХ: ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ И ЗАМЕДЛЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

В. А. ШУВАЛОВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследована длительная люминесценция порфиринов и их цинковых комплексов в микроорганизмах и растениях, для чего была собрана фосфороскопическая установка с импульсным возбуждением послесвечения; установка позволила регистрировать спектры возбуждения и кинетику затухания послесвечения. Обнаружено послесвечение клеток дрожжей в красной области спектра при 20° со временем жизни $5 \cdot 10^{-3}$ *сек*. Послесвечение резко усиливается при инкубации клеток в фосфатном буфере с добавлением ионов цинка. Спектр возбуждения послесвечения совпадает со спектром поглощения цинк-порфирина, присутствующего в клетке. Свечение при 20° представляет собой замедленную флуоресценцию цинк-порфирина, а при —196° — его фосфоресценцию. Замедленная флуоресценция эффективно тушится кислородом (K_q составляет $0{,}3 \cdot 10^9$ *л·моль*$^{-1}$·*сек*$^{-1}$). Анаэробные условия вблизи излучающей молекулы создаются в результате дыхания клеток, при этом концентрация кислорода не превышает $5 \cdot 10^{-7}$ *М*. Клетки дрожжей, инкубированные в растворе сахарозы без ионов цинка, накапливают протопорфирин, который также обладает замедленной флуоресценцией. Длительная люминесценция металлопорфиринов обнаружена в клетках аэробных бактерий (*Azotobactor vinelandii* и *E. coli*), фотосинтезирующих бактерий (*R rubrum, Chl. ethylica* и др.), этиолированных листьев кукурузы, а также в митохондриях, выделенных из печени крысы.

Изучение послесвечения фотосинтезирующих организмов является эффективным методом исследования первичного акта фотосинтеза [1; 2]. Однако интерпретация отдельных компонентов свечения затруднена ввиду сложности фотохимических процессов, сопровождающихся излучением кванта света. В работах [3, 4] миллисекундный компонент послесвечения фотосинтезирующих организмов был интерпретирован как замедленная флуоресценция хлорофилла. Вместе с тем это предположение нельзя считать полностью доказанным, так как неясно, могут ли в интактных клетках существовать условия для замедленной флуоресценции: малая концентрация кислорода (10^{-6} *М*) и других тушителей триплетных состояний в локусе излучающей молекулы. Кроме того, нельзя полностью исключить что миллисекундный компонент послесвечения является обращением первичной фотохимической реакции. Наблюдение замедленной флуоресценции пигментов в клетке наиболее удобно тогда, когда фотофизический эффект возбуждения и интеркомбинационной конверсии в молекулах не усложнен фотохимическими реакциями. Это возможно в клетках, не имеющих специализированных фотохимических систем, но обладающих пигментами порфириновой природы.

Имеется ряд данных о наличии свободных порфиринов в клетках дрожжей [5], бактерий [6], этиолированных листьев [7] и т. д. Хотя данные о наличии металлопорфиринов, кроме гемина, в организмах противоречивы [7; 8], достаточно точно установлено, что в клетках ряда организмов имеется фермент, катализирующий образование цинкового

комплекса порфиринов — цинк-порфирин-хелатаза [9; 10]. Наличие даже следовых количеств цинк-порфирина в клетках может оказаться достаточным для обнаружения его люминесцентным методом, так как этот комплекс обладает интенсивной флуоресценцией, фосфоресценцией и замедленной флуоресценцией.

Задачей работы было исследование люминесцентных свойств порфиринов и их металлических комплексов в клетках различных организмов. С этой целью была собрана высокочувствительная установка для регистрации малых количеств (до $10^{-8} — 10^{-10}$ *М*) люминесцирующих комплексов порфиринов. Измерение спектров возбуждения люминесценции с большим разрешением позволяло идентифицировать люминесцирующее соединение.

МЕТОДИКА

Блок-схема установки для измерения кинетических и спектральных характеристик длительной люминесценции (с $\tau > 10^{-4}$ *сек*) представлена на рис. 1. В качестве возбуждающего света использовали лампу-вспышку ИСШ-100-3 с длительностью светового импульса 10^{-6} *сек* Свет лампы фокусировался на щель светосильного монохроматора (относительное отверстие 1 : 3, спектральная ширина щели 5 *нм*) Монохроматический свет поступал в окно фосфороскопа, состоящего из двух вращающихся на одной оси дисков, между которыми помещается объект. Расположение окон в дисках позволяет

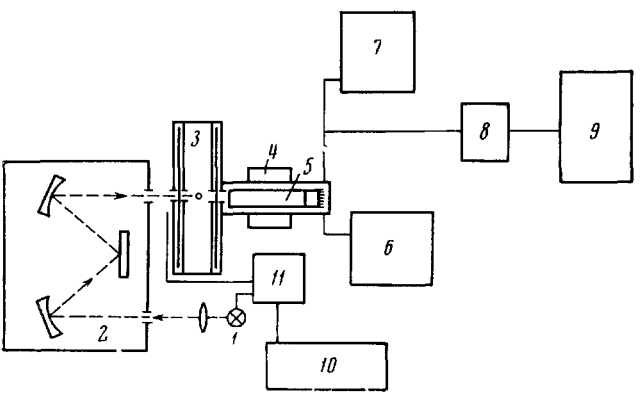


Рис 1 Блок-схема установки для измерения спектральных и кинетических характеристик послесвечения

1 — лампа вспышка ИСШ 100 3, *2* — диффракционный монохроматор, *3* — фосфороскоп, *4* — мотор на 3000 *об/мин*, *5* — ФЭУ-38, *6* — стабилизатор высоковольтного напряжения ВС 22, *7* — осциллограф С1-13 А *8* — усилитель УИ-2 *9* — самописец ЭПП 09, *10* — высоковольтный выпрямитель ИВН 1, *11* — система для поджига лампы-вспышки

попеременно освещать объект и измерять его послесвечение В диске, перекрывающем свет, имеется два узких окна (ширина 10 *мм* при диаметре диска 280 *мм*), которые на короткое время открывают внутреннюю полость для освещения объекта импульсом света В диске, открывающем фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), имеется два широких окна с углом раскрытия 160° Соотношение величин раскрытия окон в обоих дисках позволяет при скорости вращения дисков 3000 *об/мин* кратковременно ($2{,}6 \cdot 10^{-4}$ *сек*) открывать окно для прохождения импульса возбуждающего света и достаточно долго ($1{,}8 \cdot 10^{-2}$ *сек*) наблюдать затухание послесвечения

Поджиг лампы-вспышки с помощью скользящего контакта синхронизирован с открытием окна фосфороскопа Лампа вспышка работает в стробоскопическом режиме, при этом импульсы света поступают в фосфороскоп через каждые $2 \cdot 10^{-2}$ *сек* В результате этого установка позволяет наблюдать на экране осциллографа «стоячую» картину кривой затухания послесвечения или измерять стационарный уровень свечения при помощи усилителя постоянного тока (осциллограф С1-13А, усилитель УИ-2). Сигнал от усилителя подается на вход самописца (ЭПП-09), который регистрирует изменения стационарного уровня свечения во времени При измерении спектров возбуждения послесвечения осуществляется равномерный поворот реплики монохроматора (см выше), одновременно на ленте самописца записывается спектр возбуждения с отметками длин волн

Время, проходящее после центра светового импульса до полного открытия окна ФЭУ, составляет $6{,}7 \cdot 10^{-4}$ *сек* Это означает, что затухание свечения с таким временем жизни и больше (до $2 \cdot 10^{-2}$ *сек*) может быть зарегистрировано на экране осциллографа в виде непрерывной кривой. В установке использовали ФЭУ-38 с интегральной чувствительностью фотокатода 170 *мка/лм* Делитель ФЭУ питался от высоковольтного стабилизатора ВС-22 Напряжение (3 *кв*) для зарядки конденсаторов емкостью 0,05 *мкф*, питающих лампу-вспышку, подавалось с высоковольтного выпрямителя ИВН-1. Для эвакуации воздуха из кварцевой трубки Тунберга использовали диффузионный насос, дающий вакуум до $5 \cdot 10^{-5}$ *мм* рт ст Воздух из растворов пигментов откачивался при многократном замораживании При измерении фосфоресценции раствор или суспензия клеток замораживали в кварцевом сосуде Дьюара до —196°

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Послесвечение порфиринов. В соответствии с известными данными [11; 12] зарегистрирована фосфоресценция протопорфирина и его металлических комплексов при —196° в спиртовых растворах. Были измерены спектры возбуждения фосфоресценции, которые совпали со спектрами поглощения исследованных систем (рис. 2), а также времена жизни триплетных состояний. При комнатной температуре в освобожденных от воздуха растворах была зарегистрирована замедленная флуоресценция протопорфирина, цинк-протопорфирина, а также хлорофиллов *a* и *b*. Спектр возбуждения люминесценции в этом случае также совпал со спектром поглощения растворов. Спектр излучения замедленной флуоресценции цинк-протопорфирина, измеренный с помощью интерференционных светофильтров, в пределах ошибки эксперимента совпал со спектром флуоресценции этого пигмента. Спектр фосфоресценции расположен в более длинноволновой области спектра и имеет максимум около 700 *нм*. Время жизни фосфоресценции цинк-протопорфирина составило немногим больше $2 \cdot 10^{-2}$ *сек*, а время жизни замедленной флуоресценции $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *сек*. Максимальная чувствительность метода для цинк-протопорфирина составляет около 10^{-10} *М* по фосфоресценции и около 10^{-8} *М* — по замедленной флуоресценции в спиртовом растворе.

Послесвечение дрожжей. В опытах использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisia* и *Endomyces magnusii*, выращенные на модифицированной среде Ридера с добавлением источников витаминов или на сусло-агаре. Клетки дрожжей несколько раз отмывали 0,05 *М* фосфатным буфером (pH 6,8) на бидистиллированной воде. Для измерения клетки суспендировали в фосфатном буфере и помещали в фосфороскоп. Было найдено, что дрожжи, только что смытые с питательной среды, обладают слабым послесвечением в красной области спектра. Однако при инкубации клеток при 30° в течение 20 *час* в фосфатном буфере или в растворе сахарозы с добавлением микроэлементов послесвечение резко усиливалось. Послесвечение излучается самими клетками, так как многократное их отмывание фосфатным буфером не приводит к сколько-нибудь заметному уменьшению интенсивности послесвечения. В то же время в среде после удаления клеток послесвечение не регистрировалось.

Свечение дрожжей полностью подавлялось при аэрации суспензии кислородом. Характерно, что в функционирующих клетках свечение достаточно быстро восстанавливалось после прекращения аэрации (рис. 3). Время, исчисляемое от момента прекращения аэрации до восстановления свечения, может колебаться от нескольких секунд до нескольких минут в зависимости от интенсивности аэрации и от физиологического состояния клеток. Способность восстанавливать свечение после аэрации свойственна только интактным организмам и полностью отсутствует у клеток, прогретых при 55° в течение 5 *мин*. Дрожжи, инкубированные в течение 20 *час* при 30° в анаэробных условиях, имеют бо́льшее время восстановления (рис. 3). Ингибиторы дыхания, такие как KCN и антимицин А, увеличивают время восстановления свечения после аэрации, однако способность к восстановлению свечения сохраняется у клеток. Добавление

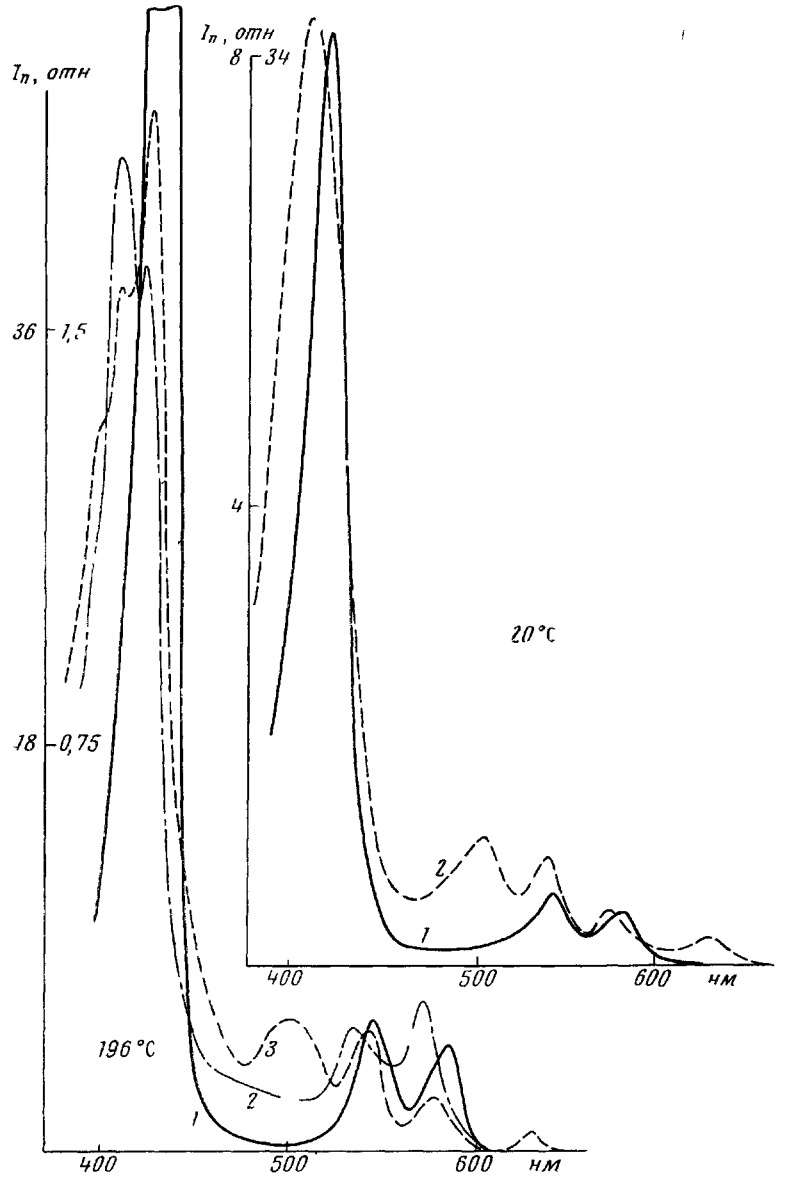


Рис. 2. Спектры возбуждения фосфоресценции и замедленной флуоресценции протопорфирина и его металлокомплексов

$\lambda_{изл} \geqslant 580$ *нм*, объем раствора 1 *мл*. —196° С: *1* — Zn-протопорфирин в спирте (10^{-10} *моль*, $\tau = 2 \cdot 10^{-2}$ *сек*); *2* — Cu-протопорфирин в спирте (10^{-10} *моль*, $\tau = 2 \cdot 10^{-4}$ *сек*); *3* — протопорфирин в спирте (10^{-8} *моль*, $\tau = 1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *сек*). 20° С: *1* —Zn-протопорфирин в спирте (10^{-10} *моль*, $\tau = 10^{-3}$ *сек*); *2* — протопорфирин на бумаге (10^{-8} *моль*, $\tau = 3{,}5 \cdot 10^{-3}$ *сек*). Цифры, соответствующие интенсивности послесвечения Zn-порфирина, расположены слева, остальные — справа

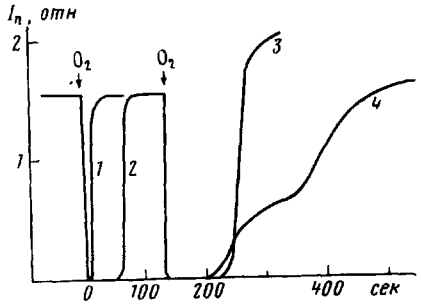


Рис. 3. Восстановление послесвечения дрожжей после прекращения аэрации

20°С, $\lambda_{возб} = 540$ *нм*, $\lambda_{изл} \geqslant 580$ *нм*
1 — исходная суспензия клеток; *2* — клетки, инкубированные в анаэробных условиях; *3* — то же, что *1*, +KCN; *4* — то же, что *1*, +антимицин А

антимицина А к клеткам приводит к изменению кривой восстановления, которая приобретает двухфазный характер (рис. 3). Откачка воздуха форвакуумным насосом полностью восстанавливает свечение как в случае термоинактивированных клеток, так и в присутствии ингибиторов дыхания.

На клетках, прогретых при 55° в течение 5 *мин*, была исследована зависимость интенсивности послесвечения от парциального давления кислорода при 20°. С этой целью из суспензии клеток в трубке Тунберга

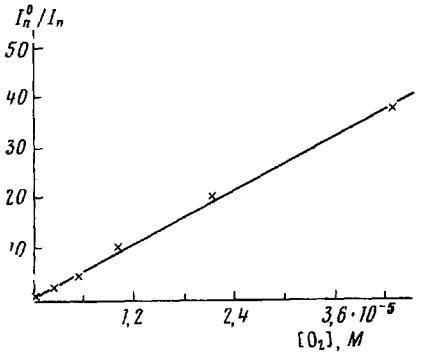


Рис. 4. Зависимость интенсивности послесвечения дрожжей, прогретых при 55° в течение 5 *мин*, от концентрации кислорода в среде

20°С; $\lambda_{изл}$ =540 *нм*; $\lambda_{изл} \geqslant$ 580 *нм* I_n^0 — интенсивность послесвечения вакуумированных клеток, I_n — то же после пуска определенного объема воздуха

откачивался воздух, который затем вводился в трубку порциями известного объема. При пуске воздуха свечение подавлялось, при этом время его жизни, составляющее в вакууме $5\cdot10^{-3}$ *сек*, уменьшалось пропорционально уменьшению интенсивности свечения. Отсюда следует, что механизм тушения свечения кислородом имеет диффузионный физический характер. Об этом также свидетельствует тот факт, что точки экспериментально полученной зависимости интенсивности послесвечения от концентрации кислорода в среде ложатся на прямую в координатах уравнения Штерна — Фольмера (рис. 4). Константа скорости тушения послесвечения кислородом составила $0{,}31\cdot10^9$ *л/моль·сек*, что близко к значению константы скорости диффузии.

Зависимость интенсивности послесвечения от интенсивности возбуждающего света имеет линейный характер и не насыщается даже при максимальных световых потоках, использованных в опыте.

Спектр возбуждения послесвечения дрожжей обладает характерными максимумами, один из которых, очень интенсивный, расположен в фиолетовой области спектра, а два других в видимой (рис. 5). Положение, соотношение и полуширина максимумов свидетельствуют о том, что послесвечение возникает при поглощении света металлопорфирином, присутствующим в клетке.

Для того чтобы выяснить, какой металл входит в комплекс с порфирином, клетки дрожжей инкубировали в течение 20 *час* при 30° в 0,05 *М* фосфатном буфере, который содержал катионы только одного типа (в концентрации 10^{-4} *М*): Mg^{2+}, Cd^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Sn^{2+}, Co^{2+} или Cu^{2+}. Обнаружено, что только наличие ионов цинка приводит к появлению интенсивного свечения с характерным трехполосным спектром. При этом в суспензии дрожжей, не содержащей специально добавленных ионов металла, интенсивность послесвечения была в несколько десятков раз меньше (табл. 1). Вакуумирование суспензии перед инкубацией с ионами цинка существенно не сказывалось на интенсивности послесвечения.

Из этих данных следует, что в клетках дрожжей, помещенных в фосфатный буфер, при наличии ионов цинка интенсивно синтезируется цинкпорфирин, который можно обнаружить по спектрам возбуждения послесвечения клеток при 20°.

Было найдено, что существует два типа трехполосных спектров, отличающихся положением максимумов (рис. 5). Первый тип, наблюдаемый при инкубации клеток в фосфатном буфере с ионами цинка, имеет

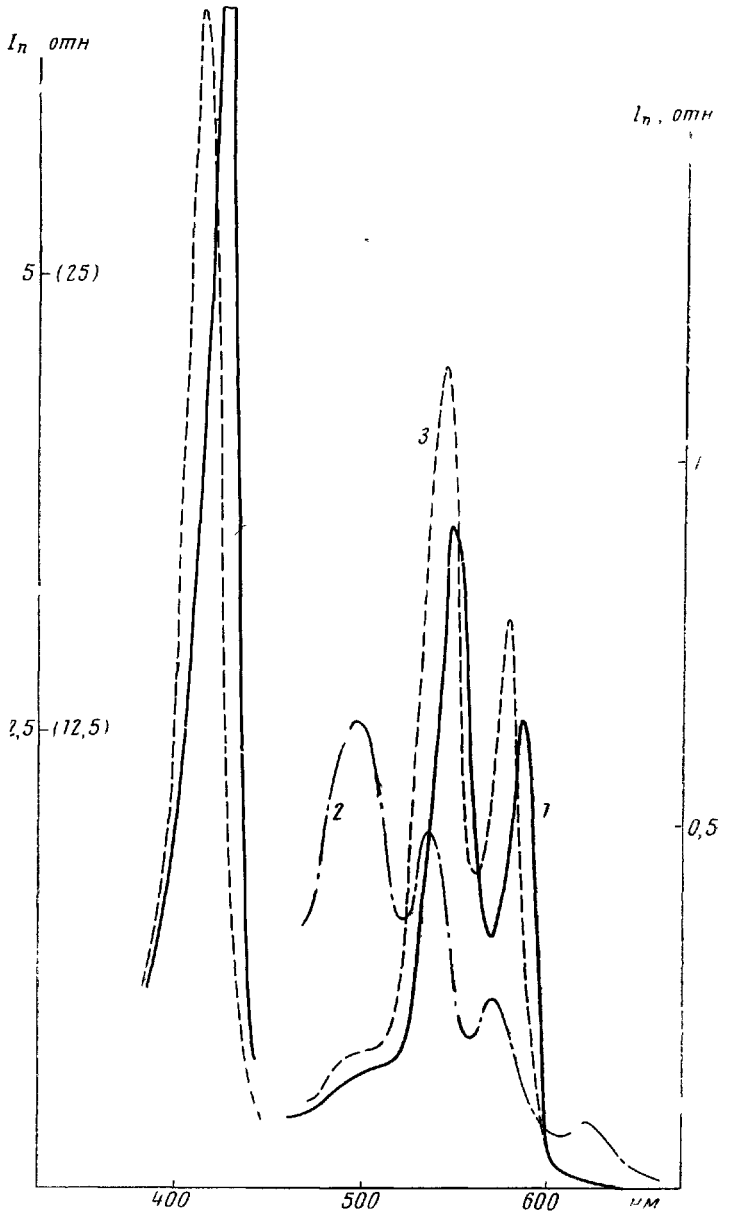


Рис. 5. Спектр возбуждения послесвечения дрожжей, инкубированных в течение 20 *час* при 30° в различных средах

20° С ; $\lambda_{изл} \geqslant 580$ *нм*. *1* — 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 6,8, $+10^{-4}$ *М* $ZnSO_4$; *2* — 0,06 *М* раствор сахарозы; *3* — то же 10^{-4} *М* $ZnSO_4$. Здесь и на рис 7 цифры в скобках — интенсивность послесвечения при возбуждении в полосе Соре. Для *1* и *3* шкала интенсивности послесвечения слева; для *2* — справа

следующие максимумы и их соотношение в относительных единицах: 418 *нм* (115), 544 *нм* (14,5), 586 *нм* (10,5). Этот тип спектра соответствует спектру возбуждения замедленной флуоресценции цинк-протопорфирина в спирте. Второй тип, наблюдаемый при инкубации клеток в

растворе сахарозы с ионами Zn^{2+}, имеет несколько другое положение максимумов: 410 *нм* (140), 542 *нм* (18) и 575 *нм* (12,5). В этом случае цинк входит, по-видимому, в комплекс с другим порфирином, отличающимся от протопорфирина расположением боковых заместителей.

При инкубации клеток в 0,2 *М* растворе сахарозы без ионов цинка спектр возбуждения послесвечения состоит из четырех полос в видимой области и одной полосы в фиолетовой области (рис. 5). Положение, соотношение и полуширина максимумов в спектре свидетельствуют о том, что послесвечение возбуждается при поглощении света протопорфирином. Интенсивность послесвечения в этом случае была на порядок ниже интенсивности послесвечения цинк-порфирина в клетках.

Таблица 1

Влияние ионов металлов на интенсивность послесвечения дрожжей, инкубированных в фосфатном буфере в течение 20 *час* при 30°

Средой для *Saccharomyces cerevisiae* служил 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 6,8

Соль, добавленная в среду, 10^{-4} *М*	Интенсивность послесвечения, отн. ед.
—	0,14
$ZnSO_4$	4,6
$MgSO_4$	0,26
$CdSO_4$	0,34
$SnSO_4$	0,14
$FeSO_4$	0,08
$CoSO_4$	0,06
$CuSO_4$	0,2

Было исследовано ингибирование образования цинк-порфирина ионами других металлов: Fe^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}. Оказалось, что сильно выраженным ингибирующим действием обладают ионы кобальта (табл. 2). Кобальт, добавленный до инкубации клеток, уменьшал интенсивность послесвечения цинк-порфирина в 10 раз, а при добавлении после инкубации — только в 1,2 раза. Возможно, что ингибирование сопровождается образованием Co-содержащих порфиринов (типа витамина B_{12}). Ионы Fe^{2+} ингибируют образование цинк-порфирина в 3—4 раза, что, по-видимому, связано с синтезом гемина [9].

Изучение зависимости накопления цинк-порфиринов (по интенсивности послесвечения) от концентрации ионов цинка в среде показало следующее. Небольшое послесвечение наблюдается в отсутствие добавленных извне ионов цинка. Накопление продукта происходит при концентрациях цинка в среде около $3 \cdot 10^{-6}$ *М* и далее линейно увеличивается до концентрации Zn^{2+} $3 \cdot 10^{-5}$ *М*. Дальнейшее увеличение концентрации ионов не приводит к увеличению количества цинк-порфирина. Тот факт, что зависимость имеет «лаг»-фазу, по-видимому, связан с наличием небольшого количества ионов цинка в клетках. Так как время жизни послесвечения цинк-порфирина в дрожжах при 20° ($5 \cdot 10^{-3}$ *сек*) превосходит значение τ для замедленной флуоресценции раствора цинк-порфирина ($1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *сек*), чувствительность метода определения цинк-порфирина в дрожжах не должна быть меньше, чем в случае раствора пигмента. Сравнение интенсивности послесвечения дрожжей с интенсивностью замедленной флуоресценции раствора цинк-порфирина, измеренной в тех же условиях (правомерность такого сравнения обусловлена идентичностью механизма излучения кванта света в обоих случаях, что будет об-

Таблица 2

Ингибирование синтеза цинк-порфирина ионами металлов в дрожжах *Saccharomyces cerevisia* инкубированных 20 *час* при 30°

Среда инкубации	Соль, добавленная в среду, 10^{-4} *М*	Интенсивность послесвечения, отн. ед
0,05 *М* фосфатный буфер, pH 6,8	—	0,14
Тот же буфер + 10^{-4} *М* $ZnSO_4$	—	5,1
То же	$CoSO_4$	0,4
» »	$FeSO_4$	1,85
» »	$MgSO_4$	5,2
» »	$CdSO_4$	5,3
» »	$CuSO_4$	4,9

суждаться ниже), показало, что максимальная концентрация цинк-порфирина в суспензии клеток составляет около $5 \cdot 10^{-7}$ *М*. Это соответствует (при концентрации клеток в суспензии $\sim 10^9$ *клеток/мл*) $\sim 10^4$ молекулам на 1 клетку. Отсюда следует, что только небольшая часть (2—3%) ионов цинка входит в комплекс с порфирином.

При максимальных концентрациях цинк-порфирина в клетках удалось измерить спектр флуоресценции металлопорфирина на регистрирую-

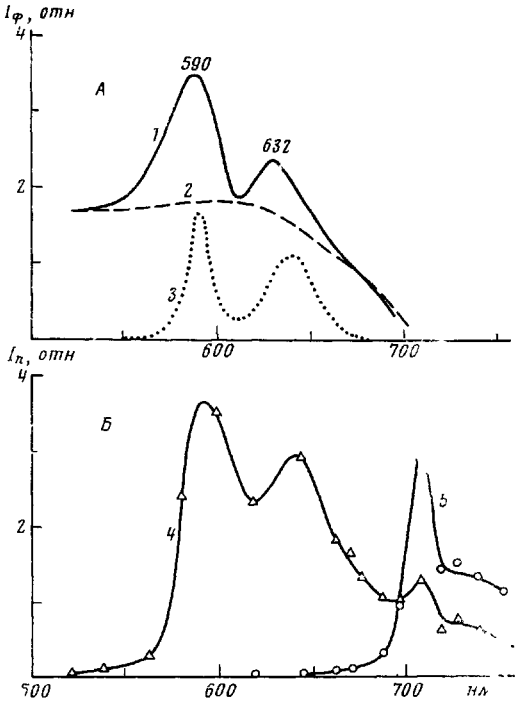


Рис. 6. Спектры флуоресценции (*А*) и послесвечения (*Б*)

1 — спектр флуоресценции дрожжей, инкубированных в фосфатном буфере, содержащем 10^{-4} *М* $ZnSO_4$; *2* — то же без цинка, *3* — спектр флуоресценции спиртового раствора цинк-протопорфирина (10^{-4} *М*), *4* — спектр послесвечения дрожжей, инкубированных в фосфатном буфере, содержащем 10^{-4} *М* $ZnSO_4$, спектр снят при 20°, *5* — то же, что и *4*, но спектр послесвечения снят при —196°

щем спектрофлуориметре. На фоне широкого максимума флуоресценции клеток в области от 350 до 660 *нм* можно отчетливо различить два узких максимума в области 590 и 632 *нм* (рис. 6, *1*). Положение и соотношение максимумов соответствует спектру флуоресценции цинк-протопорфирина в растворе (рис. 6, *3*). Различие в полуширине максимумов вызвано разной шириной щели монохроматора. Клетки, инкубированные в фосфатном буфере без цинка, не обладают флуоресценцией в этой области спектра (рис. 6, *2*).

Спектр излучения послесвечения клеток дрожжей, содержащих цинк-порфирин, представлен на рис. 6, *4*. Несмотря на то, что спектр был получен с помощью интерференционных светофильтров, удается выяснить количество максимумов и их положение с точностью ±10 *нм*. В спектре послесвечения присутствуют два интенсивных максимума при 600 и 640 *нм*. Из сопоставления кривых *1*, *3* и *4* на рис. 6 видно, что спектр послесвечения в пределах ошибки эксперимента совпадает со спектром флуоресценции цинк-порфиринов. Поскольку флуоресценция и послесвечение возникают при образовании цинк-порфирина в клетках, очевидно, что излучение послесвечения происходит с флуоресцентного уровня металлопорфирина.

Было обнаружено, что клетки, содержащие цинк-порфирин, обладают интенсивным послесвечением при замораживании до —196°. При этом время жизни свечения составляет $2 \cdot 10^{-2}$ *сек*, а спектр возбуждения соответствует спектру поглощения металлопорфирина. Поскольку клетки, не содержащие цинк-порфирина, не обладают послесвечением при —196° с аналогичным спектром возбуждения, очевидно, что фосфоресценция

связана с наличием цинк-порфирина в клетках. Спектр излучения послесвечения при —196° в отличие от спектра при 20° не совпадает со спектром флуоресценции цинк-порфирина, а имеет максимум в более длинноволновой области около 700 *нм* (рис. 6, *5*).

Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что клетки дрожжей при достаточном содержании ионов цинка в среде могут интенсивно накапливать цинк-порфирин, обнаруживаемый по спектрам возбуждения послесвечения и спектрам флуоресценции. Время жизни послесвечения, его спектры излучения при комнатной температуре и при —196°, а также сильно выраженное тушение послесвечения кислородом свидетельствуют о том, что послесвечение цинк-порфирина представляет собой замедленную флуоресценцию типа Е при комнатной температуре и фосфоресценцию при —196°. Другими словами, послесвечение отражает концентрацию триплетно-возбужденных молекул цинк-порфирина в клетках. В связи с тем, что послесвечение эффективно тушится кислородом, зная константу скорости тушения ($K_q = 0{,}3 \cdot 10^9$ *л·моль*$^{-1}$·*сек*$^{-1}$), время жизни послесвечения в отсутствие тушения ($\tau_0 = 5 \cdot 10^{-3}$ *сек*) и в опыте (τ), можно рассчитать концентрацию кислорода вблизи излучающей молекулы по следующему уравнению, аналогичному уравнению Штерна — Фольмера: $c = \frac{1}{K_q}\left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right)$.

Существенно, что дыхание клеток, чувствительное к нагреванию, KCN и антимицину А, создает пониженную концентрацию кислорода вблизи излучающей молекулы. Расчеты показывают, что эта концентрация меньше $5 \cdot 10^{-7}$ *М*. Интенсивную замедленную флуоресценцию металлопорфирина удалось зарегистрировать в клетках аэробных бактерий: *Azotobactor vinelandii* и *E. coli* (см. также [13]). Как и в случае дрожжей, клетки бактерий сами создают пониженную концентрацию кислорода после аэрации суспензии. В то же время в анаэробных бактериях *Clostridium sporogenes* и *Lactobacterium pentoaceticum* не наблюдалась замедленная флуоресценция металлопорфирина даже после инкубации клеток в присутствии ионов цинка и вакуумирования суспензии. Возможно, что образование цинк-порфирина в клетках связано с синтезом дыхательных ферментов, имеющих в качестве активной группы металлокомплексы порфиринов (цитохромы). При этом цинк-протопорфирин может являться промежуточным соединением в процессе синтеза гема [9]. Пространственная близость к дыхательной цепи может обусловливать пониженную концентрацию кислорода вблизи метаболитов синтеза и возможность наблюдать замедленную флуоресценцию цинк-порфирина.

Послесвечение фотосинтезирующих бактерий. Было изучено послесвечение клеток фотосинтезирующих бактерий следующих видов: *Rhodopseudomonas spheroides, Rhodopseudomonas palustris, Rhodospirillum rubrum, Chromatium minuttissinum, Chlorobium limicola, Chloropseudomonas ethylica.*

Бактерии были выращены по известным методикам (см. [14]) на кафедре микробиологии МГУ. Послесвечение как при 20°, так и при —196° измерялось в среде культивирования. Было найдено, что при физиологических условиях в клетках кроме послесвечения, связанного с функционированием фотосинтетического аппарата и возбуждаемого при поглощении света бактериальными аналогами хлорофилла [15; 16], имеется независимое послесвечение в красной области спектра. Послесвечение свойственно самим клеткам и отсутствует в среде после удаления клеток.

Спектр возбуждения послесвечения аналогичен спектру поглощения металлопорфирина. При —196° послесвечение значительно усиливается, что дает возможность с большей степенью точности измерить его спектр возбуждения (рис. 7). Было найдено, что спектр возбуждения одинаков для всех видов исследованных бактерий и близок к спектру возбуждения

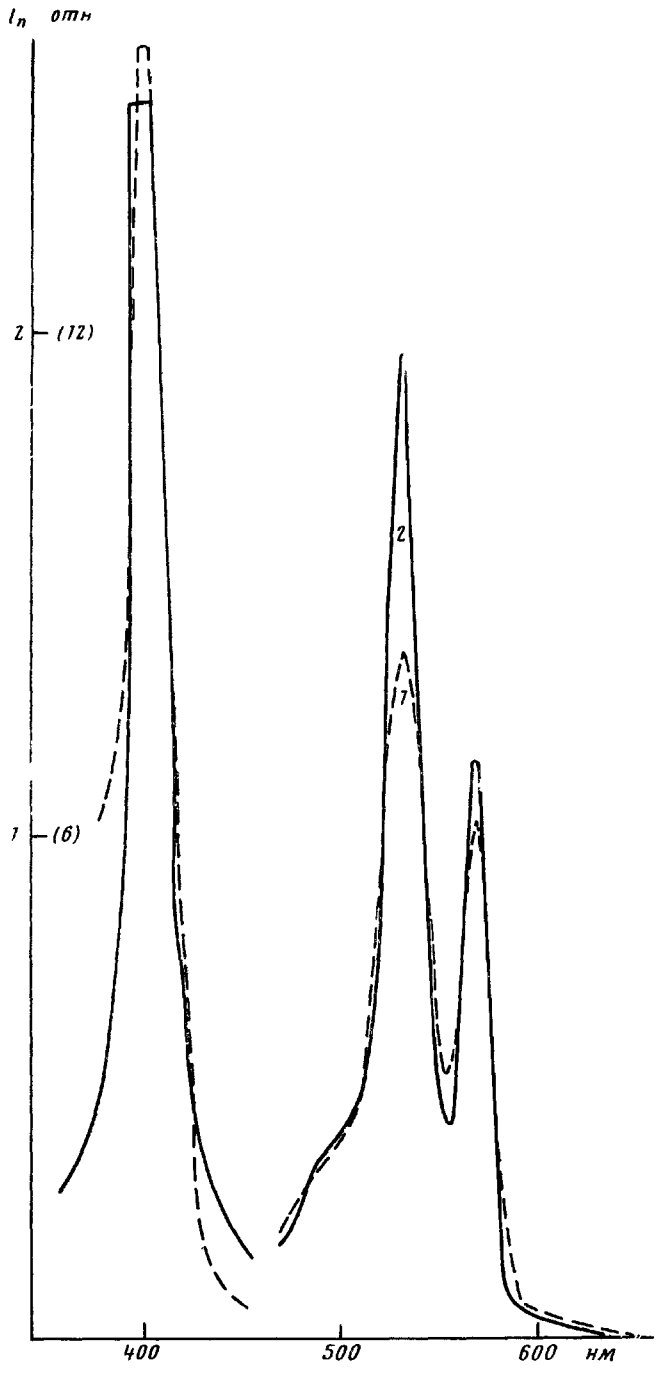


Рис. 7. Спектр возбуждения фосфоресценции этиолированных листьев кукурузы (*1*), инкубированных в 0,01 *М* растворе δ-аминолевулиновой кислоты, и фотосинтезирующих бактерий *Rhodopseudomonas palustris* (*2*) при $\lambda_{изл} \geqslant 690$ *нм*

послесвечения цинк-порфирина в дрожжах. Так же как и в случае дрожжей, время жизни послесвечения составляет при —196° $2 \cdot 10^{-2}$ *сек*, а спектр излучения имеет два максимума при 20° около 600 и 640 *нм*, а при —196° один максимум при 700 *нм*. Свечение клеток при 20° полностью подавляется аэрацией. В отличие от клеток дрожжей восстановление свечения происходит очень медленно (часы).

Таким образом, при выращивании фотосинтезирующих бактерий в них наблюдается накопление металлопорфирина, способного к замедленной флуоресценции и фосфоресценции. Сравнительное изучение спектральных и кинетических свойств послесвечения позволяет предполагать, что в фотосинтезирующих бактериях накапливается цинк-порфирин.

Послесвечение этиолированных листьев растений. В работе [17] было найдено, что этиолированные листья растений в отличие от зеленых растений практически не обладают послесвечением при комнатной температуре. Измерение послесвечения этиолированных листьев 8-дневных проростков кукурузы при —196° показало, что имеется слабая люминесценция, спектр возбуждения которой располагается в области от 350 до 560 *нм* и не имеет отчетливой структуры. Однако инкубация листьев, отрезанных от стебля, в растворе δ-аминолевулиновой кислоты в течение 24 *час* приводит к появлению интенсивной фосфоресценции при —196° со временем жизни $2 \cdot 10^{-2}$ *сек*. Измерение спектра возбуждения послесвечения, представленного на рис. 7, показало его близость к спектру возбуждения замедленной флуоресценции и фосфоресценции металлопорфирина в фотосинтезирующих бактериях и дрожжах.

Таким образом, в условиях повышенного синтеза порфиринов в присутствии δ-аминолевулиновой кислоты [7] в этиолированных листьях наблюдается накопление металлопорфирина, соответствующего по спектру и времени жизни фосфоресценции цинк-порфирину. Это соединение обладает сильной фосфоресценцией при —196°, однако замедленной флуоресценции при 20° не удается зарегистрировать, что, возможно, связано с большой концентрацией кислорода вблизи молекулы металлопорфирина

Существенно, что дыхание листьев не может обеспечить низкую концентрацию кислорода вблизи центра излучения. Это можно объяснить тем, что дыхание и накопление металлопорфирина происходит в разных органеллах клетки (митохондрии и пропластиды). Характерен в этом отношении тот факт, что зеленые листья, способные к дыханию и фотосинтезу, при помещении их в раствор δ-аминолевулиновой кислоты накапливают металлопорфирин, который фосфоресцирует при —196°, но не обладает послесвечением при 20°. По всей вероятности, накопление металлопорфирина в данном случае происходит в хлоропластах: отсюда следует, что металлопорфирин хлоропластов не защищен от кислорода, который эффективно тушит триплетно-возбужденные состояния.

Послесвечение митохондрий. Митохондрии, выделенные из печени крысы по методу [18], также обладали послесвечением в красной области спектра при 20°. Спектр возбуждения послесвечения соответствует поглощению металлопорфирина. Аэрация митохондрий приводит к подавлению свечения, которое восстанавливается после аэрации, однако значительно медленнее по сравнению с дрожжами и только в присутствии субстрата окисления (сукцината). Существенное влияние на восстановление свечения после аэрации оказывали KCN и антимицин А. При измерении послесвечения митохондрий при —196° в спектре возбуждения выявляются максимумы поглощения металлопорфирина.

Таким образом, в митохондриях также имеется определенное количество металлопорфирина, обладающего замедленной флуоресценцией и фосфоресценцией. Существенно, что эти органеллы клетки в изолированном виде могут, хотя и медленно, создавать пониженную концентрацию кислорода, необходимую для наблюдения замедленной флуоресценции металлопорфирина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод измерения спектров возбуждения послесвечения дает возможность обнаружить порфирины и их металлокомплексы, накапливающиеся в клетках аэробных микроорганизмов и растений.

Спектры возбуждения и излучения клеток дрожжей, время жизни послесвечения и отношение к кислороду позволили заключить, что послесвечение является замедленной флуоресценцией металлопорфирина при комнатной температуре и фосфоресценцией при —196°. Опыты по влиянию различных ионов металла на интенсивность послесвечения указывают на то, что в клетках дрожжей послесвечение определяется цинкпорфирином, в частности цинк-протопорфирином.

Спектральные исследования, проведенные на других аэробных микроорганизмах, а также на фотосинтезирующих бактериях, этиолированных листьях и митохондриях, показали, что в этих объектах наблюдается накопление металлопорфиринов, способных к замедленной флуоресценции и фосфоресценции. По-видимому, и в этих случаях послесвечение определяется цинк-порфирином.

Вопрос о функциональной роли цинк-порфирина до конца не ясен. Возможно, цинк-порфирин в фотосинтезирующих бактериях является промежуточным соединением в биологическом синтезе хлорофилла [9]. Этим можно объяснить высокую активность найденного в этих организмах фермента, катализирующего включение цинка в протопорфирин. Тот факт, что в предшествовавших работах не удалось выделить заметного количества цинк-порфирина, связан, по-видимому, с тем, что его концентрация в клетках очень мала и составляет, по нашим оценкам, не более 10^4 молекул на клетку.

Пониженная концентрация кислорода, являющегося эффективным тушителем послесвечения металлопорфиринов, создается в клетках, очевидно, путем метаболического восстановления кислорода и составляет в локусе излучения, согласно подсчетам, менее $5 \cdot 10^{-7}$ *М*. Способность понижать концентрацию кислорода свойственна только интактным клеткам эффективно дышащих микроорганизмов. В листьях растений, в которых также удается накопить металлопорфирин, не наблюдается замедленная флуоресценция этого пигмента при 20°. Этот факт может быть связан с наличием большой концентрации кислорода в локусе излучения или с наличием других тушителей триплетных состояний.

В свете этих данных возникает сомнение в возможности интерпретировать миллисекундный компонент послесвечения листьев растений и водорослей как замедленную флуоресценцию хлорофилла. Для принятия такого предположения необходимо постулировать особый механизм защиты триплетно-возбужденных молекул пигмента от действия кислорода, который интенсивно выделяется при фотосинтезе. Этот механизм должен удовлетворять по крайней мере двум условиям: излучающий центр должен быть пространственно отдален от места выделения кислорода и защищен окружающей средой от свободной диффузии кислорода.

Имеется ряд данных о фотобиологическом действии порфиринов в клетках микроорганизмов [5]. Возможно, что механизм этого действия связан с активностью триплетно-возбужденных молекул порфиринов и их цинковых комплексов в клетках организмов, не содержащих хлорофилл и специализированных фотохимических систем. Для проверки такого предположения может быть использован метод регистрации замедленной флуоресценции порфиринов и металлопорфиринов, отражающей концентрацию и скорость дезактивации триплетно-возбужденных молекул.

Пользуемся случаем выразить благодарность Е. Н. Кондратьевой за предоставление культур фотосинтезирующих бактерий, Н. С. Гельман, Н. П. Львову, Р. А. Звягильской, Е. Ф. Харатьян и О. А. Синегуб за помощь в выращивании микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Strehler B. L., Arnold W., J. Gen. Physiol. **34**, 809, 1951
2. Brugger J. E., Franck J., Acr. Biochem. and Biophys. **75**, 465, 1958
3. Литвин Ф. Ф., Шувалов В. А., Докл. АН СССР **181**, 733, 1968
4. Шувалов В. А., Литвин Ф. Ф., Мол. биол. **3**, 59, 1969
5. Guerin B., Jacques R., Biochim. et biophys. acta **153**, 138, 1968
6. Успенская В. Э., Докл. АН СССР **162**, 4, 1965
7. Granick S., Federat. Proc. **19**, 330, 1960
8. Gibson K. D., Neuberger A., Tait G. H., Biochem. J. **88**, 325, 1963
9. Neuberger A., Tait G. H., Biochem. J. **90**, 607, 1964
10. Little H. N., Kelsey M. I., Federat. Proc. **23**, 223, 1964
11. Calvin M., Dorought J., J. Amer Chem. Soc. **70**, 696, 1948
12. Allison J., Becker R. S., J. Chem. Phys. **32**, 1410, 1960
13. Петухов В. Г., Шувалов В. А., Шувалова И. А., Биофизика **15**, 438, 1970
14. Кондратьева Е. Н., Фотосинтезирующие бактерии, Изд-во АН СССР, М., 1963
15. Arnold W. A., Thompson J., J. Gen. Physiol. **39**, 311, 1956
16. Clayton R. K., J. Gen. Physiol. **48**, 633, 1965
17. Литвин Ф. Ф., Шувалов В. А., Биохимия **31**, 1264, 1966
18. Weinbach E. C., Analyt. Biochem. **2**, 335, 1961

Поступила в редакцию
16.VII 1970

THE LUMINESCENCE OF ZINC-PORPHYRINS IN MICROORGANISMS AND PLANTS: PHOSPHORESCENCE AND DELAYED FLUORESCENCE

V. A. SHUVALOV and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Academy of Science of the USSR, Moscow

Delayed luminescence of porphyrins and zinc-porphyrins was studied in microorganisms and plants. For this purpose a phosphoroscope was constructed with flash excitation of afterglow for measurement of action spectra and kinetics of delayed luminescence. The afterglow of yeast with $\tau = 5 \cdot 10^{-3}$ *sec* in red region was found. The luminescence was increased by incubation of yeast in phosphate buffer with addition of zinc ions. Action spectrum of afterglow is identical with zinc-porphyrin absorption spectra. The luminescence at 20° and —196° was identified as delayed fluorescence and phosphorescence of zinc-porphyrin. Delayed fluorescence is quenched by oxygen ($K_q = 0.3 \cdot 10^9$ $l \cdot mole^{-1} \cdot sec^{-1}$). Anaerobic conditions in the site of luminescent porphyrin are created by respiration of cell; in this case the concentration of oxygen is less than $5 \cdot 10^{-7}$ *M*. Yeast cells incubated in solution of sucrose without exogenous zinc accumulate protoporphyrin which is able to exhibit delayed fluorescence. Delayed luminescence of metal-porphyrins was found as well in the cells of aerobic bacteria *Azotobacter vinelandii* and *E. coli*, in photosynthetic bacteria (*R. rubrum* etc.), in etiolated leaves and isolated mitochondria of rat liver.

PREBIOTIC AND BIOCHEMICAL EVOLUTION
Ed.A.P.KIMBALL and J.ORO
North-Holland publ.Co 1971,p.209

THE EVOLUTION OF PHOTOCHEMICAL ELECTRON TRANSFER SYSTEMS

A. A. KRASNOVSKY
A.N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

Life is sustained on our planet by the photosynthetic energy conversion of light photons. The photosynthetic electron transfer underlies this process of energy conversion.

A comparative biochemical approach facilitates the study of photosynthesis in contemporary photoautotropic organisms among which are the anaerobic photosynthetic bacteria. All these organisms possess an elaborate electron transfer chain composed of pigment systems and biocatalysts arranged in lamellar structures.

Truly primitive photoautotropic organisms no longer exist, and the scientist must turn to other sources for information such as paleontology, and the study of models for abiotic molecular evolution. The use of photochemical studies makes it possible to develop theoretical stages of evolution in photochemical electron transfer. Photoreceptors that absorb and transform light energy are necessary components of any system under study. Such might be inorganic constituents in the earth's crust.

Inorganic photoreceptors. Some metal oxides possess photosensitizing activity among which are the titanium and zinc oxides which absorb in the near ultraviolet. We have shown that it is possible to create an inorganic model of the Hill reaction using these inorganic photoreceptors [1]. These oxides in the presence of near ultraviolet light cause the reduction of ferric ion and the evolution of oxygen from water (fig. 1).

$$2Fe^{+3} + H_2O \rightarrow 2Fe^{+2} + 2H^+ + \tfrac{1}{2}O_2.$$

Such evolution of oxygen has a quantum yield near 1%. No organisms now extant use pure inorganic photoreceptors. For this reason, we have turned to the study of abiogenic organic photosensitizers.

Abiogenic synthesis of pigments. Some information exists on the formation of pigments in model systems of a primitive reducing atmosphere; porphyrins were found in Ponnamperuma's laboratory [2]. Some years ago we studied the conditions of the Rothemund synthesis of porphin in a mixture of formaldehyde and pyrrole using fluorescence spectral measurements as a sensitive method of detection [3], (fig. 2). In the absence of oxygen, the

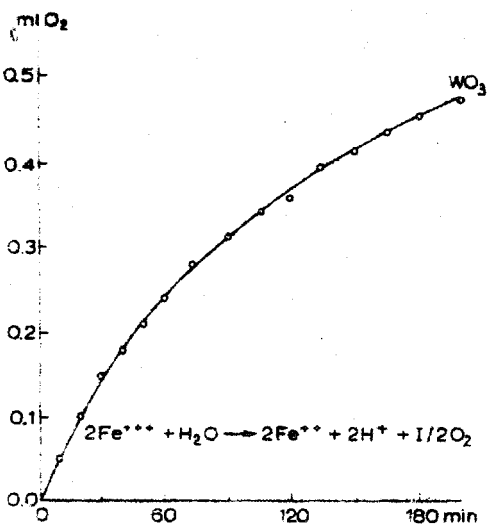


Fig. 1. WO_3 sensitized oxygen evolution. 10 ml H_2O, 0.2 g WO_3, 0.05 $FeNH_4(SO_4)_2$, light intensity (365–436 nm) 2×10^5 erg/cm^2·sec.

reaction proceeds slowly and, in addition to porphin, more reduced pigments are produced – chlorin and probably bacteriochlorin. In air, porphin formation proceeds more rapidly (table 1). In the presence of silica with alumina or titanium dioxide, the porphin fluorescence occurs very quickly. The zinc complexes of porphin are probably formed in the presence of zinc oxide. The red fluorescence sometimes appears if the reaction mixtures are allowed to stand at room temperature.

Porphin isolated from the reaction mixture is an active photosensitizer. We showed that porphin catalyzed the reduction of methyl red by ferrous ion (fig. 3). Ferrous ions were probably abundant as electron donors in the primitive ocean. However, no free porphyrins or inorganic pigments are used as photosensitizers in contemporary organisms possibly because the magnesium porphyrins were the more efficient. The possible explanation of this choice in molecular evolution may be presented in the following deduction [4]. The most abundant metals in the earth's crust are: Si, Al, Fe, Ca, K, Na, Mg, and Ti. There are no silicon, aluminum, or titanium porphyrin complexes in present day organisms probably because of their limited solubilities. The calcium, potassium, and sodium complexes of porphyrins are too easily hydrolyzed in water. Therefore, the iron and magnesium complexes may have been selected out in evolution. Also the magnesium atom in the

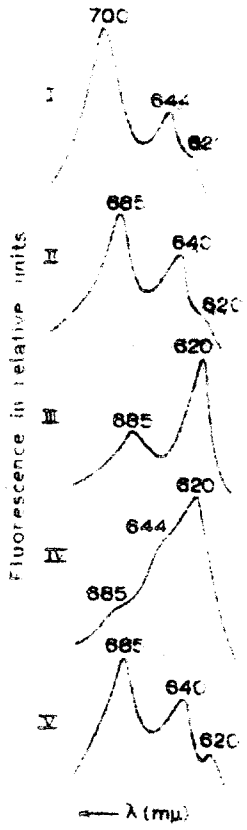


Fig. 2. Fluorescence spectra of porphyrins formed in the mixture of pyrrole and formaldehyde. I: in methanol, vacuo; II: in methanol, aerobic; III: 50% aqueous methanol, O_2; IV: as III + ZnO; V: methanol, SiO_2, O_2.

TABLE I

The porphyrin formation in the mixture of pyrrole and formaldehyde in 50% aqueous methanol

Condition of experiment	Appearance of red fluorescence (min)
$-O_2$	200
$+O_2$	30
$+O_2 + SiO_2$	15

middle of the porphyrin ring has ligand bonds directed above and below the plane of the ring giving additional bonding capabilities. Iron complexes are non-fluorescent and photochemically inactive, but are able to catalyze electron transfers with an increase in negative free energy in the reactions

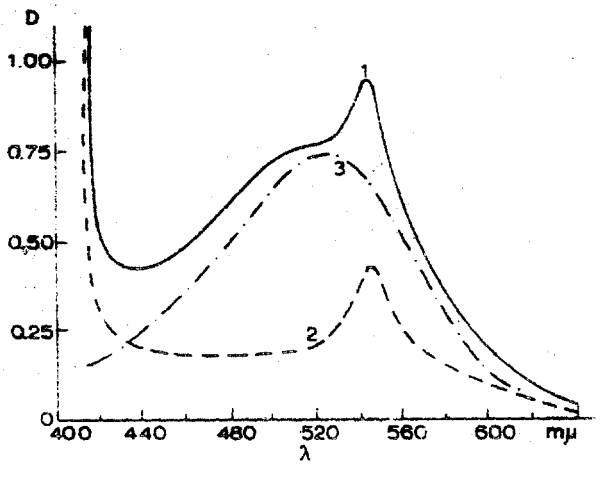


Fig. 3. Porphin photosensitized methyl red reduction by ferrous ions in acid water solution. (1) initial absorption spectra; (2) after illumination; (3) difference spectra 1 and 2 corresponds to methyl red absorption.

Conversely, the magnesium complexes are catalytically inactive, fluorescent and active photochemically. The photosensitizing activity of the magnesium pigments underlines the role of these excited molecules in cyclic oxidation-reduction systems, with their ability to give up electrons.

The primitive organisms probably had both catalytic and photochemical modes of substrate activation. However, where chemically activated substrates of abiogenic origin were abundant, probably there was no need for the latter. Therefore, primitive organisms were probably heterotrophic in accordance with Oparin's hypothesis. The iron complexes were likely used as catalysts along with the flavin and pyridine nucleotides.

The exhaustion of active substrates led inevitably to the use of photochemistry, and the magnesium complexes were incorporated into the primitive catalytic chain. There would have arisen a new type of system – a coupling of photosensitive pigments with iron porphyrin biocatalysts. Such systems are widely distributed in contemporary photoautotrophic organisms. We have prepared models of this primitive system using chlorophyll or its analogs as the photosensitizer and cytochromes, flavins or pyridine nucleotides as catalysts. When chlorophyll was introduced into deoxygenated water solutions of cytochrome *c*, and the system was illuminated with red light, we observed the photosensitized reduction of the cytochrome. Conversely, the reduced cytochrome underwent photosensitized oxidation in the presence of oxygen [5], (see figs. 4, 5, 6). Also, pyridine nucleotides, ribo

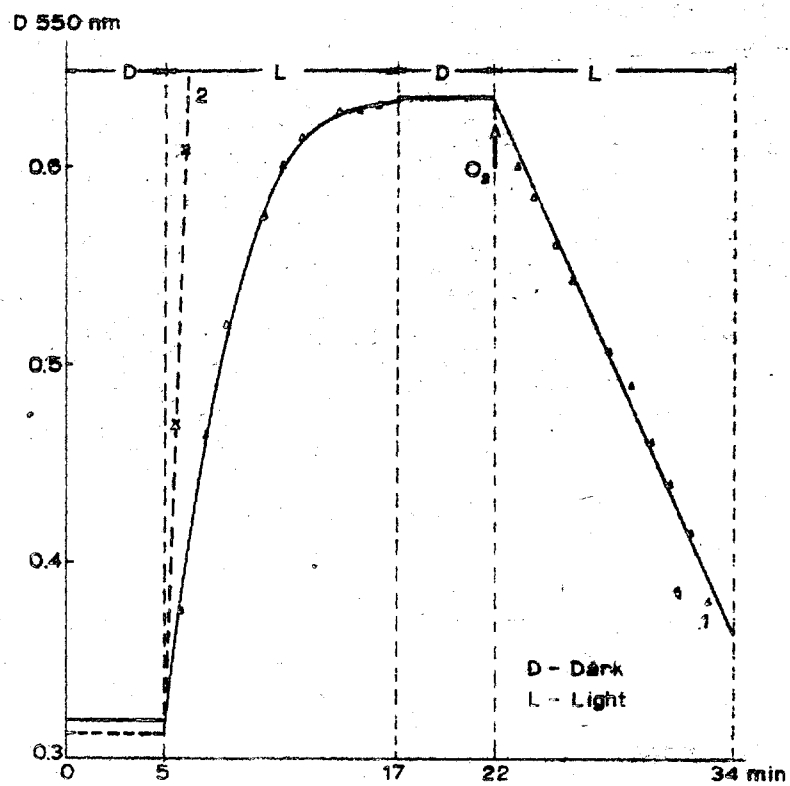


Fig. 4. Kinetics of hematoporphyrin photosensitized oxidoreduction of cytochrome *c* in 1% aqueous solution of triton X-100 (1), (2) in 50% glycerol.

flavin, and safranin in the presence of ascorbic acid undergo photosensitized reduction by chlorophyll under anaerobic conditions. The reduced pyridine nucleotides are oxidized under aerobic conditions by chlorophyll in the presence of red light.

In summary: In reducing media, chlorophyll and analogs bring about the photosensitized reduction of various electron acceptors, and in oxidizing media, the oxidation of electron donors (review [6]). From these coupled models (pigment-biocatalyst), it is possible to reconstruct different types of electron-transfer chains. The orientation of the pigments in the primitive lipoprotein membrane required an improvement of pigment structure and the lipophylic phytol or farnesol tail gradually became a moiety of the pigment molecule. In the course of evolution, pigment biosynthesis was greatly improved to make better use of the solar energy since a large quantity of

pigment had to be present. The accumulation of pigment in membranes led to the phenomena of pigment aggregation. The photosynthetic pigments exist in highly aggregated quasi-crystalline forms in contemporary photoautotrophs. The phenomenon of light energy migration to pigments directly involved in electron transfer systems was improved.

The evolution of effective photosynthetic organisms was preceded by this

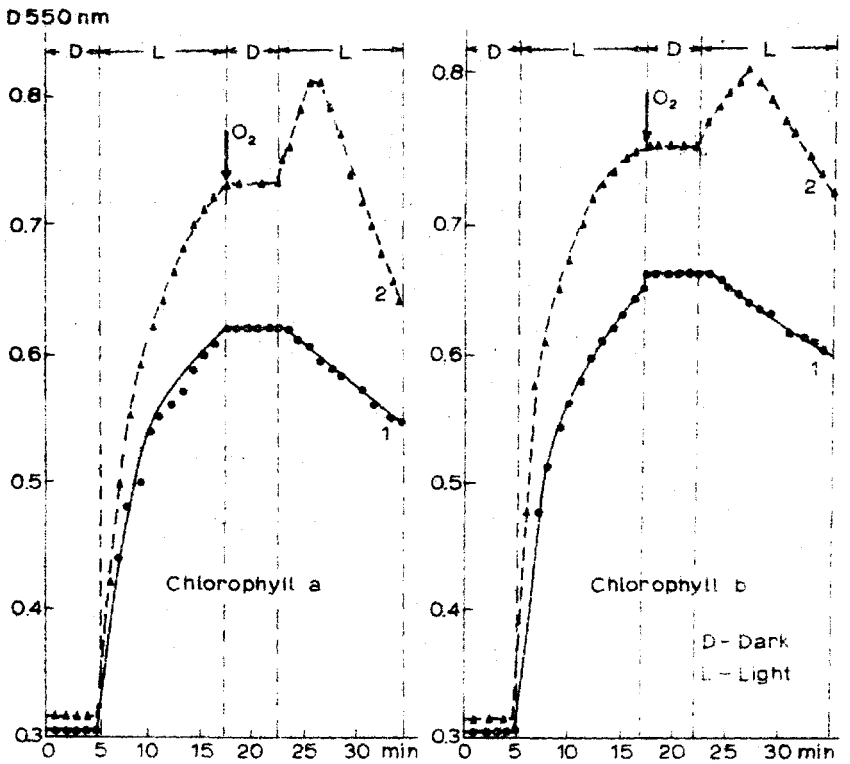


Fig. 5. Kinetics of chlorophyll photosensitized oxidoreduction of cytochrome *c* in 1% aqueous solution of triton X-100.

sequence of proper combinations. We proposed in 1957 [4] the gradual evolution from "one quantum" to "two quantum" types of electron transfer. We can propose the following electron transfer chains under anaerobic conditions: one quantum noncyclic transfer from electron donors, i.e., H_2S organic substances, to an electron acceptor with the formation of active substances such as reduced NADP or ferredoxin; one quantum cyclic electron

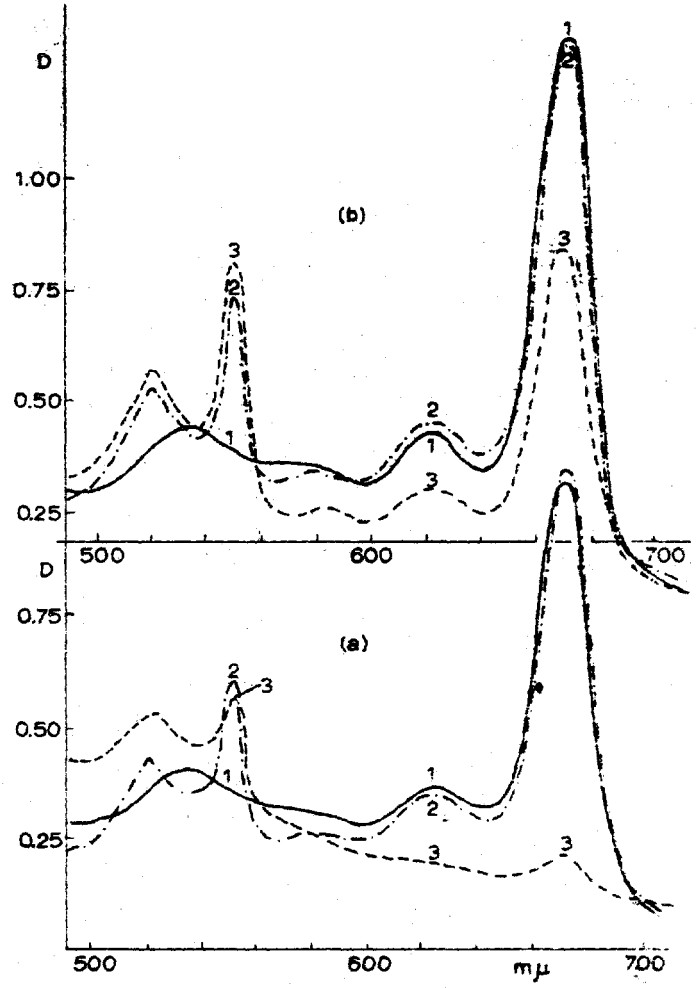


Fig. 6. Absorption spectra changes during chlorophyll sensitized oxidoreduction of cytochrome *c*. (1) initial spectrum; (2) after illumination in vacuo; (3) after illumination in air.

transfer which led to the formation of ATP from ADP and inorganic phosphate. Combinations of these types probably take place in various photosynthetic bacteria.

The use of water as the ultimate electron donor required a more elaborate system of electron transfer where two photocatalytic systems were involved in electron transfer such as the present I and II photosystems.

References

[1] A. A. Krasnovsky and G. P. Brin, Dokl. Acad. Nauk USSR *168* (1966) 1100; *147* (1962) 655.
[2] G. W. Hodgson and C. Ponnamperuma, Proc. Natl. Acad. Sci. *59* (1968) 22.
[3] A. A. Krasnovsky, and A. V. Umrikhina, Dokl. Acad. Nauk USSR *155* (1964) 691.
[4] A. A. Krasnovsky, in The origin of life on the earth (Pergamon Press, 1959), p. 606.
[5] A. A. Krasnovsky and K. K. Voinovskaia, Biophysica *1* (1956) 120.
[6] A. A. Krasnovsky, Ann. Rev. Plant Physiol. *11* (1960) 363.

Доклады Академии наук СССР
1972. Том 204, № 5

УДК 541.144.8

БИОХИМИЯ

Г. П. БРИН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА ГИДРАЗИНОМ; ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОМ И ХЛОРОПЛАСТАМИ

Реакции сенсибилизированного хлорофиллом восстановления виологенов могут служить простыми моделями I фотосистемы фотосинтеза; окислительно-восстановительные потенциалы метилвиологена и ферредоксина близки ($E_0' = -0{,}44$ в). Мы исследовали реакции восстановления метилвиологена в органических растворителях ([1–3]) и в водных растворах детергентов ([4, 5]). Брюн и Сан-Пьетро ([6]) исследовали восстановление виологенов, фотосенсибилизированное хлорофиллином а в водном растворе. Мы наблюдали весьма эффективное восстановление метилвиологена в спиртовом растворе хлорофилла в присутствии фенилгидразина ([1]). Вернон и Шоу ([7]) показали, что хлоропласты в 0,8 *М* трис-буфере (pH 8) теряют способность к выделению кислорода, но могут восстанавливать феррицианид или 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИ) в присутствии ряда доноров электрона, в том числе производных гидразина (бензидин, семикарбазид), которые являются донорами электрона для II фотосистемы. Хис ([8]) описал использование гидразина как донора электрона II фотосистемы при восстановлении ДХФИ и НАДФ.

В настоящей работе исследовалась реакция фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена с использованием солянокислого гидразина (нейтрализованного водным раствором NaOH до нужной величины pH) в качестве донора электрона. Мы сравнивали активность растворов хлорофилла и суспензии хлоропластов, предварительно консервированной в жидком азоте.

Растворы хлорофилла изучались в системе органический растворитель — вода при постепенном переходе от мономерных к агрегированным формам пигментов по мере увеличения количества воды в системе. В суспензию хлоропластов вводили возрастающее количество тех же органических растворителей до полного извлечения хлорофилла в раствор, т. е. при постепенном нарушении структуры хлоропластов и переходе от нативных агрегированных форм хлорофилла к мономерным формам. Эта процедура позволила выявить влияние степени нарушения структуры хлоропласта на реакцию; подобное исследование реакции Хилла при постепенном нарушении хлоропластов было описано нами ранее ([9, 10]).

Хлоропласты были выделены из проростков гороха и хранились в жидком азоте ([11]). Хлорофилл a + b получен обычным методом из листьев крапивы. Опыты вели в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений. В трубку помещали раствор пигмента или суспензию хлоропластов, в головку трубки — раствор метилвиологена и солянокислого гидразина при заданном pH. После удаления воздуха вакуумным насосом раствор из головки приливали в трубку. Освещение производилось лампой накаливания через конденсор и красный светофильтр КС-10 (интенсивность света 10^5 эрг/см^2·сек). О восстановлении метилвиологена судили по увеличению оптической плотности при 600 мμ.

Система хлоропласты — гидразин — метилвиологен. При освещении красным светом суспензия хлоропластов сенсибилизирует восстановление метилвиологена в присутствии гидразина. Реакция обна-

руживает характерную зависимость от pH (рис. 1*А*), максимум активности достигается при pH 8,5, в более кислых и более щелочных pH активность быстро падает. В контрольном опыте без гидразина восстановление метилвиологена в этих условиях было незначительным: за 10 мин. освещения ΔD при 600 мμ обычно не превышало 0,03. Описанное ранее восстановление виологенов хлоропластами ([12]) требует присутствия каталазы и этанола для удаления кислорода из системы.

Была измерена зависимость скорости восстановления метилвиологена от времени освещения. При величине pH 8,5 и интенсивности света

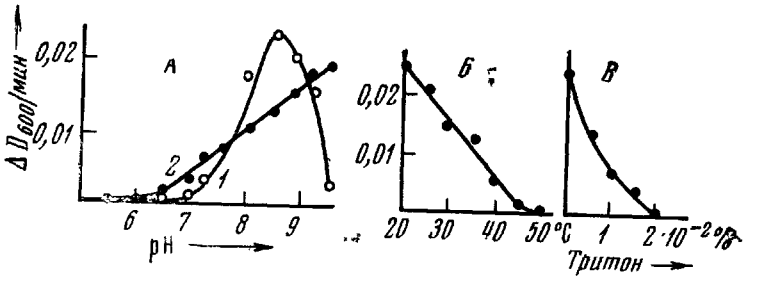


Рис. 1. Зависимость восстановления метилвиологена от pH (*А*), от предварительного нагревания хлоропластов (*Б*) и от концентрации тритона X-100 (*В*). В *А* реакция сенсибилизирована: *1* — хлоропластами (с эквивалентным содержанием $4 \cdot 10^{-2}$ мг хлорофилла в 1 мл) и *2* — хлорофиллом ($2 \cdot 10^{-2}$ мг в 1 мл). Условия опытов: в 5 мл раствора 10^{-4} *М* метилвиологена и $5 \cdot 10^{-4}$ *М* гидразина; интенсивность света $4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек

10^5 эрг/см^2·сек через 4—6 мин. восстановление виологена прекращается. Зависимость скорости восстановления метилвиологена от интенсивности света показало насыщение при $4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. Насыщающая концентрация гидразина $5 \cdot 10^{-2}$ мол/л (при pH 8,5 и интенсивности света $4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек). Наибольшая интенсивность восстановления достигается при концентрации 10^{-4} мол/л метилвиологена.

Исследование предварительного нагревания хлоропластов на скорость восстановления метилвиологена в присутствии гидразина показано на рис. 1*Б*. Наблюдаются те же закономерности, что и при инактивации реакции Хилла. Эти данные согласуются с данными, приведенными в работе Вернона и Шоу ([7]).

Ингибитор активности II фотосистемы 3,4-дихлорфенил-1,1-диметилмочевина (диурон) при концентрации 10^{-5} мол/л ингибирует реакцию Хилла и подавляет активность хлоропластов к восстановлению метилвиологена. При введении тритона X-100 ингибирование реакции Хилла и восстановления метилвиологена наблюдается при тех же концентрациях детергента (рис. 1*В*).

При постепенном введении органических растворителей в водную суспензию хлоропластов наблюдается нарушение естественного состояния хлорофилла — смещение максимума поглощения и флуоресценции в коротковолновую область спектра и подавление реакции Хилла ([9], [10]). Аналогичные закономерности наблюдались и при реакции восстановления метилвиологена; так, при введении 10% этилового спирта в суспензию хлоропластов наблюдается некоторая активация восстановления метилвиологена (подобное явление наблюдалось в случае реакции Хилла). Дальнейшее увеличение концентрации этанола (рис. 2*А*) ведет к резкому снижению активности, и при 30—50% этанола восстановление метилвиологена практически прекращается. После достижения 60% растворителя в суспензии хлоропластов, т. е. после извлечения хлорофилла

в раствор, наблюдается активное фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена.

При введении метанола также наблюдается активация реакции при 10% растворителя, полное падение активности при 50% и резкое возрастание активности после достижения 60% метанола, т. е. при концентрации, соответствующей извлечению хлорофилла в раствор.

В случае диметилсульфоксида (ДМС) максимум активности наблюдается также при 10% растворителя, падение активности при 20—50% и извлечение хлорофилла в раствор с быстрым увеличением активности после достижения 60% растворителя (рис. 2*А*).

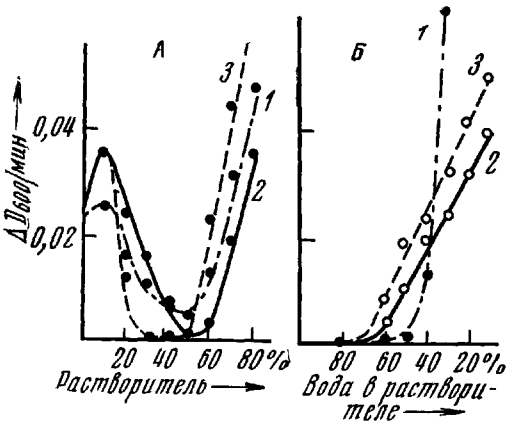


Рис. 2 Зависимость фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена (10^{-4} *М*) в присутствии солянокислого гидразина ($5 \cdot 10^{-2}$ *М*) от концентрации растворителей в суспензии хлоропластов (*А*) и от количества воды в растворе хлорофилла (*Б*). Растворители: *1* — ДМС, *2* — метанол, *3* — этанол

Система хлорофилл — гидразин — метилвиологен. Сенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена идет активно в спиртах и диметилсульфоксиде. Характер зависимости от величины pH отличается по сравнению с хлоропластами, где максимум лежит при pH 8,5; в растворе активность падает в кислых средах и растет в щелочных (рис. 1*А*). Зависимость скорости восстановления метилвиологена от концентрации хлорофилла в растворе, количества гидразина и концентрации метилвиологена близка к тем же закономерностям, что и в случае суспензии хлоропластов.

При увеличении количества воды в органическом растворителе снижается активность хлорофилла. Так, добавление 65—70% воды к раствору хлорофилла в метаноле и этаноле приводит к практически полной потере активности (рис. 2*Б*). Введение воды в раствор хлорофилла в ДМС резко снижает скорость реакции, и при 50% воды метилвиологен практически не восстанавливается. Таким образом, коллоидные агрегированные формы хлорофилла, образующиеся в системе вода — растворитель, не обладают измеримой активностью в изученной реакции.

В растворах активен «мономерный» растворенный хлорофилл; агрегация пигмента, происходящая при введении избытка воды в растворитель, приводит к постепенной инактивации системы. Возбужденный хлорофилл действует, перенося электрон от гидразина к виологену, что является частным случаем многочисленных окислительно-восстановительных реакций, фотосенсибилизированных хлорофиллом в растворах; особенность изученной реакции заключается в том, что она идет в восстановительных условиях, близких к потенциалу водородного электрода.

Сложнее обстоит дело при интерпретации механизма восстановления виологена в суспензии хлоропластов. Интактные хлоропласты обычно менее активны, чем растворы хлорофилла с той же концентрацией. Они активируются на 20—30% при введении 10% органического растворителя и инактивируются при 30—50% растворителя; далее происходит извлечение хлорофилла в раствор, где реакция идет так же, как в «мономер-

ных» растворах хлорофилла. Возможное объяснение активирующего действия малых количеств растворителя состоит в разобщении фотофосфорилирования, что было показано при действии малых концентраций детергентов на хлоропласты ([13]). Инактивация хлоропластов при 30—50% растворителя, т. е. в той области концентраций, где обычно инактивируется реакция Хилла, указывает на то, что это явление может быть связано с инактивацией организованной системы переноса электрона в хлоропластах.

Характер зависимости от pH резко отличает работу хлоропластов от работы растворенного хлорофилла; использованные ингибиторы кислородвыделяющей системы полностью инактивируют реакцию восстановления метилвиологена хлоропластами; температурная инактивация реакции соответствует инактивации реакции Хилла.

Как известно, фотосинтетический перенос электрона от воды к НАДФ осуществляется в системе двух фотохимических реакций. Нагревание, обработка растворителями, детергентами и трис-буфером при высокой концентрации нарушает звено цепи переноса электрона, ответственное за выделение кислорода. Метилвиологен является акцептором электрона, по потенциалу близким к ферредоксину, и может входить в цепь переноса электрона фотосистемы I. Однако то, что восстановление метилвиологена хлоропластами ингибируют нагревание, растворители, детергенты и диурон, указывает на участие фотосистемы II в этих реакциях. Поэтому в согласии с работами ([7, 8]) наиболее вероятно, что гидразин входит в систему переноса электрона вместо воды, в качестве электронодонорного компонента фотосистемы II.

Итак, описанные опыты показывают, что гидразин может служить донором электрона для фотовосстановления метилвиологена при использовании в качестве сенсибилизатора растворенного хлорофилла и суспензии хлоропластов.

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

Поступило
7 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 163, 761 (1965). [2] Г. П. Брин, Сборн. Механизм дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, 1967, стр. 302. [3] Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский, ДАН, 174, 221 (1967). [4] А. А. Красновский, А. Н. Луганская, ДАН, 183, 1441 (1968). [5] А. Н. Луганская, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 4, 848 (1970). [6] D. Brune, A. San-Pietro, Arch. Biochem. and Biophys., 141, 371 (1970). [7] L. P. Vernon, E. R. Shaw, Plant Physiol., 44, 1645 (1969). [8] R. L. Heath, Biochim. et biophys. acta, 245, 160 (1971). [9] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 179, 726 (1968). [10] Г. П. Брин, А. А. Красновский, Л. Ф. Комарова, ДАН, 197, 222 (1971). [11] Р. М. Бекина, А. А. Красновский, Биохимия, 33, 178 (1968). [12] B. Kok, H. Rurainski, O. Owens, Biochim. et biophys. acta, 109, 347 (1965). [13] L. P. Vernon, E. R. Shaw, Plant Physiol., 40, 1269 (1965).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 6 1972 Вып. 1

УДК 581.132

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГРЕГАЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ

М. И. БЫСТРОВА, Ф. ЛАНГ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Найдены условия моделирования в твердых пленках протохлорофилла и 4-винилпротохлорофилла агрегированных форм, обладающих основными максимумами поглощения при 635, 650 и 675—680 *нм*. Спектры поглощения определенного типа пленок пигментов идентичны спектрам интактных этиолированных листьев. Формы «650» и «675—680» термолабильны, форме «635» свойственна термостойкость Все образцы пленок при 20° обладают заметной люминесценцией в области 630—780 *нм* В спектрах люминесценции (при регистрации в вакууме) наряду с максимумами около 710 и 755 *нм* проявляется коротковолновый компонент (~640, ~655 или ~685 *нм*), соответствующий флуоресценции основной поглощающей формы Максимум флуоресценции при 655 *нм*, принадлежащий форме «650», быстро падает под действием света при одновременном возрастании длинноволновой люминесценции с максимумом около 710 *нм* При —196° интенсивность длинноволновой люминесценции увеличивается в несколько раз

Протохлорофилловые пигменты, превращающиеся в хлорофилл (хлорофиллид) при освещении, у большинства высших растений представлены в виде чрезвычайно фотоактивной формы с максимумом поглощения ~650 *нм* и соответствующим максимумом флуоресценции 655 *нм* [1—5 и др.]. Этой форме в интактных этиолированных листьях всегда сопутствует более устойчивая форма, поглощающая около 635 *нм*, которая у некоторых видов фотосинтезирующих организмов является активной в процессе образования хлорофилла (хлорофиллида) [6—9]. Кроме форм «650» и «635» в этиолированных листьях находится малое количество фотохимически неактивной формы, поглощающеи при 628 *нм* и слабо флуоресцирующей ~630 *нм* при —196° [1; 5; 9].

Форма «650» представляет собой протохлорофиллид, форма «635» является смесью неэтерифицированного и этерифицированного фитолом пигментов [3; 6; 8—11]. Обе формы локализованы в пропластидных мембранах (проламеллярных телах), являясь составной частью протохлорофиллид-белкового комплекса («протохлорофилл-голохрома») [5; 12, 13]. Воздействия, вызывающие денатурацию белкового компонента комплекса и нарушающие нативность структуры, приводят к исчезновению формы «650», одновременному возрастанию количества коротковолновой формы и инактивации фотопроцесса [9]. Данные по миграции энергии возбуждения между различными спектральным формами протохлорофилловых пигментов указывают на возможное содержание в протохлорофиллид-протеиновом комплексе от 4 до 25 молекул протохлорофиллида на молекулу апопротеина [5].

Совокупность известных данных допускает два возможных представления о природе фотоактивной формы «650». Существование этой формы в листьях может быть результатом создания особого пигмент-белкового комплекса со специфической нативной структурои; в таком комплексе белковый носитель обеспечивает пространственную конфигурацию, необходимую для фотовосстановления пигмента. В то же время форма «650»

может быть результатом межмолекулярного взаимодействия (агрегации) молекул предшественника хлорофилла, которая при синтезе и специфической локализации на белковом носителе возможна даже при низкой концентрации пигмента в этиолированных листьях.

Имеющийся экспериментальный материал по агрегации протохлорофилловых пигментов в модельных системах недостаточен. В 1953 г. в нашей лаборатории наблюдали образование агрегированной формы протохлорофилла (точнее 4-винилпротохлорофилла), выделенного из оболочек семян тыквы, с максимумом поглощения ~650 *нм* [14]. В работах [15; 16] показано образование формы с поглощением ~635 *нм* в твердых пленках того же пигмента. Спектры люминесценции таких пленок, измеряемые при 20°, обнаруживали максимумы ~705 *нм* и в области 750—760 *нм*. Обработка пленок парами аммиака приводила к образованию формы с максимумом поглощения ~645 *нм*. При исследовании спектров люминесценции протохлорофилловых пигментов в различных состояниях [17; 18] мы наблюдали, что в ряде модельных систем (адсорбаты, пиридиновые растворы при температуре —110° после освещения) протохлорофилл обнаруживает максимум флуоресценции ~655 *нм*. В работе [19] было показано образование максимума 650 *нм* в спектре поглощения растворов протохлорофиллида в неполярных растворителях, наблюдаемое через несколько часов после растворения пигмента и обратимое в присутствии полярных примесей. Протохлорофилл и 4-винилпротохлорофилл в четыреххлористом углероде обнаруживают появление в инфракрасном спектре поглощения «агрегационного» максимума при 1668 $см^{-1}$ [20]. Это свидетельствует об участии координационных связей C=O...Mg при агрегации протохлорофилловых пигментов, механизм которой сходен с механизмом агрегации хлорофилла *а*. Однако у протохлорофилловых пигментов до сих пор не наблюдалось образования высоко агрегированных форм, соответствующих длинноволновым кристаллическим структурам хлорофилла *а*.

В данной работе нас интересовала возможность моделирования в твердых пленках протохлорофилла и 4-винилпротохлорофилла агрегированных форм различного типа. Пленки с формами различного типа исследовались по спектрам люминесценции при 20 и —196°. Мы надеялись, что наша работа поможет лучшему пониманию природы основной формы предшественника хлорофилла в фотосинтезирующих организмах и принесет новую информацию о межмолекулярных взаимодействиях протохлорофилловых пигментов.

МЕТОДИКА

4-Винилпротохлорофилл и протохлорофилл получали из внутренних оболочек семян тыквы (сорта «Столовая») по методике, описанной в работе [20]. Пленки получали из эфирных растворов пигментов, как описано в нашей предыдущей работе [15]. При обработке пленок парами метанола, серного эфира и ацетона растворитель помещали в боковой отвод трубки Тунберга, по мере выдерживания образцов в парах растворителя при 20° регистрировали спектры поглощения на приборе СФ-10.

Спектры люминесценции регистрировали на установке, состоящей из монохроматора ИСП-51, фотоэлектрической приставки ФЭП 1 с фотоумножителем ФЭУ-22, чувствительным к красной и близкой инфракрасной областям спектра, и электронного автоматического потенциометра ЭПП-09 для записи спектров. Люминесценцию возбуждали ртутной лампой ДРШ-250 со стороны передней стенки сосуда с пленкой. Спектральную область возбуждения (360—580 *нм*) выделяли с помощью светофильтра СЗС-22. На рисунках интенсивность люминесценции дана без поправки на спектральную чувствительность фотоумножителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ниже представлены полученные нами данные по моделированию в пленках агрегированных форм различного типа.

Форма «635». При испарении в вакууме эфирного раствора протохлорофилла или винилпротохлорофилла в трубке Тунберга в большинстве случаев получаются пленки пигмента с максимумом поглощения

~635 *нм* [15; 16]. Такие пленки при комнатной температуре обладают заметной люминесценцией в области 630—780 *нм*. В спектрах люминесценции всегда проявляется два основных максимума — в области 750—760 и ~710 *нм*, а также значительно менее интенсивные максимумы ~640 и 655 *нм* (рис. 1, спектр *1*).

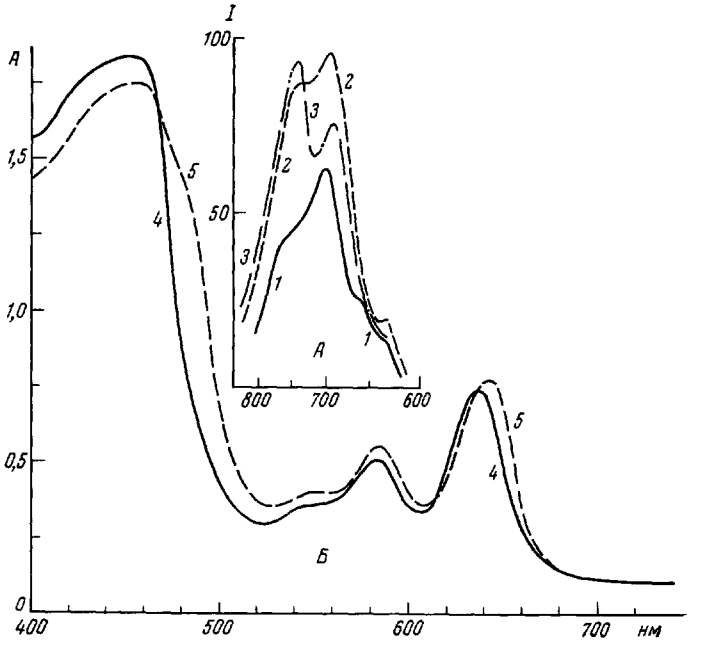


Рис 1 Действие низкой температуры (—196°) на спектры люминесценции (*А*) и поглощения (*Б*) пленок винилпротохлорофилла

1—20°, *2* и *3* — —196°, варианты спектров, *4* и *5* — спектры при 20° до и после охлаждения жидким азотом

Люминесценция пленок, полученных в различных вариантах опытов, довольно постоянна по спектральному составу, хотя точное положение и соотношение интенсивностей максимумов в разных спектрах несколько варьируют, что связано, по-видимому, с различием в плотности измеряемых участков пленки на стенках сосуда. В нашей предыдущей работе [16] была отмечена значительно бóльшая изменчивость в спектрах люминесценции различных образцов пленок протохлорофилла, что, по-видимому, связано с менее высокой степенью очистки и возможным содержанием липоидных примесей в используемых ранее препаратах пигмента.

При —196° интенсивность люминесценции пленок в области 690—780 *нм* возрастает в несколько раз, основные максимумы смещаются на несколько *нм* в коротковолновую сторону, относительная доля самого длинноволнового максимума в спектре заметно увеличивается; максимум 655 *нм* в низкотемпературном спектре в большинстве случаев не обнаруживается за счет маскировки сильно возрастающим по интенсивности соседним максимумом ~705 *нм* (рис. 1, спектры *2* и *3*). В спектрах поглощения пленок после глубокого охлаждения можно наблюдать заметно более длинноволновое положение основного максимума поглощения, до 645 *нм* (рис. 1, *Б*), что связано с необратимым увеличением степени агрегации молекул при низкой температуре.

Форма «650». В присутствии паров метилового спирта, серного эфира и ацетона происходит перестройка структуры пленок пигментов с образованием отчетливого максимума при ~650 *нм*, доминирующего в спектре. Наиболее эффективное действие оказывал метиловый спирт. Обработ-

ку парами метанола проводили после предварительного откачивания воздуха из сосуда с пленкой в течение 2 *мин* при охлаждении бокового отвода с растворителем сухим льдом. На рис. 2, *А* представлено образование формы «650» в пленке винилпротохлорофилла при обработке парами

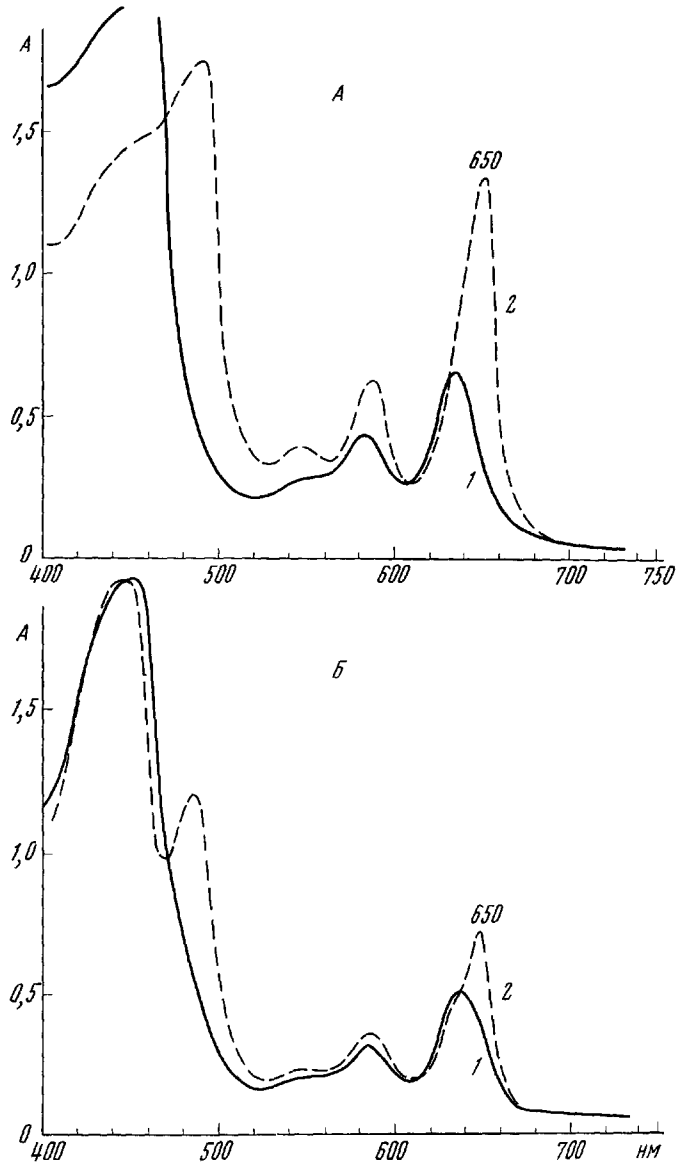


Рис 2. Образование формы 650 *нм* в пленках винилпротохлорофилла

Спектры поглощения: *А* — исходная пленка (*1*) и после обработки парами метанола в течение 20 *мин* (*2*); *Б* — исходная пленка (*1*) и после обработки парами серного эфира в течение 30 *мин* (*2*)

метанола. В указанных опытах пигмент не подвергался каким-либо химическим изменениям; спектр поглощения ацетонового элюата пленки с формой «650» полностью соответствовал спектру исходного пигмента. Эффект обработки метанолом можно было наблюдать последовательно несколько раз с одним и тем же пигментом.

Пары серного эфира и ацетона при действии на пленки винилпротохлорофилла (20—45 *мин* при 20°, в присутствии воздуха) также вызы-

вают образование максимума 650 *нм*. Общий вид спектра, соотношение высот максимумов 650 и 635 *нм* изменялись в разных вариантах опытов; во многих случаях у пленок можно было наблюдать спектры поглощения, полностью соответствующие спектрам интактных этиолированных листьев (рис. 2, *Б*).

Протохлорофилл и протохлорофиллид не отличаются от винилпротохлорофилла по способности к образованию формы «650». У некоторых

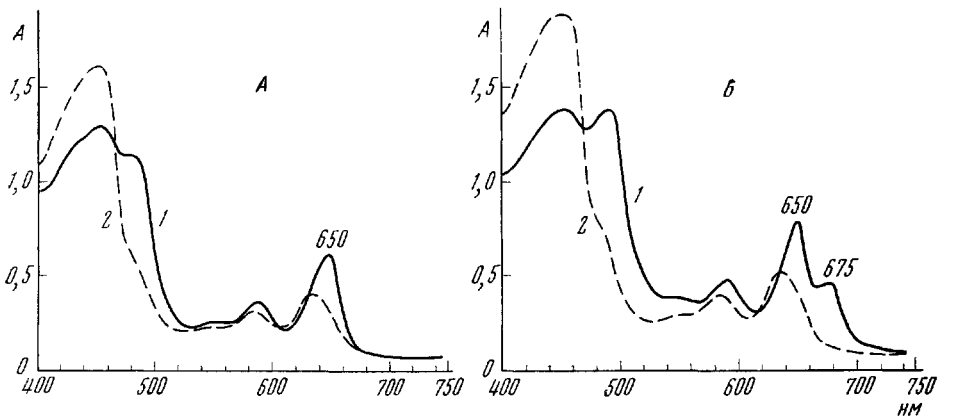


Рис 3 Действие нагревания на пленки протохлорофилла с формами 650 (*А*) и 675 *нм* (*Б*)
Спектры поглощения *1*—20°, *2*—90°

образцов протохлорофилла эту форму удавалось наблюдать в спектрах поглощения исходных пленок без какой-либо дополнительной обработки. Форма «650» сохраняется в пленках после длительного (более 2 *час*) эвакуирования воздуха форвакуумным насосом. При нагревании до 90° основное количество формы «650» исчезает, и максимум 635 *нм* становится основным в спектре (рис. 3, *А*).

Пленки пигментов, поглощающие при 650 *нм*, обладают при комнатной температуре заметной люминесценции с отчетливым максимумом при 655 *нм* и двумя другими — около 710 и 755 *нм* (рис. 4, *А*, спектр *1*). Длинноволновые максимумы всегда проявляются в спектрах; их точное положение и соотношение интенсивностей варьируют у разных образцов, как и у пленок с основной формой 635 *нм*. Максимум 655 *нм* проявляется в спектре как доминирующий только при первой экспозиции в вакууме. Действие возбуждающего света при последующих экспозициях вызывает его значительное уменьшение и возрастание максимума ~710 *нм*, который становится основным в спектре после освещения в течение 1—2 *мин* (рис. 4, *А*, спектр *2*).

Охлаждение до —196° более чем в 5 раз увеличивает длинноволновую люминесценцию, практически не изменяя интенсивность максимума 655 *нм*. При низкой температуре максимум 655 *нм*, как правило, не проявляется в спектре за счет маскировки возрастающей люминесценцией в области 700 *нм;* длинноволновые максимумы смещаются на несколько *нм* в коротковолновую область; максимум 700 *нм* доминирует в низкотемпературном спектре (рис. 4, *Б*, спектр *2*). Аналогичное действие оказывает глубокое охлаждение и на пленки с формой 635 *нм*.

Форма «640». В нашей предыдущей работе [15] было показано, что у пленок 4-винилпротохлорофилла в парах аммиака основной максимум в спектре поглощения смещается в длинноволновую область до 640—645 *нм*. Такой же эффект вызывает аммиак при обработке пленок протохлорофилла (рис. 5, *А*). Максимум ~640 *нм* представляет собой сочетание исходного максимума 635 *нм* и вновь образованного максимума

~650 *нм*. Поэтому спектры люминесценции пленок, поглощающих при 640—645 *нм*, по существу не отличаются от излучения пленок с максимумом поглощения при 650 *нм* (рис. 5, *Б*, спектры *3*, *4*). При комнатной температуре в спектрах люминесценции проявляется максимум ~655 *нм* за счет флуоресценции формы «650», а также более длинноволновые

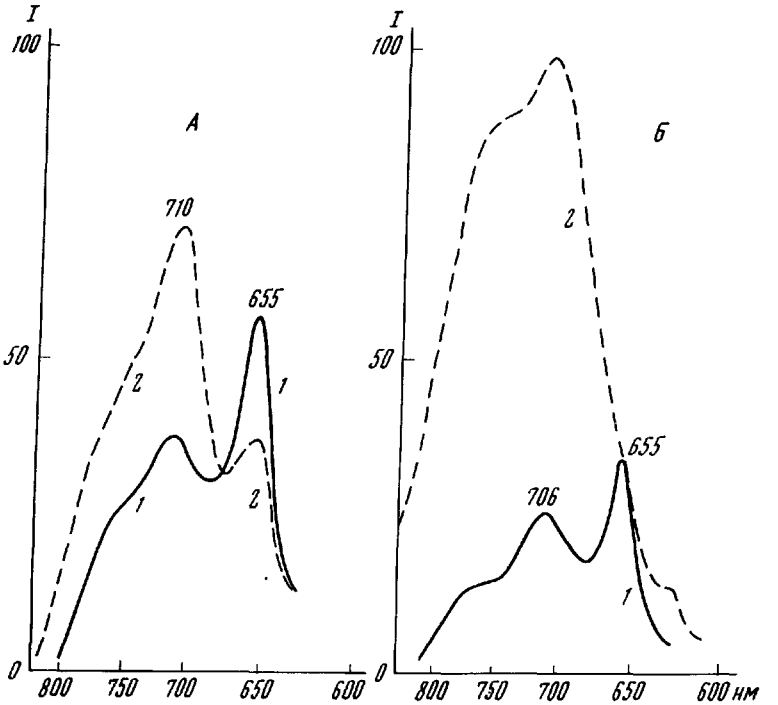


Рис 4. Спектры люминесценции пленок протохлорофилла с максимумом поглощения 650 *нм*

А — исходная пленка при 20° (*1*) и после освещения возбуждающим светом в течение 3 *мин* (*2*); *Б* — пленка при 20° (*1*) и та же пленка при —196° (*2*)

максимумы — 710—715 и ~755 *нм*, которые свойственны излучению пленок других исследованных образцов. При —196° интенсивность длинноволновой люминесценции в несколько раз возрастает, основные максимумы смещаются в коротковолновую сторону; низкотемпературные спектры сходны с люминесценцией пленок, имеющих основной максимум поглощения при ~650 *нм* (рис. 5, *Б*, спектр *4*).

Форма «675». 4-Винилпротохлорофилл и протохлорофилл обладают способностью к образованию формы с максимумом поглощения 675—680 *нм* при обработке пленок парами ацетона в присутствии воздуха при 20°. Эта форма отчетливо обнаруживается в спектре вслед за начальным образованием формы «650» в указанных условиях. После обработки разных образцов пленок пигментов парами растворителя в течение 1—2 *час* получаются спектры поглощения, различающиеся соотношением основных максимумов. Наиболее типичные варианты представлены на рис. 6 (спектры *2* и *3*). Пары серного эфира приводят к аналогичному эффекту; длительная эвакуация форвакуумным насосом практически не изменяет высоты и положения максимума 675—680 *нм*. Нагревание до 90° вызывает его исчезновение вместе с некоторым возрастанием поглощения около 630 *нм* (рис 3, *Б*).

Пленки с доминирующей формой 675—680 *нм* обладают более интенсивной люминесценцией, чем пленки с другими спектральными формами.

При комнатной температуре в спектрах люминесценции (измеряемых в вакууме) проявляется максимум ~685—690 *нм*, соответствующей флуоресценции основной поглощающей формы, а также более длинноволно-

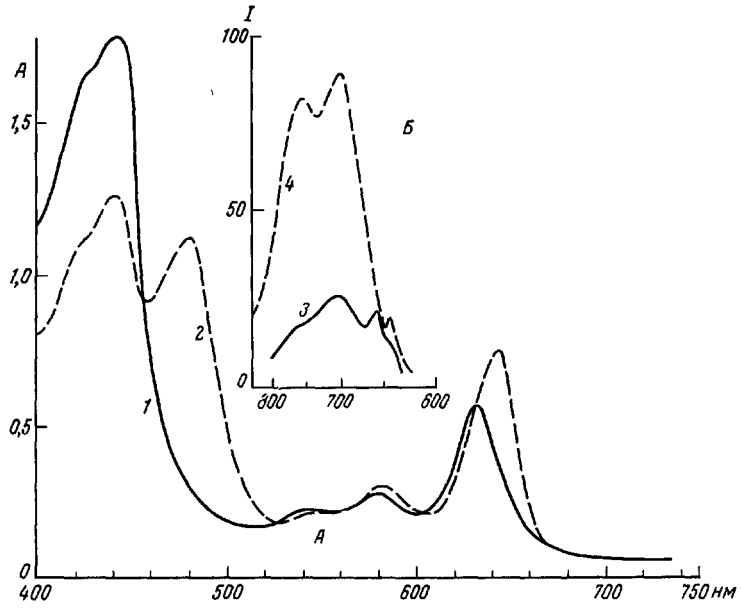


Рис. 5. Спектры поглощения (*А*) и люминесценции (*Б*) пленок протохлорофилла

1 — исходная пленка; *2* — после обработки парами аммиака при 20° в течение 1 *час*; *3*—20°; *4*— —196°

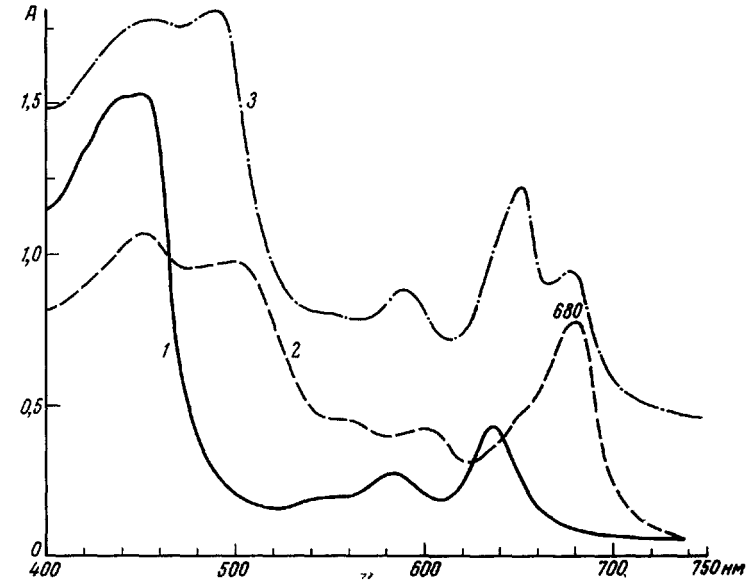


Рис. 6. Образование формы 675—680 *нм* в пленках протохлорофилловых пигментов

Спектры поглощения: *1* — исходная пленка винилпротохлорофилла; *2* — после обработки парами ацетона в течение 1 *час*; *3* — пленка протохлорофилла после обработки парами ацетона в течение 2 *час*

вые максимумы — ~710 и 760 *нм* (рис. 7, *А*, спектр *1*). Последние два максимума свойственны спектрам люминесценции исследованных нами пленок любого типа независимо от положения и формы основного макси-

мума поглощения. Пленки протохлорофилла и винилпротохлорофилла при освещении в присутствии воздуха обнаруживают резкое падение интенсивности люминесценции, что согласуется с нашими прежними результатами по свойствам Mg-комплексов. В спектрах люминесценции пленок, содержащих большее количество формы 650 *нм* (рис. 6, спектр *3*), при

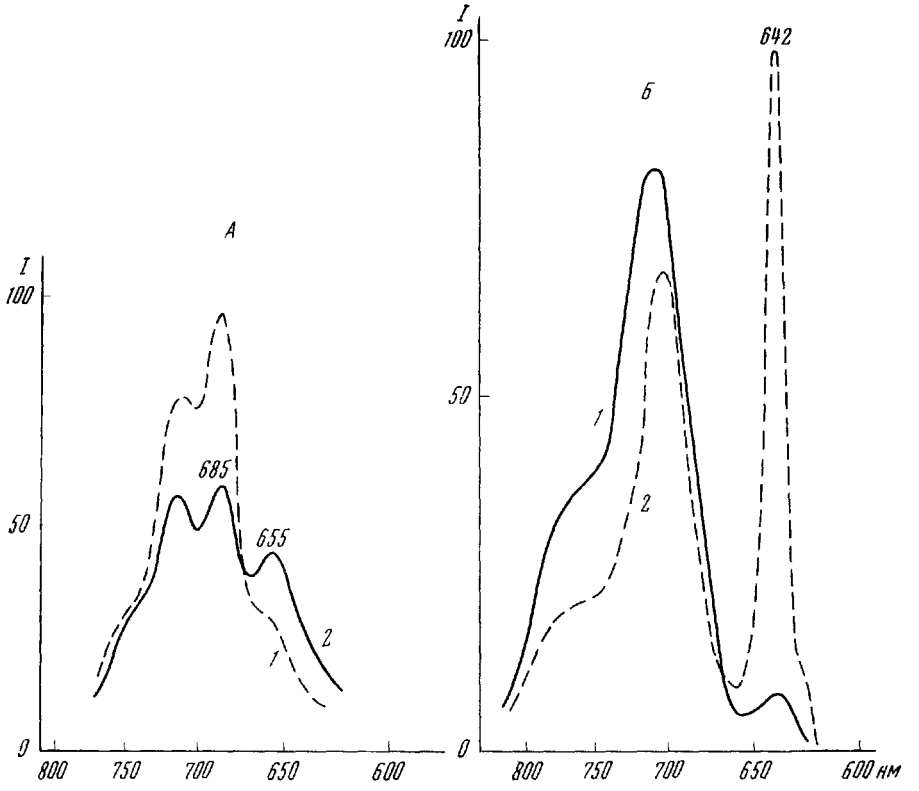


Рис 7 Спектры люминесценции пленок протохлорофилла с максимумом поглощения 675—680 *нм*

А — 20°, *1* и *2* — варианты пленок, различающиеся соотношением максимумов ~675 и 650 *нм* в спектре поглощения (см текст) *Б* — —196°, *1* — исходная пленка; *2* — та же пленка после действия низкой температуры более 15 *мин*

комнатной температуре более отчетливо обнаруживается максимум 655 *нм*, соответствующий флуоресценции этой формы (рис. 7, *А*, спектр *2*).

У пленок с формой 675—680 *нм* при —196° наблюдается значительное усиление люминесценции в области 700—780 *нм*. Интенсивность максимума ~710 *нм* при низкой температуре возрастает более чем в 5 раз вместе с коротковолновым смещением на несколько *нм* Флуоресценция в максимуме ~685 *нм*, как и при 655 *нм*, практически не изменяется. В низкотемпературном спектре сильно доминируют максимум ~700 *нм* при измерении непосредственно после охлаждения жидким азотом (рис. 7, *Б*, спектр *1*). При последующих экспозициях после более продолжительного действия низкой температуры у ряда образцов удавалось наблюдать появление в спектре очень интенсивного острого максимума ~640 *нм* (спектр *2*), обусловленного флуоресценцией формы 635 *нм*, определенное количество которой всегда присутствует в пленках наряду с формами «650» и «675». Этот эффект связан, по-видимому, с изменением условий миграции энергии возбуждения в пленках при действии низкой температуры.

Таким образом, в пленках винилпротохлорофилла и протохлорофилла удается моделировать агрегированные формы с основными максимумами

поглощения при 635, 650 и 675—680 *нм*. Получение этих форм в пленках определяется спонтанно протекающим пигмент-пигментным взаимодействием. Пары органических растворителей и аммиака, по-видимому, расшатывают жесткую структуру пленки, создавая благоприятные условия для межмолекулярного взаимодействия с образованием агрегированных форм различного типа, в создании которых могут играть роль молекулы связанной воды.

Форма с максимумом поглощения 675—680 *нм* является, по всей вероятности, структурным аналогом микрокристаллов хлорофилла *а*. Формы «635» и «650» по спектральным свойствам соответствуют формам протохлорофилловых пигментов в листьях. Форма «650» в пленках, как и в естественном состоянии, отличается термолабильностью; форме «635» свойственна термостойкость. Указанные формы могут быть получены и в пленках бесфитольного аналога протохлорофилла — протохлорофиллида, выделенного из этиолированных листьев. Не исключено, что спектральные свойства протохлорофиллида в составе естественного протохлорофиллид-белкового комплекса также определяют пигмент-пигментным взаимодействием, на характере которого, по всеи вероятности, не сказывается наличие или отсутствие фитола в молекуле.

Возможность получения агрегированных форм различного типа в пленках протохлорофилловых пигментов является доводом в пользу представления об агрегационной природе предшественника хлорофилла у фотосинтезирующих организмов. В естественном протохлорофиллид-белковом комплексе при низкой концентрации пигмента белковый компонент может способствовать ориентации молекул, обеспечивающей создание фотоактивных агрегированных форм.

Формы «635», «650» и «675» обладают основными максимумами флуоресценции ~642, 655 и 685—690 *нм* соответственно. Эти максимумы всегда проявляются в спектрах люминесценции пленок при 20° в виде самых коротковолновых компонентов наряду с длинноволновыми максимумами ~710 и 755 *нм*. Спектры люминесценции пленок, в которых доминирует форма 650 *нм* (при первоначальной регистрации в вакууме при комнатной температуре) во многом напоминают низкотемпературные спектры люминесценции неосвещенных этиолированных листьев. Так, максимум 655 *нм* в обоих случаях является основным в спектре. У листьев, как и у пленок, обнаруживается длинноволновая люминесценция с максимумами ~710 и 725 *нм*. Вместе с тем относительная величина максимума 655 *нм* в листьях значительно выше, чем в пленках; интенсивность длинноволновых максимумов гораздо меньше, и самый длинноволновый компонент в спектре имеет более коротковолновое положение по сравнению с пленками. Эти отличительные особенности люминесценции листьев определяются, по-видимому, значительно более низкой концентрацией предшественника хлорофилла в проламеллярных телах, а также иными условиями миграции энергии возбуждения по сравнению с пленками.

В неосвещенных этиолированных листьях при низкой температуре энергия возбуждения с высокой эффективностью мигрирует к форме 650 *нм* от более коротковолновых форм [5]. Форма «650», не обладая фотохимической активностью при —196°, интенсивно флуоресцирует. Основной максимум флуоресценции этиолированных листьев (655 *нм*), имея высокий температурный коэффициент [21], отчетливо проявляется в низкотемпературном спектре и практически не заметен при комнатной температуре, что обусловлено высокой эффективностью фотопревращения предшественника хлорофилла. В пленках форма 650 *нм* не подвергается фотовосстановлению, поэтому обнаруживает заметную флуоресценцию при комнатной температуре.

Максимум 655 *нм* в спектре пленок быстро падает под действием света, в то время как интенсивность длинноволновой люминесценции с максимумом ~710 *нм* значительно возрастает. Не исключено, что этот эф-

фект связан с фотоокислением формы «650» остаточным кислородом и уменьшением его тушащего действия, в результате чего происходит возгорание длинноволновой люминесценции.

Основной вклад в люминесценцию протохлорофилловых пигментов в области 700—780 *нм*, по-видимому, вносит флуоресценция наиболее длинноволновых, высоко агрегированных форм, которые скрыты в спектре поглощения, но являются эффективными собирателями энергии возбуждения, мигрирующей от более коротковолновых форм. Спектральная область длинноволновой флуоресценции совпадает с областью колебательных подуровней коротковолновых компонентов спектра. Общие соображения относительно природы длинноволновой люминесценции агрегированных форм пигментов мы высказывали в нашей предыдущей работе [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Докл. АН СССР **117**, 106, 1957
2. Shibata K., J. Biochem. **44**, 147, 1957
3. Sironval C., Brouers M., Michel J. M., Kuiper Y., Photosynthetica **2**, 268, 1968
4. Granik S., Gassman M., Plant Physiol. **45**, 201, 1970
5. Kahn A., Boardman N. K., Thorne S. W., J. Mol Biol. **48**, 85, 1970
6. Годнев Т. Н., Акулович Н. К., Орловская К. И., Раскин В. И., Докл. АН СССР **179**, 465, 1968
7. Butler W. L., Briggs W. R., Biochim. et biophys. acta **112**, 45, 1966
8. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А., Мол. биол. **5**, 366, 1971
9. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия **25**, 168, 1960
10. Красновский А. А., Быстрова М. И., Сорокина А. Д., Докл. АН СССР **136**, 1227, 1961
11. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А., Биохимия **28**, 524, 1963
12. Smith J. H. C., in: Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems, p. 257, Acad. Press, N. Y.— L., 1960
13. Boardman N. K., in: The Chlorophylls, p. 437, Acad. Press, N. Y.— L., 1966
14. Красновский А. А., Воробьева Л. М., Войновская К. К., Докл. АН СССР **92**, 1201, 1953
15. Быстрова М. И., Красновский А. А., Мол. биол. **1**, 362, 1967
16. Быстрова М. И., Красновский А. А., Мол. биол. **2**, 847, 1968
17. Красновский А. А., Быстрова М. И., Биохимия **27**, 958, 1962
18. Быстрова М. И., Красновский А. А., Биофизика **10**, 433, 1965
19. Seliskar C. J., Ke B., Biochim. et biophys. acta **153**, 685, 1968
20. Houssier C., Sauer K., Biochim. et biophys. acta **172**, 476, 1969
21. Goedheer J. C., Vernülsdonk C. A. H., Biochem and Biophys. Res. Commun **39**, 260, 1970

Поступила в редакцию
1.XII 1970

SPECTRAL EFFECTS OF PROTOCHLOROPHYLL PIGMENTS AGGREGATION

M. I. BYSTROVA, F. LANG and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The aggregation of protochlorophyll and 4-vinylprotochlorophyll in solid films was studied. The aggregated pigment forms showed absorption maxima at 635, 650, and 675—680 *nm*. The pigment forms with maxima at 650 *nm* and 675—680 *nm* are thermolabile, and the form 635 *nm* is thermostable. The solid films of pigments exhibit luminescence in the region 630—780 *nm* at 20°. In the luminescence spectra (measured in vacuo) not only the longwave maxima at ~710 and ~755 *nm* were observed but the shortwave maxima at ~640, ~655 or ~685 *nm*, too, corresponding to absorption maxima at 635, 650 and 675 *nm*, respectively. The fluorescence maximum at 655 *nm* decreased under illumination and simultaneously the longwave luminescence at ~710 *nm* did increased. Freezing to 77° K enhanced (5—10 times) the longwave luminescence in the region 700—780 *nm*. The spectral properties of aggregated pigments studied are identical to protochlorophyll pigments in the intact leaves

---

Доклады Академии наук СССР
1972. Том 205, № 1

УДК 582.132.1

БИОХИМИЯ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООКИСЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА КИСЛОРОДОМ, СОПРОВОЖДАЮЩЕЕСЯ ДЕЗАГРЕГАЦИЕЙ

Описанная ранее необратимая фотодезагрегация хлорофилла в зеленых листьях ([1]) определила поиски подобных фотопревращений в модельных системах. Мы обнаружили обратимое фотоокисление феофитина кислородом, сопровождающееся дезагрегацией длинноволновой формы пигмента ([2, 3]). В настоящей работе исследуется способность хлорофилла к подобным превращениям.

Были использованы диоксановые растворы хлорофилла a и b, содержащие 40—50% воды, в которых пигменты присутствуют в мономерной и агрегированной формах. В спектрах поглощения таких растворов обнаруживались максимумы агрегированных форм хлорофилла a (690 мμ) и хлорофилла b (670 мμ), в месте нахождения полосы поглощения мономерного хлорофилла наблюдалось расширение с коротковолновой стороны главного максимума. В применяемых средах содержится относительно мало мономерного пигмента, и бóльшая часть поглощения в области мономера обусловлена агрегированной формой хлорофилла. Освещение в присутствии кислорода воздуха вызывало снижение оптической плотности в максимуме агрегированной формы пигмента, появления новых полос поглощения обнаружено не было. В отличие от феофитина, не удалось наблюдать возрастания количества мономерной формы в результате освещения растворов хлорофилла. Поэтому для изучения фотохимических свойств мономерных и агрегированных форм хлорофилла в присутствии кислорода мы использовали более чувствительный метод измерения спектров флуоресценции.

В изучаемых растворах хлорофилла a при комнатной температуре мономерная форма имеет максимум флуоресценции около 674 мμ, агрегированная форма 700—705 мμ. У хлорофилла b, помимо мономера, флуоресцирующего при ~654—656 мμ, обнаруживается два максимума агрегированного пигмента — при 683—685 мμ и ~713 мμ. Освещение растворов хлорофилла a и b в водном диоксане красным светом приводило к изменениям в спектрах флуоресценции, сходным с наблюдавшимися нами ранее для феофитинов ([3]) (рис. 1,2). Наблюдалось падение интенсивности флуоресценции агрегированных форм пигмента и образование нового длинноволнового максимума, который появлялся уже под действием возбуждающего света (линия ртути 365 мμ) за время записи спектра (~1,5 мин). Положение нового максимума было близким для хлорофилла a (~785 мμ) и хлорофилла b (780 мμ). В отличие от феофитина, освещение при 20° вызывало понижение мономерного максимума хлорофилла в водно-диоксановом растворе.

По мере освещения раствора и понижения исходных максимумов интенсивность флуоресценции нового длинноволнового максимума возрастала и достигала максимальной величины после 30—60 сек. действия света. Более продолжительное освещение приводило к снижению максимума. После выключения света происходило возрастание флуоресценции мономерного и нового длинноволнового максимумов, во многих опытах наблюдалось также частичное увеличение флуоресценции агрегированных форм (рис. 1). Эффект действия света с последующим затемнением мог быть повторен не-

сколько раз. Освещение при комнатной температуре приводит к обратимым спектральным изменениям, в результате которых увеличивается относительное количество мономерных форм пигмента по отношению к агрегированным, но в большинстве опытов высота «мономерного» максимума после опыта не превышает его исходной величины.

Более отчетливо стадии фотореакции прослеживались при низкой температуре (для водного диоксана около 0°), т. е. в условиях возможного торможения обратных темновых реакций промежуточных продуктов (рис. 2). Освещение при 0° приводило к большему падению мономерного максимума,

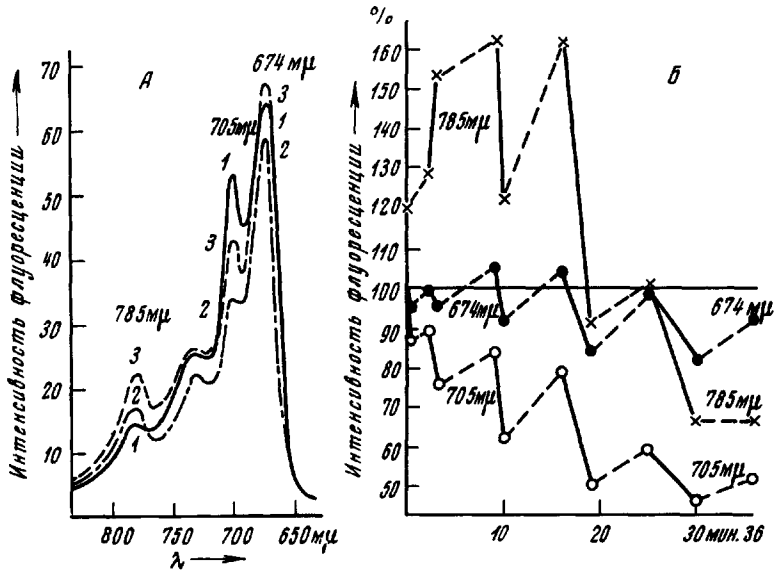


Рис. 1. Обратимое фотоокисление хлорофилла а кислородом в 55% диоксане при 20°. *А* — спектры флуоресценции: *1* — исходный раствор, *2* — 2 мин. освещения, *3* — 6 мин. темноты; *Б* — кинетика изменений интенсивности флуоресценции в максимумах при чередовании периодов света (сплошная линия) и темноты (пунктирная линия)

чем при 20°. Стояние раствора после освещения в темноте при 0° приводило к возрастанию флуоресценции во всех максимумах, при этом мономерный максимум возрастал в большей степени, чем агрегированные. Повышение температуры после освещения до 20° способствовало более значительному увеличению флуоресценции (рис. 2). Сравнение спектров флуоресценции до и после освещения свидетельствует о том, что конечным результатом фотореакции, проведенной при 0°, является понижение максимума флуоресценции агрегированного пигмента и возрастание мономерного максимума до величины, превышающей его исходное значение в неосвещенном растворе.

Освещение растворов хлорофилла в 50—60% диоксане в отсутствие воздуха вызывало лишь небольшое (до 10%) понижение максимумов флуоресценции, полностью обратимое после выключения света. Освещение этого же раствора после пуска воздуха приводило к понижению флуоресценции и образованию нового длинноволнового максимума флуоресценции.

Освещение хлорофиллов a и b в сухом диоксане не приводило к образованию нового длинноволнового максимума флуоресценции, а вызывало лишь падение интенсивности флуоресценции по всему спектру.

Разделение с помощью тонкослойной хроматографии на целлюлозе продуктов после освещения растворов хлорофиллов a и b в водном диоксане в присутствии воздуха показало, что, помимо полосы исходного пигмента и продуктов его глубокой фотодеструкции, остающихся на линии старта,

на пластинках обнаруживается полоса измененного хлорофилла, обладающего меньшим значением R_f по сравнению с исходным пигментом. Освещение растворов хлорофилла в сухом диоксане не приводило к накоплению заметных количеств этого измененного продукта.

По спектрам поглощения и флуоресценции измененные хлорофиллы a и b были полностью идентичными исходным пигментам до опыта. Фотоокисление исходных и измененных хлорофиллов в ацетоне кислородом воздуха протекало со сходными скоростями. Однако у измененного хлоро-

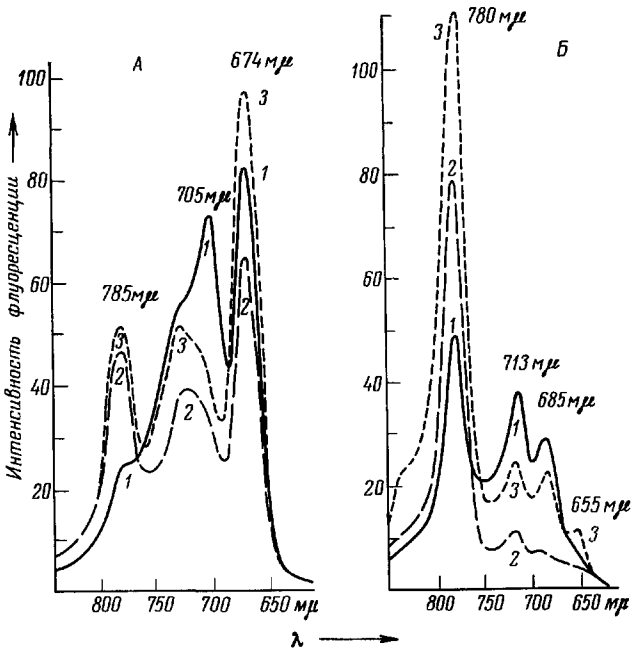


Рис. 2. Спектры флуоресценции (0°) при обратимом фотоокислении при 0° хлорофилла a в 60% диоксане (*А*) и хлорофилла b в 55% диоксане (*Б*). *А*: *1* — исходный раствор, *2* — 7 мин. освещения, *3* — после 10 мин. темноты при 20°; *Б*: *1* — исходный раствор, *2* — 10 мин. освещения, *3* — после 2 час. темноты при 20°

филла не удалось наблюдать бурую фазу Молиша при добавлении к раствору пигмента в серном эфире раствора KOH в спирте.

Мы обнаружили идентичность R_f измененного феофитина a, образующегося в результате световой реакции, и хлорина e_6, полученного из феофитина a ([4]) и отличающегося от него разомкнутым циклопентановым кольцом. Сравнение спектральных свойств этих пигментов показало сходное положение главных максимумов поглощения и различия в средней и длинноволновой части спектра. Постепенное разбавление диоксанового раствора хлорина e_6 водой до 15% содержания растворителя не приводило к образованию длинноволновой агрегированной формы и вызывало лишь сдвиг главных максимумов в длинноволновую сторону на 5—6 мμ. Освещение водно-диоксановых растворов хлорина сопровождалось падением поглощения по всему спектру и не приводило к появлению нового максимума в спектре флуоресценции.

Результаты проведенных опытов свидетельствуют о том, что хлорофиллы a и b, так же как и феофитины ([3]) способны к фотоокислению кислородом, протекающему в несколько стадий. На первой стадии (I) в результате освещения происходит фотоокисление агрегированных форм пигмента с образованием нового длинноволнового максимума флуоресценции. Соответст-

вующего нового максимума в спектре поглощения обнаружено не было. Новый максимум флуоресценции может принадлежать соединению типа перекиси (мольоксиду) ([5]) или комплексу с переносом заряда, возникающему при участии кислорода и возбужденных молекул агрегированного пигмента ([6]).

Фотоокисление мономерной формы хлорофилла, наблюдаемое нами по спектрам флуоресценции водно-диоксановых растворов, может включать стадию соединения с кислородом, хотя пока не удалось наблюдать образование нового максимума флуоресценции в длинноволновой области спектра при освещении растворов хлорофилла в сухих растворителях. С другой стороны, то, что в растворах феофитина в сухих растворителях наблюдается образование измененного продукта на свету, является доводом в пользу сходного механизма реакции в сухих и водных растворителях.

На следующей ступени процесса (II) происходит более глубокое фотоокисление пигмента кислородом в образующемся комплексе до неокрашенных промежуточных продуктов, из которых путем обратной темновой реакции (III) образуется измененный продукт, по спектральным характеристикам идентичный хлорофиллу до освещения, а по химическим свойствам сходный с хлорином. Возможно, что это связано с алломеризацией пигмента без изменения в спектре поглощения ([7]).

Предполагается наличие двух центров окисления в молекуле хлорофилла и феофитина ([8]), из которых один, связанный с сопряженной системой двойных связей, испытывает обратимые изменения, второй же, связанный с циклопентаноновым кольцом, испытывает необратимое окисление.

Дезагрегация, сопровождающая фотоокисление пигментов кислородом, вероятно, является следствием того, что образующийся в результате обратимого фотоокисления продукт с измененным циклопентаноновым кольцом обладает лучшей растворимостью в водных растворителях. Образующийся измененный хлорофилл на свету быстро разрушается вследствие необратимой фотореакции с кислородом (IV), тогда как у феофитина продукт с измененным циклопентаноновым кольцом более фотоустойчив.

Результаты работы и полученные ранее данные с феофитином ([2], [3]) свидетельствуют в пользу следующей гипотетической схемы фотоокисления пигментов кислородом в водных растворителях:

	I		II		III		IV	
Агрегированная форма	$h\nu, O_2$ ⟶ ⟵	Первичный продукт взаимодействия с кислородом	$h\nu$ ⇄	Неидентифицированные продукты окисления	темнота ⟶	Измененный пигмент типа хлорина	$h\nu, O_2$ ⟶	Продукты фотодеструкции
Мономер — — — ⟶								

Относительные скорости фотодезагрегации и фотодеструкции пигментов по этой схеме зависят от скорости промежуточных ступеней. Можно полагать, что накопления измененного хлорофилла в сухих растворителях не удается наблюдать вследствие высоких скоростей промежуточных реакций и деструктивного разрушения образующегося измененного продукта.

Наблюдаемая дезагрегация связана, таким образом, с окислением хлорофилла кислородом.

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

Поступило
18 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, **183**, 711 (1968). [2] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, **189**, 420 (1969). [3] Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, ДАН, **195**, 731 (1970). [4] H. Fischer, A. Stern, Die Chemie des Pyrrols, **2**, H. 2, Leipzig, 1940, S. 91. [5] А. А. Красновский мл., Ф. Ф. Литвин, Молек. биол., **3**, 282 (1969). [6] E. Döller, Zs. phys. Chem., N. F., **34**, 151 (1962). [7] А. Холт, Е. Джекобс, В кн.: Е. Рабинович, Фотосинтез, **3**, ИЛ, 1959, стр. 670. [8] В. М. Кутюрин, В. П. Соловьев, В. И. Григорович, ДАН, **169**, 479 (1966).

Доклады Академии наук СССР
1972. Том 207, № 4

УДК 541.14 + 547.979.4

БИОХИМИЯ

Н. Н. ДРОЗДОВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ НА ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ХИНОНАМИ

Изучение способности хлорофилла и его аналогов к обратимому окислению при взаимодействии с различными акцепторами электрона привлекает внимание исследователей в связи с тем, что возбужденный хлорофилл в первичной стадии фотосинтеза может выступать в роли донора электрона. В работах нашей лаборатории было показано, что хлорофилл и его аналоги способны к обратимому фотохимическому взаимодействию с *n*-бензохиноном и некоторыми другими хинонами в высоковязкой спиртоглицериновой среде, независимо от того, находится пигмент в мономерной или агрегированной форме ([1–3]). Помимо обратимых изменений спектра поглощения, наблюдалось изменение потенциала платинового электрода, помещенного в реагирующую систему. Детально исследовано изменение потенциала при обратимом фотоокислении хлорофилла и высказано предположение о том, что положительный знак фотопотенциала определяется образованием электродноактивного катион-радикала пигмента ([4]). Мы обратили внимание на то, что оба компонента, образующихся при фотоокислении, могут быть электродноактивными и знак фотопотенциала при обратимом окислении может определяться как продуктом восстановления акцептора электрона, так и продуктом фотоокисления пигмента.

Целью настоящей работы было сопоставление фотохимического взаимодействия хлорофилла и бактериохлорофилла с хинонами в зависимости от состояния, в котором находится пигмент,— в растворе (в органическом растворителе), в водном растворе детергента или в суспензии хлоропластов.

В опытах с водными растворами пигмента, содержащими детергент (тритон Х-100), при нашем методе измерения не удалось наблюдать обратимых спектральных изменений пигмента (в пределах ± 0,05), но можно было наблюдать отчетливый эффект изменения окислительно-восстановительного потенциала под действием света.

В работе был использован метод измерения фотопотенциала платинового электрода, находящегося в растворе пигмента с окислителем, по отношению к стандартному каломельному электроду. Величина изменения фотопотенциала регистрировалась с помощью pH-метра ЛПУ-01 и самопишущего потенциометра ЭПП-09М3. Источником света служила киноламна 300 вт со светофильтрами КС-13 и КС-19, пропускающими свет с длиной волны более 640 и 700 мμ соответственно, поглощаемый только пигментами. Перед измерением фотопотенциала из сосуда с раствором пигмента удалялся воздух с применением трехкратного поочередного замораживания и оттаивания, так как водные растворы тритона Х-100 в случае откачивания при комнатной температуре сильно пенятся, что затрудняет удаление воздуха.

Изучалось изменение потенциала платинового электрода при фотохимической реакции пигментов с *n*-бензохиноном и менадионом в растворе этилового спирта, в водном растворе тритона Х-100 и в суспензии хлоропластов.

На рис. 1 приведены данные, показывающие ход изменения потенциала платинового электрода при фотореакции хлорофилла с *n*-бензохиноном в растворе этилового спирта и в водном растворе 0,5% тритона Х-100. Концентрация пигмента (10^{-5} *M*), окислителя ($2 \cdot 10^{-5}$ *M*) и pH растворов и в том и в другом опыте одни и те же. Освещение системы хлорофилл — хи-

нон в обоих растворах приводит к быстрому изменению потенциала. При этом в спиртовом растворе при обратимом фотоокислении пигмента наблюдается появление положительного потенциала ($+\Delta E$), в то время как в растворе тритона X-100 наблюдается появление отрицательного фотопотенциала ($-\Delta E$). Аналогичные опыты были поставлены с бактериохлорофиллом, *n*-бензохиноном и менадионом.

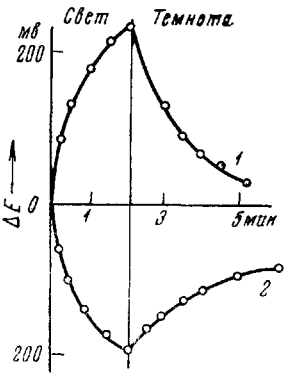


Рис. 1

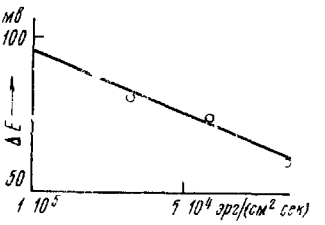


Рис. 2

Рис 1. Изменение фотопотенциала системы хлорофилл а — *n*-бензохинон в спирте (*1*) и в водном 0,5% растворе тритона X-100 (*2*). pH 5,6. Хлорофилл 10^{-5} *M*, хинон 2 10^{-5} *M*

Рис. 2. Зависимость ΔE (мв за 1 мин.) от интенсивности света

Во всех случаях наблюдалась та же закономерность изменения фотопотенциала, что и для растворов хлорофилла а.

Зависимость изменения фотопотенциала спиртовых растворов хлорофилла, содержащих хинон, от pH среды хорошо изучена ([5–7]). Знак фотопотенциала (ΔE) в этих растворах меняется от $+\Delta E$ к $-\Delta E$ с переходом от кислых значений pH к основным, что приписывается взаимодействию с электродом продуктов фотоокисления или фотовосстановления пигмента. В отличие от спиртового раствора, в водных растворах тритона X-100 при взаимодействии пигмента с *n*-бензохиноном знак фотопотенциала не зависит от pH среды. Так, при изменении pH от 4,9 до 8,2 происходит изменение предельной величины фотопотенциала, но знак ($-\Delta E$) остается одним и тем же (в милливольтах за 2 мин. освещения):

pH	8,2	6,8	5,9	4,9
Водный раствор тритона X-100	—115	—175	—185	—65
Спиртовой раствор	—100	+40	+150	+200

По-видимому, при взаимодействии пигмента с хиноном в растворе детергента механизм возникновения фотопотенциала обусловлен действием на электрод восстановленных форм окислителя, находящихся в водном растворе, тогда как пигмент находится в мицелле детергента.

В следующей серии опытов мы исследовали влияние интенсивности света, концентрации хинона, присутствия кислорода и β-каротина на изменение фотопотенциала системы хлорофилл — хинон в водных растворах тритона X-100.

На рис. 2 приведены результаты опытов, показывающие прямолинейную зависимость изменения фотопотенциала при взаимодействии хлорофилла а с *n*-бензохиноном в водном 0,5% растворе тритона X-100 от интенсивности света в пределах от $1 \cdot 10^5$ до $1{,}7 \cdot 10^4$ эрг/см^2·сек. Интенсивность красного света изменялась при помощи нейтральных светофильтров.

Ниже показана зависимость величины фотопотенциала от концентрации *n*-бензохинона (ΔE в милливольтах за 2 мин.):

Концентрация хинона, *M*	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$	0
ΔE	—77	—95	—150	—175	—130	—43	0

Наибольшее изменение величины фотопотенциала происходит при весьма низких концентрациях хинона ($1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-6}$ *M*), соизмеримых с концентрацией пигмента. Увеличение концентрации вызывает замедление реакции, по-видимому за счет того, что при этом более активно проявляется тушащее действие хинона на возбужденное состояние пигмента.

Следует отметить, что кислород и β-каротин, которые являются эффективными тушителями триплетного состояния хлорофилла, ингибируют возникновение фотопотенциала при взаимодействии пигмента с хинонами, что согласуется с показанным нами ранее тушащим действием β-каротина при фотохимических реакциях хлорофилла ([8], [9]).

При освещении водной суспензии хлоропластов с *n*-бензохиноном происходит изменение фотопотенциала в отрицательную сторону (ΔE в милливольтах за 2 мин.):

pH	8,3	6,8	5,6	4,5
ΔE	—15	—35	—40	—45

Знак фотопотенциала не зависит от pH среды (в пределах 4—9), меняется только величина ΔE, так же как и для водных растворов хлорофилла в тритоне X-100. Следует отметить, что в опытах с неразрушенными хлоропластами наблюдалась лишь незначительная обратимость при выключении света. Добавление разных количеств водного раствора тритона X-100 к суспензии хлоропластов (для получения концентраций от 0,005 до 0,1%) вызывает активацию, выражающуюся в увеличении абсолютной величины фотопотенциала и увеличении эффекта обратимости, по сравнению с опытом без добавления детергента (рис. 3); при этом введение возрастающих концентраций детергента в суспензию хлоропластов приводит к постепенному сдвигу максимума поглощения в коротковолновую область спектра. Знак фотопотенциала остается отрицательным, так как при действии детергента на хлоропласты часть пигмента солюбилизируется и возникновение фотопотенциала обусловлено взаимодействием с электродом только восстановленных форм окислителя. С другой стороны, при разрушении хлоропластов органическим растворителем (спиртом), при котором происходит выход пигмента в раствор, наблюдается появление положительного фотопотенциала, как и в спиртовых растворах хлорофилла a, где с электродом, как полагают, взаимодействует катион-радикал пигмента. По-видимому механизм возникновения фотопотенциала, являющийся результатом светоиндуцированного переноса электрона, зависит от того, в каком состоянии находится пигмент.

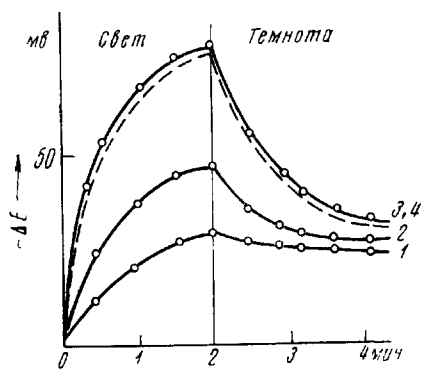


Рис. 3. Зависимость изменения фотопотенциала системы суспензия хлоропластов — *n*-бензохинон от концентрации тритона X-100. *1* — без детергента, *2* — 0,005% тритона, *3* — 0,05%, *4* — 0,1%

В основе взаимодействия пигмента с окислителем лежат элементарные процессы фотохимического окисления — восстановления:

$$Хл \rightarrow Хл^*, \quad Хл^* + Q \rightleftarrows \cdot Хл^+ + \cdot Q^-,$$

где Хл — молекула хлорофилла, Q — *n*-бензохинон. Возникновение фотопотенциала является результатом этого процесса, однако с электродом взаимодействуют, по-видимому, продукты превращения первичных ион-радикалов. Возникает вопрос, какой тип фотопродуктов взаимодействует с

электродом. В спиртовых растворах эффективность фотоокисления увеличивается с уменьшением значения величины pH ([4], [5]). Это происходит, повидимому, вследствие того, что в кислых средах за счет реакции анион-радикала семихинона ($\cdot Q^-$) с ионами протона ($\cdot H^+$) возможно образование нейтрального радикала семихинона ($QH\cdot$), с последующим диспропорционированием, что способствует накоплению в растворе катион-радикала пигмента, определяющего конечный положительный знак фотопотенциала; с увеличением pH уменьшается количество образованного нейтрального радикала $QH\cdot$, и абсолютная величина изменения фотопотенциала делается меньше. В нейтральных и щелочных растворах, благоприятных для депротонизации радикала $QH\cdot$, происходит изменение знака фотопотенциала на отрицательный за счет увеличения в растворе количества отрицательных ион-радикалов семихинона ($\cdot Q^-$), способных отдавать свой электрон нейтральному электроду.

Изменение фотопотенциала в отрицательную сторону в опытах с пигментом в водных растворах детергента (тритона X-100) обусловлено тем, что в этом случае с электродом взаимодействуют только восстановленные формы окислителя, так как молекулы пигмента сосредоточены в мицелле детергента и у них нет непосредственного контакта с электродом. Такое же объяснение может быть применено к системе суспензия хлоропластов — хинон.

Таким образом, в водных растворах детергента, наряду с изученным в нашей лаборатории необратимым окислением пигментов кислородов ([10]), могут происходить обратимые превращения при взаимодействии с хинонами, наблюдаемые по изменению фотопотенциала. В том случае, когда не удается наблюдать изменений оптической плотности пигмента, возможно фотосенсибилизированное восстановление хинонов.

На основе изложенного экспериментального материала можно заключить, что элементарные превращения молекулы пигмента происходят независимо от того, в каком состоянии находится пигмент: в мономерной или агрегированной форме, в мицелле детергента или в хлоропластах в виде естественного комплекса, но методы обнаружения промежуточных продуктов связаны со спецификой состояния пигмента. Так, в растворах мономеров или агрегатов происходит накопление и стабилизация промежуточных состояний и имеется возможность спектрального наблюдения изменений самого пигмента. В гетерогенной системе — в растворе детергента и в суспензии хлоропластов — можно наблюдать только изменение окислительно-восстановительного потенциала под лучом света, обусловленного восстановлением акцептора электрона, находящегося в непосредственном контакте с электродом, причем изменения акцептора электрона могут происходить либо за счет непосредственного его взаимодействия с пигментом, либо путем сенсибилизированного хлорофиллом фотовосстановления хинона; в этом случае исходным донором электрона могут служить органические компоненты, присутствующие в фотохимически активной системе.

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

Поступило
3 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 158, 730 (1964). [2] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [3] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, ДАН, 195, 1222 (1970). [4] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 165, 1435 (1965). [5] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Биофизика, 11, 593 (1966); 14, 43 (1969). [6] E. Fujimoria, M. Tavla, Photochem. Photobiol., 8, 31 (1968). [7] W. H. Simpson, R. A. Freeman, P. J. Reucroft, Photochem. Photobiol., 11, 319 (1970). [8] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. В. Пакшина, Биохимия, 25, 288 (1960). [9] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Биохимия, 26, 859 (1961). [10] М. Г. Шапошникова, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 36, 704 (1971).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 6 1972 Вып. 5

УДК 577.45

ДЕЙСТВИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ НА ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМАТОФОРОВ *CHROMATIUM MINUTISSIMUM*

Н. В. КАРАПЕТЯН, И. Н. КРАХМАЛЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследовано действие детергентов на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров *Chromatium* в области 750—920 *нм*. Изменения при 785—810, 845 и 885 *нм*, обусловленные фотопревращениями разных форм бактериохлорофилла, обнаруживают различную зависимость от концентрации тритона X-100. Зависимость изменения поглощения при 885 *нм* от концентрации тритона X-100 позволяет выявить 3 стадии, приписываемые разобщению фотофосфорилования, нарушению донорной части цепи переноса электрона или распаду активного центра. Предполагается, что колебания величины фотоиндуцированных изменений поглощения при 885 *нм* под действием соответствующих концентраций тритона X-100 указывают на способность хроматофоров к различным световым реакциям фотосинтеза, тогда как изменения поглощения при 845 *нм* связаны со способностью хроматофоров к фотофосфорилированию. Форма бактериохлорофилла Б830, образующаяся под действием тритона X-100 на хроматофоры, не фотоактивна. Другие детергенты в малых концентрациях оказывают такое же действие на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров, выделенных из *Chromatium* и других типов пурпурных бактерий.

При освещении фотосинтезирующих пурпурных бактерий наблюдаются обратимые изменения в спектре поглощения, вызванные превращениями компонентов фотосинтетической цепи переноса электрона. На основании исследования зависимости фотоиндуцированных изменений поглощения бактерий от действия различных факторов и агентов идентифицированы компоненты цепи переноса электрона и возможная последовательность их взаимодействия.

Особый интерес представляют световые преварщения бактериохлорофилла (БХ), обусловливающего протекание первичных процессов фотосинтеза. Как известно, в пурпурных бактериях обнаружены 3 или 2 (в зависимости от типа бактерий) спектрально различные формы БХ, обозначаемые как Б800, Б850 и Б890 [1—4]. Фотоиндуцированные изменения поглощения бактерий в области 750—920 *нм*, совпадающие по положению с максимумами поглощения разных форм БХ *in vivo*, наиболее отчетливо проявляются при высокой интенсивности действующего света и в отсутствие в культуральной среде доноров электрона [5]. При этом показано, что световым превращениям подвергается лишь небольшая часть БХ, находящаяся в активном центре и обозначенная как П890 или П870 в зависимости от типа бактерий [6].

Предполагается, что свет вызывает фотоокисление П890 и восстановление первичного акцептора неизвестной природы [2]; фотоокисленный П890 в свою очередь окисляет цитохром типа *C* [2; 5]. Измерение скорости фотоокисления цитохрома типа *C* и восстановления П890+ подтвердило эту точку зрения [7]. Световые изменения поглощения при 790

и 810 *нм* связывают с превращениями П800, который находится в комплексе с П890 [8]; фотоокисление П890 сопровождается коротковолновым сдвигом полосы поглощения при 800 *нм*. Относительно изменений при 850 *нм* известно лишь то, что при различных воздействиях они исчезают в первую очередь [5]. В опытах по термоинактивации бактерий нами было показано, что эти изменения могут быть обусловлены светоактивной частью Б850 [9]. Наличие собственной флуоресценции Б850 может указывать на то, что этот пигментный комплекс служит не только для светосбора [10].

В нашей лаборатории исследовалось действие детергентов на спектры поглощения и флуоресценции разных форм БХ в пурпурных бактериях [11]. Для выяснения вопроса о различиях в световых превращениях разных форм БХ и их связи с первичными процессами фотосинтеза мы исследовали действие малых концентраций тритона Х-100 и других детергентов на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров, выделенных из пурпурных бактерий *Chromatium*.

МЕТОДИКА

Исследования проводили в основном на изолированных хроматофорах пурпурных бактерий *Chromatium minutissimum*. В отдельных опытах для сравнения использовали также хроматофоры, выделенные из пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum* и *Rhodotheceae* sp. Условия выращивания бактерий описаны ранее [12]. Для получения хроматофоров 5-дневные клетки бактерий подвергали 3-минутному озвучиванию при —3—0° в ультразвуковом дезинтеграторе MSE (20 *кгц*, 500 *вт*); оставшиеся целые клетки и крупные клеточные обломки отделяли центрифугированием при 12 000 *g* в течение 60 *мин*. Надосадочная жидкость представляла собой концентрированный экстракт хроматофоров, а осадок после центрифугирования надосадочной жидкости при 144 000 *g* — очищенную фракцию хроматофоров. В опытах использовали образцы, содержащие 0,02—0,06 *мг/мл* БХ; содержание БХ определяли, как описано ранее [13]. Измерение фотоиндуцированных изменений поглощения хроматофоров в области 750—920 *нм* проводили на однолучевом дифференциальном спектрофотометре, собранном на основе монохроматора УМ-2 [14], а измерения в области 400—600 *нм* с помощью установки, собранной на основе ИСП-51 с приставкой ФЭП-1 [15]. Источником действующего света служила киноламна (110 *в*, 750 *вт*); максимальная интенсивность действующего света в области 570—700 *нм* составляла $2{,}3 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$. Фотоиндуцированные изменения хроматофоров, как правило, измеряли при интенсивности света $5 \cdot 10^4$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$.

В работе использовали неионогенный детергент тритон Х-100, а также другие детергенты: анионактивный — додецилсульфат натрия (ДС-Na), катионактивный — цетилтриметиламмоний бромат (ЦТАБ) и стериодный — дезоксихолат натрия (ДОХ-Na). После добавления к хроматофорам соответствующих количеств детергентов образцы инкубировали в течение 60 *мин* при комнатной температуре; фотоиндуцированные изменения поглощения достигали постоянной величины уже через 30 *мин* инкубации. Значения окислительно-восстановительного потенциала (E_h) суспензии хроматофоров измеряли с помощью платинового и каломельного электродов; платиновый электрод калибровали измерением величины E_h хингидрона при разных pH.

В приведенных дифференциальных спектрах величины изменений поглощения (ΔA) выражены в относительных единицах, а зависимость изменений поглощения при разных длинах волн от концентрации детергентов представлена в виде отношения $\Delta A'$ к величинам ΔA в отсутствие детергента, принятым за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии с известными данными [2; 6] в окислительных условиях (*трис*-буфер, pH 8,2; газовая среда — воздух) дифференциальный спектр поглощения «свет — темнота» хроматофоров *Chromatium* характеризуется увеличением поглощения при 785 *нм* и уменьшением поглощения при 810, 845 и 885 *нм* (рис. 1, *А*, кривая *1*). Все изменения обна-

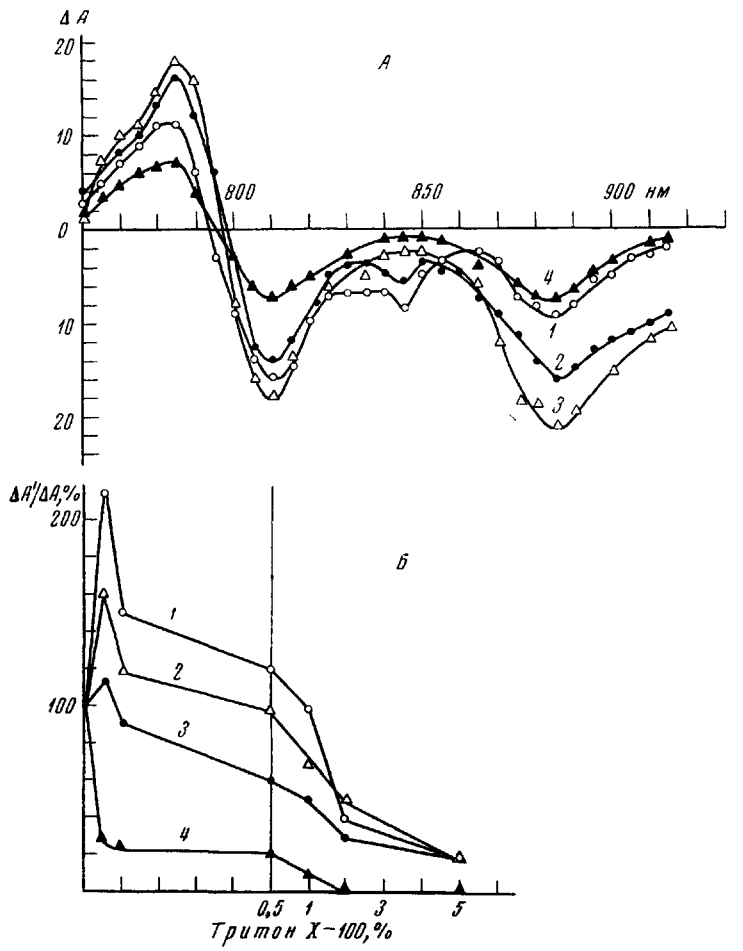


Рис. 1. Действие разных концентраций тритона X-100 на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров *Chromatium* (*А*) и зависимость фотоиндуцированных изменений поглощения при 885 (*1*), 785 (*2*), 810 (*3*) и 845 *нм* (*4*) от концентрации тритона X-100 (*Б*). Содержание БХ 0,02 *мг/мл А*: *1* — исходный образец; *2* — в присутствии 0,025, *3* — 0,05, *4* — 0,1%-ного тритона X-100

руживали сходную зависимость от интенсивности действующего света, что можно было объяснить превращениями одной формы БХ. Однако добавление детергентов оказывает различное действие на изменения поглощения при разных длинах волн [16].

Малые концентрации тритона X-100 вызывают сдвиг полосы поглощения при 865 к 830 *нм*, сопровождающийся увеличением поглощения 800 *нм* [11]. Дифференциальный спектр поглощения свет — темнота хроматофоров в присутствии 0,05% детергента значительно отличается от исходного: наблюдается исчезновение максимума при 845 *нм* и усиление изменений при 785, 810 и 885 *нм* (рис. 1, *А*, кривая *3*). Увеличение кон-

центрации тритона Х-100 вдвое (0,1%) вызывает существенное уменьшение величины изменений и при этих длинах волн (кривая *4*). Следует подчеркнуть, что появление в спектре поглощения обработанных тритоном Х-100 хроматофоров нового максимума при 830 *нм* не сопровождается появлением световых изменений поглощения при той же длине волны, т. е. форма Б830, по-видимому, не фотоактивна.

Зависимость величины фотоиндуцированных изменений поглощения при разных длинах волн от концентрации тритона Х-100 представлена на рис. 1. *Б*. Изменения при 845 *нм* исчезают при очень малых концентрациях детергента, тогда как с увеличением концентрации тритона Х-100 изменения при 785, 810 и 885 *нм* усиливаются, а затем параллельно уменьшаются и почти исчезают в присутствии 5% детергента. Следует отметить отсутствие пропорциональности в усилении изменений при 785, 810 и 885 *нм*, а также наличие фотоиндуцированных изменений при этих длинах волн в присутствии высоких концентраций тритона Х-100.

В отличие от тритона Х-100 ДС-Na действует на форму Б890, вызывая уменьшение поглощения при 890 *нм* [11]. Однако он оказывает такое же действие на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров *Chromatium*, как и тритон Х-100 (рис. 2, *А*). С увеличением концентрации детергента изменения при 845 *нм* полностью исчезают, тогда как при 885 *нм* сначала возрастают, достигая максимальной величины, а затем резко уменьшаются (рис. 2, *Б*). Изменения при 785 и 810 *нм* постоянны в области концентраций детергента, вызывающих усиление изменений при 885 *нм*.

Другие детергенты (ЦТАБ, ДОХ-Na) оказывают на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров *Chromatium* такое же воздействие, как и тритон Х-100 или ДС-Na. Более того, фотоиндуцированные изменения поглощения при 785—810 и при 865 *нм* у хроматофоров, выделенных из *R. rubrum,* или при 900 *нм* у хроматофоров, выделенных из *Rhodotheceae sp.,* обнаруживают такую же зависимость от концентрации добавленного тритона Х-100, как и соответствующие изменения поглощения хроматофоров *Chromatium*. Фотоиндуцированные изменения при 850 *нм* у хроматофоров из *R. rubrum* и *Rhodotheceae* sp. не обнаруживаются.

Следует отметить сходство в изменении поглощения при 845 и 485 *нм* от концентрации детергентов (рис. 2,*Б*, кривые *4* и *5*). В отсутствие детергентов изменения при 845 *нм* более отчетливо проявляются при добавлении к хроматофорам небольшого количества доноров электрона — аскорбата натрия или сульфида натрия. В отличие от изменений при 785, 810 и 885 *нм* изменения при 845 *нм* исчезают при —196°.

В связи со сложным действием детергентов на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров в области 750—920 *нм* представляло интерес исследование более подробной зависимости этих изменений от концентрации детергента. Как видно из рис. 3, *А*, в присутствии очень малых концентраций тритона Х-100 (0,005—0,007%) наблюдается уменьшение изменений при 785, 810 и 885 *нм*. Лишь последующее увеличение концентрации детергента ведет к усилению этих изменений. Максимальная величина изменений при указанных длинах волн наблюдается в 0,1%-ном тритоне Х-100 (различие с рис. 1, *Б* связано с бóльшим содержанием БХ в образце, см. подпись к рис. 3, *А*). Фотоиндуцированные изменения при 845 *нм* исчезают в присутствии 0,01%-ного тритона Х-100; кажущееся наличие изменений при 845 *нм* при концентрации тритона Х-100 более 0,01% обусловлено фоном, создаваемым наложением изменений при 810 и 885 *нм*. Именно усиление этого фона в связи с усилением изменений при 810 и 885 *нм* при увеличении концентрации тритона Х-100 до 0,1% приводит к кажущемуся усилению изменений при 845 *нм* (рис. 3, *А*).

Концентрации детергентов, при которых наблюдается ослабление или усиление величины фотоиндуцированных изменений поглощения при раз-

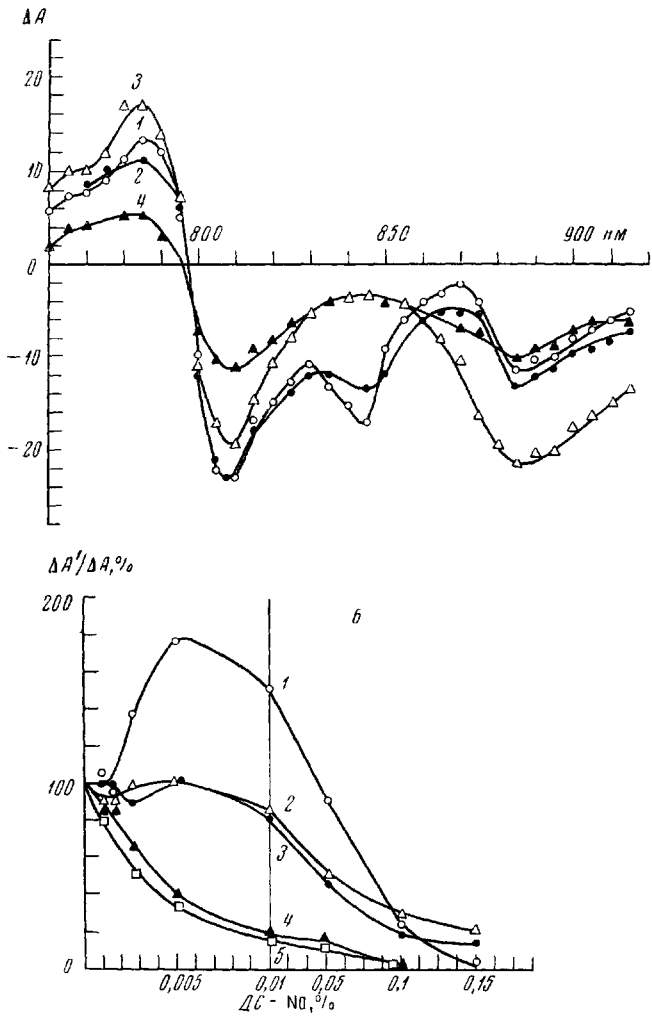


Рис. 2. Действие разных концентраций ДС-Na на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров *Chromatium* (*А*) и зависимость изменений при 885 (*1*), 785 (*2*), 810 (*3*), 845 (*4*) и 485 *нм* (*5*) от концентрации ДС-Na (*Б*). Содержание БХ 0,02 *мг/мл*. *А*: *1* — исходный образец; *2* — в присутствии 0,001, *3* — 0,005, *4* — 0,05%-ного ДС-Na

ных длинах волн, существенно зависят не только от содержания БХ в образце, но и от наличия в среде доноров электрона и состояния хроматофоров. Так, в присутствии 0,5 *мг/мл* аскорбата натрия резко меняется характер зависимости фотоиндуцированных изменений поглощения от концентрации тритона Х-100 (рис. 3, *Б*): небольшое усиление изменений в области концентраций 0,005—0,007%-ного тритона Х-100 сменяется резким снижением величины этих изменений с увеличением концентрации детергента и их исчезновением уже при 0,5%-ном тритоне Х-100.

Добавление аскорбата натрия к хроматофорам вызывает сдвиг E_h среды от 420 до 100 *мв*, что сопровождается усилением величины фотоиндуцированных изменений при 845 *нм*, появлением изменений при 865 *нм*, небольшим уменьшением изменений при 785 и 810 *нм* и существенным уменьшением изменений при 885 *нм* (рис. 4, кривые *1*, *3*). При добавлении аскорбата натрия к хроматофорам, к которым ранее был добавлен тритон Х-100 в количестве, вызвавшем максимальное усиление изменений при 885 *нм* (рис. 4, кривая *2*), происходит почти полное исчезновение

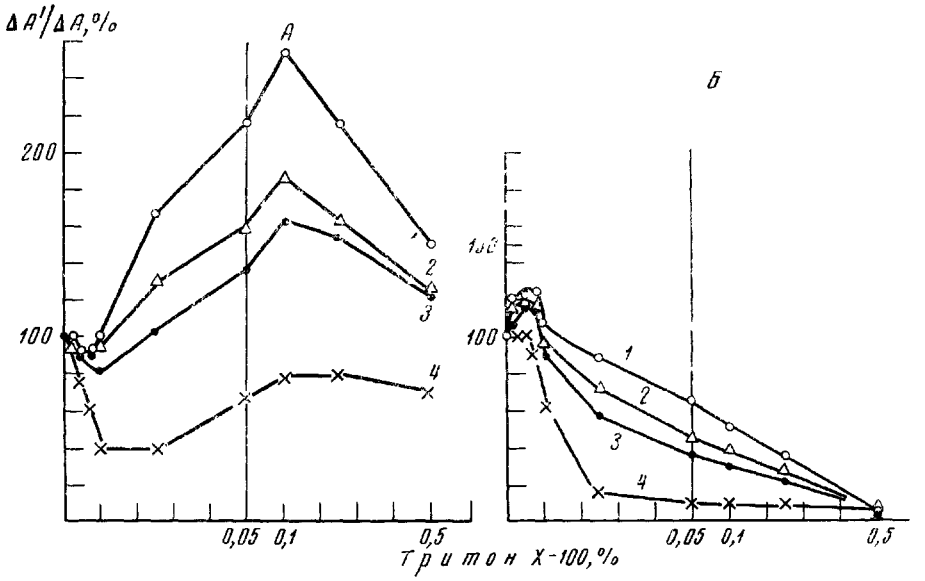
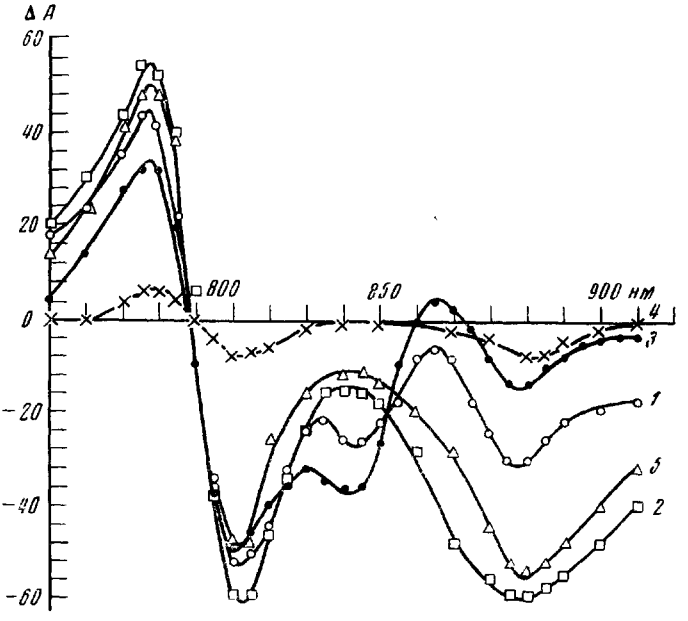


Рис. 3. Зависимость фотоиндуцированных изменений поглощения хроматофоров *Chromatium* при 885 (*1*), 785 (*2*), 810 (*3*) и 845 *нм* (*4*) от концентрации тритона Х-100 в отсутствие восстановителя (*А*) и в присутствии 0,5 *мг/мл* аскорбата натрия (*Б*). Содержание БХ 0,06 *мг/мл*



Рит. 4. Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» хроматофоров *Chromatium*. *1* — исходный образец; *2* — в присутствии 0,05%-ного тритона Х-100; *3* — в присутствии 0,5 *мг/мл* аскорбата натрия; *4* — в присутствии 0,05%-ного тритона Х-100 и 0,5 *мг/мл* аскорбата натрия; *5* — после добавления к предыдущему образцу феррицианида. Содержание БХ 0,06 *мг/мл*

спектральных изменений (рис. 4, кривая *4*). Этот эффект обратим: последующее добавление небольшого количества феррицианида, смещающего E_h от 100 *мв* до исходной величины (420 *мв*), вызывает появление фотоиндуцированных изменений поглощения при 785, 810 и 885 *нм* (рис. 4, кривая *5*).

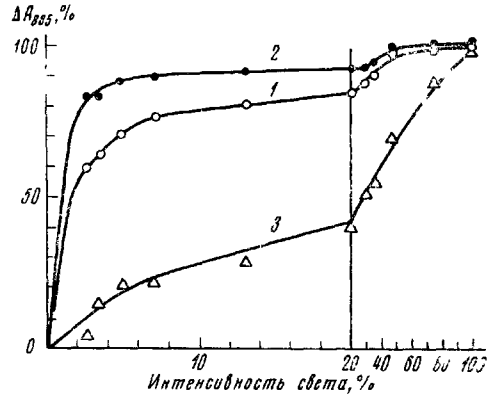


Рис. 5. Зависимость величины фотоиндуцированных изменений поглощения при 885 *нм* хроматофоров *Chromatium* от интенсивности действующего света. *1* — исходный образец; *2* — в присутствии 0,05 и *3* — 1%-ного тритона Х-100. Максимальная интенсивность действующего света $2{,}3 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$

В присутствии 0,05%-ного тритона Х-100 световые изменения поглощения при 885 *нм* (в отсутствие донора электрона) насыщаются при меньших интенсивностях освещения, чем изменения при 885 *нм* исходного образца (рис. 5). При больших концентрациях тритона Х-100 (1%) изменения при 885 *нм* медленно увеличиваются с усилением интенсивности освещения и далеки от насыщения даже при максимальной интенсивности действующего света.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

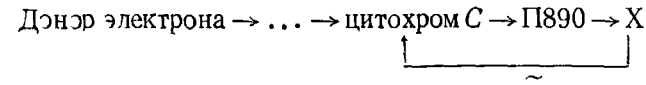
На основании исследования действия детергентов выявлено различие в фотоиндуцированных изменениях поглощения в области 750—920 *нм*, обусловленных фотопревращениями разных форм БХ. Особенно резко отличаются изменения при 845 *нм* от изменений при 785—810 и 885 *нм*. В свою очередь изменения при 785—810 и 885 *нм* также несколько различаются по зависимости от концентрации детергентов.

Использованные в работе детергенты относятся к различным типам и в больших концентрациях действуют на разные компоненты структуры фотосинтетического аппарата, что проявляется в различном влиянии детергентов на спектры поглощения хроматофоров [11; 17]. Тем не менее все эти детергенты в малых концентрациях оказывали сходное действие на дифференциальные спектры поглощения свет — темнота хроматофоров, выделенных из разных типов пурпурных бактерий, что может свидетельствовать о едином механизме действия малых концентраций детергентов на световые реакции фотосинтеза. Отметим, что характер зависимости изменений при разных длинах волн от концентрации детергентов был одинаков как для неочищенного, так и очищенного препаратов хроматофоров.

Рассмотрим последовательно возможную природу процессов, обусловливающих различный характер фотоиндуцированных изменений поглощения при 885, 785—810 и 845 *нм* в зависимости от концентрации тритона Х-100. Изменения при 885 *нм* у хроматофоров *Chromatium* обусловлены фотоокислением П890 [6], и величина изменений при 885 *нм* при интенсивном освещении хроматофоров в отсутствие детергента отражает количество П890, находящегося в окисленном состоянии. В присутствии детергентов обнаруживается сложная зависимость изменений при 885 *нм* от концентрации детергентов, в которой можно различить 3 стадии.

1. Снижение величины фотоиндуцированных изменений при 885 *нм* в присутствии малых концентраций тритона Х-100 (до 0,007%) может

быть обусловлено разобщающим действием детергента в этих концентрациях. Известно, что у хлоропластов полное разобщение нециклического фотофосфорилирования имеет место в 0,007%-ном тритоне X-100 [18]. У хроматофоров пурпурных бактерий разобщение фотофосфорилирования с аскорбатом натрия происходит в присутствии 0,007, а фотофосфорилирования с феназинметасульфатом — 0,01%-ного тритона X-100 [19] В отличие от хлоропластов хроматофоры пурпурных бактерий способны в течение довольно длительного времени к циклическому фотофосфорилированию без добавления экзогенных кофакторов или субстратов [20]. В наших опытах максимальное уменьшение величины изменений при 885 *нм*, вызванное, по-видимому, ускорением потока электронов в результате разобщающего действия детергента, наблюдается при концентрации 0,005—0,007%-ного тритона X-100. Очевидно, различия в концентрационной зависимости фотофосфорилирования и световых изменений поглощения могут определяться содержанием БХ в образце, наличием экзогенных доноров электрона и состоянием хроматофоров. Разобщение может быть не единственной причиной уменьшения величины изменений при 885 *нм*: структурные изменения хроматофоров под действием детергентов могут вызвать ускорение потока электронов, не связанное с фотофосфорилированием, или же нарушение акцепторной части цепи переноса — после X (см. схему). Снижение величины фотоиндуцированных изменений при 885 *нм* после добавления малых количеств тритона X-100 не связано со снижением поглощения при 890 *нм*, которое начинает проявляться при концентрациях тритона X-100 более 0,01%.



2. Усиление изменений при 885 *нм* с увеличением концентрации детергента можно приписать нарушению донорной части цепи переноса электрона до цитохрома *C* (см. схему). Замедление скорости восстановления $П890^+$ вызывает его быстрое накопление, и в большем количестве, чем в отсутствие детергента, т. е. в окисленном состоянии накапливаются и те молекулы П890, которые ранее функционировали и потому не могли быть обнаружены спектрально. На нарушение донорной части цепи переноса, возможно, указывает тот факт, что изменения при 885 *нм* в присутствии 0,05%-ного тритона X-100 «насыщаются» при меньшей интенсивности освещения, чем изменения у исходных хроматофоров в отсутствие детергента. Имеются указания [19], что тритон X-100 вызывает экстракцию убихинона, который, как предполагается, является не только компонентом фотосинтетической цепи переноса электрона у бактерий, но и кофактором фотофосфорилирования. Отметим, что усиление изменений при 885 *нм* в присутствии 0,01—0,1%-ного тритона X-100 может быть вызвано также резким увеличением доступа кислорода к П890 или акцепторной части цепи переноса электрона. При действии детергентов на хроматофоры обнаруживается различная степень ослабления и усиления изменений при 885 *нм*, что зависит от состояния хроматофоров и их способности к реакциям фотосинтеза. Чем больше колебания величины изменений при 885 *нм* в присутствии соответствующих концентраций тритона X-100, тем выше эффективность фотофосфорилирования и функционирования цепи переноса электрона исходных хроматофоров.

3. Снижение величины изменений при 885 *нм* после достижения максимального уровня может быть обусловлено нарушением активного центра, ведущим к уменьшению скорости фотовосстановления экзогенного акцептора [21]. При концентрациях детергентов, вызывающих подоб-

ное уменьшение величины изменений при 885 *нм*, происходит изменение состояния БХ, что вызывает вторичное увеличение скорости фотовосстановления искусственного акцептора, когда эффективность функционирования П890 очень низка [21].

Таким образом, в кривой зависимости изменений поглощения при 885 *нм* от концентрации детергентов можно выделить 3 стадии, каждая из которых обусловлена подавлением определенной части цепи переноса электрона. Действие детергентов на хроматофоры связано с их адсорбцией на мембранах. Это вызывает структурные изменения мембран, сопровождающиеся увеличением их проницаемости вследствие образования пор [22]. Именно увеличение проницаемости мембран в присутствии детергентов приводит к резкому уменьшению световых изменений поглощения после добавления аскорбата натрия, вызывающего восстановление акцепторной части цепи переноса электрона, что препятствует фотоокислению формы П890 (рис. 5). При последующем окислении донора электрона феррицианидом изменения поглощения при 885 *нм* вновь проявляются.

Изменения поглощения при 785 и 810 *нм* обусловлены фотопревращениями П800, находящегося в комплексе с П890 [8], т. е. изменения при 785 и 810 и при 885 *нм* должны иметь сходную зависимость от действия различных факторов, что и наблюдается в действительности. Однако на фоне общего сходства указанные изменения несколько различаются. Так, изменения при 785 и 810 *нм* усиливаются в меньшей степени, чем изменения при 885 *нм*, а изменения при 810 *нм* в некоторых случаях остаются постоянными при концентрациях детергентов, вызывающих существенное усиление изменений при 785 *нм*. Очевидно, изменения при 785 и 810 *нм* имеют более сложную природу и обусловлены не только «синим» сдвигом полосы при 800 *нм*, сопровождающим фотоокисление П890; они могут быть частично связаны и с другим процессом, например с изменением состояния Б800 в результате фотодезагрегации.

По нашим данным, фотоиндуцированные изменения при 845 *нм* исчезают примерно при тех же концентрациях тритона Х-100, при которых утрачивается способность хроматофоров к фотофосфорилированию [19]. Ранее связь между фотосинтетической активностью хроматофоров и изменениями при 845 *нм* была прослежена нами по сходной зависимости от термоинактивации [9]. Хранение хроматофоров также сопровождается потерей их способности к фотофосфорилированию и к изменениям при 845 *нм*. Добавление аскорбата или сульфида натрия восстанавливает способность хроматофоров к фотофосфорилированию [19] и к изменениям поглощения при 845 *нм*, а также ведет к появлению фотоиндуцированных изменений при 865 и 905 *нм* [16]. Фотопревращения каротиноидов при 485 *нм* обнаруживают сходную зависимость с превращениями формы Б850. Можно предположить, что форма Б850 в комплексе с каротиноидами связана с протеканием реакций фотофосфорилирования, и фотоиндуцированные изменения при 845 и 485 *нм*, а также при 865 *нм* могут служить показателем способности хроматофоров к фотофосфорилированию [23]. Связь фотопревращения каротиноидов с реакциями фотофосфорилирования была показана ранее [24].

Таким образом, на основании исследования действия малых концентраций детергентов на фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров в области 750—920 *нм* показано, что эти изменения, обусловленные фотопревращениями разных форм БХ, связаны с их участием в разных световых реакциях фотосинтеза. По степени ослабления или усиления величины изменений при 885 *нм* под действием соответствующих концентраций тритона Х-100 можно судить о способности хроматофоров к фотофосфорилированию и эффективности функционирования фотосинтетической цепи переноса электрона хроматофоров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wassink E. C., Katz E., Dorrestein R., Enzymologia **7**, 113, 1939
2. Duysens L. N. M., Thesis, Utrecht, 1952
3. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К., Докл. АН СССР **70**, 1201, 1953
4. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика **8**, 446, 1963
5. Duysens L. N. M., Huiskamp W. J., Wos J. J., van der Hart J. M.,— Biochim. et biophys. acta, **19**, 188, 1956
6. Clayton R. K., Photochem. Photobiol. **1**, 201, 1962
7. Parson W., Biochim. et biophys. acta **153**, 248, 1968
8. Clayton R. K., Sistrom W. R., Photochem. Photobiol. **5**, 661, 1966
9. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР **171**, 1201, 1966
10. Карапетян Н. В., Красновский А. А., Докл. АН СССР **180**, 989, 1968
11. Ерохин Ю. Е., Синегуб О. А., Мол. биол. **4**, 541, 1970
12. Кондратьева Е. Н., в кн.: Фотосинтезирующие бактерии, Изд. АН СССР, М., 1963
13. Cohen-Bazire G., Sistrom W. R., Stanier R. L., J. Cell. Comparative Physiol. **49**, 25, 1957
14. Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Биофизика **8**, 191, 1963
15. Карапетян Н. В., Климов В. В., Физиол. растений **18**, 223, 1971
16. Karapetyan N. V., in: Progress in Photosynthesis Research, p. 778, Tubingen, 1969
17. Bril C.— Thesis, Utrecht, 1964
18. Vernon L. P., Shaw E., Plant Physiol. **40**, 1269, 1965
19. Horio T., Yamashita J., Biochim. et biophys. acta **88**, 237, 1964
20. Nozaki M., Tagawa K., Arnon D. I., in: Bacterial Photosynthesis, p. 175, Antioch Press, 1963
21. Карапетян Н. В., Кольтовер В. К., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Биофизика **16**, 1146, 1971
22. Deamer D. W., Crofts A. R., J. Cell. Biology **33**, 395, 1967
23. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., в сб.: Проблемы биофотоники. Тр. I Всес. конф. по биофотонике, М., МГУ, 1970
24. Jackson J. B., Crofts A. R., FEBS Letters **4**, 185, 1969

Поступила в редакцию
9.XII 1971

DETERGENTS ACTION UPON LIGHT INDUCED ABSORPTION CHANGES OF CHROMATOPHORES FROM *CHROMATIUM MINUTISSIMUM*

N. V. KARAPETYAN, I. N. KRACHMALEVA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The action of detergents upon ligth induced absorption changes of *Chromatium* chromatophores at 750—920 *nm* were investigated. The changes at 785—810, 845 and 885 *nm*, due to phototransformations of various bacteriochlorophyll forms, show different behaviour from Triton X-100 concentrations. 3 phases are observed in the dependence curve of changes at 885 *nm* from Triton X-100 concentrations that are ascribed to photophosphorylation uncoupling, damaging of donor part of electron thansport chain or destruction of reaction center. Perhaps, the degree of reducing or enhancement of light induced changes at 885 *nm* upon action of suitable concentrations of Triton X-100 indicate the capacity of chromatophores to various ligth reactions of photosynthesis, while ligth induced changes at 845 *nm* appears to be bound up with photophosphorylation. The form B830 that appears in presence of Triton X-100 is not photoactive. Other detergents influence in the same manner on light induced absorption changes of chromatophores isolated from *Chromatium* and other types of purple bacteria.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 19, вып. 1 1972 г.

УДК 581 (132.1+154) : 635.67

ИНДУКЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ПРОЦЕССЕ ЗЕЛЕНЕНИЯ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ: НОРМАЛЬНЫЕ И МУТАНТНЫЕ РАСТЕНИЯ КУКУРУЗЫ

В. В. КЛИМОВ, Ф. ЛАНГ, Н. В. КАРАПЕТЯН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Московский университет им. М. В. Ломоносова

Исследовали фотоиндуцированные изменения флуоресценции зеленеющих и зеленых листьев нормальных и мутантных растений кукурузы.

Фотоиндуцированные изменения флуоресценции, выделение кислорода и образование длинноволнового максимума флуоресценции наблюдались у нормальных растений после 2,5—3 час., у ликопинового мутанта — после 4—5 час., а у ξ-каротинового мутанта — после 12 час. освещения этиолированных листьев. Зеленые листья обоих мутантов способны на свету выделять кислород, но с меньшей скоростью, чем нормальные листья. Фотоиндуцированные изменения флуоресценции у мутантов по сравнению с таковыми у нормальных растений меньше по величине и отличаются от них по кинетике. Одновременное появление у зеленеющих нормальных и мутантных листьев способности к изменению флуоресценции и выделению кислорода, их параллельное возрастание при зеленении и уменьшение в результате фотоингибирования указывают на тесную связь индукции флуоресценции с процессами фотосинтеза.

Предполагается, что малая фотосинтетическая активность исследованных мутантов определяется в первую очередь недостаточным функционированием фотосистемы 2.

В работах последних лет показано, что за индукцию флуоресценции листьев и водорослей ответственна фотосистема 2 [1], а отдельные стадии сложной кинетики фотоиндуцированных изменений флуоресценции отражают взаимодействие двух фотосистем через фотосинтетическую цепь переноса электрона [2, 3]. Исследования индукции флуоресценции в процессе развития фотосинтетического аппарата при зеленении этиолированных листьев позволили установить, что индукция флуоресценции [4] и способность листьев выделять кислород [5] наблюдаются лишь после 3 час. зеленения этиолированных листьев. К этому же времени в низкотемпературных спектрах флуоресценции листьев обнаруживается возрастание длинноволнового максимума при 720 *нм*, указывающее на образование агрегированного хлорофилла [5]. Именно с момента появления эффекта индукции флуоресценции наблюдается взаимодействие двух фотосистем, проявляющееся в антагонистическом действии красного и дальнего красного света на выход флуоресценции [6]. В то же время взаимодействие фотосистем по эффекту Эмерсона проявляется позже появления способности листьев к выделению кислорода, что может быть обусловлено трудностью обнаружения этого эффекта [7]. Следует отметить, что и длительное послесвечение растений также обнаруживается после 2,5—3-часового зеленения [8].

Представляло интерес провести подобные исследования на листьях мутантных растений, характеризующихся различным пигментным составом и малой фотосинтетической активностью. Комплексное исследование развития способности листьев к индукции флуоресценции и выделению кислорода в процессе зеленения с одновременным определением состоя-

ния хлорофилла и структуры фотосинтетического аппарата позволило бы не только получить дополнительную информацию о механизме индукции флуоресценции и ее связи с фотосинтетической активностью и состоянием хлорофилла, но и более полно охарактеризовать первичные процессы фотосинтеза мутантных растений.

Ранее изучалось образование хлорофилла и формирование хлоропластов в листьях нормальных, ликопиновых и ξ-каротиновых растений кукурузы [9, 10]. У мутантных листьев агрегированные формы накапливающегося хлорофилла отличаются от таких у нормальных растений [9], что, по-видимому, определяет высокую светочувствительность мутантов [11]. Листья обоих мутантов способны на свету включать CO_2, но с гораздо меньшей активностью по сравнению с нормальными листьями [12]. Исследование способности мутантов к индукции флуоресценции в сочетании с исследованием выделения кислорода могло бы дать ответ на вопрос, обусловлена ли малая фотосинтетическая активность мутантов блокированием световых реакций фотосинтеза.

В предыдущей статье [3] мы описали возможную природу отдельных компонентов кинетики фотоиндуцированных изменений флуоресценции зеленых листьев нормальных растений кукурузы. В настоящей работе приведены данные по появлению и развитию способности к индукции флуоресценции и к выделению кислорода у зеленеющих и зеленых листьев нормальных и мутантных растений кукурузы, а также данные о различиях в кинетике фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции указанных объектов.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили этиолированные, зеленеющие и зеленые листья нормальных растений кукурузы и листья ликопинового и ξ-каротинового мутантов. Свойства этих мутантов, не способных синтезировать β-каротин, описаны ранее [9, 10]. Растения выращивали в темноте при 26°; при исследовании зеленения 8—10-дневные этиолированные проростки освещали светом низкой интенсивности (25 *лк*) в течение различных интервалов времени. Низкая интенсивность освещения, использованная в связи с высокой светочувствительностью мутантов, позволила замедлить процесс зеленения и более четко выделить отдельные его стадии.

Кинетику фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции с длиной волны больше 710 *нм* листьев кукурузы регистрировали осциллографически с помощью двухлучевой установки [13]. Флуоресценция, возбуждаемая слабым монохроматическим светом (650 *нм*, 50 *эрг/см²·сек*), изменялась при освещении листьев интенсивным действующим светом, направленным перпендикулярно к возбуждающему лучу. Конструкция установки, условия освещения и измерения подробно описаны ранее [3, 13]. Отметим лишь, что использование дополнительной модуляции монохроматического луча, возбуждающего флуоресценцию объекта, усиление и регистрация лишь модулированного компонента сигнала позволили исключить регистрацию послесвечения и других побочных эффектов действующего света

Листья, осторожно прижатые пленкой к плексигласовой пластинке, помещали во внутренний цилиндр фосфороскопа. Листья можно было не отделять от растения, что давало возможность использовать один и тот же лист в течение всего процесса зеленения. При измерении фотоиндуцированных изменений флуоресценции листья освещали действующим светом 600—700 *нм* ($1{,}5 \cdot 10^6$ *эрг/см²·сек*), который эффективнее поглощается фотосистемой 2 (свет 2), или светом $\lambda > 710$ *нм* ($1{,}7 \cdot 10^6$ *эрг/см²·сек*), где в основном поглощает фотосистема 1 (свет 1).

В опытах вначале регистрировали исходный, «темновой» уровень флуоресценции, возбуждаемой светом 650 *нм*; величину «темнового» уровня флуоресценции принимали за единицу (уровень 1,0 на оси ординат на рисунках). Вызываемые действующим светом изменения выхода флуоресценции на всех рисунках (за исключением рис. 3) приведены по отношению к исходному уровню.

Фотосинтетическую активность листьев в процессе зеленения определяли по скорости выделения кислорода, измеряемого амперометрически [14]. Полярографическая ячейка состояла из платинового (10×5 *мм*) и хлорсеребряного электродов; измерение скорости выделения кислорода проводили при подаче на платиновый электрод потенциала — 0,6 *в*. Сигнал, обусловленный выделением кислорода при освещении листа, помещенного на платиновый электрод, регистрировали с помощью потенциометра ЭПП-09 с повышенной чувствительностью. Низкотемпературные спектры флуоресценции зеленеющих листьев измеряли на регистрирующем спектрофлуорометре [15]. Следует отметить, что индукцию флуоресценции, скорость выделения кислорода и спектр флуоресценции измеряли последовательно на одном и том же листе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При освещении этиолированных, нормальных и мутантных листьев действующим светом 2 наблюдалось значительное увеличение интенсивности флуоресценции $\lambda > 710$ *нм*, возбуждаемой светом 650 *нм* (рис. 1). Это явление, однако, не связано с функционированием фотосинтетической цепи переноса электрона, так как этиолированные листья не способны выделять кислород. Это увеличение флуоресценции необратимо и исчезает при предварительном освещении этиолированного листа в течение нескольких минут. Наблюдаемое усиление флуоресценции $\lambda > 710$ *нм* связано с фотопревращением протохлорофиллида в хлорофиллид, которое сопровождается длинноволновым спектральным сдвигом максимума флуоресценции, а последующее уменьшение флуоресценции на свету обусловлено, по-видимому, фотовыцветанием свежеобразованного хлорофиллида [9, 16].

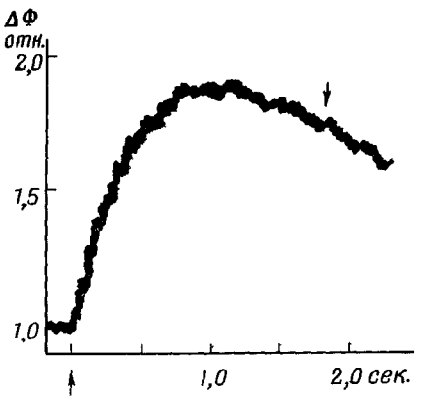


Рис 1 Изменение интенсивности флуоресценции $\lambda > 710$ *нм* при освещении этиолированного листа кукурузы действующим светом 600—700 *нм*

Здесь и далее стрелками обозначены моменты включения и выключения действующего света

Первые обратимые в темноте световые изменения выхода флуоресценции у нормальных листьев удалось зарегистрировать лишь через 2,5 часа зеленения (рис. 2). До этого момента освещение действующим светом не вызывало никаких изменений флуоресценции. В ходе дальнейшего зеленения величина изменений флуоресценции постепенно возрастала, а кинетика изменений приближалась к кинетике, характерной для зеленого листа. После 6 час. освещения уже различались несколько фаз в индукционной кривой: быстрый подъем, небольшой спад и последующее медленное возрастание флуоресценции (см. рис. 2, *А*, кривая *2*). Все эти фазы наиболее отчетливо проявлялись у листьев через 12 час. зеленения (см. рис. 2, *А*, кривая *3*). После 24 час. зеленения индукционная кривая нормальных листьев близка к индукционной кривой флуоресценции зеленых листьев (см. рис. 2, *А*, кривая *4*). В этом случае после возрастания флуоресценции до максимального уровня наблюдается спад до стационарного уровня, который не проявлялся раньше у листьев до 12 час. освещения.

Следует отметить, что рост переменной флуоресценции в процессе зеленения происходил главным образом за счет увеличения медленной составляющей фотоиндуцированных изменений флуоресценции. На рис. 2, *А* можно видеть, что если в начале зеленения (3—6 час.) доля быстрого первоначального подъема достигала 30—40% всей переменной флуоресценции, то затем она уменьшалась и после 24 час. зеленения составляла лишь 5—10%.

В процессе зеленения ликопиновых и ξ-каротиновых листьев также наблюдалось возрастание величины переменной флуоресценции.

Способность листьев к выделению кислорода появлялась в тот момент, когда удавалось наблюдать индукцию флуоресценции. В процессе зеленения скорость выделения кислорода нормальными листьями росла параллельно величине световых изменений флуоресценции (рис. 3, *А*). При фотоингибировании зеленеющих листьев наблюдалось параллельное уменьшение и одновременное исчезновение способности листьев к выделению кислорода и индукции флуоресценции по мере увеличения длительности фотоингибирования (рис. 3, *Б*).

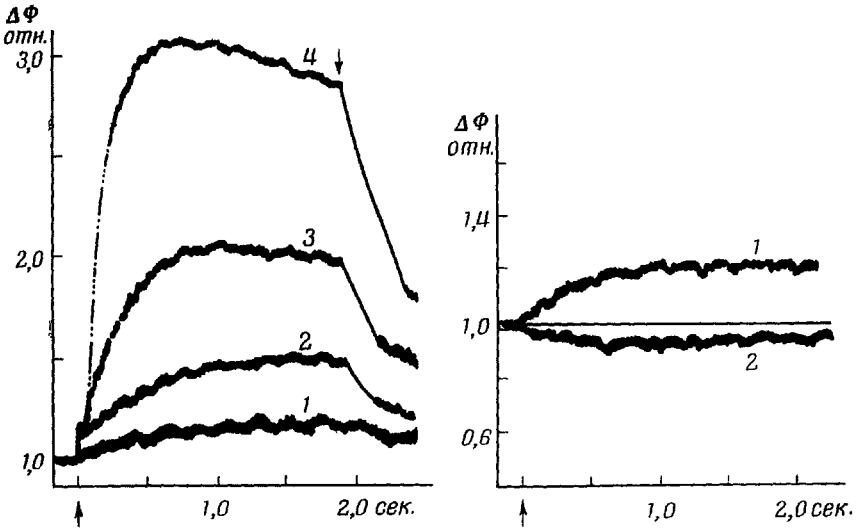


Рис. 2. Слева — кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции листьев нормальных растений кукурузы в процессе зеленения
1 — 2,5, *2* — 6, *3* — 12, *4* — 24 часа зеленения
Справа — фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции листьев кукурузы через 2,5 часа зеленения

1 — действующий свет 600—700 *нм*, аэробные условия; *2* — действующий свет $\lambda > 710$ *нм*, анаэробные условия

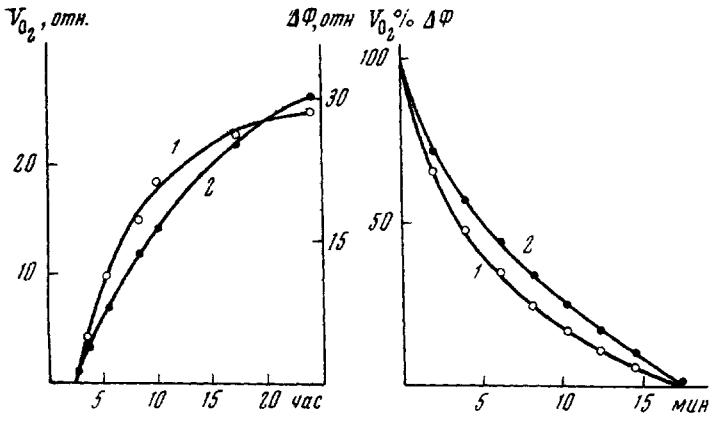


Рис. 3

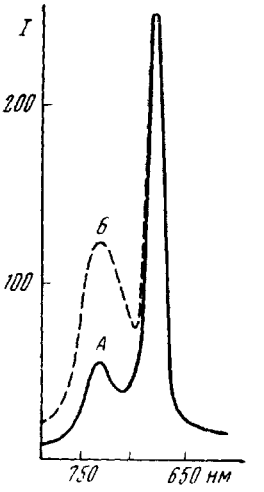


Рис. 4

Рис. 3. Скорость выделения кислорода (*1*) и величина фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции (*2*)

Слева — в процессе зеленения нормальных листьев кукурузы (освещение этиолированных листьев светом 25 *лк*), справа — в результате фотоингибирования зеленых листьев нормальных растений кукурузы в течение различного времени (освещение интенсивным «белым» светом $4{,}3 \cdot 10^6$ *эрг/см² · сек* в анаэробных условиях)

Рис. 4. Низкотемпературные спектры флуоресценции зеленеющих нормальных листьев кукурузы

А — до 2 час. зеленения (листья не способны к выделению кислорода и индукции флуоресценции), *Б* — через 2,5 часа зеленения (в момент появления фотосинтетической активности)

Измерение низкотемпературных спектров флуоресценции зеленеющего листа кукурузы показало (рис. 4), что в момент появления способности листа к световым изменениям флуоресценции и выделению кислорода происходит возрастание длинноволнового максимума флуоресценции при 735 *нм*, обусловленного образованием высокоагрегированного хлорофилла *а* [16]. Такая синхронность наблюдалась и для мутантов, но через более длительное время зеленения: через 4—5 час. у листьев ликопинового мутанта и через 12 час.— у ξ-каротинового.

Величины фотоиндуцированных изменений флуоресценции нормальных и мутантных листьев растений, выращенных на свету, существенно отличались. Если у нормальных листьев величина световых изменений

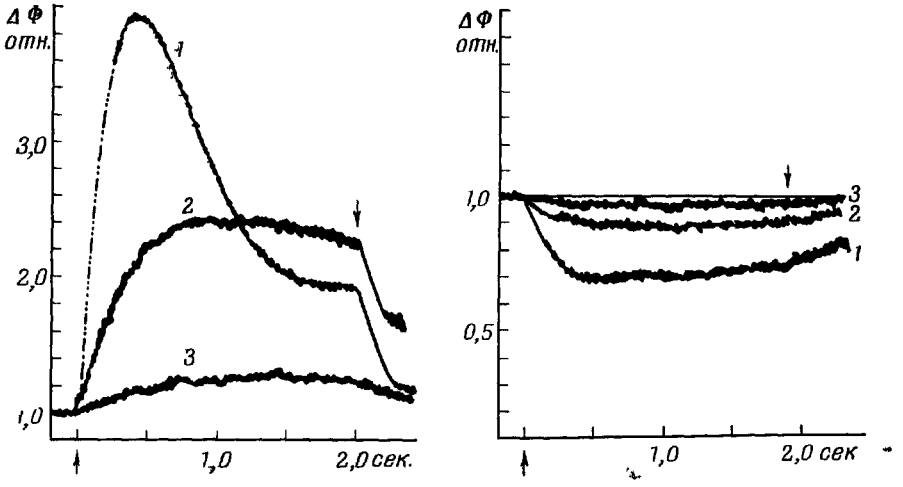


Рис. 5. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции зеленых листьев кукурузы при освещении действующим светом 600—700 *нм* в аэробных условиях (слева) и светом $\lambda > 710$ *нм* в анаэробных условиях (справа)

1 — нормальное растение, *2* — ликопиновый мутант, *3* — ξ-каротиновый мутант

флуоресценции по отношению к «темновому» уровню достигала 250—300%, то у ликопиновых и ξ-каротиновых листьев эта величина составляла соответственно 100—150 и 10—15% (рис. 5, *А*). Фотоиндуцированные изменения флуоресценции мутантов существенно отличались по кинетике от изменений флуоресценции нормальных растений.

1. При примерно равной величине быстрого компонента увеличения флуоресценции у нормальных и ликопиновых листьев (рис. 5, *А*) величина медленного компонента изменений флуоресценции ξ-каротинового мутанта наблюдается лишь медленное усиление флуоресценции на свету.

2. Нарастание фотоиндуцированных изменений флуоресценции до максимума у мутантных листьев происходит медленнее, чем у нормальных (1 сек. против 0,5 сек.).

3. Спад после достижения максимального уровня флуоресценции у мутантных листьев происходит гораздо медленнее, чем у нормальных.

Нормальные и мутантные листья сильно отличаются также по скорости выделения кислорода (рис. 6). У нормальных и ликопиновых листьев скорость выделения кислорода достигает максимальной величины через 6—8 мин. освещения, а затем медленно уменьшается. Но если у нормальных листьев стационарная скорость устанавливается довольно быстро, то у ликопиновых листьев стационарный уровень не достигается и через 30 мин. освещения (см. рис. 6, кривая *2*), что связано, по-видимому, с фотоингибированием или выцветанием хлорофилла листа мутанта. Скорость выделения кислорода ξ-каротинового мутанта достигает лишь 3—5% от таковой нормального листа (см. рис. 6 кривая *3*); выделе-

ние кислорода наблюдалось только у хорошо развитых зеленых листьев ξ-каротинового мутанта.

Когда зеленеющие листья нормальных и мутантных растений кукурузы впервые обнаруживают способность к усилению флуоресценции при освещении светом 2, можно наблюдать и уменьшение выхода флуоресценции при освещении листьев светом 1 (см. рис. 2, *Б*). Уменьшение выхода флуоресценции наблюдается только при освещении светом 1 в анаэробных условиях. У зеленых листьев ликопинового и ξ-каротинового мутантов этот эффект меньше по величине, чем у нормальных зеленых листьев (см. рис. 5, *Б*).

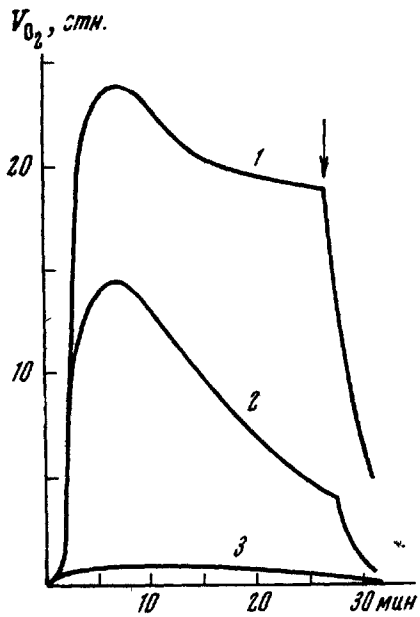


Рис. 6. Кинетика скорости выделения кислорода зелеными листьями кукурузы нормального растения (*1*), ликопинового мутанта (*2*) и ξ-каротинового мутанта (*3*) при освещении красным светом насыщающей интенсивности ($3 \cdot 10^5$ *эрг/см²·сек*)

Инкубация этиолированных листьев в 10^{-5} *М* растворе диурона не влияла на необратимое увеличение флуоресценции, наблюдаемое при освещении этих листьев. На индукцию флуоресценции зеленеющих и зеленых листьев нормальных и мутантных растений диурон оказывал такое же действие, какое ранее наблюдалось на зеленых листьях нормальных растений кукурузы [3]. В присутствии диурона величина изменений флуоресценции, вызываемых светом 2, не возрастала, так как для этих изменений интенсивность света была насыщающей. Однако вместо сложной переходной кривой индукции флуоресценции наблюдается лишь быстрый подъем выхода флуоресценции до максимального стационарного уровня.

Уменьшение выхода флуоресценции, вызываемое светом 1, полностью исчезало в присутствии диурона как у зеленых, так и у зеленеющих листьев нормальных и мутантных растений кукурузы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные показывают, что обратимые фотоиндуцированные изменения флуоресценции связаны с процессами фотосинтеза и что величина этих изменений может служить хорошим показателем активности фотосинтегического аппарата. Об этом свидетельствуют одновременное появление способности к изменениям флуоресценции и к выделению кислорода у зеленеющего листа, их параллельное возрастание в процессе зеленения и уменьшение в результате фотоингибирования, а также соотношение величин переменной флуоресценции и скорости выделения кислорода у нормальных и мутантных растений.

Лишь обратимые изменения флуоресценции связаны с функционированием фотосинтетического аппарата. Необратимые изменения флуоресценции $\lambda > 710$ *нм* при освещении этиолированного листа были обусловлены спектральными сдвигами в результате фотопревращений протохлорофиллида в хлорофиллид. Этиолированные листья сразу же после их освещения еще не способны к фотосинтезу и к фотоиндуцированным изменениям флуоресценции, хотя они уже содержат некоторое количество хлорофилла. В соответствии с другими работами [5, 6], в наших

опытах появление фотосинтетической активности обнаруживалось через 2,5 часа зеленения этиолированных листьев нормальных растений кукурузы и совпадало с образованием длинноволновой формы хлорофилла *a*, флуоресцирующей при 735 *нм* [9, 10, 16]. У мутантов появление способности к индукции флуоресценции и к выделению кислорода также всегда совпадало с появлением агрегированных форм хлорофилла, но после более длительного времени зеленения (4—12 час. освещения). Эти данные, а также тот факт, что к моменту появления способности к фотосинтезу содержание хлорофилла у мутантов гораздо выше, чем у нормальных растений [10], указывают на то, что появление фотосинтетической активности определяется не общим содержанием хлорофилла, а наличием его определенных высокоагрегированных форм.

В исследованиях связи пигментного состава и морфологических изменений при зеленении была показана относительная автономность этих процессов при освещении этиолированных листьев светом низкой интенсивности: в ходе зеленения не обнаружено прямой зависимости между стадиями образования ультраструктур хлоропластов и разных форм хлорофилла [10]. Однако как у нормальных, так и у мутантных растений появление фотосинтетической активности совпадает с началом образования первичных концентрических ламелл, т. е. фотосинтетическая активность наблюдается на очень ранних стадиях формирования хлоропластов [10].

Начиная с момента появления у зеленеющих листьев способности выделять кислород и усиливать флуоресценцию при освещении светом 2, обнаруживалось и уменьшение флуоресценции при освещении этих листьев светом 1. Фотоиндуцированное уменьшение флуоресценции, приписываемое действию фотосистемы 1 [1, 3], исчезало при добавлении диурона, который прерывает поток электронов между фотосистемами. Однако из этих данных еще не следует, что обе фотосистемы одновременно достигают функционально активного состояния. При измерении индукции флуоресценции действие фотосистемы 1 может быть обнаружено только в том случае, когда фотосистема 2 уже активна, т. е. уменьшение выхода флуоресценции, вызываемое действием фотосистемы 1, может происходить только после того, как Q — первичный акцептор фотосистемы 2 — хотя бы частично восстановлен фотосистемой 2 до QH [1—3]. Следовательно, можно говорить лишь о том, что к моменту появления активности фотосистемы 2 фотосистема 1 уже активна и что, начиная с этого момента, обе фотосистемы могут взаимодействовать через цепь переноса электронов.

Сравнительное исследование фотосинтетической активности и индукции флуоресценции мутантных растений кукурузы дало возможность охарактеризовать их способность к первичным процессам фотосинтеза. Оба мутанта обладают функционирующей фотосистемой 2, на что указывает их способность к выделению кислорода и к фотоиндуцированным изменениям флуоресценции. Отрицательные изменения флуоресценции при освещении светом 1 указывают на функционирование у мутантов фотосистемы 1 и цепи переноса между фотосистемами, которая блокируется в присутствии диурона. Наличие фотосистемы 1 у мутантов ранее было показано по их способности к фотоиндуцированным изменениям поглощения при 700 *нм*, приписываемым фотоокислению П700 [17].

Однако по сравнению с нормальными растениями мутанты обладают гораздо меньшей фотосинтетической активностью (по скорости выделения кислорода) и меньшей величиной фотоиндуцированных изменений флуоресценции. Ранее было показано, что и эффективность включения CO_2 мутантами значительно меньше, чем листьями нормальных растений [12]. Следует отметить, что малую способность ликопинового и ξ-каротинового мутантов к фотосинтезу, по-видимому, нельзя отнести только за счет низкого содержания хлорофилла у листьев этих мутантов. На это

указывает тот факт, что хотя у ξ-каротинового мутанта содержание хлорофилла составляет 20—25% нормальной величины [10], его фотосинтетическая активность не достигает и 5%.

Возникает вопрос, обусловлена ли малая скорость выделения кислорода подавлением ферментативных реакций при включении CO_2, или же слабое включение CO_2 определяется подавлением фотосинтетической цепи переноса электронов. Полученные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, малая фотосинтетическая активность ликопинового и ξ-каротинового мутантов обусловлена подавлением световых реакций фотосинтеза, в первую очередь пониженной активностью фотосистемы 2. На это указывает малая величина фотоиндуцированных изменений флуоресценции у этих мутантов как при освещении светом насыщающей интенсивности, так и при освещении в присутствии диурона, блокирующего перенос электрона между двумя фотосистемами.

Малая величина изменений флуоресценции у мутантов может быть обусловлена как малым содержанием фотохимических центров фотосистемы 2, так и нарушением структуры этих центров или других участков фотосинтетической цепи переноса электрона. Если бы причиной малых изменений флуоресценции у мутантов было только малое содержание фотохимических центров по отношению ко всему хлорофиллу, то кинетика изменений флуоресценции у мутантных листьев была такой же, как у нормальных. В действительности же фотоиндуцированные изменения флуоресценции у мутантов не только малы по величине, но и существенно отличаются от изменений флуоресценции нормальных листьев по кинетике. Это указывает на нарушение фотосинтетической цепи переноса электрона у мутантов, которые могут быть локализованы как в донорной, так и в акцепторной части фотосистемы 2.

Интересно отметить сходство кинетики фотоиндуцированных изменений флуоресценции у зеленых листьев мутантов и у листьев нормальных растений на разных стадиях зеленения. Кинетика изменения флуоресценции у ξ-каротинового мутанта сходна с такой у нормальных листьев после 2,5 час. зеленения, индукция флуоресценции ликопинового мутанта сходна с индукцией флуоресценции нормальных листьев после 12 час. зеленения. Таким образом, по способности к индукции флуоресценции мутанты можно представить как зеленеющие нормальные растения, у которых развитие фотосинтетического аппарата блокировано на определенной стадии зеленения, причем у ξ-каротинового мутанта это блокирование произошло на более ранней стадии зеленения, чем у ликопинового.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет предположить, что малая фотосинтетическая активность исследованных мутантов связана в первую очередь с подавлением фотосистемы 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duysens L. N., Sweers H. E. In. Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, 353. Tokyo, Press, 1963.
2. Mundy J. C, Govindjee. Biophys. J., **9**, 1, 1969.
3. Карапетян Н. В., Климов В. В., Ланг Ф., Красновский А. А. Физиол. растений **18**, 507, 1971.
4. Goedheer J. C. Biochim. et biophys. acta, **51**, 494, 1961.
5. Goedheer J. C. Biochim. et biophys. acta, **53**, 420, 1961.
6. Butler W. L. Biochim. et biophys. acta, **102**, 1, 1965.
7. Литвин Ф. Ф., Хэ И-тань. Физиол. растений, **14**, 219, 1967.
8. Литвин Ф. Ф., Шувалов В. А. Биохимия, **31**, 1264, 1965.
9. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А. Биохимия, **34**, 257, 1967
10. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А. Молекул. биол., **5**, 364, 1971.
11. Shlyk A. A., Fradkin L. I, Savchenko G. E., Faludi-Daniel A. Photosynthetica, **1**, 241, 1967.
12. Gyurjan I., Racovan J. N., Faludi-Daniel A. In: Progress in Photosynthesis Research, 1, 63. Tübingen, 1969.
13. Карапетян Н. В., Климов В. В. Физиол. растений, **18**, 223, 1971.

14. Литвин Ф. Ф., Хэ И-тань, Ефимцев Е. И. Физиол. растений, **12**, 364, 1965.
15. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А. Биофизика, **6**, 392, 1961.
16. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. Докл. АН СССР, **117**, 106, 1957.
17. Faludi-Daniel A., Amesz J., Nagy A. Biochim. et biophys. acta, **197**, 60, 1970.

Поступила в редакцию
21.V.1971

FLUORESCENCE INDUCTION DURING THE GREENING OF ETIOLATED LEAVES: NORMAL AND MUTANT MAIZE SEEDLINGS

V. V. KLIMOV, F. LANG, N. V. KARAPETYAN, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow and M. V. Lomonosov Moscow State University

Light induced fluorescence changes of etiolated, greening and green leaves were studied in normal and mutant maize seedlings.

Light-induced fluorescence changes, oxygen evolution and longwave fluorescence maximum were observed for normal seedlings after 2.5—3 hours, for lycopene mutant — after 4—5 hours and for — carotene mutant — after 12 hours of illumination of etiolated leaves. Green leaves of both mutants are capable for oxygen evolution on the light but at a lower rate than the normal leaves. Light-induced fluorescence changes of the mutants are less pronounced then those of the normal leaves and have another time course. Simultaneous appearance of the capability to fluorescence changes and oxygen evolution in the normal and mutant leaves, their synchronous enhancement during greening and the decrease as a result of photoinhibition indicate a close relation between the fluorescence induction and the photosynthetic processes.

The low photosynthetic activity of the mutants is presumed to be determined first of all by insufficient functioning of the photosystem 2.

А. А. Красновский,
член-корреспондент АН СССР

ХЛОРОФИЛЛ И ФОТОСИНТЕЗ

Термоядерные процессы в недрах звезд приводят к испусканию потоков излучений, пронизывающих космическое пространство. Поглощение излучений поверхностью остывших небесных тел определяет возможность развития жизни, основанной на том или ином типе фотосинтеза — преобразования лучистой энергии в потенциальную химическую энергию.

Если где-либо во Вселенной будет обнаружена высокоорганизованная жизнь, подобная нашей земной, она, вероятно, будет также основана на том или ином типе фотосинтеза. В этом и заключается «космическая роль растений», преобразующих энергию термоядерных синтезов в химическую энергию.

Следует указать на то, что в использовании солнечного излучения поверхностью Земли тесно сплелись геологические и биологические процессы, которые образовали поверхностную часть земной коры — биосферу. Установлено, что весь кислород земной атмосферы имеет фотосинтетическое происхождение, и масштабы фотосинтеза растений на суше и в океане таковы, что кислородная атмосфера Земли может образоваться приблизительно за две тысячи лет.

Существование человечества целиком и полностью зависит от процесса фотосинтеза. Мы используем для своих насущных нужд фотосинтетически образованные в растениях пищевые вещества — углеводы, белки, жиры и вещества, вторично преобразованные в животных организмах, например, молоко, мясо, рыбу. Эти вещества окисляются в организмах с помощью кислорода земной атмосферы, который тоже образован путем фотосинтеза растений.

С незапамятных времен люди использовали тепло, образованное при сжигании продуктов фотосинтеза — дров и угля. Открытие огня было, по существу, открытием путей использования консервированной энергии Солнца — энергии звездных термоядерных синтезов. И в нашей энергетике пока главную роль играет использование продуктов фотосинтеза минувших веков — запасов каменного угля, нефти, газа.

Итак, хотя теперь всем ясно, что пища и кислород, за счет которых существует человечество, образованы в процессе фотосинтеза растений, суть этого процесса начали понимать лишь около двухсот лет назад.

Античные авторы считали, что растения всасывают пищу из почвы (Аристотель, IV век до н. э.), и эти представления без ревизии существовали почти 2 тысячи лет.

Ван Гельмонт в начале XVII века поставил один из первых количественных экспериментов: ива выращивалась в песке, вес которого проверялся до и после опыта. Иву поливали водой и взвесили после того, как выросло небольшое деревце. Так как вес песка не изменился, то был сделан вывод, что вещество ивы образовалось из воды.

Гений Ломоносова позволил ему предположить, что дело не только в воде. В своем сочинении «Слово о явлениях воздушных от электрической силы происходящих» (1753 г.) он писал, что деревья «...жирными листьями жирный тук в себя из воздуха впитывают: ибо из бессочного песку столько смоляной материи в себя получить им невозможно».

Но требовались количественные эксперименты. В 1771 году Джозеф Пристли поставил свой классический опыт. В замкнутом пространстве, где горит свеча, портится воздух; растение его освежает — «дефлогистонирует», в терминологии того времени, а по-нашему — выделяет кислород. Интересно, что опыты Пристли не всегда могли воспроизвести его современники и даже он сам, потому что еще не была выяснена роль света в этом процессе. Вскоре Ингенхуз доказал, что растению нужен свет, а Сенебье — что растение поглощает углекислоту и выделяет кислород.

Бурное накопление экспериментального материала шло в течение всего XIX века.

Через 100 лет после открытия Пристли Тимирязев показал, что свет, поглощенный хлорофиллом, используется для фотосинтеза, а Бутлеров нашел, что при полимеризации формальдегида образуются сахароподобные соединения. Это открытие легло в основу теории Байера о том, что первичным продуктом фотосинтеза является формальдегид. Подобные представления существовали до 40-х годов нашего века, когда применение радиоактивных изотопов углерода — короткоживущего C^{11} (в работах Рубена, Камена и др.) и долгоживущего C^{14} в работах группы Кальвина позволило установить, что фиксация и восстановление углекислоты является циклическим процессом, не требующим световой активации; углеродный цикл работает за счет активных соединений, образованных в цепи фотосинтетического переноса электрона: восстановленных пиридиннуклеотидов и аденозинтрифосфата.

В оптимальных условиях фотосинтезирующая клетка может использовать до 30% поглощенной энергии Солнца; у обычных растений эта величина не превышает 1—2%. Понятно поэтому, что фотосинтез растений и бактерий со все возрастающей энергией изучается во всех странах мира.

Фотосинтез изучают ученые различных специальностей: физики — взаимодействие кванта света с пигментной системой, физико-химики — первичные фотопродукты, «запасающие» энергию света, биохимики и физиологи растений —

сложный круговорот веществ при фотосинтезе, математики используют методы моделирования.

Наш институт интересуют главным образом принципы участия хлорофилла и других пигментов растений в преобразовании энергии света «на молекулярном уровне»; мы хотим разобраться в первичном механизме того явления, которое Тимирязев назвал «усвоением света» растением.

Известно, что суммарная реакция дыхания представляет собой обращение реакции фотосинтеза:

$$H_2O + CO_2 \underset{\text{дыхание } (+110\ ккал)}{\overset{\text{фотосинтез } (-110\ ккал)}{\rightleftharpoons}} {}^1/_6\, C_6H_{12}O_6 + O_2$$

При дыхании освобождается энергия (+110 *ккал*), заключенная в продуктах фотосинтеза, тогда как при реакциях фотосинтеза запасается энергия квантов света, поглощенная зеленым пигментом растений — хлорофиллом.

Чтобы использовать потенциальную химическую энергию, заключенную, например, в куске сахара и кислороде воздуха, нужны катализаторы, ускоряющие реакцию между этими соединениями. Для этой цели организмы используют целый набор биологических катализаторов — ферментов. Эти ферменты ускоряют окислительно-восстановительные процессы, при которых сахар окисляется, а кислород восстанавливается. В живых клетках такой окислительно-восстановительный процесс реализуется в виде ступенчатого переноса водорода от вещества, отдающего этот водород, к веществу, его воспринимающему. При биохимических процессах обычно переносится не атом водорода целиком, а раздельно электрон и протон (ион водорода). Поэтому часто слова «перенос электрона» и «перенос водорода» используются как синонимы.

Как мы уже отмечали, фотосинтез по своему конечному результату является процессом, «обратным» дыханию. В случае фотосинтеза реакцию между углекислотой и водой принципиально невозможно осуществить лишь с помощью катализаторов — ферментов. В систему нужно подвести энергию извне. Энергия квантов света используется растением посредством поглощающего свет хлорофилла и других пигментов растений. Как и дыхание, фотосинтез — окислительно-восстановительный процесс, при котором молекула воды окисляется с выделением молекулярного кислорода, а молекула углекислого газа восстанавливается, образуя в конечном счете сахара. В этом сложном процессе участвует хлорофилл, который, однако, работает лишь в возбужденном состоянии, поглотив квант света; ему помогают в эстафетном переносе

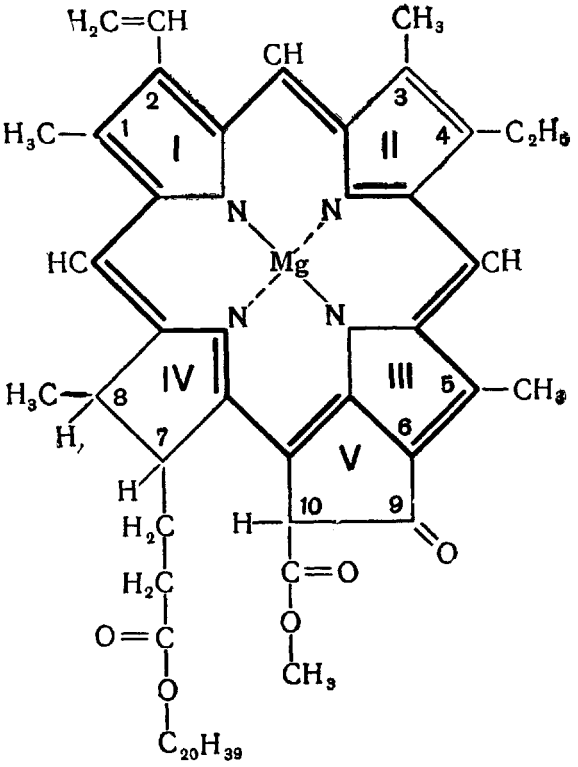
электрона ферменты — биологические катализаторы: пиридиннуклеотиды, ферредоксин, флавины, цитохромы.

Цитохромы — соединения, содержащие железо, переносят электрон в темноте, не требуя световой активации. В отличие от этих соединений хлорофилл может работать только при освещении. Существенно то, что активны лишь возбужденные молекулы хлорофилла, поглотившие квант света.

В результате работы эстафеты фотосинтетического переноса электрона образуются более устойчивые, долгоживущие соединения — восстановленные пиридиннуклеотиды и аденозинтрифосфат — они включаются в цикл реакций углеродного цикла.

Главный вопрос — *каким образом работает возбужденный светом хлорофилл в биохимической цепи переноса электрона?*

Для решения этого вопроса нужно изучить свойства возбужденных светом молекул хлорофилла и похожих на него пигментов, которые находятся в растениях и фотосинтезирующих бактериях.



ХЛОРОФИЛЛ „а"

Хлорофилл находится в центре всех реакций фотосинтеза. Это очень важное вещество. Мы все возникли с помощью молекулы хлорофилла; хотя бы поэтому его химическая структура заслуживает рассмотрения (рис. 1). Эта сложная молекула в основе своей содержит четыре пиррольных кольца, связанных метиновыми (CH) мостиками. В центре молекулы находится атом магния. К ней присоединена длинная углеводородная фитольная цепь, придающая молекуле хлорофилла способность связываться с жироподобными веществами. Важной особенностью молекулы хлорофилла является система сопряженных по кругу двойных связей, в которой делокализованы так называемые пи-электроны.

Если осветить раствор хлорофилла, например, синим светом, мы увидим яркое красное свечение — флуоресценцию — обратное испускание кванта света. Изучение люминесценции и других спектральных свойств пигментов позволило показать, что при возбуждении светом образуется два «сорта» возбужденных молекул хлорофилла, один из которых живет примерно 10^{-8} *сек*, а другой на несколько порядков больше (синглетное и триплетное возбужденные состояния).

$$\text{Хлорофилл} + h\nu \rightarrow \text{Хл}^{*}\ 10^{-8}\ \textit{сек}$$
$$\downarrow$$
$$\text{Хл}^{\tau}\ 10^{-3}\ \textit{сек}$$

Эти возбужденные молекулы хотя и «живут» очень недолго, но обладают очень большой химической активностью. Обычный зеленый хлорофилл в темноте сравнительно малоактивное вещество, однако возбужденный хлорофилл совершенно не похож на этот зеленый пигмент. Даже цвет возбужденного хлорофилла отличается от зеленого цвета обычного хлорофилла. Применение импульсной спектроскопии позволило измерить спектр поглощения триплетных возбужденных молекул: если бы мы могли их увидеть глазом, они обладали бы красновато-коричневой окраской.

Опыты нашей лаборатории показали, что возбужденные молекулы хлорофилла и его аналогов (Хл) способны воспринимать электрон или атом водорода от других молекул так называемых донаторов водорода (Д): аскорбиновой кислоты, цистеина и др.

$$\text{Хл}^{*} + \text{Д} \rightleftarrows \cdot\text{Хл}^{-} + \cdot\text{Д}^{+}$$

При реакции образуются активные продукты фотовосстановления хлорофилла, которые при обратной реакции в темноте регенерируют хлорофилл. Эти продукты восстановления при реакции с молекулами окислителями — акцепторами электрона приводят к образованию исходной молекулы хлорофилла. Образование свободных радикалов при этой реакции показано с помощью ряда методов: путем измерения электронного

парамагнитного резонанса, инициирования фотополимеризации и т. д.

С другой стороны, оказалось, что возбужденные молекулы хлорофилла и его аналогов способны реагировать с молекулами — окислителями, акцепторами электрона или водорода (А).

$$Хл^* + А \rightleftarrows \cdot Хл^+ + \cdot А^-$$

Для изучения этих реакций особенно удобны вязкие спиртоглицериновые среды, в которых при низких температурах происходит стабилизация промежуточных активных продуктов.

Продукты фотоокисления хлорофилла обладают особыми спектральными и химическими свойствами и в темноте, после выключения света или при действии восстановителя образуют исходную молекулу хлорофилла.

Итак, возбужденные светом молекулы хлорофилла и его аналогов способны к реакциям обратимого окисления и восстановления — отдаче и восприятию электрона.

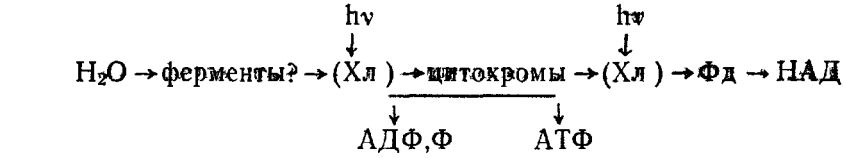
Воспользуемся механической аналогией. При поглощении света как бы растягивается пружина: система хлорофилл — донор или акцептор электрона; происходит «запасание» энергии кванта света в форме потенциальной химической энергии; свет выключен — пружина снова возвращается в исходное состояние. Но для нас важно, чтобы запасенная энергия света была полезно использована. Говоря языком аналогий, растянутая на свету пружина должна в темноте сжиматься, приводя в движение колеса машины фотосинтетического переноса водорода.

Теперь сделаем такой опыт. Возьмем хлорофилл, вещество, способное отдавать электрон, например, аскорбиновую кислоту или цистеин, и вещество, способное принимать электрон, например, молекулы пиридиннуклеотида или особого красителя — метилвиологена. Освещаем эту систему красным светом, который поглощает только хлорофилл. Мы увидим, что за счет энергии света происходит так называемая фотосенсибилизированная реакция — восстановление акцептора электрона и окисления донатора электрона. Это легко увидеть путем измерения спектров поглощения.

Опыты показывают, таким образом, что возбужденный хлорофилл может играть роль переносчика электрона (*е*) — насоса, перекачивающего электроны под действием света от молекул, способных отдавать электрон, к молекулам, способным его воспринимать.

$$Д \xrightarrow[e]{} \overset{\overset{h\nu}{\downarrow}}{Хл} \xrightarrow[e]{} А$$

Этот фотохимически мобилизованный электрон при фотосинтезе может перехватываться эстафетой биологических катализаторов: цитохромами, пиридиннуклеотидами (НАД), ферредоксином (Фд) и направляется в цикл восстановления углекислоты.



Таким образом, возбужденная молекула хлорофилла работает поочередно, воспринимая и отдавая электрон. Однако эти промежуточные процессы идут столь быстро, что мы обычно видим лишь неизменную молекулу хлорофилла. При этом энергия квантов света, поглощенных хлорофиллом, преобразуется в химическую энергию активных промежуточных соединений, запасающих энергию света.

Итак, разнообразные опыты с использованием хлорофилла в модельных системах позволили выдвинуть гипотезу, что возбужденный хлорофилл при фотосинтезе «перекачивает» — переносит электроны.

Для того чтобы перейти к изучению этих реакций непосредственно в живых организмах, нужно понять природу, состояние, «молекулярную упаковку» пигментов в структурах фотосинтезирующих организмов. Работы института показали, что молекулы хлорофилла охотно слипаются друг с другом, давая агрегированные формы (от греческого «агрегс» — стадо). Эта самосборка пигмента в агрегированные формы разных типов происходит в хлоропластах растений и в хроматофорах бактерий. Именно эти формы пигментов участвуют в процессах переноса электрона при фотосинтезе.

Электронная микроскопия показывает сложную структуру хлоропластов и хроматофоров бактерий, но пока не может показать расположение отдельных молекул пигментов и ферментов в фотосинтезирующих структурах.

Здесь на помощь исследователю приходят методы измерения спектральных (оптических) свойств — люминесценции и поглощения, отражающих типы связи и состояния молекулы пигмента. Особено перспективно сочетание этих методов с глубоким охлаждением объекта до температуры жидкого азота, что дает возможность получить спектры с более резкой структурой и фиксировать замороженный объект под действием светового луча, вызывающего люминесценцию. Наиболее характерны эффекты взаимодействия между молекулами пигментов, ведущие к сдвиту спектров поглощения и люминесценции в длинноволновую область.

Удобным объектом для изучения постепенного формирования пигментной системы растения являются так называемые «этиолированные», т. е. выросшие в темноте листья растений, бледные проростки с маленькими желтыми листочками, образующиеся, например, при прорастании клубней картофеля. Эти листочки содержат предшественник хлорофилла — протохлорофилл; при освещении листья зеленеют, в них образуется хлорофилл сначала в так называемых «мономерных» формах, а затем по мере накопления молекулы хлорофилла слипаются друг с другом — образуются агрегированные формы.

$$\text{Протохлорофиллид} \xrightarrow{\text{свет}} \underset{\text{фитол}}{\text{Хлорофилл}} \rightarrow \underset{\text{(мономер)}}{\text{(Хлорофилл)}} \rightarrow \underset{\text{(агрегированные формы)}}{\text{(Хлорофилл)}_n}$$

Агрегированные формы имеют различные спектры и разную молекулярную организацию. Наиболее длинноволновые формы дают настоящие кристаллы, которые можно изучить с помощью электронографии и рентгеноструктурного анализа. В ряде лабораторий показано, что разные формы пигментов участвуют в кооперативном процессе переноса электрона. На это указывает, например, эффект Эмерсона, при котором фотосинтез ускоряется при сочетании длинноволнового красного света с более коротковолновым.

Работы нашей лаборатории показали, что пигменты фотосинтезирующих бактерий — бактериохлорофилл и бактериовиридин находятся в живых бактериях в агрегированных формах — различных типах молекулярных упаковок, молекулярного «слипания»; существенно, что молекулы пигмента укладываются определенным образом — при их сближении происходит самосборка агрегированных форм.

Весьма существенно, что химическая структура исходного звена молекулы пигмента и связанных с ней аддендов диктует типы межмолекулярных агрегатов, участвующих в фотосинтезе. В организмах это взаимодействие осуществляется на белково-липоидных структурах пластид и зависит, в свою очередь, от конформации этих структур.

Мы пока еще не знаем с полной определенностью, какова молекулярная организация хлоропласта и хроматофора, какова молекулярная геометрия расположения молекул пигментов и ферментов, участвующих в цепи переноса электрона. Здесь наши интересы смыкаются с интересами других лабораторий, изучающих другие биохимические структуры — митохондрии и рибосомы.

Итак, мы знаем теперь достаточно определенно, что в фотосинтезе участвуют разные формы пигментов. Однако нас

больше всего интересует, каковы принципы их участия в фотосинтезе, что с ними происходит в организме при действии света?

Глазом мы не можем заметить какие-либо изменения зеленого цвета растений и водорослей в процессе их действия. А может быть, эти изменения так малы, что требуются специальные методы, чтобы их заметить? С этой целью используется метод дифференциальной спектроскопии, позволяющий увидеть ничтожные изменения оптической плотности хлорофилла в листьях — до одной десятитысячной от исходной величины. С помощью этого метода удалось увидеть быстрые изменения флуоресценции и поглощения пигментов в организмах под действием светового импульса, которые связаны с изменением состояния пигментно-белково-липоидного комплекса и окислительно-восстановительными превращениями пигментов.

Таким образом, в работах нашего института удалось обосновать рабочую гипотезу о природе фотохимических стадий фотосинтеза и природе разных форм пигментов, участвующих в этом процессе. Дальнейшие исследования должны показать, в какой степени эти принципы реализуются в живых фотосинтезирующих организмах.

Мы надеемся, что познание природы фотосинтеза на молекулярном уровне позволит в перспективе сознательно управлять фотосинтетической деятельностью растений, а раскрытие принципов фотосинтеза обещает помочь делу создания искусственных систем, более полно использующих энергию Солнца.

Так же как бионика учится у организмов новым инженерным принципам, познание фотосинтеза, возможно, укажет новые пути прямого преобразования лучистой энергии в химическую. Однако нужно ли слепо копировать работу и механизмы фотосинтеза, возникшие у растений в течение миллиардов лет химической и биологической эволюции?

Если человечество овладеет на Земле управляемым термоядерным синтезом и энергетические проблемы будут решены, то, может быть, экономически выгодным будет химический синтез сахаров, жиров, белков из воды, азота и углерода, и человечество не будет зависеть от фотосинтеза растений в такой мере, как это имеет место сегодня.

ХРОНИКА

УДК 577

К ПЯТИДЕСЯТИЛЕТИЮ ТЕОРИИ А. И. ОПАРИНА О ПРОИСХОЖДЕНИИ ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ

В мае 1972 года исполнилось 50 лет со дня первого публичного выступления А. И. Опарина, в котором были сформулированы основные положения его гипотезы о происхождении жизни; этому событию была посвящена специальная сессия Отделения биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений Академии наук СССР, которая состоялась 30 мая 1972 года. Главная идея А. И. Опарина заключалась в том, что жизнь на земле возникла в результате эволюционного развития физико-химических превращений углеродистых соединений и в этом процессе были сопряжены пути химической и биологической эволюции.

Небиологическое образование органического вещества на первичной земле могло происходить при действии ультрафиолетового излучения солнца и электрических разрядов на первичную бескислородную атмосферу земли. Многообразные органические вещества в первичном океане могли полимеризоваться и на основе высокополимерных соединений, приводящих к образованию коллоидных систем и коацерватов; возникли первичные гетеротрофные организмы — пробионты. Усовершенствование способов питания и постепенное исчерпание абиогенного органического вещества в среде привело к развитию фотосинтеза — сначала анаэробного, а затем, использующего воду в качестве исходного донора электрона с выделением молекулярного кислорода в среду. Развитие аэробного фотосинтеза привело к появлению кислородной атмосферы земли и лавинному развитию аэробной жизни в ее нынешней форме.

Наиболее существенно то, что гипотеза А. И. Опарина стимулировала развитие экспериментальных физико-химических и биологических исследований в области происхождения жизни: если в начале нашего века разработке проблемы происхождения жизни уделяли преимущественное внимание авторы научно-фантастических романов, то в настоящее время в этой области науки работают десятки лабораторий в разных странах мира.

В 1957 году в Москве был организован 1-й Международный симпозиум по происхождению жизни, который положил начало систематическим международным собраниям, посвященным этой проблеме. Размах работы в этой области привел к тому, что на последнем Международном симпозиуме по происхождению жизни, который состоялся в 1970 году в Понт-а-Муссоне (Франция), было решено организовать Международное общество по происхождению жизни, Президентом которого был единодушно избран А. И. Опарин. Вице-президентами избраны Р. Флоркен (Бельгия) и С. Фокс (США), казначеем — Р. Бюве (Франция) и генеральным секретарем Р. Янг (США). В исполнительный комитет общества вошли: Ш. Акабори (Япония), К. Дозе (ФРГ), М. Кальвин (США), А. Качальский (Израиль), Е. М. Крепс (СССР), А. А. Красновский, Ф. Липманн (США), С. Миллер (США), С. Поннамперума (США), Г. Портер (Англия), Р. Сильвестр-Бредли (Англия), Г. Эглинтон (Англия). Задачей общества является содействие экспериментальным и теоретическим исследованиям в области происхождения жизни. Это общество должно объединить широчайший круг исследователей разных специальностей: астрономов, геологов, физиков, химиков, биологов.

Исследования ныне существующих на земле организмов показывают, что они построены по сходному биохимическому плану. Механизмы воспроизведения ныне существующих организмов основаны на принципе двойной спирали нуклеиновых кислот. Энергетика простейших одноклеточных организмов и высокоорганизованных существ основана на работе энзиматической цепи переноса электрона; у фотосинтетиков в эту цепь переноса электрона включены возбужденные светом молекулы пигментов. Проблема биохимической эволюции организмов разработана достаточно полно. Однако мы не находим на земле более просто построенных организмов, стоящих на границе химической и биологической эволюции.

Еще Дарвин отметил 100 лет тому назад в своем известном письме Гукеру, что первичное живое белковое вещество невозможно обнаружить потому, что сейчас это вещество было бы немедленно съедено или поглощено более высокоорганизованными организмами. Следует также подчеркнуть, что первичные организмы возникли в анаэробных условиях и кислородная атмосфера земли была бы для них смертельна.

Можно обратиться к исследованию древнейших отложений с тем, чтобы найти в них следы первичных организмов. Развитие изотопных методов датирования древних горных пород, а также химической и физической техники изучения включений, позволило установить, что в отложениях возрастом до 3 миллиардов лет обнаруживаются микроструктуры, сходные с некоторыми типами нынешних сине-зеленых водорослей.

Еще Д. И. Менделеев высказал предположение о абиогенном образовании углеводородов нефти. Хотя большинство исследователей считают, что нефть образуется из органических веществ биологического происхождения, нельзя исключить возможность образования глубинной нефти абиогенным путем. В нефти обнаружены ванадиевые и никелевые комплексы порфиринов, имеющие, по-видимому, вторичное происхождение. Судя по структуре боковых заместителей, это продукты разложения хлорофилла, в которых ванадий и никель заместили центральный атом магния. Наличие порфиринов в нефти приводится обычно как довод в пользу ее биогенного происхождения, хотя эти соединения могли просочиться из молодых пород в более древние отложения. Физико-химический анализ углеводородных фракций в древних породах пока не позволяет с полной определенностью установить абиогенное или биогенное происхождение этих соединений (Кальвин, Эглинтон). Исследование состава небесных тел и органического вещества в космосе может дать важную информацию об эволюции органического вещества во вселенной.

Поразительные успехи в исследовании космоса за последние годы привели к тому, что пробы небесных тел стали доступны для анализа в земных лабораториях. В пробах с лунной поверхности пока не обнаружены абиогенно образованные органические вещества.

Трудно сомневаться в том, что в будущем станут доступными для исследований образцы с поверхности Марса и Венеры, однако весьма маловероятно, что на этих планетах существует высокоорганизованная жизнь. Дальнейшее усовершенствование техники спектральных исследований позволит, видимо, получить более достоверные данные о природе вещества поверхности планет.

При анализе метеоритов обнаружен целый ряд органических соединений; в ряде случаев возможно предположить их возникновение посредством абиогенных синтезов, а в некоторых — за счет вторичных включений «земного» происхождения.

Пожалуй наиболее впечатляющие результаты получены при моделировании в лабораторных условиях процессов, которые могли бы идти в первичной восстановительной атмосфере земли. При действии тихих электрических разрядов (Миллер, Поннамперума) и ультрафиолетового излучения (А. Н. Теренин, Грот, А. Г. Пасынский и Т. Е. Павловская) на смесь аммиака, водяных паров, углекислого газа и водорода обнаружены разнообразные органические вещества, служащие основными кирпичами биохимического обмена веществ нынешних организмов. Так, в работах разных исследователей найдены многочисленные аминокислоты, органические основания, сахара, фосфорные эфиры и даже порфирины. Конечно, эти соединения обнаружены в чрезвычайно малых количествах, но принципиальная возможность их абиогенного образования послужила серьезным экспериментальным доводом в пользу гипотезы А. И. Опарина.

Накопление «мономерных» соединений — аминокислот, органических оснований, фосфорных соединений — определило возможность их полимеризации: самопроизвольной и под действием органических и неорганических катализаторов, таких как глины и т. д. Например, при нагревании смеси аминокислот обнаружено образование белковоподобных полипептидов (Акабори), термически образованные полипептиды в водных растворах образуют гетерогенные коллоидные частицы — микросферы (Фокс). Наконец, имеются данные о возможности синтеза некоторых полипептидов без участия рибосомального аппарата (Липманн). Удалось также моделировать образование полинуклеотидов из мономеров с использованием неорганических и органических катализаторов. Наконец, в коацерватах удалось моделировать открытые биохимические системы, имитирующие элементы обмена веществ первичных пробионтов (А. И. Опарин с сотр.).

Значение модельных исследований связано не только с установлением возможных путей химической эволюции. Эти исследования приводят к реконструкции работающих биохимических систем из простых составных частей, и тем самым — к раскрытию молекулярных механизмов биохимических процессов. Так, самосборка полимеров из мономеров и гетерогенных структур из полимерных молекул показывает механизмы образования биологических структур. Моделирование первичных процессов фотосинтеза и биокатализа в простых системах является одним из путей исследования элементарных стадий этих процессов в клетках фотосинтезирующих и гетеротрофных организмов.

Увлечение исследователей модельными реакциями такого рода оправдано не только поисками возможных путей химической эволюции, но и перспективой раскрытия молекулярной природы биохимических процессов в ныне существующих организмах. Модельные эксперименты с биохимическими системами ныне ведутся в десятках лабораторий у нас в стране и за рубежом, и следует ожидать конечного успеха на пути синтеза самовоспроизводящих структур в лабораторных условиях.

Конечно, модельные эксперименты такого рода указывают лишь возможные пути химической эволюции и механизмы ее сопряжения с эволюцией биологической. Лишь совокупные усилия разных наук — астрономии, космических исследований, геологии, химии, физики и биологии — позволят экспериментально разрешить проблему происхождения жизни. Трудно сомневаться в решающем вкладе биохимии в эту проблему.

А. А. Красновский

Доклады Академии наук СССР
1972. Том 204, № 6

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
М. И. БЫСТРОВА, И. Н. МАЛЬГОШЕВА

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ТВЕРДЫХ ПЛЕНКАХ; ИНФРАКРАСНЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ

Бактериохлорофилл в твердых пленках и коллоидных растворах образует формы, поглощающие в ближней инфракрасной области спектра (800, 850—870, 890—910 мμ) и соответствующие поглощению пигмента в клетках фотосинтезирующих бактерий ([1–3]). Спектры люминесценции бактериохлорофилла в твердых пленках и клетках бактерий также сходны ([4]). В нашей лаборатории было установлено ([5]), что в образовании агрегированных форм бактериовиридина (720—750 мμ) принимают участие главным образом координационные связи кетогрупп молекул пигмента с центральным атомом магния, в согласии с результатами изучения агрегации хлорофилла в неполярных растворителях ([6, 7]). И.-к. спектры бактериохлорофилла ранее изучались лишь в растворах ([8, 9]).

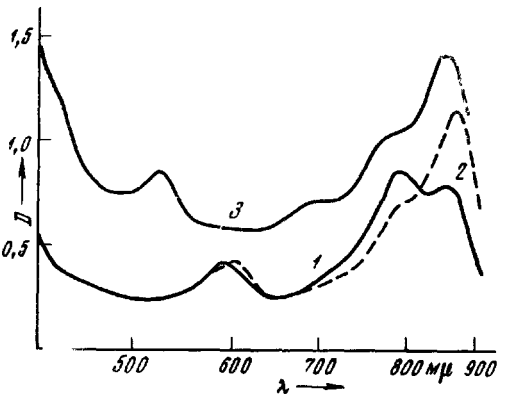


Рис. 1. Спектры поглощения твердых плепок пигментов. *1* — бактериохлорофилл; *2* — та же пленка после обработки парами насыщенного водой серного эфира в течение 20 мин. при 20°; *3* — бактериофеофитин

С целью получения данных о молекулярной организации агрегированных форм мы исследовали структуру и.-к. спектров поглощения твердых пленок бактериохлорофилла и его безмагниевого аналога в области колебаний двойных связей молекул (1800—1600 $см^{-1}$) в сравнении с и.-к. спектрами твердых пленок хлорофилла а и феофитина а.

Бактериохлорофилл выделяли из культуры Rhodopseudomonas spheroides обычными методами с конечной хроматографической очисткой на сахарозе. Безмагниевые производные получали обработкой эфирных растворов пигментов 0,2*N* HCl с последующим промыванием водой и хроматографическим разделением на сахарозе. Твердые пленки для измерения и.-к. спектров получали на пластинках из NaCl испарением эфирных растворов пигментов ($\sim 10^{-3}$ *M*) с последующим высушиванием в вакуумном эксикаторе над пятиокисью фосфора в течение нескольких часов. Использовали серный эфир, освобожденный от перекисей и свежеперегнанный над металлическим натрием. И.-к. спектры измеряли на приборе UR-10, видимые спектры — в сфере Ульбрихта модифицированного спектрофотометра СФ-10.

Бактериохлорофилл при испарении эфира образует пленку с основными максимумами поглощения около 800 и 860 мμ (рис. 1, *1*). И.-к. спектр таких пленок (рис. 2, *1*) обнаруживает три основных максимума: ~1735, ~1660, ~1612 $см^{-1}$. Максимум ~1660 доминирует в спектре,

ему сопутствует плечо около 1640 $см^{-1}$, также наблюдается малоинтенсивный компонент около 1700 мμ.

Максимум 1735—1740 $см^{-1}$ в пленке по сравнению с раствором в серном эфире (рис. 2, *2*) несколько смещен в низкочастотную сторону. Этот максимум согласно данным для растворов хлорофилла и его аналогов ([6–9]), принадлежит колебаниям сложноэфирных группировок в составе пропионовокислого остатка и карбометоксильной группы у 7-го и 10-го атомов С.

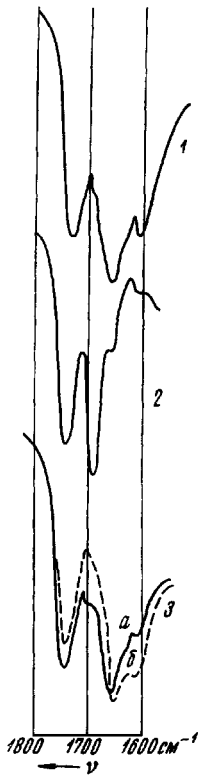


Рис. 2

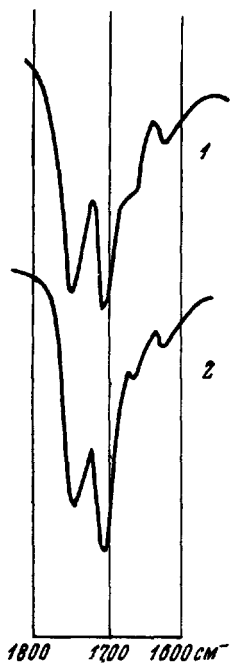


Рис. 3

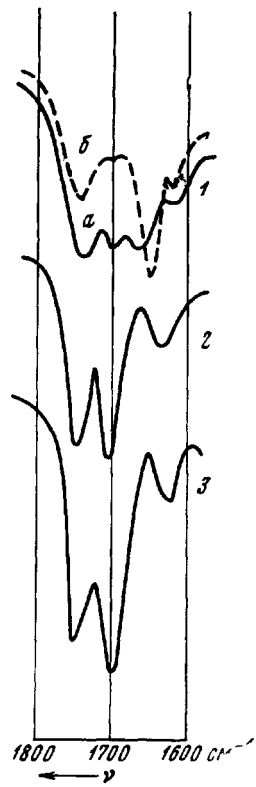


Рис. 4

Рис. 2. И.-к спектры поглощения бактериохлорофилла. *1* — твердая пленка; *2* — раствор в серном эфире, $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ *M*; *3* — твердая пленка; исходная (*а*) и после обработки парами насыщенного водой серного эфира в течение 20 мин. при 20° (*б*)

Рис. 3. И.-к. спектры поглощения бактериофеофитина. *1* — раствор в серном эфире, $0{,}3 \cdot 10^{-2}$ *M*; *2* — твердая пленка

Рис. 4. И.-к. спектры поглощения пигментов. *1* — твердая пленка хлорофилла а: исходная (*а*) и после обработки парами метанола при 20° в течение 45 мин. (*б*); *2* — раствор феофитина а в серном эфире, $0{,}3 \cdot 10^{-2}$ *M*; *3* — твердая пленка феофитина а

Максимум ~1700 $см^{-1}$ характерен для вибрации свободных кетогрупп у 9-го атома С ([6–9]). Этот максимум доминирует в спектре эфирного раствора (рис. 2, *2*) и едва заметен у пленок бактериохлорофилла. Это свидетельствует о том, что в твердых пленках подавляющая часть кетогрупп молекул оказывается связанной.

Максимум 1660 $см^{-1}$ может быть результатом взаимодействия кетогрупп с магнием у образующихся в твердых пленках высокоагрегированных форм бактериохлорофилла. Подобный максимум ранее наблюдался у безводных пленок и препаратов кристаллического хлорофилла а ([7, 10–12]), а также у высококонцентрированных растворов пигмента в сухих алифа-

тических растворителях ([7], [13]). У твердых пленок бактериохлорофилла максимум ~1660 см$^{-1}$, по-видимому, охватывает также поглощение свободных ацетильных групп у 2-го атома С. Из работы ([9]) известно, что в алифатических углеводородах ацетильные группы бактериохлорофилла практически не принимают участия в агрегации. В пленках при образовании высокоагрегированных форм часть ацетильных групп, по-видимому, может участвовать в межмолекулярном взаимодействии, образуя координационные связи с атомом магния. В эфирном растворе (рис. 2, *2*) максимум ~1665 см$^{-1}$ проявляется только за счет вибраций свободных ацетильных групп ([8], [9]), поэтому значительно менее интенсивен, чем в пленках.

Максимум ~1640 см$^{-1}$ может принадлежать кетогруппам, связанным с магнием через посредство молекул воды (кетоС=О...НО(Н)...Mg). Связанная вода всегда есть в получаемых обычными способами препаратах пигментов ([14], [15]), и нельзя исключить ее возможное участие в агрегации бактериохлорофилла в твердых пленках. Известно ([9], [15]), что при обработке водой растворов хлорофилла а в алифатических углеводородах происходит образование высокоагрегированных, кристаллических структур со стехиометрией взаимодействия пигмент — вода 1:1, при этом в и.-к. спектре появляется максимум ~1640 см$^{-1}$. У твердых пленок бактериохлорофилла максимум ~1640 см$^{-1}$ обнаруживается без введения воды извне в структуру агрегированных форм. Следует указать на то, что растворы бактериохлорофилла в CCl_4 ([6], [9]) и сухих углеводородах с небольшой концентрацией пигмента ([9]) также обнаруживают максимум около 1640 см$^{-1}$, который приписан колебанию связей кетоС=О...Mg у агрегатов низкого порядка (тримеры, гексамеры ([13])). Такая интерпретация максимума ~1640 см$^{-1}$ в твердых пленках менее вероятна, так как в пленках мы имеем дело с образованием высокоагрегированных структур.

Максимум ~1612 см$^{-1}$ в пленках по сравнению с эфирным раствором несколько смещен в низкочастотную сторону, сильно увеличен по интенсивности, почти равен максимуму сложноэфирных группировок. Возможно, что этот максимум определяется не только колебаниями связей С=С и С=N молекулярного скелета ([6-9]), но и вибрацией ацетильных групп I пиррольного кольца, координационно связанных с магнием.

Выдерживание пленок в парах насыщенного водой серного эфира при комнатной температуре в течение 20—30 мин. приводит к увеличению степени межмолекулярного взаимодействия, что проявляется в уменьшении максимума ~800 мμ в спектре поглощения и одновременном возрастании длинноволнового максимума, который смещается до ~875 мμ (рис. 1, *2*). В и.-к. спектре область свободных кетогрупп (~1700 см$^{-1}$) при этом уменьшается, все «агрегационные» максимумы увеличиваются по интенсивности, и основной максимум (~1660 см$^{-1}$) обнаруживает сдвиг в низкочастотную область (до ~1650 см$^{-1}$) (рис. 2, *3*). Это приводит к предположению, что при образовании высокоагрегированных, квазикристаллических, структур бактериохлорофилла могут принимать участие все отмеченные типы межмолекулярных связей.

Бактериофеофитин так же, как и бактериохлорофилл, образует пленку с длинноволновым максимумом поглощения около 865 мμ (рис. 1, *3*). Однако в и.-к. спектре пленок максимум свободных кетогрупп (~1705 см$^{-1}$) доминирует, и весь спектр близок по структуре к спектру растворов бактериофеофитина в полярных растворителях (рис. 3, *1*, *2*). Это свидетельствует о том, что у безмагниевого аналога бактериохлорофилла кетогруппы, а также, по-видимому, и другие карбонильные группировки молекул не принимают участия в межмолекулярном взаимодействии и в создании форм с длинноволновым поглощением. Возможно, образование длинноволновых агрегированных форм бактериофеофитина обусловлено сильным π—π-взаимодействием хромофорных систем, развивающимся в результате близкого контакта между молекулами.

Хлорофилл а при испарении эфира образует пленку с основным максимумом поглощения около 675 мμ. И.-к. спектр таких пленок, в согласии с данными ([10–12]), обнаруживает максимумы около 1735, 1695, 1660, 1610 $см^{-1}$ (рис. 4, *1*). «Агрегационный» максимум ~1660 $см^{-1}$, обязанный взаимодействию кетогрупп с магнием, соизмерим с максимумом свободных кетогрупп (~1700 $см^{-1}$).

Обработка пленок парами метанола (в течение 30—45 мин. при 20°) приводит к появлению в спектре поглощения отчетливого максимума при ~740 мμ ([2]). В и.-к. спектре (рис. 4, *1*) при этом максимум свободных кетогрупп почти полностью исчезает, и появляется новый отчетливый максимум около 1645 $см^{-1}$. Этот максимум может принадлежать кетогруппам, связанным водородными связями с метиловым спиртом, координационно взаимодействующим также с центральным атомом магния другой молекулы пигмента по схеме: кето-C = O ...HO(CH_3) Mg.

Данная интерпретация основана на работах ([9, 11, 12, 15]), в которых при обработке водой твердых пленок или растворов хлорофилла в углеводородах наблюдалось образование в и.-к. спектре максимума около 1640 $см^{-1}$, приписанного взаимодействию кетогрупп с водой, координационно связанной с атомом магния. В наших опытах метанол, как и вода, играл роль «посредника» между компонентами молекулярных соединений.

Феофитин а образует твердую пленку с главным максимумом поглощения около 700 мμ. Однако в и.-к. спектре, как и у бактериофеофитина, не обнаруживается «агрегационных» максимумов; доминирует максимум свободных кетогрупп (около 1700 $см^{-1}$), и весь спектр практически идентичен спектру эфирного раствора пигмента (рис. 4, *2*, *3*). Максимумы ~1745 и ~1625 $см^{-1}$ принадлежат соответственно карбонильным группам в составе сложноэфирных связей и связям C=C и C=N молекулярного скелета ([6–9]).

Отсутствие указанных координационных связей у агрегатов феофитина приводит к выводу об участии в агрегации иного типа межмолекулярного взаимодействия, развивающегося за счет сближения облаков π-электронов при непосредственном контакте хромофорных частей молекул.

Таким образом, исследование структуры и.-к. спектров поглощения твердых пленок бактериохлорофилла и хлорофилла позволило показать участие в межмолекулярном взаимодействии кетогрупп, вероятно связанных с центральным атомом магния за счет координационных связей или через посредство молекул воды или спирта. У бактериофеофитина и феофитина а в твердых пленках не наблюдается образования связей этого типа, и следует предположить, что при агрегации безмагниевых пигментов происходит непосредственное взаимодействие между облаками π-электронов сопряженных по кругу систем двойных связей молекул.

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

Поступило
10 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952). [2] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, ДАН, 174, 480 (1967). [3] М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 1, 362 (1967). [4] А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун-Юй-Цюнь, ДАН, 143, 456 (1962). [5] А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева, ДАН, 189, 885 (1969). [6] J. J. Katz, G. L. Closs et al., J. Am. Chem. Soc., 85, 3801 (1963). [7] A. F. H. Anderson, M. Calvin, Arch. Biochem. and Biophys., 107, 251 (1964). [8] A. S. Holt, E. E. Jacobs, Plant Physiol., 30, 553 (1955). [9] K. Ballschmiter, J. J. Katz, J. Am. Chem. Soc., 91, 2661 (1969). [10] А. В. Карякин, В. М. Кутюрин, А. К. Чибисов, ДАН, 140, 1321 (1961). [11] В. Е. Холмогоров, А. Н. Сидоров, А. Н. Теренин, ДАН, 147, 954 (1962). [12] K. Ballschmiter, J. J. Katz, Nature, 200, 1231 (1968). [13] K. Ballschmiter, K. Truesdell, J. J. Katz, Biochim. et biophys. acta, 184, 604 (1969). [14] В. М. Кутюрин, В. П. Князев, ДАН, 149, 456 (1963). [15] K. Ballschmiter, T. M. Cotton et al., Biochim. et biophys. acta, 180, 347 (1969).

Доклады Академии наук СССР
1972. Том 202, № 1

УДК 576.11

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. В. УМРИХИНА

АБИОГЕННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ПОРФИНА, ХЛОРИНА И БАКТЕРИОХЛОРИНА

Проблема абиогенного образования порфиринов в процессе химической эволюции изучается путем создания модельных систем, имитирующих добиологические условия на Земле. К числу таких систем относится смесь пиррола и формальдегида ([1–5]).

Методы. Реакцию проводили в стеклянных толстостенных ампулах. Обычно использовали растворы формальдегида (2%) и пиррола (0,5%) в метаноле, что соответствовало оптимальным условиям проведения реакции. Запаянные ампулы с раствором нагревали на кипящей водяной бане. За ходом реакции следили по появлению красной флуоресценции порфиринов. После окончания синтеза и измерения спектров люминесценции реакционных смесей проводили очистку и фракционирование продуктов реакции.

Влияние кислорода. Ускоряющее действие кислорода воздуха на синтез порфина показано нами ранее ([2]). В ампулах, в которых присутствовал воздух, видимая глазом флуоресценция появлялась уже через 15—20 мин. нагревания, тогда как в отсутствие воздуха — только после нескольких часов. Во всех опытах в спектре флуоресценции отчетливо наблюдаются два максимума (рис. 1*а*) в присутствии воздуха при 685 и 633 мμ, «плечо» в области 620 мμ (или максимум, если флуоресценция при 633 мμ низка) и неясно выраженное «плечо» в области 750 мμ. В вакууме основные максимумы 704 и 648 мμ. Таким образом, хотя общий вид спектра в вакууме и в присутствии воздуха одинаков, положение максимумов флуоресценции в вакууме сдвинуто на 15—20 мμ в длинноволновую сторону. Сдвиг спектра можно объяснить образованием изомерных форм порфиринов ([6]).

По мере увеличения количества воды от 5 до 50% время от начала нагревания до появления флуоресценции сокращалось от 15—30 мин. до 1—2 мин., однако при этом конечный выход продуктов падал. Как в вакууме, так и в присутствии воздуха в начале реакции в присутствии воды в спектре флуоресценции преобладает максимум при 633 или 648 мμ соответственно.

Действие посторонних соединений. Ускоряющее действие на синтез порфиринов оказали препараты кремнезема, окись цинка, окислы железа, двуокись титана, хлористый калий, поливинилпирролидон и другие соединения. Наиболее активны были окись цинка (рис. 1*б*) и двуокись титана. В присутствии катализаторов время нагревания ампул в вакууме до появления красной флуоресценции сокращалось от 5—7 час. до 15—30 мин. и выход продукта увеличивался по сравнению с контрольным опытом без катализатора.

Доноры электрона. Аскорбиновая кислота ингибировала синтез порфина, тогда как триптофан активно катализировал реакцию. При этом реакцию в присутствии триптофана можно наблюдать даже при охлаждении реакционных смесей до 3—5°. В этих условиях красная флуоресценция порфиринов появлялась через несколько дней, а при нагревании — через 15—30 мин. Выход порфириновых соединений в присутствии триптофана увеличивался. На воздухе основной максимум флуоресценции

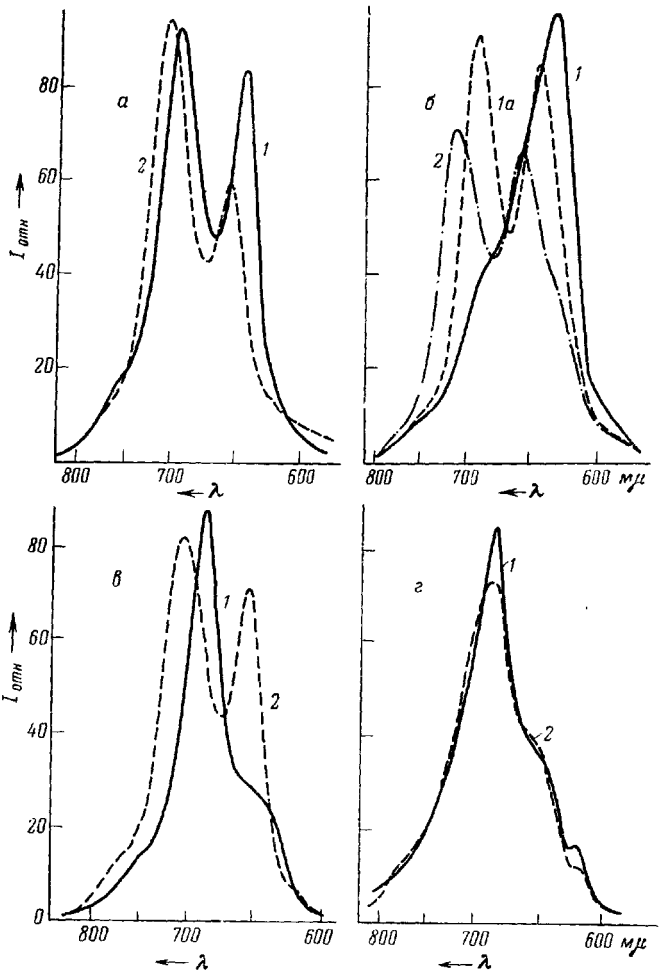


Рис. 1. Спектры флуоресценции, наблюдаемые (*1* — на воздухе, *2* — в вакууме) при нагревании растворов пиррола (0,5%) и формальдегида (2%) в метаноле (2 мл) в разных условиях: *а* — контрольный опыт; добавки: *б* — 1 мг окиси цинка; *в* — 1 мг триптофана; *г* — 1 мг хинона

лежал при 685 мμ (рис. 1*в*), в вакууме положение максимумов флуоресценции при 704 и 643 мμ. Однако нагревание растворов в присутствии избытка триптофана (10 мг на 2 мл раствора) вызывало образование продуктов, обладающих синей флуоресценцией, возможно дипиррилметенов. Использование для реакции триптофана вместо пиррола не приводило к образованию порфиринов.

Акцепторы электрона. Парабензохинон в количестве 1 мг на 2 мл раствора ускорял реакцию синтеза порфиринов и способствовал увеличению выхода продуктов. В этом случае (как в вакууме, так и в присутствии воздуха) практически не образуется соединения с максимумом флуоресценции при 633 мμ и, кроме того, нет сдвига спектра в длинноволновую сторону в вакуумных условиях (рис. 1*г*), что указывает на образование в вакууме и на воздухе одной изомерной формы порфиринов.

Фракционирование. В ходе синтеза могут образоваться порфин, хлорин и бактериохлорин. Исходя из наших и литературных данных ([7]) основные максимумы поглощения порфина в неполярных растворителях лежат при (1)617, (2)570, (3)520, (4)490 мμ с распределением интенсивностей по максимумам 4; 2; 3; 1 (филлотип спектра). В спектре люминесценции наблюдаются две основные полосы при 690 и 620 мμ. В спектре поглощения хлорина основной максимум лежит при 635 мμ, максимум флуоресценции — при 640 мμ. Спектр поглощения транс-формы тетрафенилбактериохлорина имеет максимумы при 743 и 524 мμ, цис-формы — при 600 и 650 мμ ([8–10]).

Таким образом, наблюдаемые в наших опытах максимумы флуоресценции при 685 и 620 мμ в присутствии воздуха (и в вакууме при 704 и 622 мμ) можно приписать изомерным формам порфина, а максимум при 633 мμ (в вакууме 648) — хлорину. Максимум при 764 мμ в концентрированных растворах пигментов, по-видимому, обусловлен присутствием бактериохлорина.

Предварительное фракционирование продуктов реакции осуществляли путем экстракции порфиринов разной степени восстановленности растворами соляной кислоты. В 5% растворы HCl переходит преимущественно порфин ([7]), а в 10 и 20% растворы — хлорин. Солянокислое число бактериохлорина неизвестно. Растворы пигментов в 5; 10 и 20% HCl нейтрализовали ацетатом натрия, пигменты вновь переводили в свежую порцию бензола и измеряли спектры флуоресценции полученных фракций I, II и III. Фракция I, полученная из 5% HCl, содержала главным образом порфин (максимумы флуоресценции 685 и 620 мμ), однако в спектре флуоресценции наблюдается также небольшой максимум при 633 и 764 мμ. Фракции II и III (из 10 и 20% HCl) содержали в основном хлорин, основной максимум флуоресценции лежит при 633 мμ. В этих фракциях присутствовал в небольшом количестве порфин, и если исходный раствор содержал продукт с максимумом флуоресценции при 764 мμ, то во фракциях II и III его было относительно больше, чем во фракции I.

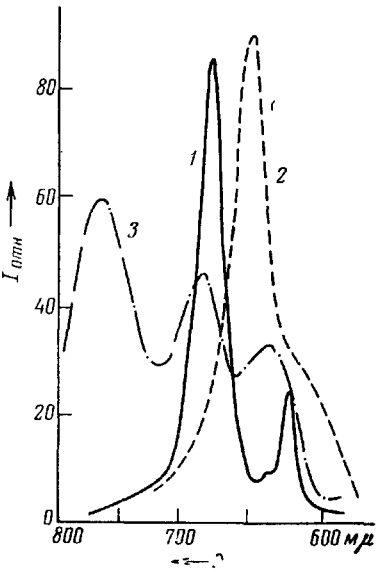


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов порфиринов в бензоле после хроматографии на окиси алюминия: *1* — порфин; *2* — хлорин; *3* — смесь пигментов с преобладанием бактериохлорина

Для окончательного разделения порфирины хроматографировали на колонках Al_2O_3 из бензольного раствора. При хроматографировании фракции I элюат в бензоле содержал только порфин (рис. 2). Первые порции элюата, полученные при хроматографировании фракций II и III, содержали преимущественно хлорин (см. рис. 2), следующие порции — смесь порфина и хлорина, затем порфин. Флуоресцирующие зоны адсорбента, не элюируемые бензолом вынимали из колонки отдельными порциями, пигменты снимали с окиси алюминия пиридином и измеряли спектры флуоресценции полученных растворов. Оказалось, что в спектре флуоресценции верхней и нижней зон основной максимум флуоресценции лежит при 764 мμ (см. рис. 2).

Полностью очистить продукт с максимумом флуоресценции при 764 мμ (предположительно бактериохлорин) пока не удалось. Однако максимум при 764 мμ отсутствует в спектре флуоресценции как порфина, так и хлорина (см. рис. 2, кривые *1* и *2*) и, следовательно, принадлежит третьему соединению, вероятнее всего бактериохлорину. Если элюат с окиси алюминия в пиридине оставить на несколько дней на воздухе, то интенсивность флуоресценции в максимуме бактериохлорина при 764 мμ падает и увеличивается интенсивность флуоресценции при 685 и 640 мμ, что можно объяснить окислением бактериохлорина до порфина путем промежуточного образования хлорина. О легкой окисляемости бактериохлориновых пигментов с образованием хлориновых и порфириновых соединений свидетельствуют известные данные ([8–10]).

В спектре возбуждения люминесценции раствора смеси порфиринов в бензоле присутствует максимум при 530 мμ (рис. 3), вероятно, соответствующий, по аналогии с тетрафенилбактериохлорином, второму максимуму поглощения бактериохлорина. В спектре возбуждения люминесценции растворов порфина и хлорина в бензоле максимум при 530 мμ отсутствовал.

Фотовосстановление порфина. При фотовосстановлении порфина аскорбиновой кислотой в сухом пиридине наблюдается образова-

ние продуктов с максимумом поглощения при 635 мμ и флуоресценцией при 643 мμ (рис. 4), которые соответствуют хлорину. Образовавшийся хлорин устойчив как в вакууме, так и в присутствии воздуха.

Фотовосстановление порфи-

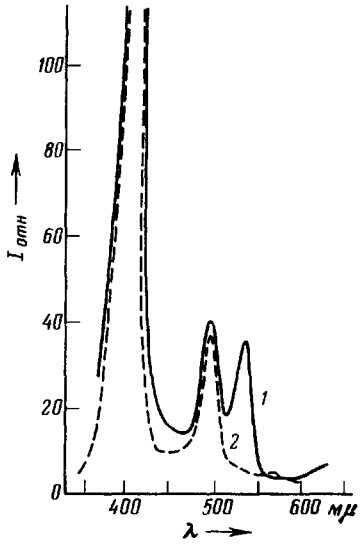


Рис. 3

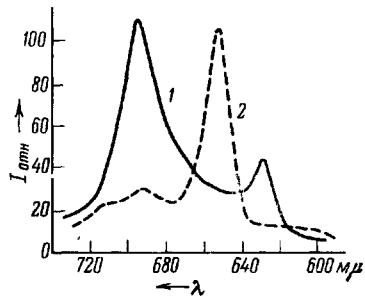


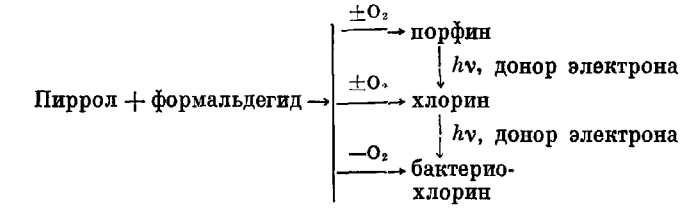
Рис. 4

Рис. 3. Спектры возбуждения люминесценции растворов порфиринов в бензоле: *1* — смесь пигментов; *2* — порфин

Рис. 4. Спектры флуоресценции, наблюдаемые при фотовосстановлении порфина аскорбиновой кислотой (5 мг) в пиридине (4 мл) в вакууме: *1* — до освещения; *2* — после 15 мин. освещения

на аскорбиновой кислотой в вакууме в кислой среде (растворы HCl в воде или этаноле) протекало путем последовательного образования форм с максимумами поглощения при 440; 500 и 625 мμ. Продукт с поглощением при 625 мμ и флуоресценцией при 630 мμ по своим спектральным и фотохимическим свойствам соответствовал кислой форме хлорина ([11]).

Результаты работы можно резюмировать следующей схемой:



Образование восстановленных форм порфиринов может происходить либо в процессе их синтеза из пиррольных предшественников, либо в результате вторичного фотохимического или темнового восстановления различными донорами электрона. Полученные данные приводят к выводу, что в процессе поисков абиогенно образованных порфиринов на других планетах или в глубинах земной коры следует учитывать возможность образования продуктов разной степени восстановленности: порфиринов, хлоринов и бактериохлоринов.

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

Поступило
16 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] P. Rothemund, J. Am. Chem. Soc., 58, 625 (1936). [2] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, 155, 691 (1964). [3] G. W. Hodgson, B. L. Baker, Nature, 216, 29 (1967). [4] A. Szutka, J. F. Hazel, W. M. McNabb, Radiation Res., 10, 597 (1959). [5] А. Шутка, В сборн. Происхождение предбиологических систем, М., 1966, стр. 245. [6] S. Aronoff, M. Calvin, J. Organic. Chem., 8, 205 (1943). [7] C. Rimington, S. F. Mason, O. Kennard, Spectrochim. acta, 12, 65 (1958). [8] А. Н. Сидоров, Биофизика, 10, 226 (1965). [9] G. R. Seely, K. Talmadge, Photochem. Photobiol., 3, 195 (1964). [10] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. М. Бокучава, ДАН, 190, 464 (1970). [11] А. В. Умрихина, Н. А. Юсупова, А. А. Красновский, ДАН, 175, 1400 (1967).

БИОФИЗИКА

Том XVII, вып. 6 1972

СВЕТОВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ХРОМАТОФОРОВ CHROMATIUM В ПРИСУТСТВИИ *p*-БЕНЗОХИНОНА

И. Н. КРАХМАЛЕВА, Н. В. КАРАПЕТЯН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследовали фотоиндуцированные изменения окислительно-восстановительного потенциала (ΔE) суспензии хроматофоров Chromatium в присутствии *p*-бензохинона. Показано, что $-\Delta E$ при освещении хроматофоров красным светом наблюдается только при кислых pH в анаэробных условиях при наличии хинона. Величина $-\Delta E$ возрастает при действии на хроматофоры инактивирующих факторов (тритон X-100, ДС-Na, ацетон, нагревание), подавляющих активность П890. При действии возрастающих концентраций тритона X-100 и при нагревании всегда наблюдается $-\Delta E$, тогда как при высоких концентрациях ДС-Na или ацетона вместо $-\Delta E$ обнаруживается $+\Delta E$. В присутствии тритона X-100 и хинона $-\Delta E$ не насыщается при интенсивностях света, достаточных для насыщения бактериального фотосинтеза. В дифференциальном спектре «свет — темнота» хроматофоров в кислой среде в присутствии хинона помимо обычных изменений поглощения при 790 и 810 *ммк* наблюдаются большие медленные изменения при 880 *ммк*, обратимые в темноте. В присутствии хинона и тритона X-100 такие изменения наблюдаются при 840 *ммк*. Предполагается, что у хроматофоров в присутствии тритона X-100 восстановление хинона сенсибилизировано молекулами «валового» бактериохлорофилла, состояние которого изменено в результате действия детергента.

Для изучения фотосинтетической цепи переноса электрона и механизма фотофосфорилирования часто используют изолированные хроматофоры, которые в отличие от бактерий способны осуществлять лишь отдельные реакции фотосинтеза в присутствии искусственных доноров или акцепторов электрона. Было показано, что в анаэробных условиях хроматофоры R. rubrum способны восстанавливать на свету НАД или фумарат за счет фотоокисления экзогенных доноров электрона; хроматофоры Chromatium менее активны в подобных фотореакциях и не способны восстанавливать экзогенный НАД [1]. Было установлено, что окислительно-восстановительные превращения экзогенных доноров и акцепторов протекают с участием фотосинтетической цепи переноса электрона и сенсибилизированы П890 [1].

Нами было показано, что о фотохимической активности хроматофоров Chromatium можно судить по скорости фотовосстановления иминоксильного радикала, обладающего в окисленном состоянии характерным сигналом ЭПР [2]. Представляло интерес исследование фотохимической активности хроматофоров пурпурных бактерий с использованием хинонов в качестве экзогенного акцептора, так как в качестве первичного акцептора электронов фотосинтетической цепи переноса электронов у бактерий может служить убихинон [3]. Способность бактериальных хроматофоров восстанавливать на свету экзогенный убихинон за счет фотоокисления искусственного донора электронов была показана [4, 5]. Возможность обратимого фотоокисления бактериохлорофилла хинонами при

освещении раствора красным светом была установлена в работах нашей лаборатории [6, 7].

Ранее мы сообщили данные о действии детергентов и нагревания на световой сигнал ЭПР [2] и на фотоиндуцированные изменения поглощения и флуоресценции бактериохлорофилла [8—10] хроматофоров пурпурных бактерий. Целью настоящей работы было исследование фотохимической активности хроматофоров Chromatium, измеряемой по фотовосстановлению экзогенного *p*-бензохинона, и зависимости этой реакции от действия инактивирующих факторов.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на изолированных хроматофорах пурпурных бактерий Chromatium minutissimum; условия выращивания бактерий и метод получения хроматофоров описаны ранее [2, 10, 11]. О фотовосстановлении *p*-бензохинона судили на основании изменения окислительно-восстановительного потенциала (E_h) суспензии хроматофоров в трубке Тунберга при освещении красным светом. Измерение исходного E_h и его световых изменений (ΔE) проводили с помощью гладких платиновых электродов, в качестве электрода сравнения служил каломельный электрод. Величины E_h и ΔE регистрировали с помощью потенциометра ЛПУ-01; точность измерения 2—3 *мв*. Для измерения абсолютных величин E_h платиновые электроды были откалиброваны путем измерения E_h насыщенного раствора хингидрона в зависимости от pH [12]. Измерение фотопотенциала проводили в анаэробных условиях, эвакуирование трубки Тунберга осуществляли с помощью форвакуумного насоса. Хроматофоры освещали светом $\lambda > 700$ *ммк* от лампы накаливания 127 *в*, 300 *вт* через тепловой фильтр; максимальная интенсивность освещения составляла $3{,}5 \cdot 10^6$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$. Концентрация бактериохлорофилла в пробе была равна 0,02 *мМ*, концентрация хинона 2 *мМ*. В качестве инактивирующих факторов использовали различные концентрации тритона X-100 или додецилсульфата натрия (ДС-Na), добавление ацетона или нагревание хроматофоров при различных температурах в течение 1 *мин*. Фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров в присутствии хинона или тритона X-100 измеряли на однолучевом дифференциальном спектрофотометре [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При освещении суспензии хроматофоров Chromatium светом $\lambda > 700$ *ммк* независимо от активности хроматофоров, pH среды и наличия или отсутствия в газовой среде кислорода не удается наблюдать изменений E_h среды. Изменения E_h наблюдаются при освещении хроматофоров в анаэробных условиях лишь в присутствии экзогенного акцептора электронов *p*-бензохинона: включение света вызывает отрицательный фотопотенциал ($-\Delta E$), полностью обратимый в темноте (рис. 1, *А*, кривая *1*). Уменьшение E_h происходит только в анаэробных условиях, пуск воздуха вызывает исчезновение фотопотенциала.

Отрицательный фотопотенциал в присутствии хинона очень мал у свежевыделенных хроматофоров, но существенно возрастает у хроматофоров, хранившихся в течение нескольких дней при +5° С. При этом $-\Delta E$ всегда выше в присутствии убихинона по сравнению с бензохиноном. Добавление детергентов к хроматофорам в присутствии бензохинона вызывает существенные изменения фотопотенциала. С увеличением концентрации тритона X-100 до 0,5% $-\Delta E$ возрастает до максимальной величины (рис. 2, *А*). Дальнейшее повышение концентрации тритона X-100 ведет к падению фотопотенциала, который остается отрицательным по знаку. Добавление тритона X-100 вызывает не только увеличение $-\Delta E$, но и ускорение прямой и обратной реакций (рис. 1, *А*, кривая *2*).

Интересно отметить, что кинетика обратной реакции не зависит от 10^{-5} *М* антимицина А, что указывает на непосредственное взаимодействие гидрохинона с фотоокисленным донором [5].

Добавление к хроматофорам ДС-Na в присутствии хинона также вызывает изменение величины фотопотенциала. Однако, в отличие от тритона Х-100, при добавлении высоких концентраций ДС-Na наблюдается

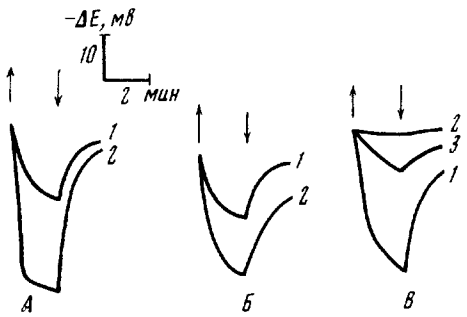
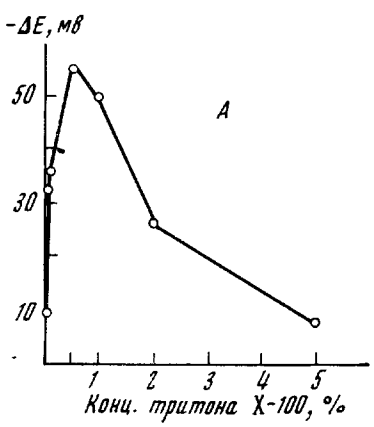
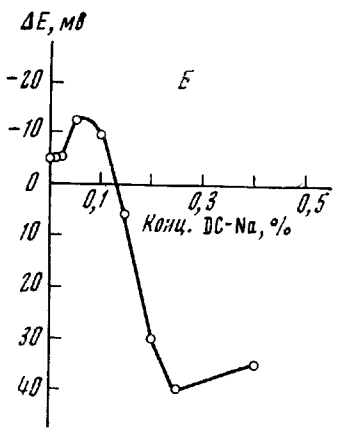


Рис. 1. Кинетика — ΔE при освещении суспензии хроматофоров Chromatium в присутствии 2 *мМ* бензохинона и 0,5% тритона Х-100 в анаэробных условиях при pH 4

А — в отсутствие (*1*) и в присутствии (*2*) детергента, *Б* — при +20 (*1*) и +5° С (*2*) *В* — в зависимости от E_h суспензии +550 (*1*), +330 (*2*), +460 *мв* (*3*) Стрелками обозначены моменты включения и выключения света





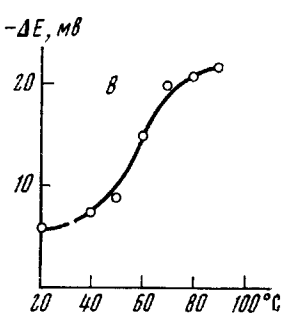


Рис 2 Зависимость ΔE хроматофоров Chromatium в присутствии 2 *мМ* хинона в анаэробных условиях от концентрации тритона Х-100 (*А*) и ДС-Na (*Б*) и от температуры нагревания (*В*)

$+\Delta E$, который после достижения максимальной величины практически не зависит от дальнейшего повышения концентрации детергента (рис. 2, *Б*). При концентрации ДС-Na, при которой наблюдается $+\Delta E$, происходит солюбилизация бактериохлорофилла, обнаруживаемая по появлению максимума при 780 *ммк* в спектре поглощения хроматофоров. В случае использования тритона Х-100 подобной солюбилизации бактериохлорофилла не происходит, в связи с чем всегда наблюдается $-\Delta E$.

Действие растворителей на фотопотенциал хроматофоров в присутствии бензохинона сходно с действием ДС-Na. При освещении хроматофоров в присутствии хинона и 10% ацетона происходит небольшое увеличение $-\Delta E$. Добавление же к хроматофорам 70% ацетона ведет, как и в растворах бактериохлорофилла [6], к возникновению $+\Delta E$, обуслов-

ленному окисленной формой экстрагированного бактериохлорофилла. Величина $-\Delta E$ хроматофоров в присутствии хинона существенно увеличивается после их термоинактивации. С увеличением температуры предварительного нагревания величина $-\Delta E$ растет, достигая максимума при 90° С (рис. 2, *В*). Действие термоинактивации сходно с действием тритона Х-100: всегда наблюдается $-\Delta E$.

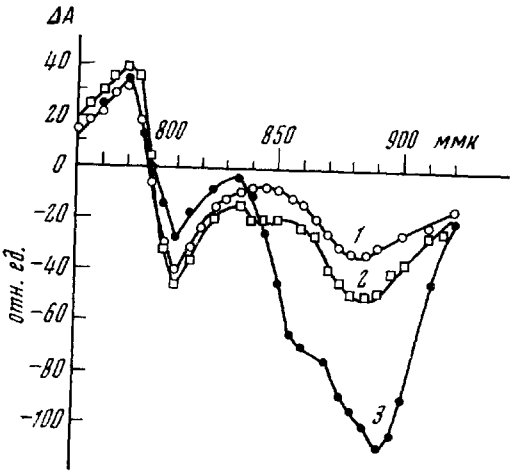


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» хроматофоров Chromatium при pH 4,2

1 — в анаэробных условиях, *2* — в анаэробных условиях в присутствии 1 *мМ* аскорбата натрия; *3* — в анаэробных условиях в присутствии 2 *мМ* бензохинона

Измеренный $-\Delta E$ хроматофоров в присутствии хинона и тритона Х-100 обнаруживает сильную зависимость от pH среды: фотопотенциал максимален при pH 4, уменьшается с увеличением pH и полностью исчезает при pH 8. При pH 4 фотопотенциал увеличивается с увеличением интенсивности освещения, не достигая насыщения при максимальной интенсивности. В присутствии тритона Х-100 величина фотопотенциала зависит от температуры: понижение температуры от +20 до +5° С при-

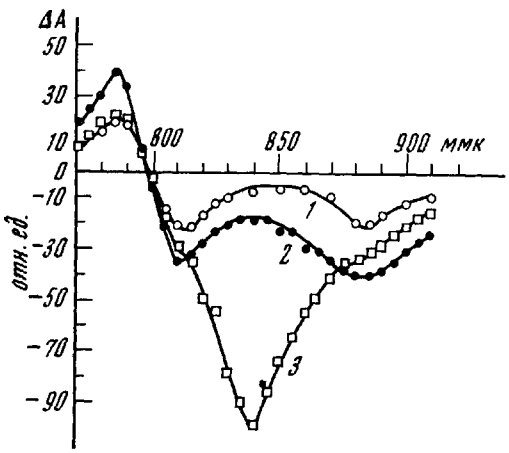


Рис. 4 Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» хроматофоров Cromatium при pH 4,2:

1 — в анаэробных условиях; *2* — в анаэробных условиях в присутствии 0,1% тритона Х-100; *3* — в анаэробных условиях в присутствии 0,1% тритона Х-100 и 2 *мМ* бензохинона

водит к увеличению $-\Delta E$ (рис. 1, *Б*). Величина ΔE в присутствии хинона и тритона Х-100 резко зависит от исходного E_h суспензии (рис. 1, *В*). При pH 4 и $E_h = +550$ *мв* фотопотенциал максимален; уменьшение до +330 *мв* в результате добавления аскорбата натрия приводит к исчезновению фотопотенциала. При последующем увеличении E_h от +330 до +460 *мв* добавлением феррицианида вновь наблюдается $-\Delta E$.

С целью выяснения возможного участия разных форм бактериохлорофилла в сенсибилизированном восстановлении бензохинона мы исследовали фотоиндуцированные изменения поглощения хроматофоров Chro-

matium в области 750—920 *ммк* в условиях, когда происходит эффективное восстановление хинона. Световые изменения поглощения хроматофоров при pH 4,2 меньше по величине (кривые *1* в рис. 3 и 4), чем те же изменения при pH 8. Добавление к хроматофорам при pH 4,2 аскорбата натрия ведет к усилению изменений поглощения, т. е. активные центры хроматофоров при кислых pH частично окислены (рис. 3, кривая *2*).

Освещение хроматофоров в присутствии бензохинона в анаэробных условиях не влияет на величину и кинетику изменений поглощения при 790 и 810 *ммк*, тогда как изменения при 880 *ммк* значительно увеличиваются и обнаруживается «плечо» при 860 *ммк* (рис. *3*, кривая *3*). В отличие от ранее наблюдаемых изменений при 880 *ммк* (без хинона), в присутствии хинона изменения при 880 *ммк* медленно достигают стационарного уровня (~30 *сек*) и медленно обратимы. Наличие кислорода не влияет на вид дифференциального спектра в присутствии хинона. Освещение хроматофоров в присутствии хинона и тритона X-100 вызывает появление интенсивного максимума при 840 *ммк* (рис. 4): в то время как изменения при 790, 810 и 880 *ммк* быстры, изменения при 840 *ммк* медленно (~30 *сек*) достигают насыщения и медленно обратимы в темноте. Следует отметить, что добавление хинона (в присутствии тритона X-100 и без него) к хроматофорам при pH 8 не вызывает подобных изменений дифференциального спектра поглощения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты показывают, что хроматофоры Chromatium при освещении красным светом в анаэробных условиях способны обратимо восстанавливать хинон. Возникновение $-\Delta E$ при освещении хроматофоров следует приписать взаимодействию с платиновым электродом восстановленного хинона, продиффундировавшего из хроматофоров в среду, и изменению вследствие этого равновесия в системе хинон — гидрохинон.

Следующие факты указывают на то, что $-\Delta E$ действительно обусловлен восстановлением хинона. Во-первых, фотопотенциал наблюдается только в присутствии хинона. Во-вторых, максимальный $-\Delta E$ наблюдается при кислых pH, при которых хиноны обладают высокой окислительной способностью. С повышением pH окислительная способность хинонов и фотопотенциал хроматофоров, как раствора хлорофилла в присутствии хинона [14], резко уменьшаются. Восстановление хинона аскорбатом натрия ведет к исчезновению $-\Delta E$; последующее химическое окисление образованного гидрохинона приводит к появлению $-\Delta E$. В-третьих, усиление фотопотенциала при понижении температуры объекта до +5°C вызвано, очевидно, накоплением восстановленного хинона вследствие блокирования обратной реакции.

Можно предположить, что у интактных хроматофоров в восстановлении хинона принимает участие фотосинтетическая цепь переноса электрона и хинон взаимодействует с первичным акцептором или непосредственно с П890. При этом донором электронов служат эндогенные восстановители, содержание которых в хроматофорах, по-видимому, достаточно, несмотря на промывание хроматофоров при их выделении. Фотопотенциал минимален у свежевыделенных хроматофоров, но возрастает у хранившихся хроматофоров, что может быть обусловлено лучшей доступностью хинона к месту реакции вследствие структурных изменений хроматофоров при старении. Структурные изменения хроматофоров, вызываемые действием детергентов или нагреванием, также ведут к увеличению $-\Delta E$, однако в этом случае происходит существенное изменение состояния не только активного центра, но и «валового» бактериохлорофилла. При этом фотопотенциал увеличивается, хотя фотосинтетическая цепь переноса электронов подавлена.

Следовательно, инактивированные хроматофоры могут восстанавливать хинон не только за счет функционирования цепи переноса. Очевидно, у инактивированных хроматофоров в восстановлении хинона принимают участие и молекулы «валового» бактериохлорофилла, состояние которых изменено в результате действия детергентов или нагревания. На это указывает появление медленных непропорционально больших спектральных изменений при 840 или при 880 *ммк*. В присутствии тритона X-100 в сенсибилизированном восстановлении хинона участвуют молекулы Б850, а без тритона X-100 — молекулы Б890, не выделенные из хроматофоров в среду, так как в спектре хроматофоров не наблюдается появления коротковолнового максимума поглощения.

В отличие от хинона, в фотовосстановлении водорастворимого иминоксильного радикала четко обнаруживаются стадии, связанные с участием в сенсибилизации молекул П890 или Б890 [2]. При малых концентрациях тритона X-100 восстановление экзогенного акцептора сенсибилизировано П890. При повышении концентрации тритона X-100 наблюдается ингибирование активности П890 и падение скорости восстановления акцептора, но затем происходит вторичное возрастание скорости восстановления иминоксильного радикала, обусловленное его взаимодействием с молекулами «валового» бактериохлорофилла в измененном состоянии. При восстановлении хинона не наблюдается промежуточного падения скорости его восстановления. По-видимому, это связано с тем, что падение скорости восстановления хинона в результате подавления цепи переноса электрона нивелируется увеличением скорости восстановления вследствие улучшения доступности хинона к месту реакции, а также вследствие участия в сенсибилизации «валового» бактериохлорофилла. Именно с улучшением доступности хинона к месту реакции вследствие структурных изменений хроматофоров можно объяснить увеличение $-\Delta E$ в присутствии 10% ацетона.

Таким образом, при изучении фотохимической активности хроматофоров и, очевидно, хлоропластов и изолированных из них фракций по фотовосстановлению экзогенного акцептора электронов типа хинона следует учитывать возможное участие в сенсибилизированном восстановлении молекул «валового» хлорофилла, которые не выведены из частиц в среду, но состояние которых изменено в результате воздействия инактивирующих факторов или агентов для выделения фракций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vernon L. P., in: Bacterial Photosynthesis, Antioch Press, p. 235, 1963.
2. Карапетян Н. В., Кольтовер В. К., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Биофизика, **16**, 1138, 1971.
3. Clayton R. K., Biochem. Biophys. Res. Communs., **9**, 49, 1962.
4. Zaugg W. S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **50**, 100, 1963.
5. Zaugg W. S., Vernon L. P., Tirpack A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **51**, 232, 1964.
6. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, **30**, 605, 1965.
7. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Обольников Е. А., Самохвалов Г. И., Докл. АН СССР, **183**, 221, 1968.
8. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **171**, 1201, 1966.
9. Karapetyan N. V. in: Progress in Photosynthesis Research, Tubingen, p. 787, 1969.
10. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Мол. биол., **6**, 790, 1972.
11. Кондратьева Е. Н., в сб.: Фотосинтезирующие бактерии. Изд-во АН СССР, 1963.
12. Clark W. M., in: Oxidation-Reduction of Organic Systems, Baltimore, 1960.
13. Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Биофизика, **8**, 191, 1963.
14. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Биофизика, **11**, 593, 1966.

Поступила в редакцию
30.III.1972

LIGHT INDUCED CHANGES OF REDOX-POTENTIAL OF CHROMATIUM CHROMATOPHORES IN THE PRESENCE OF *p*-BENZOQUINON

I. N. KRAKHMALEVA, N. V. KARAPETYAN, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Photoinduced changes of redox potential (ΔE) of chromatophore suspension of Chromatium in the presence of *p*-benzoquinon were studied. It is shown that when chromatophores are illuminated by red light $-\Delta E$ is observed only at acid pH in anaerobic conditions in the presence of quinon. $-\Delta E$ value increases when chromatophores are under the effect of inactivating factors (Triton X-100, DC-Na, aceton, heating) which supress the activity of P890. $-\Delta E$ is always observed under the effect of rising concentrations of Triton X-100 and heating, while at high concentrations of DC-Na or aceton $+\Delta E$ is found instead of $-\Delta E$. In the presence of Triton X-100 and quinon $-\Delta E$ is not saturated at light intensities sufficient for the saturation of bacterial photosynthesis. Besides usual absorption changes at 790 and 810 nm slower changes at 880 nm reversible in the dark are observed in a difference spectrum «light-dark» of chromatophores in an acid medium in the presence of quinon. In the presence of qionon and trition X-100 such changes are observed at 840 nm. It is suggested that the reduction of quinon in chromatophores in the presence of Triton X-100 is sensitized by the molecules of «bulk» bacteriochlorophyll in the changed state due to the effect of the detergent.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 19, вып. 5 1972 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОДОРОДА ПРИ ОСВЕЩЕНИИ ВОДОРОСЛЕЙ

В. П. ОЩЕПКОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Посредством газо-хроматографического метода исследовали выделение водорода и кислорода при освещении Chlorella pyrenoidosa и других одноклеточных водорослей в атмосфере аргона. Выделение O_2 и H_2 в регистрируемых количествах происходит альтернативно. Исследована возможность обратимых переходов выделения $H_2 \rightleftharpoons O_2$. Переход от O_2 к H_2 может быть вызван снижением интенсивности света, добавлением глюкозы, диурона (10^{-6} *M*), динитрофенола (10^{-4} *M*), нагреванием до 40°, светом с λ длиннее 700 *нм*. Переход от H_2 к O_2 может быть вызван увеличением интенсивности света, охлаждением предварительно нагретого объекта до комнатной температуры, светом с λ короче 700 *нм*. Любое химическое или физическое воздействие на объект, ингибирующее одну из этих функций или смещающее их динамическое равновесие, приводит к более явному проявлению другой. Динитрофенол (10^{-4} *M*) ингибирует фотообразование H_2, но этот эффект не наблюдается в явном виде на белом свету, так как одновременно подавляется выделение O_2, что приводит к сдвигу динамического равновесия функций и к кажущемуся стимулированию выделения H_2. Предполагается, что механизм фотообразования H_2 у водорослей аналогичен механизму фотообразования H_2 у фотосинтезирующих бактерий.

Явление выделения водорода при освещении водорослей открыли в 1942 г. Гаффрон и Рубин [1]. Тридцатилетний период исследований [2—6] отражает сложную эволюцию представлений об условиях и механизме этого явления. Все исследователи, занимавшиеся изучением данного вопроса, подчеркивают необходимость предварительной анаэробной адаптации водорослей, которая может колебаться от нескольких минут до дней [2, 7] в зависимости от вида, штамма, условий культивирования и т. д. Действие разобщителей фотофосфорилирования, по данным [1, 5, 8], стимулирует выделение H_2 на свету у зеленых водорослей, но ингибирует фотообразование H_2 пурпурными фотосинтезирующими бактериями [9]. В то же время сообщалось, что образование H_2 водорослями в темноте ингибируется разобщителями фосфорилирования [1]. Абелз [10] на бесклеточных экстрактах Chlamydomonas eugametos наблюдал светозависимое выделение H_2 при добавлении восстановленных пиридиннуклеотидов, однако в работе не исследовалось влияние добавления АТФ. В литературе нет единого мнения по поводу механизмов взаимосвязи светового выделения O_2 и H_2. В работах [6, 8] авторы связывают фотообразование H_2 у Scenedesmus с нециклическим переносом электрона от эндогенного донора через фотосистему I. Установлено выделение H_2 на свету у мутанта Scenedesmus, утратившего фотосистему II [8]. Хили [5] допускает возможность участия в процессе фотосистемы II для некоторых видов водорослей вследствие различного действия на фотообразование H_2 диурона (ингибитора фотосистемы II) у разных водорослей. На Chlamydomonas moewusii показано ингибирование фотообразования H_2 монофторацетатом, отсутствие эффекта Эмерсона и сдвиг максимума спектра действия фотообразования H_2 приблизительно на 20 *нм* в длин-

новолновую область относительно спектра действия фотосинтеза [11]. Спруит [3] описал у Chlorella одновременное выделение O_2 и H_2 на свету в молярном отношении 1 : 2. Однако в дальнейшем такая стехиометрия процесса не была подтверждена [4], хотя одновременное выделение на свету O_2 и H_2 в условиях анаэробиоза было установлено манометрическими и масс-спектрометрическими измерениями [4, 5]. В свою очередь эти результаты противоречат данным о резкой чувствительности гидрогеназы к O_2, приводящей к инактивации этого фермента. Указанная разноречивость экспериментальных данных дает повод для разнообразных гипотетических схем механизма фотообразования H_2 у водорослей [5, 6, 12].

В настоящей работе сделана попытка исследования некоторых неясных вопросов механизма выделения водорода. Нас, в частности, интересовало: условия и необходимость анаэробной адаптации водорослей, связь функций выделения O_2 и H_2, значение фотофосфорилирования для фотообразования H_2.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования обычно использовалась бактериально чистая синхронная культура водоросли Chlorella pyrenoidosa Prings 82*T*, любезно предоставленная нам лабораторией фотосинтеза Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР. Культуру выращивали на среде Тамия при $t=37$—38° при непрерывной продувке воздуха (240 *л/час*) и CO_2 (60 *л/час*). Освещенность люминесцентными лампами составляла 15000 *лк*. В опыт обычно брали аутоспоры перед третьим делением. Клетки осаждали центрифугированием, промывали 0,05 *М* фосфатным буфером pH 6,8, после чего суспендировали в том же буфере, доводя оптическую плотность объекта при 680 *нм* до 0,5.

Для регистрации выделения газов, сопровождающих метаболизм водоросли, использовали газо-хроматографический метод. На базе газового хроматографа «Хром-3» была создана установка и разработана методика, близкая к описанной ранее Свиннер-

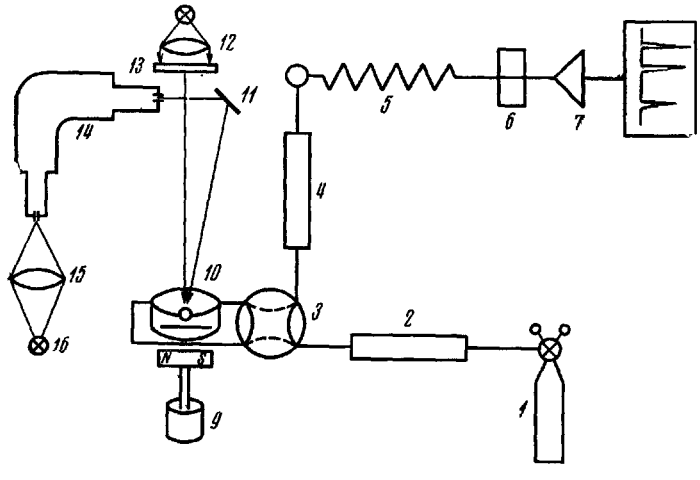


Рис. 1. Принципиальная схема установки для регистрации выделения газов, сопровождающих метаболизм водорослей

1 — баллон газа-носителя (аргон) с редуктором, *2* — поглотитель следов кислорода (Ni-Cr-катализатор), *3* — четырехходовой кран, *4* — поглотитель паров воды (ангидрон) и углекислоты (аскарит), *5* — хроматографическая колонка (молекулярные сита 5А), *6* — детектор (катарометр), *7* — усилитель постоянного тока, *8* —самописец, *9* —магнитная мешалка, *10* — стеклянная кювета с объектом, *11* — поворотное зеркало, *12*— осветитель ОИ-19, *13* — светофильтр, *14* — монохроматор, *15* — конденсор, *16* — лампа накаливания

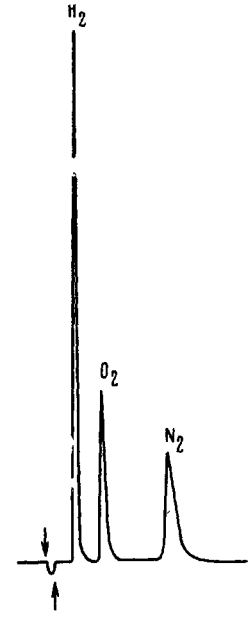


Рис. 2. Хроматограмма искусственной смеси H_2, O_2, N_2, введенной в кювету

Стрелками обозначено переключение потока газа-носителя на кювету и отключение кюветы от линии

тоном и сотр. [13] методике анализа растворенных газов в водных растворах. Принципиальная схема установки приведена на рис. 1. Детали методики будут описаны в другом месте. Проверку линейности показаний в интересующем диапазоне концентраций, а также оценку чувствительности методики проводили по модифицированному методу экспоненциального разбавления, предложенному Лавлоком [14].

Условия анализа: колонка из нержавеющей стали длиной 1 *м*, с внутренним диаметром 6 *мм*. Насадка — молекулярные сита 5*А* (60—80 *меш*). Газ-носитель аргон (V=85 *мл/мин*), давление на входе колонки 0,45 *ати*. Температура комнатная (20±2°). Детектор-катарометр, ток моста 120 *ма*. Шкала самописца 2 *мв*, время пробега шкалы 1 сек. Чувствительность методики по H_2 при данном режиме работы составила 0,01 *мкл*. Хроматограмма искусственной смеси H_2, O_2 и N_2, введенной в кювету, представлена на рис. 2. В качестве источника действующего света использовали осветитель ОИ-19 (лампа накаливания 20 *вт*, 8 *в*). 1 *мл* объекта вносили шприцем в стеклянную кювету, которую продували газом-носителем 3 раза по 15 сек. через 3 мин. для создания в кювете анаэробных условий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние интенсивности света на фотообразование молекулярного водорода водорослями. При освещении объекта, находящегося в анаэробных условиях, через светофильтр СЗС-26 (полоса пропускания 400—750 *нм*, интенсивность $2{,}5 \cdot 10^4$ *эрг/см²·сек*) в течение 10 мин. на хроматограмме регистрируются два пика, соответствующие H_2 и O_2. При следующих таких же экспозициях на хроматограммах регистрируется только пик O_2. Если снизить интенсивность света до $3{,}4 \cdot 10^3$ *эрг/см²·сек* нейтральными фильтрами, то при тех же экспозициях постепенно уменьшается и затем пропадает пик O_2, но в то же время появляется и возрастает пик H_2. При дальнейшем освещении регистрируется только пик H_2. Увеличение интенсивности освещения снова ведет к выделению O_2. Процесс полностью обратим. Можно подобрать экспериментальным путем промежуточную интенсивность действующего света, при которой не будут проявляться на хроматограмме пики H_2 и O_2, но не удается подобрать интенсивность света, при которой оба компонента проявлялись бы на хроматограмме достаточно явно. Интенсивность света, при которой наблюдается переход от выделения кислорода к водороду и обратно ($O_2 \rightleftharpoons H_2$), а также величины интенсивности света, соответствующей оптимальному выходу по H_2 или O_2, зависит от вида, физиологического состояния и предыстории водоросли. Так, например, предварительная инкубация объекта в анаэробных условиях в течение суток или аэробная инкубация в культуральной среде при пониженной температуре (+2°) в течение нескольких суток не приводит к качественным изменениям описанных эффектов, однако приводит к смещению точки перехода функций $O_2 \rightleftharpoons H_2$ в сторону большей интенсивности света, что в несколько раз увеличивает выход H_2. Хранение суспензии водорослей при комнатной температуре в аэробных условиях в фосфатном буфере или дистиллированной воде в течение суток приводит также к резкому увеличению выхода H_2, причем выделение O_2 в анаэробных условиях, как правило, не удается регистрировать даже при больших интенсивностях света.

Влияние глюкозы. Как отмечалось еще в первой работе Гаффрона с культурой Scenedesmus [1], добавление глюкозы стимулировало фотообразование H_2. В наших опытах также происходило увеличение эффекта, но в дополнение к известному было установлено, что добавление глюкозы вызывает смещение точки перехода функций $O_2 \rightleftharpoons H_2$ в сторону большей интенсивности света. Если добавление глюкозы происходит в тот момент, когда объект уже «работает» с выделением O_2, происходит переход на выделение H_2 при той же интенсивности света. Если затем повышать интенсивность света, то при определенной величине, зависящей от количества добавленной глюкозы, объект снова перейдет к выделению O_2. Дальнейшее ступенчатое увеличение концентрации глюкозы

Влияние интенсивности света и добавления глюкозы на выделение кислорода и водорода водорослями Chlorella pyrenoidosa

Интенсивность света, *эрг/см²·сек*	Высота пика, *мм*		Концентрация глюкозы, *мМ*	Интенсивность света, *эрг/см²/сек*	Высота пика, *мм*		Концентрация глюкозы, *мМ*
	H_2	O_2			H_2	O_2	
$2{,}5\cdot10^4$	0	5	0	$5{,}0\cdot10^4$	0	3	2
$3{,}4\cdot10^3$	4	0	0	$5{,}0\cdot10^4$	75	0	4
$1{,}2\cdot10^4$	8	0	0	$1{,}4\cdot10^5$	0	8	4
$2{,}1\cdot10^4$	2	0	0	$1{,}4\cdot10^5$	62	0	8
$3{,}0\cdot10^4$	0	6	0	$2{,}6\cdot10^5$	157	0	8
$3\cdot0\cdot10^4$	57	0	2	$5{,}7\cdot10^5$	92	0	8
$4{,}0\cdot10^4$	17	0	2				

Объем суспензии водорослей 1 *мл*, D=0,5 при 680 *нм*. Газовая фаза—аргон. Ток моста детектора 120 *ма*. Шкала самописца 2 *мв*. Истсчник света—ссветитель СИ-19. Светофильтры нейтральные и СЗС-26.

будет приводить к повторению описанных явлений, вплоть до интенсивности света $5{,}7\cdot10^5$ *эрг/см²·сек* (таблица).

Влияние света разной длины волны. Объект освещали через интерференционные светофильтры с полушириной 10 *нм*. Для устранения кратных порядков пропускания последовательно ставили соответствующие граничные светофильтры. Установлено, что при освещении объекта светом равной интенсивности $2{,}4\cdot10^4$ *эрг/см²·сек* с длиной волны короче 700 *нм* наблюдается либо выделение O_2, либо слабое выделение H_2, тогда как при освещении объекта светом λ длиннее 700 *нм* происходит резкое увеличение выделения H_2. В длинноволновой области

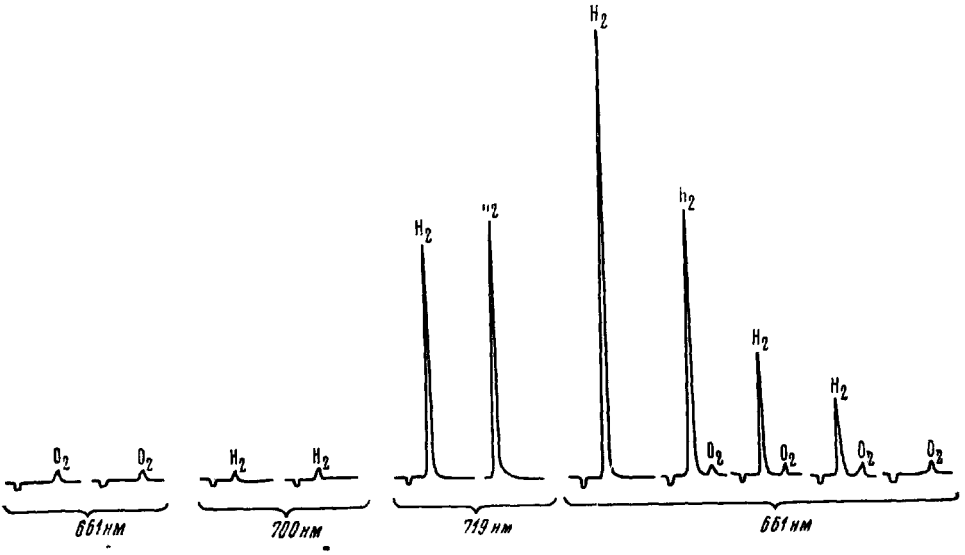


Рис. 3. Эффект спектрального разделения выделения водорода и кислорода водорослями и переходная кинетика процесса

Показаны последовательные хроматограммы, записанные после 10 мин. экспозиции объекта на свету. Время продувки кюветы газом-носителем 5 сек Указаны максимумы пропускания интерференционных светофильтров в *нм*. Интенсивность монохроматического света во всех случаях $2{,}4\cdot10^4$ *эрг/см²·сек*. Условия анализа и объект те же, что и в таблице

эффект выделения H_2 регистрировался нами до 762 *нм*. Характерная хроматограмма представлена на рис. 3. Важно отметить, что при замене светофильтра с максимумом пропускания 719 *нм* на светофильтр с максимумом пропускания 661 *нм* объект не сразу переходит к регистрируемому выделению O_2, а лишь постепенно, причем вначале регистрируется

еще больший выход H_2 с последующим спадом и постепенным переходом к выделению O_2, либо на значительно более низкий уровень выделения H_2. Такую кинетику можно объяснить постепенным переходом от внутриклеточно анаэробных условий к внутриклеточно аэробным, приводящим к постепенной инактивации гидрогеназы.

Влияние нагревания. Нагревание объекта в процессе опыта в пределах 20—40° может приводить к смене функций — от выделения O_2 к выделению H_2, а охлаждение до исходной, комнатной температуры, к обратному переходу. Хроматограмма, иллюстрирующая это положение, приведена на рис. 4. В связи с этим интересно отметить, что коэффициент

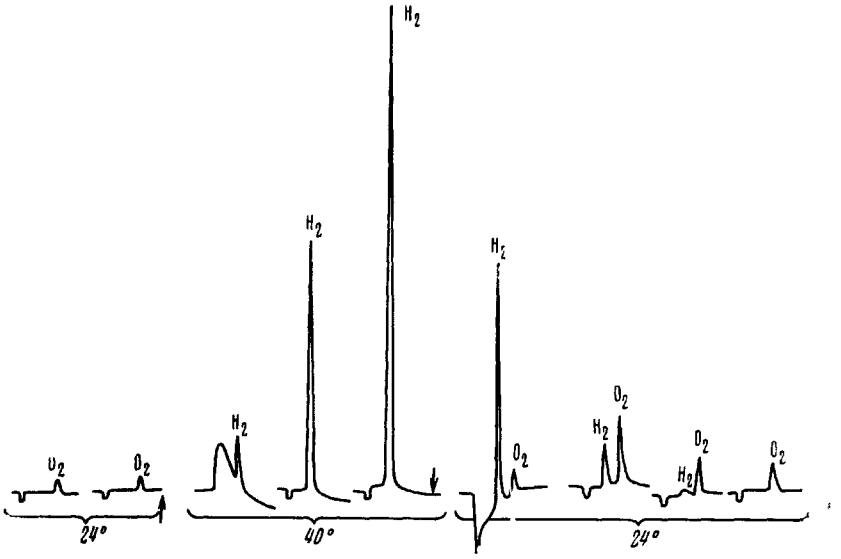


Рис. 4. Влияние нагревания водорослей в процессе опыта на выделение кислорода и водорода

Интенсивность белого света $2{,}5 \cdot 10^4$ *эрг/см²·сек*. Стрелками обозначено включение и выключение нагревания кюветы теплым воздухом из фена: Условия и объект те же, что и в опытах рис. 3 и таблицы

Вант-Гоффа Q_{10} в диапазоне температур 25—35° для фотообразования H_2 (в случае скрытой, но потенциально активной функции образования O_2) больше 1, а на объектах, утративших способность выделять O_2, меньше 1, т. е. такой же, как у Rhodospirillum rubrum.

Действие диурона (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина). Ингибитор фотореакции II — диурон — в концентрации 10^{-6} *М* приводит к стимуляции фотообразования H_2 либо к переходу с O_2 на H_2, если объект освещали светом достаточно высокой интенсивности. Дальнейшее увеличение интенсивности света до уровня насыщения увеличивает выход H_2, но не приводит к переходу на выделение O_2. Эти данные соответствуют данным авторов [8, 11] и свидетельствуют о независимости реакции фотообразования водорода и процесса выделения кислорода. Следует отметить, что в наших опытах добавление диурона к объектам, утратившим способность к выделению O_2, вызывало частичное ингибирование фотообразования H_2, что указывает на неспецифичность действия данного гербицида.

Влияние 2,4-динитрофенола (ДНФ). Этот разобщитель фосфорилирования в концентрации 10^{-4} *М* увеличивал фотообразование H_2 на белом свету и подавлял образование H_2 в темноте. В то же время установлено, что на объектах, утративших способность к выделению O_2, а также после предварительного добавления 10^{-6} *М* диурона, добавление ДНФ вызывает только ингибирование фотообразования H_2.

При интенсивностях света, близких к переходу с O_2 на H_2, ДНФ стимулирует такой переход. Это указывает на неспецифический характер действия разобщителя фотофосфорилирования, приводящий к частичному ингибированию фотосистемы II и, как следствие этого, увеличению фотообразования H_2. Прямое доказательство высказанного положения можно получить, если сочетать добавление динитрофенола со спектральным

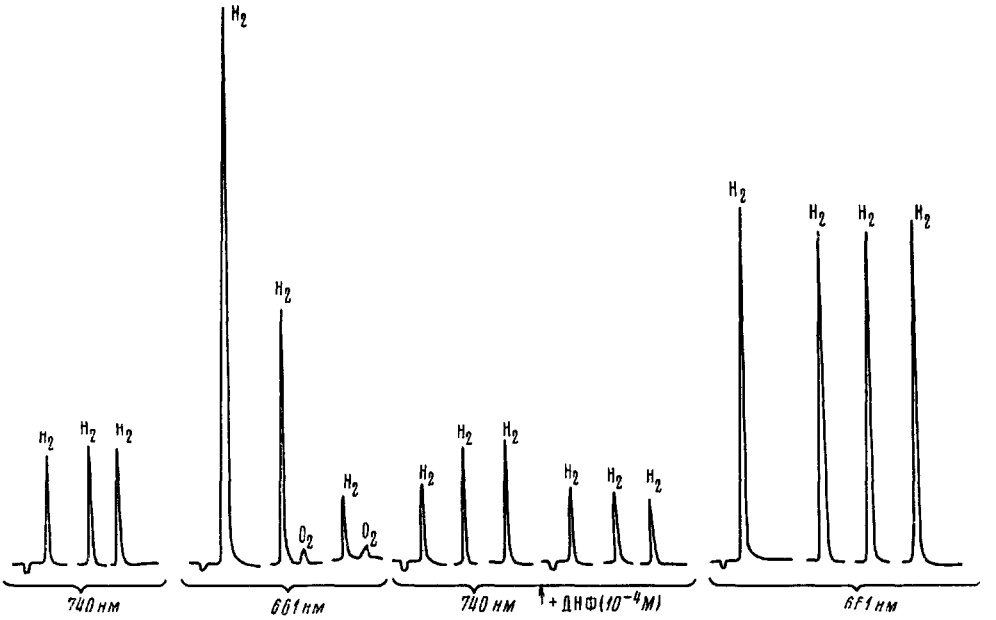


Рис. 5. Эффект сочетания добавления динитрофенола со спектральным разделением выделения водорода и кислорода водорослями

Стрелкой обозначено добавление динитрофенола (10^{-4} *М*). Условия и объект см. рис. 3 и таблицу

разделением функций выделения H_2 и O_2. Как показано на рис. 5, добавление ДНФ при освещении объекта через интерференционный светофильтр 740 *нм* вызывает частичное ингибирование фотообразования H_2, при переходе же на освещение через светофильтр 661 *нм* первоначальный выход H_2 меньше, чем при такой же смене светофильтров без добавления ДНФ, и, что самое главное, последующий незначительный спад выхода H_2 не приводит к переходу на регистрируемое выделение O_2. Следовательно, разобщитель фотофосфорилирования ДНФ вызывает ингибирование фотообразования H_2 водорослями, но этот эффект маскируется конкуренцией функций O_2 и H_2.

Как указано выше, работа в основном выполнена на синхронной культуре Chlorella pirenoidosa, иногда в опыт брались несинхронные культуры, выращенные при различных режимах освещения, что, однако, не приводило к принципиальным качественным изменениям описанных результатов. Во всех необходимых случаях имели темновой контроль. Сравнительные опыты ставили на автотрофных культурах Chlorella vulgaris и Scenedesmus obliquus, на которых также получены качественно идентичные результаты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность известных экспериментальных данных позволяет обсудить вероятный механизм фотообразования молекулярного водорода у водорослей. Установлено, что анаэробная адаптация водорослей не является необходимым условием для проявления функции выделения H_2

при освещении. Такая адаптация желательна для увеличения выхода H_2, но ее можно заменить добавлением глюкозы. В анаэробных условиях и в темноте клетка переходит на гетеротрофный метаболизм, за счет ферментативного окисления эндогенных запасов соединений углерода — продуктов предшествовавшего фотосинтеза. Узким местом цепи темновых биохимических реакций, вероятно, является стадия гидролиза запасенных полимерных углеводов до мономеров. Обратимые переходы $O_2 \rightleftharpoons H_2$ при изменении интенсивности света, а также факт существования «нулевой» точки говорят о том, что при освещении в анаэробных условиях водоросли сохраняют способность к фотосинтезу с выделением O_2 даже в том случае, если они «адаптированы», т. е. способны к интенсивному гетеротрофному обмену веществ. Выделяющийся кислород может быть терминальным акцептором в процессе ферментативного окисления соединений углерода, а также может приводить к инактивации гидрогеназы при достаточной внутриклеточной концентрации. Это делает условие анаэробиоза для образования H_2 обязательным. Регуляцию анаэробного энергетического метаболизма при перепроизводстве восстановителей в условиях недостатка CO_2 осуществляет «водородный клапан», по терминологии Грея и Геста [15]. Конкуренция фотосинтеза с выделением кислорода и анаэробного метаболизма с выделением водорода при освещении приводит к альтернативному выходу O_2 и H_2 в регистрируемых количествах. Любое физическое или химическое воздействие на объект, ингибирующее одну из функций или смещающее их динамическое равновесие, приводит к более явному проявлению другой функции. Диурон ингибирует преимущественно фотосистему II, ответственную за выделение O_2, поэтому добавление его в малых концентрациях ведет к стимуляции выделения H_2. Нагревание объекта до 40° усиливает темновые реакции ферментативного окисления и одновременно частично подавляет реакцию выделения O_2, что приводит к переходу от выделения O_2 к выделению H_2 при той же интенсивности света. Охлаждение объекта до комнатной температуры восстанавливает исходное динамическое равновесие в пользу выделения кислорода. Разобщитель фосфорилирования — динитрофенол ингибирует фотообразование H_2, но этот эффект не наблюдается в явном виде на белом свету, так как одновременно подавляется выделение O_2, что приводит к сдвигу динамического равновесия функций и к кажущемуся стимулированию выделения H_2. Сам факт ингибирующего действия разобщителя указывает на роль фотофосфорилирования в процессе фотообразования H_2. С другой стороны, стимуляцию выделения H_2 вызывает свет с длиной волны больше 700 *нм*, что в значительной мере исключает возможность переноса электрона по нециклической цепи и свидетельствует скорее в пользу участия в процессе фотообразования H_2 циклического фотофосфорилирования.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные в сочетании с данными других авторов [1, 8, 10, 11] согласуются со схемой, предложенной Гестом [9, 16] для объяснения фотообразования H_2 у фотосинтезирующих пурпурных бактерий [17]. Согласно этой схеме, в ходе ферментативного окисления соединений углерода образуются в избытке, по сравнению с биосинтетическими потребностями клетки, восстановленные пиридиннуклеотиды; далее по цепи обратного переноса электрона окислительно-восстановительный потенциал системы доводится до потенциала водородного электрода, который, вероятно, при участии ферредоксина и гидрогеназы приводит к выделению молекулярного водорода; процесс циклического фотофосфорилирования при этом поставляет необходимую энергию.

Следует указать, что вообще существует возможность прямой фотосенсибилизации этого процесса хлорофиллом [18]. Так, в опытах нашей лаборатории в системе восстановленные пиридиннуклеотиды — хлорофилл — метилвиологен при освещении красным светом наблюдалось фо-

товосстановление метилвиологена — акцептора электрона с $E_0 = -0{,}446$ в, близким к ферредоксину. Возможность работы такого механизма in vivo нуждается в исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gaffron H., Rubin J. J. Gener. Physiol., 26, 219, 1942.
2. Frenkel A. W. Arch. Biochem. and Biophys., 38, 219, 1952.
3. Spruit C. J. P. Meded. Landbouhogeschool., 58, 1, 1958.
4. Bishop N., Gaffron H. In: Photosynthetic mechanims in green plants, 441. Nat. Acad. Sci., Washington, 1963.
5. Healey F. P. Planta, 91, 220, 1970.
6. Stuart T. S., Gaffron H. Planta, 100, 228, 1971.
7. Gaffron H. In: Plant Physiology (ed. by F. C. Steward), 1B, Acad. Press, 1960.
8. Kaltwasser H., Stuart T. S., Gaffron H. Planta, 89, 309, 1969.
9. Gest H., Ormerod J. G., Ormerod K. S. Arch. Biochem. and Biophys., 97, 21, 1962.
10. Abeles F. B. Plant Physiol., 39, 169, 1964.
11. Healey F. P. Plant Physiol., 45, 153 1970.
12. Bishop N. Annual Rev. Plant Physiol., 17, 185, 1966.
13. Swinnerton J. W., Linnenbon V. J., Cheek C. H. Analyt. Chem., 34, 483, 1962.
14. Lovelock J. E. Analyt. Chem., 33, 162, 1961.
15. Gray G. T., Gest H. Science, 148, 186, 1965.
16. Gest H. Nature, 209, 879, 1966.
17. Гоготов И. Н., Кондратьева Е. Н. Докл. АН СССР, 175, 714, 1967.
18. Красновский А. А., Брин Г. П. Докл. АН СССР, 163, 761, 1965.

Поступила в редакцию
11.IV.1972

A STUDY ON HYDROGEN EVOLUTION DURING THE ILLUMINATION OF THE ALGAE

V. P. OSHCHEPKOV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The evolution of hydrogen and oxygen during the illumination of Chlorella pyrenoidosa and other unicellular algae was studied in the atmosphere of argon by gas chromatography. The evolution of O_2 and H_2 in registered amounts was alternative. A possibility for reversible transitions of the evolution $H_2 \rightleftharpoons O_2$ was investigated. The transition from O_2 to H_2 can be induced by a decrease of the light intensity, the addition of glucose, DCMU (10^{-6} M) and dinitrophenol (10^{-4} M), heating up to 40° or the light with $\lambda > 700$ nm. The transition from H_2 to O_2 can be caused by an increase of the light intensity, cooling of the preliminary heated object down to the room temperature or the light with $\lambda < 700$ nm. Any chemical or physical treatment of the object, inhibiting one of these functions or shifting their dynamic equilibration, results in a more obvious manifestation of the other function. Dinitrophenol (10^{-4} M) inhibits photoproduction of H_2, but this effect can not be observed clearly in the white light since the evolution of O_2 is inhibited at the same time, resulting in a shift of the dynamic equilibration of the functions and in the apparent stimulation of the evolution of H_2. The mechanism of H_2 photoproduction in the algae is presumed to be similar to that in the photosynthesizing bacteria.

Доклады Академии наук СССР
1972. Том 207, № 3

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

В. А. ШУВАЛОВ, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

СВЯЗЬ ПЕРВОГО КОМПОНЕНТА ПОСЛЕСВЕЧЕНИЯ С ФОТОПЕРЕНОСОМ ЭЛЕКТРОНА В ХЛОРОПЛАСТАХ

В предшествовавших работах ([1]) нами было проведено феноменологическое исследование процесса послесвечения. В результате этого было выделено пять основных компонентов послесвечения.

В данной работе основное внимание было уделено изучению природы первого (миллисекундного) компонента послесвечения, время жизни которого мало зависит от температуры от −170 до 40° ([1]).

Исследование послесвечения хлоропластов осуществлялось на импульсной фосфороскопической установке, описанной ранее ([2]). Возбуждение производилось импульсами света с $\lambda \geqslant 630$ мμ и длительностью 10^{-6} сек., следующими друг за другом с частотой 50 гц. Регистрировалась кинетика затухания послесвечения, начиная с $4 \cdot 10^{-4}$ сек. после центра вспышки. Спектры возбуждения и излучения послесвечения измерялись с помощью монохроматора с разрешением 5 мμ. Опыты производились на хлоропластах гороха, консервированных замораживанием в сухом льду ([3]). Перед измерением хлоропласты разводились десятикратно дистиллированной водой и центрифугировались при 1000 *g* в течение 1 мин. для удаления крупных ассоциатов. Концентрация хлорофилла в опыте достигала 15 μг/мл. Измерение первого компонента послесвечения в основном производилось при −40°, что позволяло на несколько порядков уменьшить вклад секундных компонентов послесвечения, а также исследовать свечение в условиях блокирования энзиматических процессов.

Нами была предпринята попытка исследовать свечение при −40° в присутствии доноров и акцепторов электрона 2 фотосистемы с тем, чтобы попытаться установить связь свечения с актами переноса электрона в реакционном центре этой фотосистемы. В качестве акцепторов электрона использовали феррицианид (Fe^{3+}Ц), $Fe(NH_4)(SO_4)_2$-(Fe_3^{+}АК), *n*-бензохинон, 2,6-дихлорфенолиндофенол, а также метилвиологен. В качестве возможных доноров электрона — ионы двухвалентного марганца ([4]), гидроксиламин, гидразин, аскорбат и восстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол.

Послесвечение хлоропластов при −40° усиливается в 10—20 раз в присутствии Fe^{3+}Ц и Fe^{3+}АК, тогда как Fe^{2+}Ц и Fe^{2+}АК не влияли значительно на послесвечение (рис. 1). Добавление других акцепторов электрона не изменяло существенно контрольного уровня послесвечения. Одновременное добавление к хлоропластам Fe^{3+}Ц и 3-[3,4-дихлорфенил]-1,1-диметилмочевины (ДХФМ) в концентрации 10^{-4} мол/л незначительно уменьшает интенсивность послесвечения. Кинетика затухания послесвечения характеризуется одним компонентом с $\tau \simeq 6 \cdot 10^{-4}$ сек. Интенсивность свечения существенно не зависит от pH в районе 4,5 — 8,5. Можно было предположить, что возникающее послесвечение связано с обратимым переносом электрона на Fe^{3+}.

Существенное влияние на послесвечение оказывают также ионы Mn^{2+}. При добавлении $MnCl_2$ в концентрации 10^{-2} мол/л наблюдается резкий всплеск послесвечения в первый момент освещения, после чего стационарная интенсивность послесвечения быстро спадает к уровню, который превышает уровень свечения контрольных хлоропластов в 20 — 30 раз (рис. 1).

После периода темноты в несколько десятков секунд описанная кинетика повторяется. Действие ДХФМ в концентрации 10^{-4} мол/л приводит к почти полному подавлению наблюдаемого послесвечения. При pH 4,5 свечение во время освещения спадает до уровня свечения контрольных хлоропластов, что не наблюдается при pH 6,0 и 8,5. Кинетика затухания свечения имеет два компонента с $\tau \simeq 10^{-3}$ и 0,1 сек. (рис. 1). Другие использованные доноры электрона не изменяли свечения контрольных хлоропластов.

Как в случае Fe^{3+}Ц, так и в случае $MnCl_2$ послесвечение имело спектр возбуждения, совпадающий со спектром поглощения хлорофилла в красной области спектра, а спектр излучения, совпадающий со спектром флуоресценции хлорофилла.

Было найдено также, что хлористые соли щелочноземельных металлов $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ индуцируют послесвечение, которое по интенсивности, кинетике затухания и чувствительности к действию ДХФМ тождественно свечению в присутствии $MnCl_2$. Соли, обозначаемые нами $MeCl_2$, можно рассматривать как фактор, влияющий на состояние мембраны ([5], [6]), окружающей реакционный центр. Было предположено, что если Fe^{3+} и $MeCl_2$ вызывают образование ион-радикалов хлорофилла реакционного центра (хл.р.ц.) противоположного знака, то можно ожидать при одновременном присутствии Fe^{3+} и $MeCl_2$ ингибирования накопления радикалов пигмента и уменьшения послесвечения.

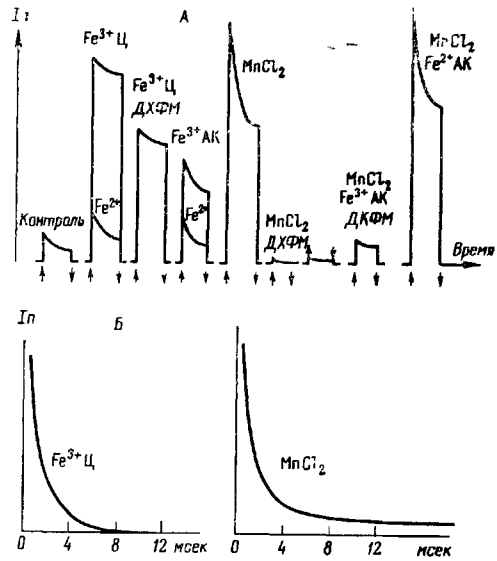


Рис. 1. Зависимость стационарной интенсивности (*А*) и кинетики затухания (*Б*) послесвечения хлоропластов при —40° от присутствия акцепторов и доноров электрона фотосистемы 2 (в опыте 7 на *А* одновременно присутствуют $MnCl_2$ и Fe^{3+}АК). Стрелки вверх — включение возбуждающего света, стрелки вниз — его выключение. Величина $\lambda_{воз} \geqslant 630$ мμ, $\lambda_{изл} \geqslant 670$ мμ. Концентрации: Fe^{3+}Ц и Fe^{3+}АК 10^{-4} *М*; $MnCl_2$ 10^{-2} *М*. Время освещения в каждом опыте на *А* 50 сек.

Чтобы проверить это предположение, было изучено одновременное действие Fe^{3+}АК и $MnCl_2$ на послесвечение хлоропластов при —40°. Оказалось, что одновременное присутствие агентов, вызывающих в отдельности резкое усиление послесвечения контрольных хлоропластов, приводит к почти полному подавлению послесвечения при —40° (рис. 1). Добавление в эту систему ДХФМ частично восстанавливает свечение, имеющее кинетику, которая наблюдается при добавлении Fe^{3+}АК. Fe^{2+}АК не изменяет послесвечения, индуцируемого $MnCl_2$ (рис. 1).

Таким образом, полученные данные можно понять с точки зрения обратимого переноса электрона между хл.р.ц., акцептором электрона (Fe^{3+}) и донором электрона, который активируется в присутствии $MeCl_2$. Существенно, что кинетика послесвечения в присутствии Fe^{3+}Ц и $MeCl_2$ (рис. 1) соответствует кинетике исчезновения катион- и анион-радикалов хлорофилла в растворах, измеренной с помощью флеш-фотолиза ([7]).

Вместе с тем остается неясным вопрос о механизме активации донора электрона в присутствии $MeCl_2$. В качестве подхода к решению этого вопроса было исследовано действие различных солей щелочноземельных металлов и Mn^{2+}, а также катионов других групп. Было найдено, что хлористые соли Na^+, K^+, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+} вызывают активацию свечения, интенсивность которого, однако, в несколько раз меньше, чем в присутствии

$MnCl_2$ и $MgCl_2$; $CrCl_3$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$ не оказывали влияния на свечение или приводили к его ингибированию; наиболее сильным индуцирующим действием обладали хлористые соли Mn^{2+} и щелочноземельных металлов. Было найдено, что не существует строгой специфичности действия ионов указанной группы — в качестве катиона могут быть ионы Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, в качестве аниона — Cl^-, Br^-. Однако если сумма ионных радиусов использованных катионов и анионов меньше чем 2,5 Å (MgF_2, $BeCl_2$) или больше 3,0 Å (MgI_2, $BaCl_2$, $Mg(NO_3)_2$, $MgSO_4$, $MnSO_4$), наблюдается резкое уменьшение действия соли на послесвечения контрольных хлоропластов (рис. 2). Эти факты указывают на то, что для возникновения послесвечения необходимо присутствие не только иона щелочноземельного металла или Mn^{2+}, но и соответствующего однозарядного аниона так, чтобы сумма ионных радиусов лежала в интервале от 2,5 до 3,0 Å. Характерно, что в присутствии Fe^{3+}АК действие солей на послесвечение имеет ингибирующий характер, причем наблюдается та же закономерность суммы ионных радиусов (рис. 2).

Для проверки гипотезы об усилении потока электронов на Fe^{3+} в присутствии $MeCl_2$ было проведено измерение скорости восстановления Fe^{3+}Ц по уменьшению максимума его поглощения при 420 мμ в присутствии хлоропластов и $MeCl_2$ при 20°. Было найдено в согласии с [8], что скорость восстановления Fe^{3+}Ц контрольными

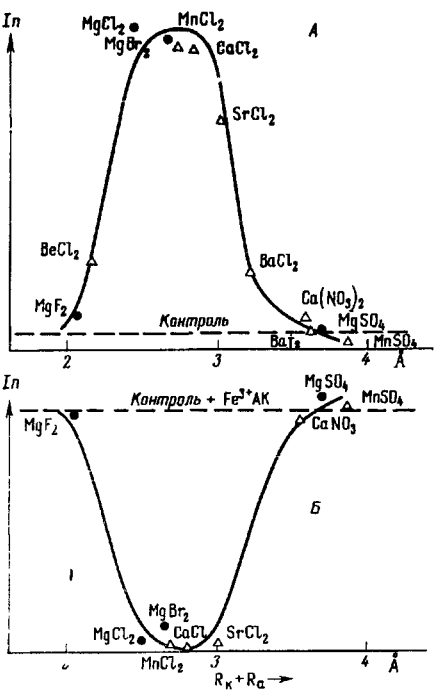


Рис. 2. Зависимость интенсивности послесвечения хлоропластов при —40° от суммы ионных радиусов катиона и аниона ($R_к + R_а$) в добавленных солях (10^{-2} *М*) для контроля (*А*) и контроля в присутствии Fe^{3+}АК (*Б*)

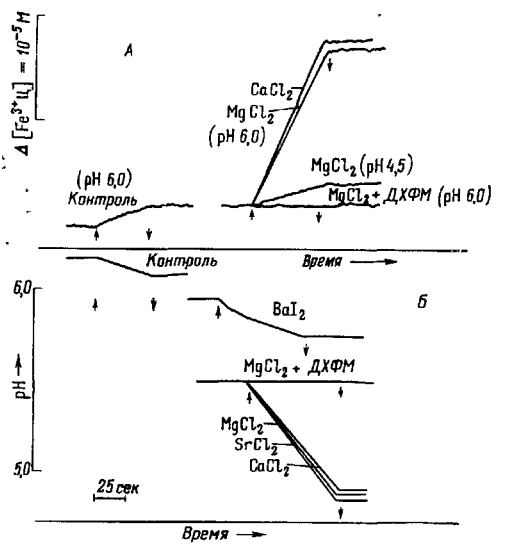


Рис. 3. Фотореакции в хлоропластах при 20° в зависимости от присутствия $MeCl_2$ (10^{-2} *М*): фотовосстановление Fe^{3+}Ц (*А*); фотовыделение H^+ в присутствии Fe^{3+}Ц (*Б*)

хлоропластами резко усиливается в присутствии $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ (рис. 3). Низкое значение pH уменьшает скорость реакции, которая полностью ингибируется ДХФМ ($5 \cdot 10^{-6}$ *М*). Тот же самый эффект наблюдается по фотовыделению H^+ из хлоропластов в присутствии Fe^{3+}Ц и $MeCl_2$ (рис. 3). Восстановление Fe^{3+}Ц и выделение H^+ происходит в стехиометрическом соотношении.

Эти факты подтверждают концепцию связи послесвечения с переносом электрона; стехиометрическое выделение H^+ свидетельствует скорее в пользу участия воды или гидроксильных ионов в качестве донора электронов.

Таким образом, процесс переноса электрона при —40°, сопровождаемый послесвечением, можно представить в виде следующих гипотетических уравнений:

$$\text{ХлН} + Fe^{3+} + h\nu \rightleftarrows \cdot\text{ХлН}^+ + Fe^{2+}, \quad (1)$$

обратный процесс сопровождается послесвечением с $\tau \simeq 6 \cdot 10^{-4}$ сек.;

$$H_2O + \text{ХлН} + h\nu \overset{MeCl_2}{\rightleftarrows} OH\cdot + \cdot\text{ХлН}^- + H^+, \quad (2)$$

обратный процесс сопровождается послесвечением с $\tau \simeq 10^{-3}$ и 0,1 сек.;

$$H_2O + Fe^{3+} + h\nu \xrightarrow[MeCl_2]{\text{ХлН}} OH\cdot + Fe^{2+} + H^+, \quad (3)$$

процесс не приводит к накоплению радикалов хлорофилла и не сопровождается послесвечением.

Механизм действия $MeCl_2$ может быть понят с точки зрения влияния на состояние мембраны хлоропластов ([5, 6]). Однако имеются факты, указывающие на непосредственное взаимодействие $MeCl_2$ с хл.р.ц. Сюда относится известный факт окисления ионов марганца хлоропластами ([4]), а также обнаруженное в данной работе окисление ионов иода (KJ) до молекулярного иода, которое полностью блокировалось ДХФМ.

Мы попытались понять полученные в работе факты с помощью следующего представления. Хл.р.ц. погружен в мембрану, соединенную с окружающей средой марганцевыми каналами. Функция Me^{2+}, образующего плотную гидратную оболочку, заключается в переносе H_2O из внешней среды к хл.р.ц. с помощью образования координационных связей с кислородсодержащими группировками канала. Вслед за Me^{2+} в канал проникает Cl^-, который фиксируется в определенных ее полостях, вблизи хл.р.ц. Кислород молекулы ДХФМ, вероятно, образует водородную связь с атомами кислорода мембраны, а два ее атома хлора занимают полости мембраны, предназначенные для Cl^-, что блокирует реакцию переноса H_2O к хл.р.ц.

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

Поступило
27 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. А. Шувалов, Ф. Ф. Литвин, Молекулярная биология, 3, 59 (1969). [2] В. А. Шувалов, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 5, 698 (1971). [3] Р. М. Бекина, А. А. Красновский, Биохимия, 33, 178 (1968). [4] R. H. Kenten, P. J. G. Mann, Biochem. J., 61, 279 (1955). [5] Д. М. Островский, И. М. Цфасман, Н. С. Гельман, Биохимия, 34, 993 (1969). [6] W. Van Iterson, J. Opden Kamp, Bacteriol., 99, 304 (1969). [7] А. В. Карякин, А. К. Чибисов, Сборн. Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 296. [8] S. Isawa, R. L. Heath, G. Hind, Biochim. et biophys. acta, 180, 388 (1969).

BIOPHYSICAL JOURNAL

Published for the Biophysical Society by The Rockefeller University Press New York

PHOTOSYNTHESIS

A SPECIAL ISSUE DEDICATED TO EUGENE I. RABINOWITCH

GUEST EDITOR: GOVINDJEE

July 1972 *volume* 12 *number* 7

BIOJAU 12(7) 705-932 (1972)

THE FRAGMENTS OF THE PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER CHAIN IN MODEL SYSTEMS

A. A KRASNOVSKY

From the A. N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

ABSTRACT In this paper the recent research from our laboratory is reviewed. Short fragments of the photochemical electron transfer chain of photosynthesis were reproduced in aqueous detergent solutions or in organic solvents. The function of photosystem I is reproduced in a ternary system of chlorophylls, electron donors (dienols, sulfhydryl compounds, hydrazine, etc.), and electron acceptors (viologens, nicotinamide-adenine dinucleotide [NAD], flavines, etc.). Chlorophyll-photosensitized reduction of viologens in some cases is activated by oxygen at the expense of active reductants formed during the photosensitized oxidation of an initial electron donor (thiourea). Chlorophyll-photosensitized oxidoreduction of cytochromes is activated by flavines, viologens, vitamin K derivatives, and some other redox systems (cofactors of cyclic photophosphorylation) The primary mechanism of the reactions studied depends on the reversible chlorophyll photooxidoreduction. In binary systems, chlorophyll (monomeric or aggregated) and electron donor or electron acceptor, reversible photoreduction or photooxidation is observed. Irreversible bacteriochlorophyll oxidation leads to the formation of chlorophyll and protochlorophyll analogues; irreversible protochlorophyll photoreduction results in chlorophyll-like pigment appearance. The photodisaggregation of chlorophyll was observed. The models of photosystem II studied were the photochemical oxygen evolution in aqueous solutions of electron acceptors (ferric compounds, quinone), photosensitized in the near UV part of the spectrum by inorganic semiconductors (tungsten, titanium, and zinc oxides). All reactions described are based on electron (hydrogen) transfer photosensitized by pigment system.

INTRODUCTION

In photosynthesis the light energy absorbed by chlorophyll is utilized in an oxidation-reduction process against a gradient of chemical potential. The light energy conversion proceeds in the photosynthetic electron transfer chain where photochemical reactions of excited chlorophyll molecules are coupled with the work of biochemical systems. The reconstruction of simple fragments of the electron transfer chain may facilitate the study of the molecular mechanism of light energy conversion.

Any type of electron transfer in which unexcited partner molecules are involved may be used to release the energy of chlorophyll excitation in the form of stored chemical energy. In the binary system (excited chlorophyll–unexcited partner molecule) either member of the pair might be reduced or oxidized. In the triple system (reductant-chlorophyll-oxidant), photosensitization might be observed with the excited chlorophyll being the intermediate electron carrier. Thus, the action of light absorbed by chlorophyll is to transfer an electron from reductant to oxidant.

Excited States

According to some authors, the absorption of a quantum of light by a molecule of chlorophyll leads to the singlet excited state ($S + h\nu \rightarrow S^*$) which is converted into a triplet metastable molecule ($S^* \rightarrow T$) capable of absorbing a second light quantum. The formation of excited triplets ($T + h\nu \rightarrow T^*$) is probable only at very high light intensities, and such a mechanism of summation of the energy of two light quanta is very improbable in photosynthesis which requires rather low intensities of light.

The pioneering work of Terenin in 1943 suggested the peculiar role of triplet molecules in photochemistry to be that of chemically reactive biradicals. Now, vast experimental data have accumulated showing that photochemistry of "monomeric" chlorophyll and dyes in solution may be considered mainly as the chemistry of triplet excited molecules (1).

The unstable intermediates of photochemical reactions, carrying the energy of light quanta, are very short-lived, and their study requires special methods; it is easier, however, to study the more stable products formed from these labile intermediates. In this paper, we discuss our work with the models of photosystems I and II of photosynthesis; the previous work of our laboratory has already been reviewed in references 2–5.

MODELS OF PHOTOSYSTEM I

Here, an electron donor with a redox potential ($E_{\cdot}'$) close to that of the cytochromes and an electron acceptor with Eo' close to that of ferredoxin are used. As an electron acceptor, we used methylviologen with an Eo' of -0.43 v. In aqueous solutions of the detergent Triton X-100, it is possible to observe chlorophyll-photosensitized reduction of viologens, flavines, and some other dyes, using one of the following as an electron donor: ascorbate, cysteine, glutathione, thiourea, hydrazine, etc. (6, 7). The study of these photoreactions is possible by immediate spectrophotometric measurements in the Thunberg tube. For instance, after illumination with red light of an aqueous detergent solution of chlorophyll, cysteine, and methylviologen, a blue-reduced viologen appears, which is reversibly oxidized after admission of air. This type of reaction requires anaerobiosis, as oxygen reacts rapidly with the reduced forms of the acceptors listed above. Recently, Brune and San Pietro (8) have studied chlorophyllin-catalyzed photoreduction of viologen dyes.

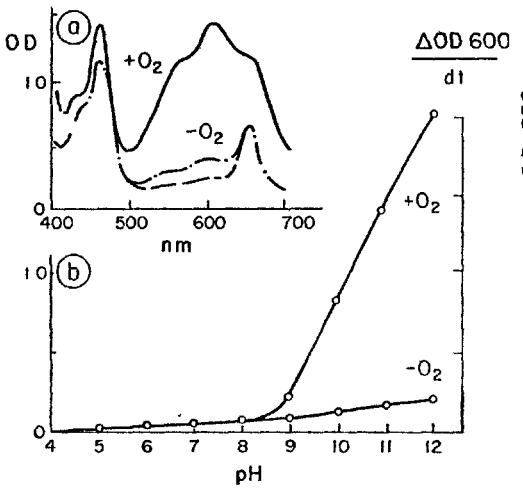


FIGURE 1

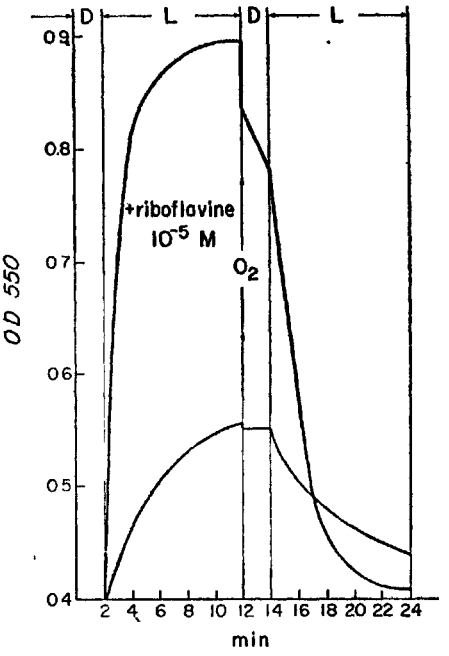


FIGURE 2

FIGURE 1 Chlorophyll-photosensitized reduction of methylviologen in 0.5% aqueous solution of Triton X-100 in the presence of thiourea. (*a*) Absorption spectrum at pH 10; solid curve, $+O_2$; dashed curve, $-O_2$, before illumination; dashed-dot curve, $-O_2$, after illumination (9, 10). (*b*) Dependence of reaction on pH; abscissa is rate of change in absorbance (OD) at 600 nm; $-O_2$, *in vacuo*; $+O_2$, in air.

FIGURE 2 Chlorophyll-photosensitized oxidoreduction of cytochrome *c* (OD change at 550 nm) in aqueous 0.5% solution of Triton X-100 in the absence and in the presence of 10^{-5} M riboflavine or riboflavine-5′-phosphate. L, light; D, dark (11).

When thiourea was used as an electron donor, we could not observe photoreduction of viologen under anaerobic conditions (Fig. 1); but paradoxically, in the presence of atmospheric oxygen, illumination of the system thiourea-chlorophyll-viologen (avoiding stirring of the Thunberg tube cuvette!) caused a high rate of photoreduction of viologen (9). After stirring with air, the reduced viologen is oxidized. This reaction is enhanced at a pH of the medium more basic than 8. The study of this phenomenon revealed that photosensitized thiourea oxidation proceeds in the zone of illumination which leads to local anaerobiosis (9, 10). The photooxidation product of thiourea is a strong reducing agent capable of reducing viologen in the dark (or in a photosensitized reaction) and is also capable of photoreducing chlorophyll. The stimulation of photoreduction of viologen by oxygen was observed most clearly in the case of thiourea; in the case of cysteine and glutathione, the reaction proceeds after oxygen evacuation, but without this procedure the sensitized viologen reduction is more efficient.

The question is, Why does the photoreaction not proceed backwards immediately?

One possible explanation is that the primary "one-electron" intermediate undergoes immediate dismutation and that the reaction of the more stable "two-electron" products requires activation energy. In the case of the intact photosynthetic electron transfer chain, such a demand is fulfilled at the terminals of the chain where rather stable two-electron reduced pyridine nucleotides are formed and the oxidation of water molecules leads to gaseous oxygen evolution.

Chlorophyll-Photosensitized Oxidoreductions of Cytochrome

This reaction was studied in an aqueous solution of Triton X-100 containing oxidized cytochrome *c* and chlorophyll. Under red light illumination *in vacuo*, cytochrome reduction is observed; after admission of air, illumination caused ferrocytochrome oxidation (11, 12).

According to Vernon (13), flavines enhance cytochrome photoreduction in chloroplasts; in our model systems, the reaction was strongly enhanced by flavines (riboflavine, flavine mononucleotide, flavine-adenine dinucleotide), viologens, menadione, and some redox systems that are cofactors of photophosphorylation (Fig. 2). The mechanism of activation is probably due to the action of compounds listed above as auxiliary redox systems between chlorophyll and cytochrome.

To reveal the molecular mechanism of photosensitized reactions, interaction between excited chlorophyll and partner molecules (i.e., electron donors and acceptors) was studied. The reversible transformations of chlorophyll under the action of light were revealed in the pioneering works of E. Rabinowitch (14) and R. Livingston (15, 16).

Excited Chlorophyll–Electron Acceptor Reaction

Reversible Oxidation. As early as 1937, Rabinowitch and Weiss (17) observed that the reaction of chlorophyll with ferric ions is activated by light. Linschitz and Rennert (18) described the photochemical interaction of chlorophyll with quinone in ethyl ether–isopentane, and ethyl alcohol (EPA) at liquid nitrogen temperature; Tollin and Green (19) found the electron spin resonance (ESR) signal of semiquinone when illuminating this system.

The reversible oxidation of chlorophyll and its analogues is easy to observe in viscous ethyl alcohol–glycerol solutions in the presence of electron acceptors at −70°C (20, 21), but in the case of the bacteriochlorophyll-ubiquinone system, we observed the reversible reaction at room temperature (22). After the light is switched off, the reaction goes backwards (Fig. 3). The oxidized intermediate of chlorophyll has an absorption maximum at 470 nm, and that of bacteriochlorophyll, at 430 nm. Essentially, illumination by blue light in the absorption band of the intermediates considerably accelerates the back reactions (22).

$$\mathrm{Chl} + \mathrm{Ox} \underset{\text{blue } h\nu}{\overset{\text{red } h\nu}{\rightleftharpoons}} \cdot \mathrm{Chl}^{+} + \cdot \mathrm{Ox}^{-}.$$

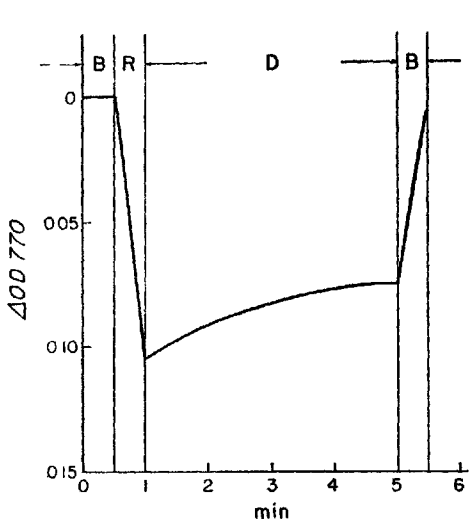


FIGURE 3

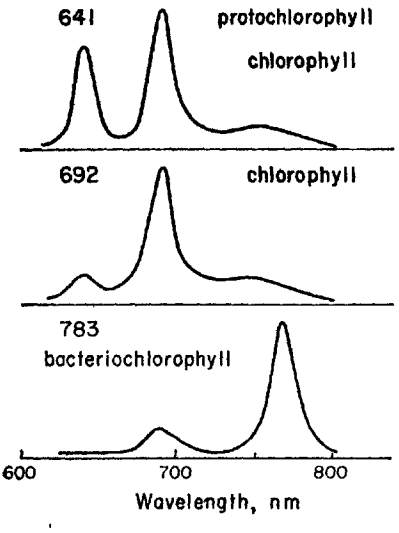


FIGURE 4

FIGURE 3 Reversible photooxidation of bacteriochlorophyll (OD change at 770 nm) by ubiquinone in alcohol-glycerol mixture. D, dark; action of red (R) or blue (B) light (22). FIGURE 4 Fluorescence spectra of bacteriochlorophyll photooxidation (by *o*-quinone) products in toluene (24). Ordinate, absorbance or optical density in relative units; products are chlorophyll and protochlorophyll.

This phenomenon explains the paradoxical effect of blue light inactivity during pigment photooxidation.

Studying reversible chlorophyll photooxidation, Evstigneev had demonstrated in the system pigment-quinone that the reaction proceeds most strongly in acid media, and that the potential of the inert platinum electrode is changed to the positive direction, probably because of cation radical pigment formation having electrode activity (see reference 23). It must be pointed out that the photopotential caused in this system by red light is quenched under the action of blue light (22).

Irreversible Photooxidation. In photosynthetic organisms, most pigments differ in the degree of "semi-isolated," double-bond reduction according to the following sequence: bacteriochlorophyll-chlorophyll-protochlorophyll (chlorophyll *c*). We shall consider the oxidation of the most reduced pigment-bacteriochlorophyll. After interaction *in vacuo* with fresh *o*-quinone solution (obtained by pyrocatechol oxidation with Ag_2O), some chlorophyllous pigment is formed in the dark. Illumination in the bacteriochlorophyll absorption band leads to a nearly complete conversion into chlorophyllous pigment (see Fig. 4), which, in turn, is converted into protochlorophyllous pigments by subsequent illumination with red light (in the "chlorophyll" absorption band) (24).

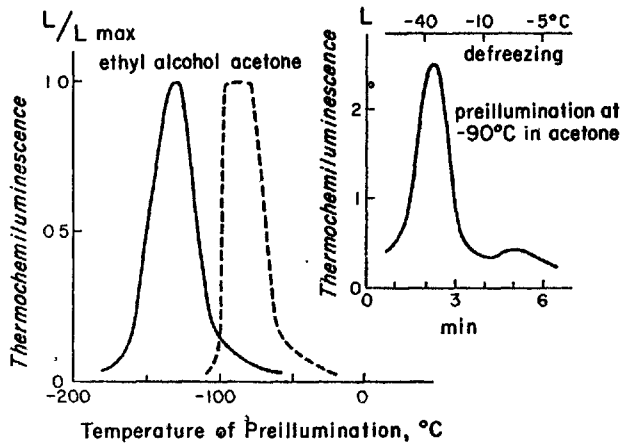


FIGURE 5 Thermochemiluminescence of chlorophyll; dependence on the temperature of preillumination. Right curve, kinetics of thermoluminescence after chlorophyll illumination in acetone at −90°C; L/L max, ratio of luminescence intensity to the maximum luminescence intensity observed (27–29).

Excited Chlorophyll–Oxygen Interaction

Along with products of irreversible destructive chlorophyll photooxidation, intermediates are formed which regenerate some chlorophyll (bacteriochlorophyll) after interaction with reductants (25, 26). After the illumination of chlorophyll in the presence of oxygen, chemiluminescence arises as a result of the transformation of high energy chlorophyll intermediates (peroxides) (27). When the chlorophyll solutions were illuminated at low temperatures, a thermoluminescence was observed upon warming or after thawing (labeled "defreezing" in the figure; see Fig. 5); this thermoluminescence was due to subsequent reactions of primary chlorophyll peroxide (28, 29). Electron donors, especially thiourea, strongly quench this photochemiluminescence, thus indicating their interaction with chlorophyll peroxide. On the other hand, the oxidants, the electron acceptors, quench the chemiluminescence by their interaction with excited singlet and triplet chlorophyll. There are the following main steps of the reaction mechanism: triplet excited chlorophyll interacts with oxygen forming the primary photoperoxide; the "dark" stages of primary peroxide transformations lead to the appearance of singlet excited molecules which emit the chemiluminescence quanta.

Excited Chlorophyll–Electron Donor Reactions

Reversible Photoreduction. All the chlorophyll analogues and derivatives possessing hydrogen, magnesium, or zinc in the center of the porphyrin ring are liable to this reaction as revealed in 1948 (reviews 2–5). The ability to react does not depend on the degree of semi-isolated, double-bond reduction; the reaction proceeds in the case of bacteriochlorophyll, too. The primary reversible step is the electron

addition to the system of circularly conjugated double bonds of the porphyrin molecules; the back reaction proceeds in the dark accompanied by initial pigment regeneration. In the primary step of the reaction, an ion-radical pair is formed as registered by ESR measurements and the polymerization technique.

$$\cdot\text{Chl}\cdot + \text{Red} \rightarrow \cdot\text{Chl}^- + \cdot\text{Red}^+.$$

The photoreduction is often accompanied by pheophytin formation due to easier pheophytinization of photoreduced intermediates.

In an aqueous solution of Triton X-100 containing dissolved thiourea and atmospheric oxygen, the reversible photoreduction of chlorophyll is observed. At pH 9, the red-photoreduced chlorophyll is formed; upon stirring with air, the initial green chlorophyll is regenerated. The red-reduced chlorophyll reacts easily with various electron acceptors in the dark. (I wish to mention that we have seen a peculiar case when photoreduction of unexcited chlorophyll was carried out by excited [at 365 nm] reduced pyridine nucleotide analogues [30].)

Evidence for the reactions studied was revealed in most cases by spectral measurements; the photopotentiometric measurements facilitated the study of primary photoproducts (23). The potential reactivity of triplet states of chlorophyll is often proved by variation of the redox potential of the partner molecule. It is not yet clear whether it is possible for an excited or photooxidized chlorophyll to accept an electron from a water molecule (31).

Irreversible Photoreduction. We would expect that analogous to the stepwise oxidation presented above there may also be successive photoreduction from protochlorophyll → chlorophyll → bacteriochlorophyll; it is well known that during illumination of etiolated leaves protochlorophyll is transformed into chlorophyll with high quantum yield. In solutions of protochlorophyll, however, the reversible photoreduction by ascorbic acid is seen; an intermediate which absorbs maximally at 470 nm appears, and a chlorophyllous product is formed usually with negligibly low quantum yield. When pyridine treated with sodium is used as a solvent, the photoreduction of protochlorophyll by ascorbic acid results in irreversible chlorophyll-like pigment formation with a yield of up to 20% (32). In this case the sodium-dipyridyl formed probably may act as an intermediate redox system which facilitates the reduction of the semi-isolated double bond of chlorophyll.

In the course of chlorophyll photoreduction, there are formed several "shortwave" intermediates including a pink-photoreduced form (having an absorption band at 520 nm), but not bacteriochlorophyll. Unlike chlorophylls, the photoreduction of porphyrins in acid media leads to chlorin and possible bacteriochlorin, coming probably from intermediate isomerization (33).

Mechanism of Sensitized Electron Transfer

The mechanism of reactions studied does not involve energy transfer from excited pigment molecules to the reacting molecules, because according to present knowledge

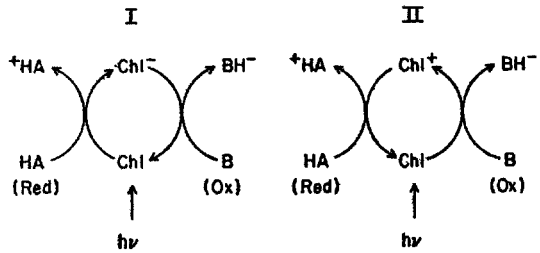


FIGURE 6 The scheme of primary mechanism of chlorophyll-photosensitized oxidoreductions *hν*, light reactions; others, dark reactions.

most of the electron acceptors and donors used do not possess singlet or triplet levels situated lower than the S^* or the T levels of chlorophyll, a necessary prerequisite of energy transfer. This is probably the case, however, when carotene or tetracene inhibits the photoreactions of chlorophyll.

The experiments indicate that the elementary mechanism of reactions studied involves primary photooxidation or photoreduction of the sensitizing pigment accompanied by a dark stage of interaction between the primary photoproducts and electron donors or acceptors (Fig. 6). These ideas were proposed in primary form by E. Baur, J. Franck, and R. Livingston. The domination of a given type of primary photoreaction depends on the nature of the medium, the properties of reactants, and the pH, as shown in the experiments of Evstigneev (34) and Seely (35).

Along with the involvement of photoreduced and photooxidized pigments in the system of sensitized reactions, there is a possibility of participation of semioxidized electron donors and semireduced electron acceptors in the intermediate reactions; the photooxidation of thiourea results in the appearance of very active reducing substances capable of reducing, in the dark, viologens, safranine, and other electron acceptors. During photosensitized oxidation in the presence of oxygen, two elementary reactions compete: photoreduction of chlorophyll by the electron donor and moloxide formation with subsequent dark reactions of these active photoproducts.

MODELS OF PHOTOSYSTEM II

This photosystem corresponds to the Hill reaction with dichlorophenol indophenol (DCPIP) as oxidant; photooxidation of water molecules is coupled with a suitable reduction. The action of solvents, detergents, and ultrasonic treatment on the ability of chloroplasts to do the Hill reaction, photophosphorylation, and light-induced pH changes was studied in our laboratory. The photophosphorylation inhibition usually coincides with inhibition of the light-induced pH change, both of which require an intact membrane, while the ability to do the Hill reaction is much more stable to damage. We tried to determine the conditions of self-assembly of active chloroplast structure after damage by organic solvents. Under action of ethyl ether on chloroplasts, Hill activity is fully suppressed, and chlorophyll disaggregation is seen by

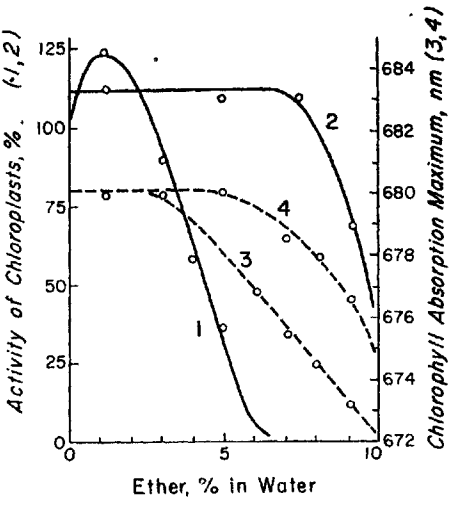


FIGURE 7 The action of diethyl ether on the Hill reaction and chlorophyll absorption maximum in chloroplasts 1, Hill reaction activity in the presence of ether; 2, after ether removal by evacuation; 3, absorption maximum with ether; 4, after ether removal by evacuation (36).

absorption spectra measurements. After ether removal by evacuation, the Hill activity is restored (see Fig. 7), and the primary state of chlorophyll (680 nm absorption maximum) reversibly appears (36). Similar effects were observed under the action of dimethyl sulfoxide and methanol on chloroplasts. If the solvent concentration is above some critical value, the damage is irreversible. It seems that under the action of solvents, local solubilization of pigments in lipoproteidic lamellar structures proceeds and the removal of olvent causes the self-assembly of primary structure; however, we cannot yet reconstruct the Hill reaction when chlorophyll is extracted from the chloroplasts' structure.

We succeeded in creating inorganic models of the Hill reaction (37, 38). Zinc, titanium, and tungsten oxides were used as photosensitizers in water solutions of oxidants, ferric ammonium sulfate, ferricyanide, or *p*-benzoquinone. When illuminated by long wave UV in the region of the absorption band of the photosensitizer, the model system evolved molecular oxygen with quantum yields of up to 1% (39).

The stoichiometry of the reaction studied was the same as that of the Hill reaction:

$$2Fe^{+++} + H_2O \rightarrow 2Fe^{++} + 2H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 .$$

The following primary mechanism of reaction was proposed. After light absorption, the electron of the semiconductor lattice is shifted into the conducting zone, leaving behind a hole (electron vacancy). The water molecules (or hydroxyl ions) and ferric ions are probably absorbed on different active centers of semiconductor particle surface. The following elementary acts probably take place:

$$Fe^{+++} + e^- \rightarrow Fe^{++},$$

$$OH^- + \oplus \rightarrow {}^{\circ}OH.$$

Subsequent OH radicals recombine at the semiconductor surface, which results in oxygen evolution. In the case of WO_3, the mechanism may be complicated by photochemical cleavage of WO_3, leading to lower oxide formation which gives a dark reaction with added oxidant. The realization of models described above becomes possible because the semiconductor particles function not only as photosensitizers but also as catalysts which promote recombination of primary photoproducts. Metzner (40) described similar reactions using silver chloride sensitized by the absorbed dyes excited by visible light.

Aggregated Chlorophylls

The question is, What mechanism of electron transfer operates in living cells? The elucidation of this problem requires knowledge of the state of pigments in the photosynthetic organisms. The bulk of chlorophyll in a chloroplast exists in aggregated forms closely bound to the lipoids and proteins of the lamellae and enzymatic partners of the electron transfer chain. The bulk of pigment acts as an antenna absorbing light quanta and transferring the energy of excitation to an active center, the latter probably is a type of pigment aggregate. The study of the photochemical properties of the aggregated pigment is thus important.

Self-Assembly of Pigment Molecules in Aggregates. The state of pigments in cells differs from that in solution. Usually the absorption and fluorescence spectra of pigments in vivo are situated at longer wavelength regions as compared with those of the dissolved pigments. This phenomenon is particularly pronounced in the case of bacteriochlorophylls. The spectral effects of aggregation were studied in the laboratories of E. Rabinowitch, C. S. French, and S. Brody.

We observed that pigments in solid films and colloids reveal the types of aggregation seen in living cells and perfectly reproduce the spectra of pigments in organisms (see 2–5). Thus, solid films of chlorophyll *a* (obtained by evaporation of ether solution) have an absorption maximum at 680 nm just as do chloroplasts (41–43); in water vapor at 20°C, a shoulder appears at 705–715 nm; heating it up to 50°C leads to a crystalline form absorbing at 740–745 nm. The vapors of methanol, ethanol, and aqueous solutions of acetaldehyde, formaldehyde, and ammonia produced the same effect at room temperature, probably because the bonding with magnesium atoms of chlorophyll makes "bridges" between the pigment molecules in aggregates. The solid films of bacteriochlorophyll usually possess two absorption maxima at 800 and 860 nm; in the vapors of water, alcohols, or acetaldehyde containing ether, a long wave maximum at 900–920 nm appears. The films of *Chlorobium* chlorophyll (bacterioviridin) display the same long wavelength shift (740–760

nm); dissolved pigment absorbs at 665 nm as chlorophyll *a*. The farnesol "tail" in the bacterioviridin molecule, being shorter than phytol in chlorophyll, facilitates aggregation. Similar effects are seen in low temperature fluorescence spectra of aggregated pigments. A study of the fine structure of absorption and luminescence spectra of aggregated pigments in cells and in solid films has shown their similarity; the detailed study of this problem was undertaken by Litvin and coworkers (44).

Thus, the chemical structure of pigment molecules and the presence of low molecular additives determine the mode of pigment molecular arrangement in aggregated structures in chloroplasts and chromatophores. The gradual conversion from monomeric to aggregated chlorophyll forms in the course of greening of etiolated leaves was studied at great length in our laboratory with the aid of absorption and luminescence spectra measurements. The specificity of action of light quanta on aggregated pigments, as compared with photochemistry of monomeric forms which dominate in solutions, remains to be elucidated.

Photochemistry of Aggregated Pigments

Photosensitization. In 1946 in our work with Brin, the photosensitizing activity of crystalline phthalocyanines was revealed. Photosensitizing action of aggregated pigments is most convenient to study in the case of such irreversible reactions as photoreduction of azo dyes or cytochromes. Preferential formation of a different pattern of aggregates, having absorption bands at 680 and 740 nm, was found in aqueous colloidal solutions of chlorophyll and bacterioviridin. The measurements of quantum yield of methyl red photoreduction had shown the equal effectiveness of both forms (45). Similar results were obtained with bacterioviridin colloids; however, the quantum yield of photosensitization by monomeric forms is much higher.

Photodisaggregation. We proposed that destructive bleaching of aggregated pigments in chloroplasts proceeds via intermediate disaggregation. That phenomenon was observed most clearly in the case of illumination of leaves of pigment-deficient maize mutants (Fig. 8) (46). The illumination of leaves *in vacuo* results in a strong enhancement of fluorescence; after the admittance of air, a quick decrease of fluorescence results because of the bleaching of monomeric chlorophyll. To observe disaggregation it is necessary to avoid oxygen to prevent bleaching of monomeric chlorophyll. The photodisaggregation phenomenon was seen also in model systems, by illumination of aggregated pheophytin in a water-acetone mixture; the effect was observed only in the presence of oxygen, probably being a special case of pheophytin oxidation (Fig. 9) (44).

Elementary Photoprocesses in Aggregates. Terenin and Kholmogorov (48) observed an ESR signal in solid chlorophyll films in the presence of water and oxygen. It was not then possible to see the triplet signal in chloroplasts and solid pig-

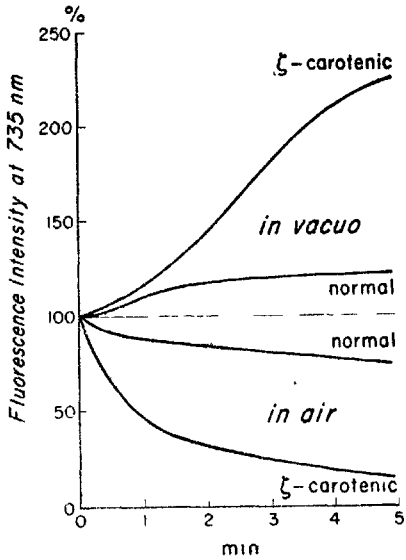


FIGURE 8

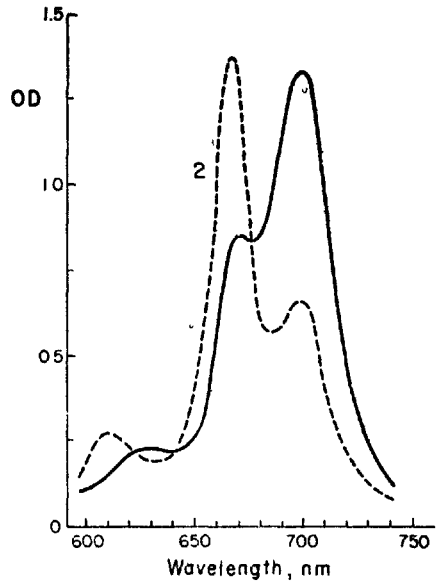


FIGURE 9

FIGURE 8 Photodisaggregation and photooxidation of chlorophyll in normal and mutant (ζ-carotenic) maize leaves (46).

FIGURE 9 Pheophytin photodisaggregation in acetone-water. 1, initial spectrum; 2, after illumination (47).

ment films by ESR measurements; in the same experimental condition, the chlorophyll solutions reveal a clear triplet signal (49). Many years ago Terenin and Nelson found photoconductivity in solid films of chlorophyll. Litvin and Zvolinsky (50) demonstrated that the quantum yield of photoconductivity is higher in "long wave" quasi-crystalline forms than in the "shortwave" ones; the same phenomenon was observed in the films of chloroplasts and bacterial chromatophores. Studying the photoeffect on the boundary of solid pigment film and solution, Evstigneev and Terenin (51) had found that the photopotential depends on the nature of dissolved substances. The effect was studied in detail by Evstigneev (52). Based on these experiments, one can present the mechanism of the photosensitizing action of aggregated forms that would be similar to the action of inorganic semiconductors: an electron acceptance by a molecule on the phase boundary equilibrated by an electron donation by the donor molecule to the "hole" that also migrates to the phase boundary. This elementary mechanism is complicated with the energy migration from shortwave to long wave pigment forms.

Reversible Photoreactions of Aggregated Pigments. We studied reactions of aggregated pigments with electron donors and acceptors in solid films and water colloid solutions. The solid films of chlorophylls possess very low fluorescence at room temperature; freezing to liquid nitrogen temperature leads to enhancement of the long wave fluorescence of aggregated forms. *In vacuo*, the solid films possess

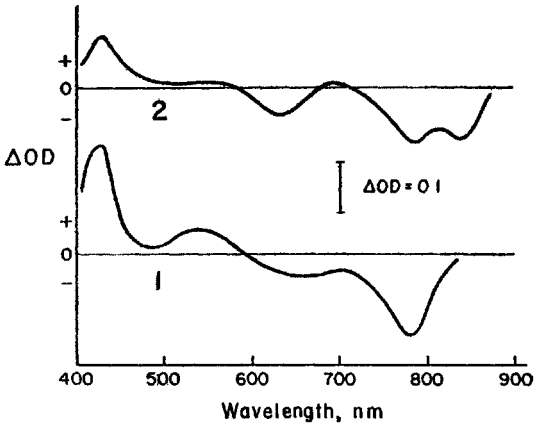


FIGURE 10 Reversible photooxidation of aggregated bacteriochlorophyll by *p*-benzoquinone in alcohol-glycerol. Differential absorption spectra: 1, after 2 min of illumination; 2, after 12 min of illumination (54).

luminescence at room temperature; oxygen causes the quenching of this long wave luminescence. This quenching, however, is seen under the action of the light beam exciting the fluorescence, and it lasts several seconds; this quenching is not a physical one but it is due to a photochemical reaction with oxygen (53). The most active reaction occurs in the case of long wave pigment forms that are possibly arranged without any close packing of pigment molecules.

In a viscous alcohol-glycerol (1:9) solution, having an excess of glycerol, the aggregates of bacteriochlorophyll and chlorophyll dominate, remaining in equilibrium with some monomers. The illumination of solutions containing *p*-benzoquinone had shown the possibility of reversible photooxidation of aggregates; intermediates correspond, by their absorption spectra, to the photooxidized monomer (Fig. 10) (54). The mechanism of the reaction is not yet clear; perhaps the intermediate stage is pigment photodisaggregation. It is possible that energy migration from monomeric to aggregated pigments is active.

Thus, all the data presented demonstrate that monomeric and aggregated pigments that are excited are able to undergo reversible oxidoreduction and sensitization of oxidoreductive reactions, modeling the fragments of photosynthetic electron transfer chain. The question arises as to whether these properties of pigments underlie their action in photosynthesis. The study of photochemical pigment transformations in vivo by the aid of differential spectroscopy and flash techniques has revealed spectral changes usually ascribed to triplet state formation, and oxidoreductive and acid-base transitions involved in electron and proton transfers. It is usually proposed that these changes take place in the reaction centers: the long wave pigment aggregates bound to proteins and lipids. These changes are coupled with the redox transformations of biocatalysts: cytochromes, quinones, etc. The results on the study of chlorophyll photochemistry in isolated systems are in agreement with the findings

n the in vivo systems, but the ultimate elucidation of the mechanism of primary photoreactions in photosynthesis requires much more effort.

Received for publication 17 July 1971.

REFERENCES

1. TERENIN, A. N. 1967. Photonics of Dye Molecules. Izdatelstvo Nauka, Moscow.
2. KRASNOVSKY, A. A. 1965. *Photochem. Photobiol.* **4**:641.
3. KRASNOVSKY, A. A. 1968. *In* Elementary Photoprocesses in Molecules. B. Neporent, editor. Plenum Publishing Corporation, New York. 163. (Translated from Russian.)
4. EVSTIGNEEV, V. B. 1968. *In* Elementary Photoprocesses in Molecules. B. Neporent, editor. Plenum Publishing Corporation, New York. 184. (Translated from Russian.)
5. KRASNOVSKY, A. A. 1969. *In* Progress in Photosynthesis Research. H. Metzner, editor. Laupp'sche Buchhanglung, Tübingen, W. Germany. **2**:709.
6. KRASNOVSKY, A. A., and G. P. BRIN. 1965. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **163**:761.
7. BRIN, G. P., A. N. LUGANSKAYA, and A. A. KRASNOVSKY. 1967. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **174**:221.
8. BRUNE, D., and A. SAN PIETRO. 1970. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**:371.
9. KRASNOVSKY, A. A., and A. N. LUGANSKAYA. 1968. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **183**:1441.
10. LUGANSKAYA, A. N., and A. A. KRASNOVSKY. 1970. *Mol. Biol.* **4**:848.
11. KRASNOVSKY, A. A., and E. S. MIKHAILOVA. 1969. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **185**:938.
12. KRASNOVSKY, A. A., and E. S. MIKHAILOVA. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **194**:953.
13. VERNON, L. P., and E. R. SHAW. 1965. *Biochemistry.* 4:132.
14. PORRET, D., and E. RABINOWITCH. 1937. *Nature (Lond.).* **140**:321.
15. LIVINGSTON, R. 1941. *J. Phys. Chem.* **45**:1312.
16. LIVINGSTON, R. 1960. *In* Encyclopedia of Plant Physiology. W. Ruhland, editor. Springer-Verlag K.G., Berlin, Germany. **5**:830.
17. RABINOWITCH, E., and J. WEISS. 1937. *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci.* **162**:251.
18. LINSCHITZ, H., and J. RENNERT. 1952. *Nature (Lond.).* **169**:193.
19. TOLLIN, G., and G. GREEN. 1962. *Biochim. Biophys. Acta.* **60**:524.
20. KRASNOVSKY, A. A., and N. N. DROZDOVA. 1964. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **158**:730.
21. DROZDOVA, N. N., and A. A. KRASNOVSKY. 1965. *Biokhimiya.* **30**:605.
22. KRASNOVSKY, A. A., and N. N. DROZDOVA. 1969. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **188**:1384.
23. EVSTIGNEV, V. B. 1969. *In* Progress in Photosynthesis Research. H. Metzner, editor. Laupp'sche Buchhanglung, Tübingen, W. Germany. **2**:733.
24. KRASNOVSKY, A. A., N. N. DROZDOVA, and E. M. BOKUCHAVA. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **190**:464.
25. KRASNOVSKY, A. A. 1947. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **83**:61[illegible].
26. KRASNOVSKY, A. A. 1947. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **83**:835.
27. KRASNOVSKY, A. A., JR., and F. F. LITVIN. 1967. *Mol. Biol.* **1**:699.
28. KRASNOVSKY, A. A., JR., and F. F. LITVIN. 1969. *Mol. Biol.* **3**:282.
29. KRASNOVSKY, A. A., JR., and F. F. LITVIN. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **194**:197.
30. KRASNOVSKY, A. A., and G. P. BRIN. 1963. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **153**:212.
31. KUTIURIN, V. M., I. Y. ARTAMKINA, and I. N. ANISIMOVA. 1968. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **180**:1002.
32. KRASNOVSKY, A. A., M. I. BYSTROVA, and F. LANG. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **194**:1441.
33. UMRIKHINA, A. V., G. A. YUSUPOVA, and A. A. KRASNOVSKY. 1967. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **175**:1400.
34. EVSTIGNEEV, V. B. 1965. *Photochem. Photobiol.* **4**:171.
35. SEELY, G. R. 1966. *In* The Chlorophylls. L. P. Vernon and G. R. Seely, editors. Academic Press, Inc., New York. 523.
36. KRASNOVSKY, A. A., and G. P. BRIN. 1968. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **179**:726.
37. KRASNOVSKY, A. A., and G. P. BRIN. 1961. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **139**:142.

38. KRASNOVSKY, A. A. and G. P. BRIN. 1962. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **147**:666.
39. KRASNOVSKY, A. A. and G. P. BRIN. 1966. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **168**:1100.
40. METZNER, H. 1968. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**:1586.
41. KRASNOVSKY, A. A., and M. I. BYSTROVA. 1967. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **174**:480.
42. BYSTROVA, M. I., and A. A. KRASNOVSKY. 1967. *Mol. Biol.* **1**:363.
43. BYSTROVA, M. I., and A. A. KRASNOVSKY. 1968. *Mol. Biol.* **2**:847.
44. LITVIN, F. F., and V. I. SINETCHEKOV. 1967. *Biofizika.* **12**:433.
45. BYSTROVA, M. I., and A. A. KRASNOVSKY. 1971. *Mol. Biol.* **5**:291.
46. LANG, F., L. M. VOROBYOVA, and A. A. KRASNOVSKY. 1969. *Biofizika.* **14**:245.
47. VOROBYOVA, L. M., and A. A. KRASNOVSKY. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **195**:229.
48. TERENIN, A. N., and V. E. KHOLMOGOROV. 1965. *In* Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis. Izdatelstvo Nauka, Moscow. 5.
49. RIKHIREVA, G. T., A. V. UMRIKHINA, L. P. KAYUSHIN, and A. A. KRASNOVSKY. 1966. *Biofizika.* **11**:769.
50. LITVIN, F. F., and V. I. ZVOLINSKY. 1968. *Biofizika.* **13**:241.
51. EVSTIGNEEV, V. B., and A. N. TERENIN. 1951. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **81**:223.
52. EVSTIGNEEV, V. B. 1963. *Biofizika.* **8**:664.
53. KRASNOVSKY, A. A., and M. I. BYSTROVA. 1968. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **182**:211.
54. DROZDOVA, N. N., and A. A. KRASNOVSKY. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **195**:1222.

Доклады Академии наук СССР
1973. Том 211, № 3

УДК 577.3

БИОХИМИЯ

Н. В. КАРАПЕТЯН, В. В. КЛИМОВ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ПЕРЕМЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ДИГИТОНИНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ ХЛОРОПЛАСТОВ

Общепринято, что переменная флуоресценция (ΔФ) хлоропластов и растений обусловлена испусканием хлорофилла a фотосистемы 2 ([1]). На основании фотоиндуцированных изменений флуоресценци можно судить о состоянии и активности реакционных центров фотосистемы 2. Однако до сих пор не удалось обнаружить изменений поглощения в красной области спектра, связанных с функционированием хлорофилла в активном центре фотосистемы 2. Световые превращения в активном центре фотосистемы 1 сопровождаются изменениями поглощения при 700 мμ (ΔD_{700}), но не найдено ΔФ, коррелирующих с этими изменениями поглощения ([2]). У пурпурных бактерий фотоокисление бактериохлорофилла в активном центре (П890) сопровождается усилением флуоресценции (Ф) валового бактериохлорофилла ([3]).

В настоящей работе мы пытались обнаружить переменную флуоресценцию хлорофилла a фотосистемы 1. С этой целью мы провели сравнительное исследование флуоресцентных свойств фрагментов хлоропластов, обогащенных одной из фотосистем. Дигитониновые фрагменты хлоропластов получали по методике Андерсон и Бордмана ([4]) с помощью дифференциального центрифугирования суспензии хлоропластов, инкубированной с 0,5% дигитонина в течение 30 мин. при 4°. Измерения исходной (постоянной) Ф с $\lambda > 660$ мμ и ΔФ проводили на двухлучевой установке, описанной ранее ([5]). На этой же установке измеряли фотоиндуцированные ΔD_{700} ([6]), а также фотохимическую активность хлоропластов и фрагментов по скорости фотовосстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) или фотоокисления ДХФИФН$_2$ ([7]). Содержание хлорофиллов в образце составляло 0,1 мг/мл при измерении ΔФ и фотохимической активности, и 0,05 мг/мл при измерении ΔD_{700}.

Исследования полученных фрагментов показали, что осадок 10 000 *g* (фракция 10 000 *g*) действительно обогащен фотосистемой 2, а осадок 144 000 *g* (фракция 144 000 *g*) — фотосистемой 1. Это заключение было сделано на основании спектральных свойств фрагментов, их пигментного состава, фотохимической активности и величины световых ΔD_{700} (табл. 1).

Полученные фрагменты обнаружили существенное различие по способности к Ф и ΔФ. При одинаковом содержании хлорофилла исходный уровень Ф тяжелой фракции лишь в 1,5 раза интенсивнее, чем Ф легкой фракции, тогда как световые ΔФ тяжелой фракции на 2 порядка выше (табл. 1). Отношение ΔФ / Ф равно 7 у тяжелой фракции и лишь ~0,1 у легкой фракции, что подтверждает связь ΔФ с функционированием фотосистемы 2 ([8–10]). Сравнительное исследование действия различных окислительно-восстановительных агентов на ΔФ обоих типов фрагментов позволило установить, что ΔФ легкой фракции частично обусловлены ΔФ примеси фотосистемы 2 (рис. 1 *А*, *Б*). На это указывает сходное действие гидроксиламина и диурона на ΔФ обеих фракций. В то же время найдено существенное различие в действии аскорбата на кинетику ΔФ фрагментов после выключения действующего света. Если в условиях нашего опыта темновой спад ΔФ при добавлении аскорбата к фракции 10 000 *g* удлиня-

ется более чем в 6 раз, то добавление аскорбата к фракции 144 000 *g* вызывает появление в кривой спада ΔФ быстрой компоненты, которая не может быть приписана фотосистеме 2. Одновременное добавление аскорбата и диурона еще более замедляет скорость темнового спада ΔФ тяжелой фракции, тогда как у легкой фракции в этом случае наблюдается лишь быстрая компонента, за которую, по-видимому, ответственна фотосистема 1 (в присутствии диурона и аскорбата переменная Ф фотосистемы 2 подавлена).

Существенно различное влияние на ΔФ обоих типов фрагментов оказывают метилвиологен и феназинметасульфат (ФМС). При добавлении

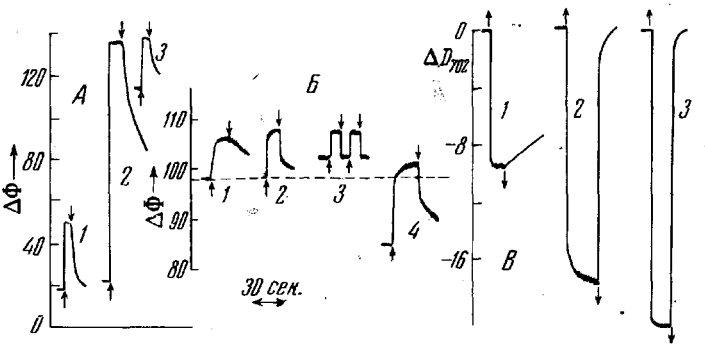


Рис. 1. Кинетика фотоиндуцированных ΔФ (*А*, *Б*) и ΔD_{700} (*В*) фракций 10 000 *g* (*А*) и 144 000 *g* (*Б*, *В*). *А*, *Б* — исходная величина ΔФ (*1*) и ΔФ в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ *М* аскорбата (*2*), $2 \cdot 10^{-3}$ *М* аскорбата и 10^{-5} *М* диурона (*3*), 10^{-5} *М* ФМС (*4*). *В* — исходная величина ΔD_{700} (*1*) и ΔD_{700} в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ *М* аскорбата (*2*) или 10^{-5} *М* ФМС (*3*). Интенсивность света (600—700 мμ) $1{,}5 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$

этих агентов к фракции 10 000 *g* не наблюдается заметных изменений в величине и кинетике ΔФ, тогда как у фракции 144 000 *g* ФМС и метилвиологен вызывают усиление величины ΔФ (рис. 1 *Б*). Особый интерес представляет сходство в поведении световых ΔФ и ΔD_{700} легкой фракции при добавлении аскорбата, метилвиологена или ФМС (рис. 1 *Б*, *В*). Добавление аскорбата к легкой фракции активирует величину световых ΔD_{700} и резко увеличивает скорость их спада в темноте. Возрастание ΔD_{700} наблюдается также при добавлении метилвиологена и малых концентраций феррицианида, однако скорость спада в этих случаях изменяется мало.

Величина ΔD_{700} существенно активируется также при добавлении ФМС. На рис. 2 *А* представлена зависимость Ф, ΔФ и ΔD_{700} фракции

Таблица 1

Пигментный состав, фотохимическая активность и величины Ф, ΔФ и ΔD_{702} хлоропластов и фрагментов хлоропластов

Объект	Хл. a/b	ΔD_{702}, ед. о. п. × $\times 10^3$	Фотовосстановление ДХФИФ, μ мол. на 1 мг хлорофилла в час *	Фотоокисление ДХФИФН$_2$, μ мол. на 1 мг хлорофилла в час ***	Ф, отн. ед. **	ΔФ, отн. ед. ***
Хлоропласты	2,69	6,8	106	84	14,5	75
Осадок 10 000 *g*	2,07	3,2	15	128	18,0	128
Осадок 144 000 *g*	4,69	19,5	136	0	12,0	1,1

* Скорость фотовосстановления ДХФИФ ($2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*) измеряли в присутствии гидроксиламина ($5 \cdot 10^{-3}$ *М*).

** Скорость фотоокисления ДХФИФ ($2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*), восстановленного аскорбатом ($3 \cdot 10^{-5}$ *М*), измеряли в присутствии 10^{-4} *М* метилвиологена и 10^{-5} *М* диурона.

*** Величины Ф и ΔФ указаны в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ *М* гидроксиламина.

144 000 g от концентрации ФМС (в этих опытах регистрировали ΔФ с $\lambda > 710$ мμ, возбуждая Ф светом 680 мμ). С увеличением концентрации ФМС до $5 \cdot 10^{-5}$ M ΔФ и ΔD_{700} параллельно возрастают до уровня, который вдвое выше исходного. Увеличение концентрации ФМС $> 5 \cdot 10^{-5}$ M вызывает уменьшение как ΔФ, так и ΔD_{700}. При этом темновой уровень Ф постоянно падает с повышением концентрации ФМС. Активация ΔФ при добавлении ФМС не обусловлена уменьшением темнового уровня Ф (рис. 1 *Б*), так как это тушение Ф и активация ΔФ и ΔD_{700} в присутствии ФМС вызваны, по-видимому, независимыми процессами (ср. с активирующим действием аскорбата на ΔD_{700} без тушения Ф). Активация

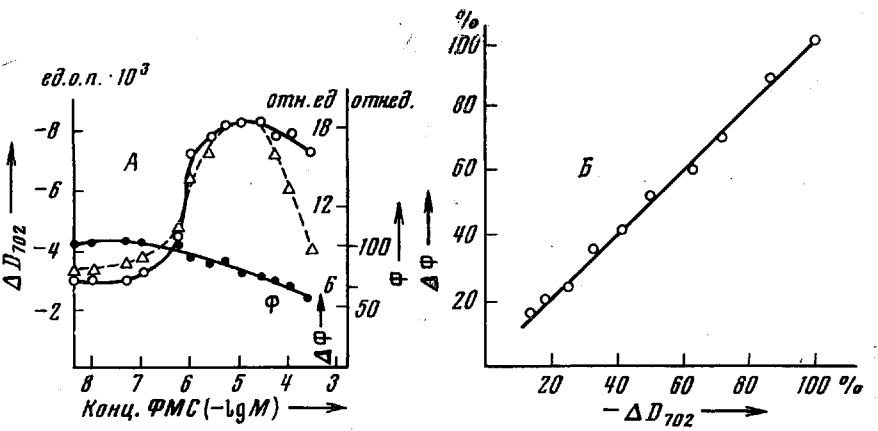


Рис. 2. Зависимость величин ΔФ и ΔD_{700} фракции 144 000 g от концентрации ФМС (*А*) и ΔФ от ΔD_{700} при разных интенсивностях света (*Б*). Для *А*: треугольники — ΔФ, светлые кружки — ΔD_{700}, темные — Ф

ΔD_{700} и ΔФ при освещении легких фрагментов в присутствии ФМС может быть связана со стимуляцией циклического потока электронов фотосистемы 1 ([11]).

Световые ΔФ и ΔD_{700} обнаруживают сходную зависимость и от интенсивности действующего света. При этом в кривой зависимости ΔФ наблюдаются 2 фазы, которые могут быть обусловлены наличием двух компонент ΔФ, насыщающихся при разных интенсивностях света. Зависимость быстрой компоненты ΔФ совпадает с зависимостью ΔD_{700} от интенсивности света. Рис. 2 *Б* показывает, что у легкой фракции величины ΔФ прямо пропорциональны величинам ΔD_{700} при разных интенсивностях света (измерения проведены в присутствии 10^{-5} M ФМС).

Таким образом, основные результаты работы сводятся к следующему. Подтверждено, что за переменную Ф хлоропластов ответственна главным образом фотосистема 2. Обнаружена переменная Ф фотосистемы 1 у легкой фракции хлоропластов, когда ΔФ от фотосистемы 2 значительно подавлена. Предполагается, что быстрая компонента переменной Ф легкой фракции непосредственно связана с фотоокислением П700. Прямая зависимость ΔФ от ΔD_{700} при разных интенсивностях света может свидетельствовать об уницентральной организации активных центров фотосистемы 1, в соответствии с ([12]) и в противоположность ([13]).

Как было указано ранее, переменная Ф, связанная с фотоокислением хлорофилла в активном центре, была найдена у пурпурных бактерий ([3]). Но в отличие от легких фрагментов хлоропластов, которые обогащены фотосистемой 1, у бактерий зависимость ΔФ от ΔD_{870} при разных интенсивностях света свидетельствует о мультицентральной организации активных центров бактерий ([3]). Таким образом, активные центры фотосистемы 1

хлоропластов и активные центры пурпурных бактерий, сходные по ряду признаков, существенно отличаются по типу взаимодействия между собой в пигментной матрице.

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

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
14 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] L. N. M. Duysens, H. E. Sweers, In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo, 1963, p. 353. [2] W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens, Biochim. et biophys. acta, 94, 355 (1965). [3] W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens, Nature, 197, 355 (1963). [4] J. M. Anderson, N. K. Boardman, Biochim. et biophys. acta, 112, 403 (1966). [5] Н. В. Карапетян, В. В. Климов, Физиол. раст., 18, 233 (1971). [6] Н. В. Карапетян, В. В. Климов, Физиол. раст., 20, № 3 (1973). [7] B. Ke, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 42, 1310 (1967). [8] W. J. Vredenberg, L. Slooten, Biochim. et biophys. acta, 143, 385 (1967). [9] J. M. Briantais, Physiol. Veg., 7, 135 (1969). [10] R. B. Park, K. E. Steinback, P. V. Sane, Biochim. et biophys. acta, 253, 204 (1971). [11] L. P. Vernon, B. Ke, In: The Chlorophyils, 1966, p. 569. [12] P. Joliot, A. Joliot, B. Kok, Biochim. et biophys. acta, 153, 625 (1968). [13] J. Amesz, D. C. Fork, Photochem. Photobiol., 6, 903 (1967).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 7 1973 Вып. 6

УДК 577.158.8

ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ И ЦИТОХРОМОВ В ХРОМАТОФОРАХ И БАКТЕРИЯХ *CHROMATIUM* В ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Н. В. КАРАПЕТЯН, И. Н. КРАХМАЛЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва и институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пущино, Московская область

При освещении интенсивным светом пурпурных бактерий *Chromatium* и выделенных из них хроматофоров в восстановительных условиях, помимо изменений поглощения (ΔA) при 785, 810, 845 и 885 *нм*, обнаруживаются положительные ΔA при 865 и 905 *нм*, которые насыщаются при малых интенсивностях света. В присутствии восстановителей происходит резкое уменьшение ΔA_{885} и усиление ΔA_{845}. Инкубация хроматофоров в среде с 6 *М* мочевиной не оказывает существенного влияния на величину ΔA при 865 и 905 *нм*. В восстановительных условиях у хроматофоров обнаружена сложная кинетика фотоиндуцированных ΔA при 423 *нм*, вызванная, очевидно, восстановлением на свету цитохрома *С*-555. Проведено сравнительное исследование действия термоинактивации на ΔA при 885, 865 и 423 *нм* в восстановительных условиях. Подавление быстро обратимого в темноте ΔA_{423} ведет к усилению ΔA_{885}, что подтверждает взаимодействие цитохрома *С*-555 с П890. Медленно обратимые в темноте ΔA_{423} и ΔA_{865} обнаруживают сходную зависимость от нагревания, интенсивности света и E_h, что может указывать на связь ΔA_{865} с фотосинтетическим переносом электрона. Обсуждается возможная природа процессов, обусловливающих ΔA при 865 и 905 *нм*.

При освещении пурпурных бактерий *Chromatium* или изолированных хроматофоров наблюдаются обратимые изменения поглощения (ΔA), обусловленные фотопревращениями компонентов фотосинтетической цепи переноса электрона. Изменения при 890 *нм* приписывают фотоокислению П890-молекулы бактериохлорофилла (БХ) в активном центре, которое сопровождается восстановлением первичного акцептора электронов и окислением цитохрома типа *С*. Указанием на то, что фотоокисление П890 происходит в элементарном акте, служит регистрация этого процесса при —196°, высокая скорость фотоокисления (менее 0,5 *мксек*) и высокий квантовый выход, равный 1 [1; 2]. Соответствие кинетики окисления цитохрома *С* и восстановления $П890^+$ указывают на наличие комплекса П890 с цитохромом [2]. Фотоокисление П890 сопровождается усилением флуоресценции «валового» БХ и появлением светового сигнала ЭПР, приписываемого $П890^+$ [3]. Изменения при 890 или при 870 *нм* найдены у всех видов пурпурных бактерий, способных к фотосинтетическому росту, но отсутствуют у гетеротрофно растущих мутантов [4]. На основании обнаружения у пурпурных бактерий лишь одного типа спектральных изменений в близкой инфракрасной области поглощения, а также сходства спектров действия фотоокисления цитохромов *С*, участвующих в циклическом и нециклическом переносе электрона, предполагается функционирование у пурпурных бактерий лишь одной фотосистемы. У фотосинтезирующих бактерий не обнаружен эффект Эмерсона [5].

В последние годы у хроматофоров *Chromatium* был найден новый тип спектральных изменений — фотоиндуцированное увеличение поглощения в области 860—910 *нм* [6; 7]. Сходные ΔA были обнаружены у различных видов пурпурных бактерий при освещении светом малой интенсивности [8—11], причем было показано, что они возникают только в восстановительных условиях. Фотопревращения БХ в присутствии восстановителей представляют несомненный интерес, так как они происходят в условиях, наиболее благоприятных для роста бактерий. В восстановительных условиях не наблюдаются ΔA_{890}, возможно, в связи с быстро протекающей реакцией восстановления П890$^+$ или же вследствие того, что «химическое» восстановление акцепторной части цепи переноса электрона блокирует фотоокисление П890. Именно поэтому в восстановительных условиях могут проявиться спектральные изменения в близкой инфракрасной области, связанные не с фотоокислением БХ, а с другими типами его фотопревращений.

Целью настоящей работы явилось исследование природы фотоиндуцированных ΔA пурпурных бактерий *Chromatium* и выделенных из них хроматофоров в присутствии восстановителей и выяснение сопряжения фотопревращений разных форм БХ с цитохромами типа *С*.

МЕТОДИКА

Условия выращивания бактерий *Chromatium minutissimum* и выделения хроматофоров описаны ранее [12]. В опытах использовали 5-дневные клетки бактерий в культуральной среде или суспензии хроматофоров в *трис*-HCl-буфере, pH 8,2. Содержание БХ в образцах составляло 0,02 *мг/мл*.

Установки для измерения фотоиндуцированных ΔA при 750—920 и 400—600 *нм* описаны ранее [13; 14]. О превращениях разных типов цитохромов судили по кинетике ΔA при 423 *нм* (ΔA_{423}) после выключения действующего света: быстрое увеличение поглощения приписывается восстановлению высокопотенциального цитохрома *С*-555, а медленное — восстановлению низкопотенциального цитохрома *С*-552 [15]. Интенсивность действующего света в области 570—700 *нм* регулировали нейтральными светофильтрами; максимальная интенсивность составляла $2{,}3 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$ (100%). Условия измерения окислительно-восстановительного потенциала (E_h) и калибровки электродов, а также используемые при измерении E_h хроматофоров редокс-буферы описаны ранее [7; 16]. Изменение E_h вызывали добавлением к образцу дитионита, аскорбата натрия, ферроцианида или феррицианида. При измерении E_h хроматофоров удаляли кислород, откачивая его из трубок Тунберга вакуумным насосом. Условия, при которых $E_h > 400$ *мв*, обозначены как окислительные, а при $E_h < 0$ *в* — как восстановительные. Измерение E_h и ΔA проводили в параллельных опытах. В случае использования бактерий указано лишь количество добавленного восстановителя, так как величина E_h среды не отражает истинного значения E_h в клетках.

При термоинактивации бактерии или хроматофоры нагревали при различных температурах в течение 1,5 *мин*, после чего их охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,5 *мг/мл* аскорбата и удаляли кислород; спектральные измерения проводили через 2 *час* инкубации.

Для предотвращения конформационных изменений к хроматофорам в присутствии аскорбата натрия добавляли перекристаллизованную мочевину до 6 *М* конечной концентрации [17]; кислород удаляли и измерения проводили через 1—2 *час* инкубации.

Величину фотоиндуцированных ΔA выражали в относительных единицах или как $\Delta A/\Delta A_{макс}$ в зависимости от интенсивности света, причем изменения при максимальной интенсивности света приняты за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При освещении хроматофоров *Chromatium* в анаэробных условиях ($E_h = 200$ *мв*), помимо ΔA при 785, 810, 845 и 885 *нм*, наблюдается увеличение поглощения при 865 *нм* (рис. 1, кривая *2*). Уменьшение величины E_h до 50 *мв* в результате добавления аскорбата натрия приводит к исчезновению ΔA_{885} и появлению ΔA_{905} (рис. 1, кривая *3*). Добавление дитионита ведет почти к полному исчезновению ΔA в области 750—910 *нм*. Действие дитионита обратимо, и при последующем добавлении феррицианида вновь наблюдаются изменения, характерные для окислительных условий. Положительные ΔA при 865 и 905 *нм* исчезают при —196°, а также после длительного хранения образца при комнатной температуре.

В определенной области E_h у хроматофоров *Chromatium* одновременно наблюдаются ΔA при 865, 885 и 905 *нм*. Изменения при 905 *нм* обнаруживаются лишь после существенного уменьшения величины противоположных по знаку изменений при 885 *нм*. Изменения при 865 и 905 *нм* наблюдаются лишь в восстановительных условиях и, по-видимому, отражают один и тот же процесс, хотя и обусловлены превращениями разных форм БХ. Поскольку ΔA_{865} более выражены, чем ΔA_{905}, исследовали главным образом ΔA_{865}.

Изменения при 865 *нм* существенно отличаются от изменений при 885 *нм* по зависимости не только от E_h, но и от интенсивности света. В восстановительных условиях ΔA_{865} насыщаются при малых интенсивностях света (рис. 2, кривая *4*), в то время как ΔA в этих условиях как при 885 *нм*, так и при других длинах волн (рис. 2, кривые *1—3*, *5*) не достигают

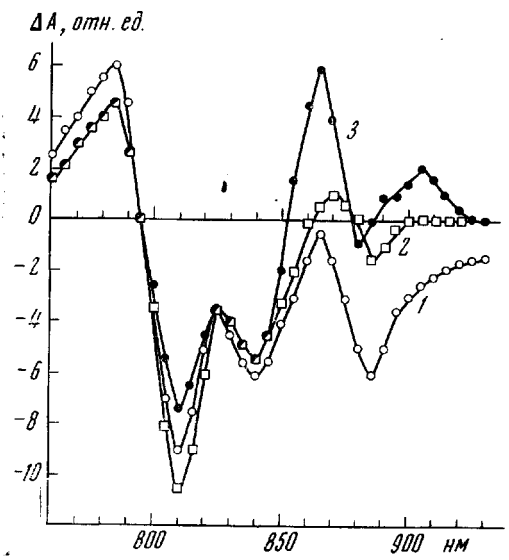


Рис. 1

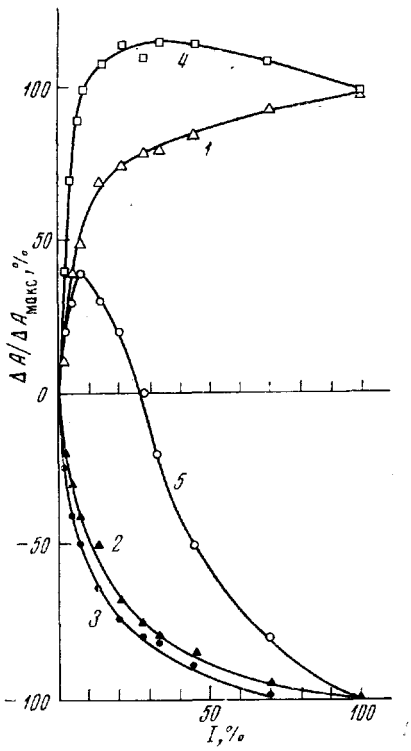


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость дифференциальных спектров поглощения «свет — темнота» хроматофоров *Chromatium* от E_h среды: *1* — аэробные условия, E_h=380 *мв*; *2* — тот же образец, анаэробные условия, E_h=+200 *мв*; *3* — то же, что и *2*+0,5 *мг/мл* аскорбата натрия, E_h=+50 *мв*. Интенсивность света — $2 \cdot 10^4$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$

Рис. 2. Зависимость величины ΔA хроматофоров *Chromatium* от интенсивности света при E_h=—50 *мв*: *1* — 785; *2* — 810; *3* — 845; *4* — 865; *5* — 885 *нм*

насыщения даже при максимальной интенсивности света. При слабых же интенсивностях света вместо уменьшения поглощения при 885 *нм* наблюдается его увеличение, которое снижается с усилением интенсивности света и связано с уменьшением ΔA при 865 и 905 *нм* за счет появления ΔA при 885 *нм*. При E_h=420 *мв* ΔA при 785, 810, 845 и 885 *нм* характеризуются одинаковой зависимостью от действующего света и насыщаются при максимальной интенсивности освещения.

То обстоятельство, что положительные ΔA при 865 и 905 *нм* не наблюдаются при низких температурах, могло бы служить свидетельством того, что они обусловлены конформационными изменениями белкового носителя пигментного комплекса [9]. С целью выяснения природы ΔA при 865 и 905 *нм* исследовали денатурирующее действие мочевины на хроматофоры. Инкубация хроматофоров в течение 1 *час* в восстанови-

тельных условиях в среде с 6 *М* мочевиной приводила лишь к небольшому уменьшению величины положительных ΔA, но не вызывала их исчезновения (рис. 3). Усиление ΔA при 885 *нм* при инкубации хроматофоров в среде с 6 *М* мочевиной в отсутствие восстановителей (E_h=400 *мв*) обусловлено, очевидно, аэрацией суспензии при внесении мочевины [10]. Добавление 10^{-4} *М* *п*-хлормеркурибензоата также не оказывало существенного влияния на характер дифференциального спектра поглощения в восстановительных условиях.

Изменения при 865 *нм* существенно отличаются от изменений при 885 *нм* также по чувствительности к кратковременному нагреванию хроматофоров *Chromatium* при различных температурах (рис. 4, *А*). Изменения при 865 *нм* (рис. 4, *А* кривая *2*) достигают максимальной величины после нагревания хроматофоров при 60°, что сопровождается уменьшением величины изменений при 885 *нм* (рис. 4, *А*, кривая *1*). Последующее повышение температуры ведет к резкому уменьшению величины ΔA_{865} и их исчезновению при 80°. Изменения же при 885 *нм* достигают максимальной величины при нагревании до 70° и исчезают при 90°. Таким образом, ΔA_{865} более термолабильны.

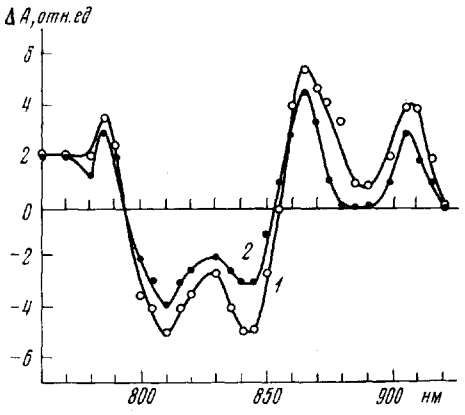


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» хроматофоров *Chromatium* в восстановительных условиях (Eh= —50 *мв*) в отсутствие (*1*) и в присутствии (*2*) 6 *М* мочевины

Для выяснения сопряжения фотопревращений разных форм БХ с превращениями цитохромов *С* исследовали также зависимость ΔA при 423 *нм* бактерий от температуры нагревания (рис. 4, *Б*). Предварительно были проведены кинетические измерения фотопревращений цитохромов *С*. В соответствии с данными, полученными ранее [15], после освещения бактерий в окислительных условиях наблюдали лишь быстрое увеличение поглощения при 423 *нм* (рис. *5* кривая *1*); медленное увеличение поглощения обнаруживалось только в восстановительных условиях (рис. *5*, кривая *2*). Медленно обратимые ΔA при 423 *нм* после выключения света насыщались при малых интенсивностях освещения, тогда как быстрые не насыщались даже при максимальной интенсивности света (рис. 6, *А*). Хотя фотопревращения БХ измеряли, используя хроматофоры, а фотопревращения цитохромов — используя бактерии, интересно отметить сходство кривых ΔA при 885 *нм* и быстро обратимого увеличения поглощения при 423 *нм*, а также ΔA при 865 *нм* и медленно обратимого увеличения поглощения при 423 *нм* (см. рис. 2 и 6, *а*).

При исследовании зависимости фотопревращений обоих типов цитохромов от температуры нагревания бактерий были установлены различия этих цитохромов (рис. 4, *Б*). С увеличением температуры нагревания происходит резкое снижение величины ΔA_{423}, вызванное быстро обратимой реакцией, причем исчезновение этих изменений сопровождается максимальным повышением величины ΔA_{885} (см. также рис. 4, *А*). Изменения при 423 *нм*, вызванные медленно обратимой реакцией, достигают максимальной величины при 70° и исчезают при 90°. Эти изменения обнаруживают большое сходство с изменением ΔA при 865 *нм* от температуры нагревания. При сопоставлении зависимости фотопревращений БХ и цитохромов от температуры нагревания следует иметь в виду, что

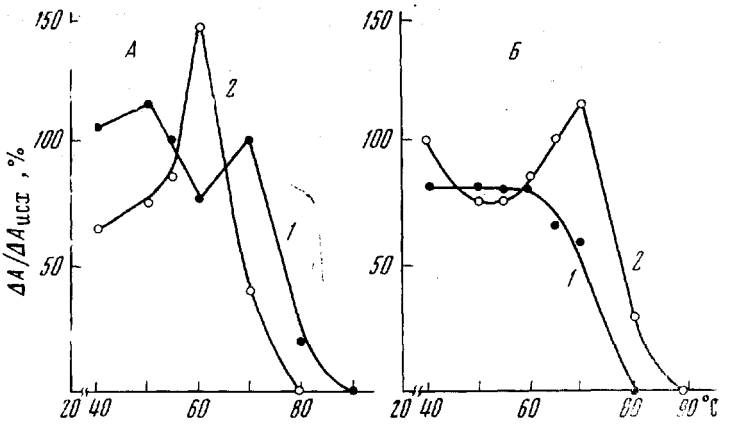


Рис. 4. Зависимость величины ΔA от температуры предварительного нагревания хроматофоров (*А*) и бактерий *Chromatium* (*Б*). *А*: *1* — ΔA_{885}; *2* — ΔA_{865}. *Б*: *1* — быстро и *2* — медленно обратимые ΔA_{423} после выключения света. Восстановительные условия. Измерения проводили при интенсивном (100%) (кривые *1*) и слабом (5%) освещении (кривые *2*)

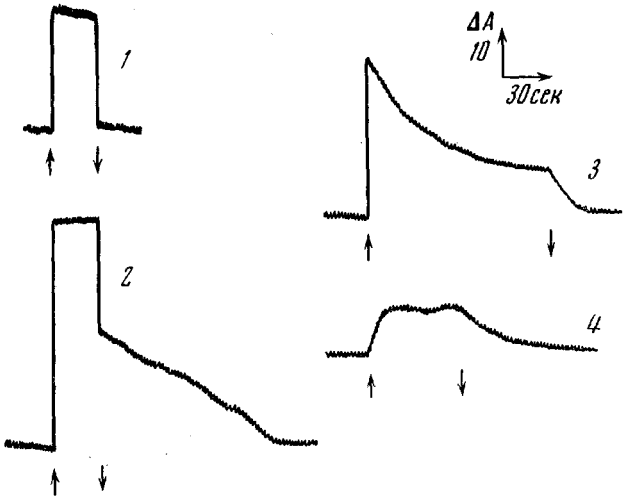


Рис. 5. Кинетика ΔA_{423} бактерий *Chromatium* в присутствии 5 *мМ* феррицианида (*1*) или 1 *мМ* ферроцианида (*2*) и хроматофоров *Chromatium* в присутствии 10 *мМ* дитионита, E_h=—100 *мв* (*3*, *4*). Измерения проводили при интенсивном (100%) (кривые *1—3*) и слабом (10%) освещении (кривая *4*)

при использовании хроматофоров температурная зависимость сдвигается на 10° в сторону меньших температур [18].

При длительной инкубации хроматофоров *Chromatium* в восстановительных условиях (E_h=—100 *мв*) наблюдается сложная кинетика фотоиндуцированных ΔA при 423 *нм*. При включении интенсивного действующего света происходит быстрое уменьшение поглощения до минимальной величины и затем его медленное увеличение до постоянной величины (рис. 5, кривая *3*). После выключения света происходит медленное увеличение поглощения до исходного уровня. Увеличение поглощения при 423 *нм* на свету, наблюдаемое также у бактерий в присутствии дитионита, насыщается при больших интенсивностях света, обнаруживая зави-

симость, сходную с зависимостью, обусловленной быстро обратимой реакцией (рис. 6, *Б*, кривая *1*). Зависимость же «послесветового» увеличения поглощения от интенсивности света имеет сложный характер: эти изменения быстро достигают максимальной величины, а затем уменьшаются с увеличением интенсивности света (рис. 6, *Б*, кривая *2*). По-видимому, увеличение поглощения на свету при 423 *нм* обусловлено фотовосстановлением цитохрома *С*-555, который в восстановительных

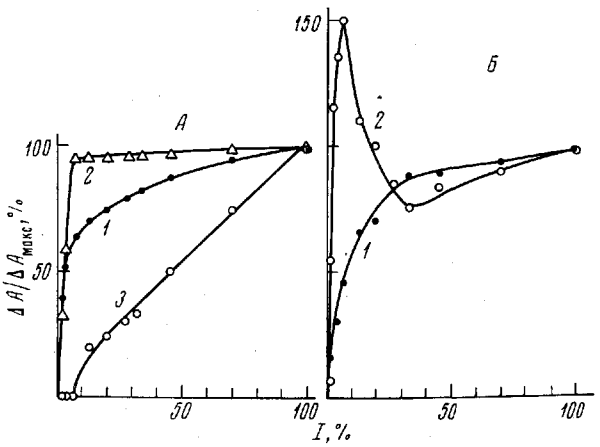


Рис. 6. Зависимость ΔA_{423} бактерий *Chromatium* в анаэробных условиях от интенсивности света: *А* — величины светового уменьшения поглощения (*1*) и увеличения поглощения после выключения света за счет быстро (*2*) и медленно (*3*) обратимых реакций в присутствии 1 *мМ* аскорбата натрия (см. рис. 5, кривая *2*); *Б* — величины увеличения поглощения на свету (*1*) и после выключения света (*2*) в присутствии 10 *мМ* дитионита (см. рис. 5, кривая *3*)

условиях на свету не накапливается в окисленном виде. При освещении же хроматофоров светом слабой интенсивности обнаруживаются лишь фотопревращения цитохрома *С*-552 (рис. 5, кривая *4*). Таким образом, оба типа цитохромов можно различить кинетически и в хроматофорах, но при измерении в сильно восстановительных условиях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По сравнению с ΔA_{885} положительные ΔA при 865 и 905 *нм* хроматофоров *Chromatium* обнаруживают ряд различий: 1) они наблюдаются только в восстановительных условиях в определенной области E_h, при которых акцепторная часть цепи переноса электрона «химически» восстановлена; 2) положительные ΔA насыщаются при меньших интенсивностях света и не наблюдаются при низких температурах; 3) положительные ΔA наблюдаются в условиях, при которых более четко проявляются фотопревращения низкопотенциального цитохрома С-552, функционирующего в нециклической цепи переноса электрона [15]; 4) тип связи цитохрома *С*-552 с компонентом, ответственным за ΔA при 905 *нм* (П905), отличается от типа связи П890 с цитохромом *С*-555.

Не вызывает сомнения, что положительные ΔA при 865 и 905 *нм* обусловлены фотопревращениями молекул БХ. Положительные ΔA, связанные с нециклическим потоком электронов, можно приписать структурным изменениям БХ-липопротеинового комплекса или окислительно-восстановительным фотопревращениям молекулы БХ.

На возможность конформационных изменений белкового носителя, вызывающих «красный» сдвиг, указывалось ранее [9]. Однако обнару-

женная нами независимость положительных ΔA от действия денатурирующих агентов не позволяет приписать их конформационным изменениям белковой части пигментного комплекса. Одно из возможных объяснений этого спектрального сдвига—действие на мембрану электрического поля, возникающего при переносе электрона по фотосинтетической цепи [19]. При этом предполагается, что у пурпурных бактерий функционирует одна фотосистема, сенсибилизирующая поток электронов как в циклической, так и в нециклической цепи [20].

Положительные ΔA могут быть обусловлены фотопревращениями молекулы БХ (П905) в активном центре другой фотосистемы, функционирующей в сильно восстановительных условиях. Возможно, именно с участием этой фотосистемы происходит фотовосстановление НАД у бактерий *Chromatium*, у которых, в отличие от несерных бактерий, не обнаружен обратный перенос электрона. В качестве молекул БХ в активном центре низкопотенциальной фотосистемы могут функционировать П905 [7], П865 [21], П836 [22] или П424 [23]. Особый интерес представляют изменения при 424 *нм*, которые наблюдаются у хроматофоров *Chromatium* в восстановительных условиях (E_h=—320 *мв*) даже при —196° и протекают с высокой скоростью ($\sim$70 *мксек*) с квантовым выходом $\sim$1 [23]. Эти свойства позволили приписать ΔA_{424} фотопревращениям активного центра низкопотенциальной фотосистемы. Однако трудность заключается в том, что в близкой инфракрасной части спектра бактерий в восстановительных условиях пока не найдены фотоиндуцированные ΔA, которые имели бы место и при —196°. Кроме того, неясен механизм фотореакции в активном центре предполагаемой низкопотенциальной фотосистемы.

Возможно, что в отличие от фотоокисления П890 происходит фотовосстановление БХ в активном центре низкопотенциальной фотосистемы. Способность молекул БХ к фотовосстановлению *in vitro* была показана ранее Красновским и др. [24; 25]. На восстановительную природу фотореакции, приводящей к ΔA при 865 и 905 *нм*, могло бы указать усиление ΔA_{865} при подавлении акцепторной части цепи переноса электрона в результате фотоинактивации (рис. 4, *А*). Кстати, именно при «химическом» восстановлении акцепторной части (E_h=—100 *мв*) наблюдается на свету восстановление фотоокисленного цитохрома *С*-555. Однако не имеется прямых указаний на наличие у пурпурных бактерий второй фотореакции. Ее наличие позволило бы объяснить фотовосстановление НАД бактериями *Chromatium*, так как при допущении только одной фотореакции E_m первичного акцептора, воспринимающего электрон от П890, равен —150 *мв*, что недостаточно для прямого восстановления НАД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chance B., Nishimura M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **49**, 19, 1960
2. Parson W. W., Biochim. et biophys. acta **153**, 248, 1968
3. Vredenberg W. J., Duysens L. N. M., Nature **197**, 355, 1963
4. Clayton R. K., Sistrom W. R., Zaugg W. S., Biochim. et biophys. acta **102**, 341, 1965
5. Blinks L. R., van Niel C. B., in: «Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria», Tokyo Press, p. 297, 1963
6. Karapetyan N. V., Abstr. Ist Internat. Congress on Photosynthesis, Freudenstadt, p. 95, 1968
7. Cusanovich M. A., Bartsch R. G., Kamen M. D., Biochim. et biophys. acta **153**, 397, 1968
8. Clayton R. K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **50**, 583, 1963
9. Vredenberg W. J., Amesz J., Biochim. et biophys. acta **126**, 244, 1966
10. Карапатян Н. В., Красновский А. А., Докл. АН СССР **180**, 989, 1968
11. Sybesma C., Fowler C. F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **61**, 1343, 1968
12. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Мол. биол., **6**, 773, 1972
13. Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. Биофизика **8**, 191, 1963
14. Карапетян Н. В., Климов В. В., Физиол. растений **18**, 223, 1971

15. Olson J. M., Chance B., Arch. Biochem. and Biophys. 88, 26, 1960
16. Крахмалева И. Н., Карапетян Н. В., Красновский А. А., Биофизика 17, 990, 1972
17. Жоли М., Физическая химия денатурации белков, «Мир», М., 1968
18. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР 171, 1201, 1966
19. Emrich H. M., Junge W., Witt H. T., Z. Naturforsch. 24b, 1144, 1969
20. Parson W. W., Case G. D., Biochim. et biophys. acta 205, 232, 1970
21. Okayama S., Kakuno T., Horio T., J. Biochem. 68, 19, 1970
22. Schmidt G. L., Kamen M. D., Biochim. et biophys. acta 234, 70, 1971
23. Seibert M., Devault D., Biochim. et biophys. acta 253, 396, 1971
24. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР 81, 879, 1951
25. Красновский А. А., Дроздова Н. Н. Докл. АН СССР 158, 730, 1964.

Поступила в редакцию
17.XI.1972

LIGHT INDUCED TRANSFORMATIONS OF BACTERIOCHLOROPHYLLS AND CYTOCHROMES IN *CHROMATIUM* CELLS AND CHROMATOPHORES UNDER REDUCTIVE CONDITIONS

N. V. KARAPETYAN, I. N. KRAKHMALEVA and A. A. KRASNOVSKII

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, Photosynthesis Institute, Academy of Sciences of the USSR, Poustchino, Moscow Region

Under the intense illumination of *Chromatium* cells and isolated chromatophores under reductive conditions not only usual absorbancy changes (ΔA) at 785, 810, 845 and 885 *nm* were observed but positive ΔA at 865 and 905 *nm* were revealed, too. The latter ones are saturated at a low light intensity. In the presence of reductants distinct decrease in ΔA_{885} and increase of ΔA_{865} takes place. The incubation of chromatophores in 6 *M* urea do not affect the value of ΔA at 865 and 905 *nm*. The complex kinetics of light induced ΔA_{423} is detected in chromatophores under reductive conditions, that is due to the photoreduction of cytochrome C-555. The comparative investigation of the effect of heating on ΔA at 885, 865 and 423 *nm* under reductive conditions was carried out. The inhibition of a component of ΔA_{423} fast reversible in the dark causes the enhancement of ΔA_{885} that suggests a close relationship between cytochrome C-555 and P890. A component of ΔA_{423} which is slowly reversible in the dark and the ΔA_{865} exhibit similar dependence on heating, light intensity and E_h that can indicate the relation of ΔA_{865} to photosynthetic electron transfer. Possible nature of processes responsible for ΔA_{865} and A_{905} is discussed.

А. А. КРАСНОВСКИЙ,
член-корреспондент АН СССР

ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Жизнь на Земле полностью зависит от фотосинтеза. Ибо и человек и животные питаются теми веществами, которые первично создаются зелеными растениями. Закономерно возникает вопрос, связано ли также возникновение жизни на Земле с тем или иным типом фотосинтеза?

50 лет назад А. И. Опарин обосновал положение, что фотосинтез растений не является первичным типом метаболизма, а возник на основе обмена веществ первичных гетеротрофных организмов, которые использовали органическое вещество небиологического происхождения. Органическое вещество могло образоваться в результате фотохимических реакций в первичной бескислородной атмосфере Земли, на что указывал в своих работах также Дж. Холдейн. Эти представления были убедительно аргументированы и их принимает большинство исследователей, работающих в этой области науки.

Рассмотрим экспериментальные данные различных областей знания, указывающие на пути химической и биологической эволюции фотосинтеза [1]. Прежде всего следует использовать сведения о филогении и эволюции ныне существующих фотосинтезирующих организмов; геология и палеоботаника дает представления о природе и возрасте ископаемых остатков организмов и органических молекул, образованных при их распаде; экзобиология представляет сведения о возможности жизни на других планетах и небесных телах. Важным источни-

[1] См. М. Кальвин. Химическая эволюция. М., «Мир», 1971; Г. Гаффрон. Стадии фотохимической эволюции. — В сб.: «Горизонты биохимии». М., Изд-во иностр. лит., 1965; А. А. Красновский. О развитии способа действия фотокаталитической системы организмов. — В сб.: «Возникновение жизни на Земле». М. Изд-во АН СССР, 1957.

ком информации является создание в лабораторных условиях модельных систем, имитирующих химические и биохимические процессы на первичной Земле.

Эволюция фотосинтезирующих организмов. Прежде всего рассмотрим те сведения, которые дает сравнительная биология ныне существующих организмов. Для построения филогении фотосинтезирующих организмов привлекается обширный материал из различных областей биологии: морфологии, цитологии, биохимии, палеоботаники, генетики и т. д.

В настоящее время на Земле доминируют аэробные фотосинтетики, выделяющие кислород. Наряду с ними, существует небольшая группа анаэробных фотосинтезирующих бактерий, обмен веществ которых основан на использовании для восстановления углекислоты большой группы органических и неорганических веществ; при фотосинтезе бактерии не выделяют кислород воды.

Ныне общепринято мнение, что наиболее древние фотосинтезирующие растения — синезеленые водоросли. В древнейших докембрийских отложениях, датируемых двумя — тремя миллиардами лет, найдены остатки этих организмов в виде включений в кварцевых породах, что определило их сохранность.

Некоторые типы синезеленых водорослей плохо переносят большое парциальное давление кислорода в среде, предпочитая обстановку, близкую к анаэробной. Это также указывает на их возможное происхождение из анаэробов. Однако далеко не решен вопрос о том, происходят ли синезеленые водоросли от фотосинтезирующих бактерий, или они имеют общего предка — не сохранившегося на Земле первичного анаэробного фотосинтетика. Последнее является более вероятным, и эту гипотезу принимает большинство исследователей.

Филогенез высших растений исследован гораздо лучше, так как он основан на изучении ныне существующих типов организмов и на достоверном палеоботаническом материале. Внутри этого типа голосеменные растения предшествуют покрытосемянным. Причем пигментный состав всех высших фотосинтетиков обладает значительным сходством. В них доминируют хлорофиллы α и β каротины и ксантофиллы.

Проблема биохимической эволюции ныне существующих организмов разработана достаточно полно. Одна-

ко мы не находим на Земле менее сложно построенных организмов, стоящих на границе химической и биологической эволюции.

Еще Ч. Дарвин отметил 100 лет назад в своем известном письме Гукеру, что первичное живое белковое вещество невозможно обнаружить потому, что сейчас это вещество было бы немедленно съедено или поглощено более высокоорганизованными организмами. Следует также подчеркнуть, что первичные организмы возникли в анаэробных условиях и кислородная атмосфера земли была бы для них смертельна.

Поэтому, для того чтобы судить о путях эволюции более древних организмов, следует обратиться к геологии.

Геология. Хорошо известно, что наиболее древние породы имеют восстановительный характер. Давно замечено, что лава при вулканических извержениях содержит соединения закисного железа. Окисленные породы, содержащие высшие окислы железа и других элементов, датируются возрастом около 1 млрд. лет. Если бы в результате какого-то процесса происходило образование кислорода, то этот элемент неизбежно захватывался бы восстановленными соединениями первичной земной коры. Чтобы избыток кислорода сохранялся в газовой атмосфере Земли, нужен был такой мощный процесс, как фотосинтез растений, при котором происходило бы непрерывное выделение кислорода. В результате этого вещества поверхности земной коры находятся в окисленном состоянии.

Для фотосинтезирующих организмов обязательно наличие пигментной системы, улавливающей солнечное излучение. Все ныне существующие фотосинтезирующие организмы содержат хлорофиллоподобные пигменты, построенные на основе порфиринового цикла. Эти пигменты обладают также длинным углеводородным фитольным или фарнезоловым «хвостом». Вполне вероятно, что первичный фотосинтезирующий организм также содержал пигменты порфириновой природы. Таким образом, порфириновая «метка» отложений, а также наличие в них углеводородов, близких к фитолу, может быть свидетельством остатков фотосинтезирующих организмов в ископаемых породах.

Хорошо изучены порфирины в нефти, где они нахо-

дятся преимущественно в виде ванадиевых и никелевых комплексов. Обычно считают, что эти комплексы имеют вторичное происхождение, так как центральный атом магния в молекуле хлорофилла довольно быстро обменивается на водород и безмагниевое производное — феофитин образует более устойчивые вторичные комплексы с указанными металлами. Анализ боковых групп порфиринов показывает, что эти порфирины являются продуктами разложения хлорофилла и попали в нефть в результате превращений органических остатков фотосинтезирующих организмов.

В геологическом смысле, нефти — сравнительно молодые образования: их возраст обычно не превышает полумиллиарда лет, однако имеются единичные работы относительно нахождения порфиринов в древних докембрийских породах, возрастом около трех миллиардов лет; эти данные требуют независимого подтверждения. В древних породах (сланцы, нефть) найден ряд жирных углеводородов, например фитан. Химический анализ органических веществ, особенно углеводородных фракций в древних породах пока не позволяет установить с полной определенностью их биологическое или абиогенное происхождение.

Итак, геологические исследования пока не позволяют достаточно достоверно найти остатки фотосинтезирующих организмов более древних, чем синезеленые водоросли.

Эволюция состава земной атмосферы тесно связана с процессом фотосинтеза. Нынешняя атмосфера Земли содержит около 20% кислорода. В верхних слоях атмосферы существует слой озона, который поглощает коротковолновое (короче 300 *нм*) ультрафиолетовое излучение Солнца. Фотосинтез ныне существующих на Земле организмов происходит в спектральной области от 300 до 900 *нм*, то есть в пределах от длинноволновой ультрафиолетовой до близкой инфракрасной области спектра.

Основываясь на геологических данных, голландский биохимик Руттен обосновал то положение, что нынешний уровень кислорода в атмосфере был достигнут 400—500 млн. лет назад, а первичная бескислородная восстановительная атмосфера начала заменяться кислородной около 1,5 млрд. лет назад.

Наличие слоя озона в верхних слоях атмосферы имеет чрезвычайно большое значение для происхождения и эволюции жизни, так как поглощение жесткого ультрафиолета озоновым экраном предохраняет от разрушения нуклеиновый и белковый аппарат ныне существующих организмов. Наибольшее содержание озона обнаружено на высоте около 25 *км*, где толщина слоя (при приведении к нор-

мальным условиям) составляет всего около 3 *мм*. Это количество озона практически полностью поглощает коротковолновый ультрафиолет Солнца до 290—300 *нм*. Озон может образоваться под действием тихих электрических разрядов или под действием ультрафиолетового излучения на кислород и в свою очередь распасться под действием более длинноволнового ультрафиолета. Таким образом, равновесная концентрация озона в атмосфере зависит от скорости его образования из кислорода и скорости его распада. До сих пор не решен вопрос о происхождении кислорода, из которого образуется озон атмосферы. Так, при действии короткого ультрафиолета на пары воды происходит ее фотолиз с образованием кислорода. Однако маловероятно накопление кислорода при этой реакции в количестве, достаточном для поддержания и образования слоя озона в атмосфере. Во всяком случае, в атмосфере Венеры и Марса озон пока не обнаружен.

Мы приходим, таким образом, к предположению, что озон образуется из кислорода, имеющего фотосинтетическое происхождение. В этом случае первичный фотосинтез мог произойти в безозоновой атмосфере, когда первичные организмы не были защищены от действия короткого ультрафиолета. Впрочем, толща воды достаточно хорошо поглощает короткое ультрафиолетовое излучение и первичные фотосинтетики, возникшие в первичном океане, вероятно неплохо были защищены от действия ультрафиолета слоем воды, тогда как фотосинтезирующие организмы, которые вышли на сушу из океана после образования озонового экрана, уже не боялись короткого ультрафиолета.

Атмосфера планет. Спектроскопические наблюдения показали, что в атмосфере Юпитера и Сатурна доминируют метан, аммиак, водород и гелий. В атмосфере Венеры и Марса обнаружены углекислый газ и вода, наличие аммиака, кислорода и озона нельзя считать твердо установленным. Таким образом, нет сомнений в том, что на этих планетах не происходит фотосинтеза «земного» типа. На Юпитере и Сатурне можно ожидать наличие стадий химической эволюции, а на Венере и Марсе примитивных путей ассимиляции углекислоты. Знание состава атмосферы этих планет позволяет моделировать добиологические процессы, действуя излучением и тихими электрическими разрядами на смеси газов, имитирующих атмосферу этих планет, сходную с первичной атмосферой Земли. Обратимся теперь к анализу небесных тел неземного происхождения.

Экзобиология. Химический анализ метеоритов давно привлекает внимание исследователей. До сих пор не ясно, существовали ли в метеоритах органические вещества «изначально», образовались ли они в процессе прохождения метеорита через земную атмосферу или возникли из загрязнений земной природы. Во всяком случае, при анализе метеоритов до сих пор достоверно не обнаружены порфирины, а также вещества фотосинтетической природы. Существуют данные, что органические вещества метеоритов образовались путем абиогенных химических синтезов из более просто построенных молекул.

Анализ проб лунного грунта пока не привел к обнаружению органического углерода. Американские исследователи обнаружили следы порфиринов на лунной поверхности вблизи прилунения космического корабля, однако они привели достаточно убедительные

доводы, что обнаруженные порфирины образовались путем абиогенных синтезов в выхлопных газах ракетного двигателя корабля.

В космическом пространстве путем спектрального анализа обнаружены радикалы органических молекул и существуют единичные указания на то, что отдельные полосы испускания могут принадлежать порфиринам. Но все эти данные требуют независимого подтверждения и дальнейшего исследования.

Таким образом, отсутствуют достаточно достоверные данные геологических и экзобиологических исследований, указывающих на пути добиологического фотосинтеза. Поэтому в настоящее время большое внимание привлекает создание модельных систем, имитирующих в лабораторной обстановке события, имевшие место в восстановительной атмосфере первичной Земли.

Мы уже отмечали, что озон в атмосфере, вероятно, образуется из кислорода фотосинтетического происхождения. Следовательно, можно полагать, что первичная атмосфера была прозрачна для короткого ультрафиолета, и при осуществлении химических моделей абиогенных синтезов следует исходить из того предположения, что короткое ультрафиолетовое излучение достигало в те далекие времена поверхности Земли. Лишь короткое ультрафиолетовое излучение (130—180 *нм*) может осуществить разрыв прочных связей в молекулах аммиака, метана или воды и привести к их химическим превращениям.

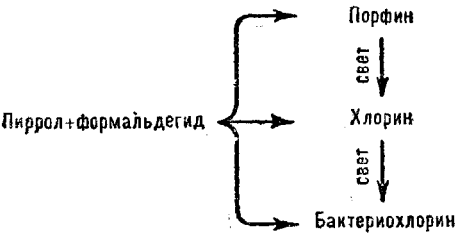
В модельных экспериментах смесь газов, имитирующих первичную атмосферу, подвергалась действию ультрафиолетового излучения (Теренин, Грот, Павловская и Пасынский), тихих электрических разрядов (Миллер), пучков электронов и гамма-излучений (Кальвин). В этих экспериментах обнаружены аминокислоты, пуриновые основания, сахароподобные и многие другие органические соединения (Поннамперума и др.).

Возникшие мономерные молекулы могли полимеризоваться самопроизвольно, а также под действием ультрафиолетового света или катализаторов, среди которых могли быть неорганические компоненты земной коры — глины, на что указывают модельные эксперименты. При этом образовались полипептиды, полинуклеотиды и другие полимеры, которые при достижении определенной величины цепи могли согласно гипотезе А. И. Опарина сформировать коллоидные частицы типа коацерватов или микросфер (Фокс). Эти гетерогенные образования могли включать в себя разнообразные ак-

тивные вещества, в том числе железные или магниевые комплексы порфиринов.

Абиогенный синтез порфиринов или других пигментов-фотосенсибилизаторов является важнейшим условием, определяющим возможность возникновения первичного фотосинтеза. Модельные эксперименты показывают, что включение хлорофилла в коацерваты или гема в микросферы приводит к получению фотохимически или каталитически активных структур.

Химический синтез порфина из пиррола и формальдегида был осуществлен более 30 лет назад. Флюоресцентный метод изучения продуктов реакции позволил обнаружить в нашей лаборатории наряду с порфином также хлорин и бактериохлорин:



Опыты показали, что образование этих пигментов катализируют окислы кремния и титана, имитирующие компоненты земной коры. Мы нашли, что хлорин может возникнуть не только из пиррола и формальдегида, но и при фотохимическом гидрировании порфирина.

По данным американских исследователей, в смеси газов (водяных паров, аммиака, углекислоты, метана), имитирующих первичную бескислородную атмосферу Земли, при действии тихих электрических разрядов или ультрафиолетового излучения обнаружены формальдегид и следы порфиринов.

Все эти результаты подтверждают возможность абиогенного образования различных порфиринов и тем оправдывают их поиски в недрах Земли и на других планетах.

Взаимодействие с неорганическими компонентами земной коры привело к включению ионов металлов в цепь порфиринового кольца. Мы уже отмечали, что наиболее вероятно было включение магния и железа.

Магниевые комплексы легли в основу хлорофилла и его аналогов, а железные — в основу катализаторов типа цитохрома и гемоглобина. Существенное отличие магниевых комплексов от железных состоит в том, что магниевые комплексы порфиринов активны лишь в возбужденном состоянии.

Возможность включения наиболее распространенных элементов земной коры в порфириновое кольцо

Элемент	% в земной коре	Активность порфиринового комплекса	
		катализ	фотохимия
Si — кремний	27,6	не растворимы в водной среде биосферы	
Al — алюминий	8,5		
Fe — железо	5,0	активен	неактивен
Ca — кальций	3,5	гидролизуются в водной среде	
Na — натрий	2,6		
K — калий	2,5		
Mg — магний	2,0	неактивен	активен
Ti — титан	0,6	не растворимы	

Фотосенсибилизирующее действие пигментов. В нашей лаборатории было установлено, что возбужденные молекулы порфиринов способны переносить электрон (водород) от молекулы донора к молекуле акцептора.

Фотосенсибилизирующее действие порфириновых пигментов детально изучали в нашей лаборатории. В качестве донора электрона мы использовали диэнолы, сульфгидрильные соединения, гидразин, соединения двухвалентного железа и т. д., а в качестве акцепторов электрона — флавины, пиридиннуклеотиды, цитохромы, кислород, ряд красителей, в том числе метилвиологен, и т. д. (рис. 1).

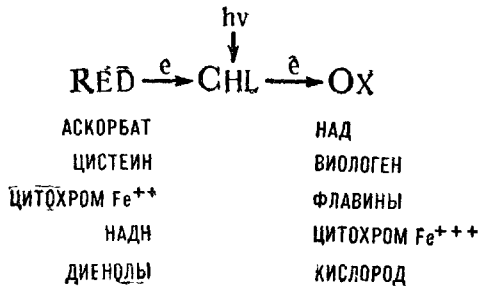


Рис. 1.

Red — донор электрона; Chl — хлорофилл, порфирины; Ox — акцептор электрона.

Реакции такого типа моделируют фрагменты цепи переноса электрона у первичных организмов, они осуществляются либо в гомогенных, либо в несложных гетерогенных системах.

Удивительно, что фотосенсибилизаторами могут быть неорганические компоненты земной коры — окислы титана, цинка и вольфрама: в нашей лаборатории было найдено, что эти неорганические соединения обладают способностью к фотосенсибилизации не менее активной, чем порфирины.

Более того, с помощью неорганических сенсибилизаторов: двуокиси титана, окиси цинка удалось моделировать реакцию Хилла, которая идет в хлоропластах (фотохимическое выделение кислорода воды, сопряженное с восстановлением экзогенных акцепторов электрона — соединений окисного железа и хинонов).

Однако ныне существующие организмы не используют неорганические сенсибилизаторы — эволюция пошла по пути использования соединений порфиринов с ионами металлов. Модельные опыты указывают на возможность включения неорганических сенсибилизаторов в других вариантах химической эволюции, не нашедших дальнейшего продолжения.

Пути химической эволюции фотосинтеза. Итак, обширный материал (полученный преимущественно в модельных экспериментах) позволяет представить пути химической и биологической эволюции фотосинтеза, которые показаны на схеме (рис. 2).

СХЕМА ХИМИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ

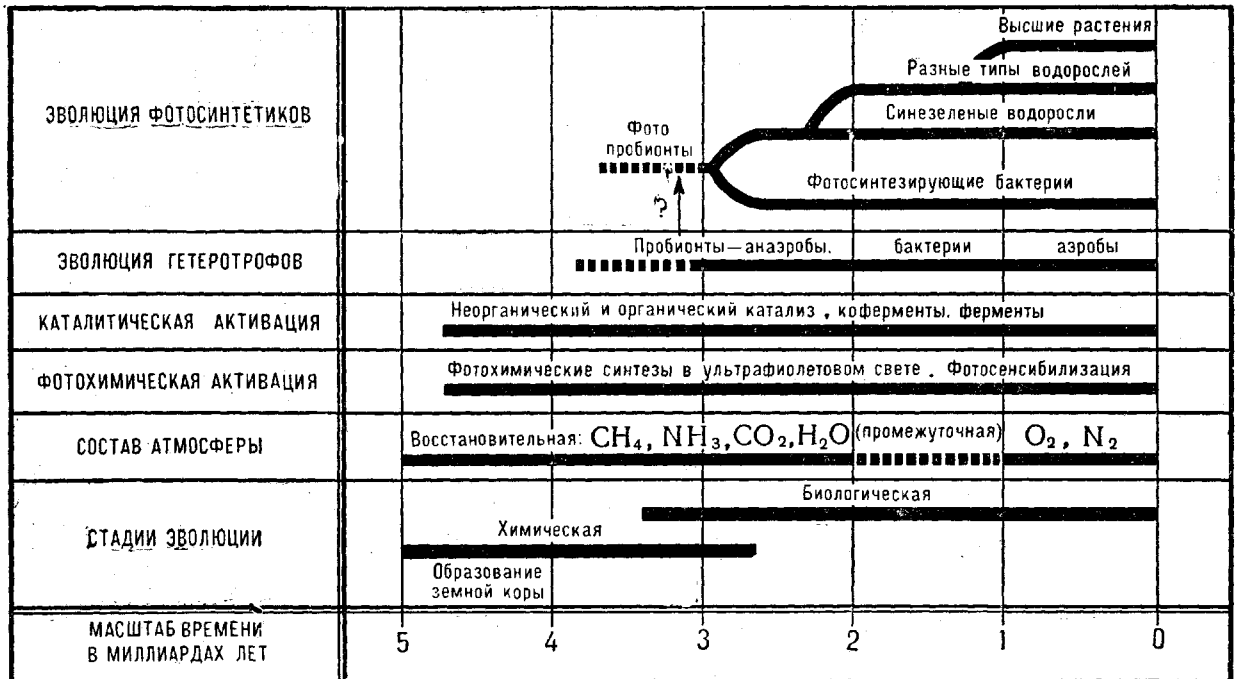


Рис. 2.

Прокомментируем эту схему, хотя нам и не удастся избежать повторений.

Итак, прежде всего показана возможность образования многообразных органических веществ при действии ультрафиолетового излучения на газовые смеси, имитирующие состав первичной атмосферы Земли. Таким образом, существовал богатый набор веществ, которые могли использоваться для формирования первичных катализаторов и фотосенсибилизаторов, а также доноров и акцепторов электрона.

В условиях обилия химически активных органических соединений, по-видимому, не было нужды в световой активации, и примитивные цепи переноса электрона у пробионтов могли работать с использованием первичных катализаторов, представляющих собой комплексные соединения органических молекул с неорганическими ионами. К числу таких катализаторов могли принадлежать железопорфирины. С другой стороны, могла происходить фотосенсибилизированная активация цепи переноса электрона с использованием свободных порфиринов или флавинов. Здесь могли быть более активными магниевые комплексы порфиринов, обладающие дополнительными координационными возможностями — связыванием аддендов перпендикулярно плоскости порфиринового кольца.

Вопрос о том, какой путь активации субстрата использовали первичные организмы, — световой или каталитический, остается открытым. Вероятно, существовали варианты того и другого пути активации первичной цепи переноса электрона. В соответствии с этим нужно указать на следующие возможности. Прежде всего — активирующее действие света на работу каталитической цепи переноса электрона. Эта возможность иллюстрируется экспериментами, в которых показана фотохимическая активность флавиновых коферментов и восстановленных пиридиннуклеотидов. При этом следует отметить, что каталитически активные железные комплексы — цитохромы фотохимически малоактивны. Таким образом, освещение могло активировать работу каталитической цепи переноса электрона, ускоряя термодинамически возможные реакции.

Следующая возможность заключалась в том, что вновь образованные порфирины использовались в каче-

стве фотокатализаторов, ускоряющих термодинамический самопроизвольный перенос электронов. Включение металлов привело к использованию наряду с этим каталитических путей активации и сопряжения фотохимических и каталитических стадий процесса.

Поскольку в первичном энергетическом обмене процессы переноса электрона, вероятно, были связаны с образованием богатых энергией фосфорных соединений, следует представить возможные пути такого сопряжения.

Вероятно, образование богатых энергией фосфорных эфиров было возможным в результате работы циклической или нециклической системы переноса электрона, так как это происходит у ныне существующих организмов. Образование полифосфатов или пирофосфатов удается также осуществить путем термических превращений ряда фосфорорганических соединений Гидролиз таких полифосфатов, вероятно, мог быть сопряжен с «обратным» переносом электрона.

Наконец, нужно отметить наши модельные эксперименты, в которых использовались доноры водорода, распространенные на первичной Земле — гидразин, глицин, ионы двухвалентного железа и т. д. Эти доноры электрона могут использоваться в системах, содержащих хлорофилл и порфирины, а также в системах с неорганическими сенсибилизаторами — двуокиси титана и окиси цинка.

Итак, мы приходим к заключению, что первичные организмы могли прибегнуть в равной мере к каталитической и фотохимической активности субстратов. По мере исчерпания готового органического вещества в первичном океане потребовалось использование более инертных доноров водорода, в конечном счете молекул воды.

В этом случае в обмене веществ первичных организмов фотохимическая реакция должна происходить с запасанием энергии света, т. е. против градиента термодинамического потенциала, как это имеет место при фотосинтезе растений.

Такие реакции принципиально невозможно осуществить каталитическим путем. Однако фотохимические реакции такого типа удается моделировать в простых системах. Например, в наших опытах совместно с Г. Н. Брин еще в 1949 г. наблюдалось фотовосстановле-

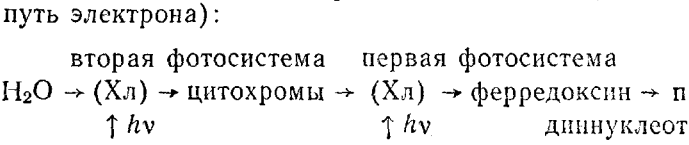
ние пиридиннуклеотидов аскорбиновой кислотой, идущей с некоторым запасанием энергии в продуктах реакции. К реакциям такого типа относятся неорганические модели реакции Хилла, о которых мы упоминали выше.

Первичные организмы, вероятно, уже обладали липопротеидной мембраной, а способность порфириновых пигментов встраиваться в мембрану потребовала включения в их молекулу жирного «хвоста». У хлорофилла это фитольная цепочка. Следует подчеркнуть, что этот «хвост» не влияет на фотохимические свойства пигмента, которые определяются главным образом порфириновым кольцом, обладающим сопряженной по кругу системой двойных связей. Вероятно, первичная цепь переноса электрона монтировалась в этих липопротеидных мембранах.

Первичный фотокаталитический блок представляет собой тройную систему: донор электрона — пигмент — акцептор электрона. Эта система весьма эффективно работает не только в моделях, но и в организмах, при этом возбужденная светом молекула пигмента играет роль переносчика электрона от молекулы-донора к молекуле-акцептору. Эта система хорошо моделирует так называемую «первую» фотосистему фотосинтеза.

Совершенствование цепи фотохимического и каталитического переноса электрона происходило путем различных сочетаний фотокаталитических блоков, расположенных в первичной мембране. Основываясь на известных данных об устройстве цепи переноса электрона наиболее древних фотосинтетиков — фотосинтезирующих бактерий, можно представить нециклический и циклический перенос электрона, сопряженный с фосфорилированием.

При использовании воды в качестве донора электрона потребовалось сочетание двух фотореакций для переноса электрона от воды к пиридиннуклеотидам, иначе говоря — сопряжение двух фотокаталитических блоков, ныне обозначаемых как фотосистемы 1 и 2 (стрелка — путь электрона):



Длинный путь химической и биологической эволюции от простых фотокаталитических реакций, текущих в неорганизованных системах, к хорошо организованным системам фотосинтетического переноса электрона, по-видимому, потребовал более 3 млрд. лет.

Возникновение фотосинтеза, использующего воду в качестве донора электрона с выделением кислорода в среду, привело к образованию кислородной атмосферы Земли и к лавинному развитию аэробной жизни в ее нынешней форме.

Изложенное здесь является наброском наиболее вероятной гипотезы о возникновении фотосинтеза. Лишь совместные усилия разных наук — астрономии, геологии, химии, физики, биологии и космических исследований позволят решить экспериментальную проблему возникновения фотосинтеза на Земле, тесно связанную с проблемой происхождения жизни.

Том XLIX | Труды Московского общества испытателей природы | 1973
Vol. XLIX | Transactions of the Moscow Society of Naturalists

ФОТОХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА

А. А. Красновский

Свет, поглощаемый хлорофиллом растений, используется для фотосинтеза, поэтому изучение световых превращений хлорофилла необходимо для понимания механизма элементарных процессов конверсии энергии света при фотосинтезе. Здесь будет дан краткий обзор результатов работы лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

Изучение фотохимических свойств пигментов в изолированных системах указывает лишь на возможные пути их участия в фотосинтезе, решающие же результаты должны быть получены при изучении световых процессов непосредственно в организмах. Усовершенствование физических методов исследования позволило за последние годы получить подобные данные.

СВОЙСТВА ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ

В согласии с общепринятыми представлениями, поглощение кванта света молекулой пигмента приводит к образованию синглетных возбужденных состояний, которые самопроизвольно переходят в триплетное долгоживущее, метастабильное состояние, способное к поглощению второго кванта света. Накопление возбужденных триплетных молекул возможно лишь при очень большой интенсивности света (при импульсном возбуждении в условиях флеш-фотолиза), и такой механизм суммирования энергии двух квантов света весьма маловероятен при фотосинтезе, идущем при малой интенсивности света.

Измерения Портера и Г. П. Гуриновича показали, что молекула хлорофилла *a* в растворе высвечивает в виде флуоресценции до 30% энергии. Квантовый выход образования триплетных состояний достигает 0,7 и предполагается, что безызлучательная деградация энергии идет с триплетного возбужденного уровня.

Совокупность наблюдений указывает на то, что световые превращения хлорофилла в растворах определяются главным образом превращениями пигмента в триплетном возбужденном состоянии и фотохимия хлорофилла в растворах может рассматриваться как химия триплетных возбужденных молекул.

Химики изучают свойства новых лабильных молекулярных образований, наблюдая типы их взаимодействий с другими молекулами. Тот же метод применим и в фотохимии. Отличие заключается в том, что при фотохимических реакциях образуются чрезвычайно активные соединения типа свободных радикалов; эти промежуточные продукты, несущие энергию кванта света, обладают малой длительностью жизни и их изучение требует особых методических приемов. Гораздо легче наблюдать более устойчивые продукты, которые обычно образуются из этих лабильных соединений. Поэтому

мы начнем с рассмотрения необратимых фотохимических реакций хлорофилла, при которых образуются достаточно устойчивые и долгоживущие фотопродукты.

Необратимое и обратимое фотоокисление. В фотосинтезирующих организмах распространены пигменты, различающиеся степенью восстановления «полуизолированных» двойных связей в молекуле пигмента: бактериохлорофилл — хлорофилл — протохлорофилл (хлорофилл *с*). С давних пор высказывалось предположение о механизме участия пигментов в фотосинтезе путем обратимых превращений в этом ряду. Однако это предположение было оставлено, так как быстрые обратимые превращения в этом ряду не наблюдались.

Рассмотрим окисление наиболее восстановленного пигмента — бактериохлорофилла. При реакции бактериохлорофилла со свежеобразованным раствором *о*-хинона (полученным при окислении раствора пирокатехина окисью серебра) уже в темноте образуется хлорофиллоподобный продукт. Опыты Н. Н. Дроздовой в нашей лаборатории показали, что освещение в максимуме поглощения бактериохлорофилла ведет к увеличению глубины реакции; в результате освещения красным светом области поглощения хлорофиллоподобного продукта происходит дальнейшее его окисление до протохлорофиллоподобного соединения, что иллюстрируется характерными изменениями спектра флуоресценции и поглощения. Существенно то, что образование этих устойчивых продуктов идет через стадию обратимого окисления с образованием неустойчивых промежуточных соединений.

Обратимое «одноэлектронное» фотоокисление хлорофилла и его аналогов легко наблюдать при освещении растворов пигментов в вязких спиртоглицериновых средах в присутствии акцепторов электрона (например, различных хинонов); при этом происходит обратимое фотоокисление пигмента, наблюдаемое у хлорофилла лишь при —70°, тогда как у бактериохлорофилла обратимое фотоокисление убихинонами удается наблюдать и при комнатной температуре. После выключения света и размораживания среды реакция идет в обратном направлении с регенерацией хлорофилла. Лабильный продукт фотоокисления бактериохлорофилла имеет максимум поглощения при 430 нм, а у хлорофилла *а* — при 470 нм. Существенно, что освещение синим светом в максимумах поглощения этих продуктов фотоокисления чрезвычайно ускоряет обратную реакцию с регенерацией исходного пигмента. Этим явлением объясняется тот парадоксальный эффект, что обратимое фотоокисление идет гораздо глубже под действием красного, чем синего света.

В. Б. Евстигнеев с сотрудниками показали, что в системе хлорофилл — *п*-хинон реакция идет глубже в кислых средах и потенциал инертного платинового электрода изменяется в положительную сторону, что соответствует образованию катион-радикала пигмента, обладающего электродной активностью. Электродный потенциал также быстрее затухает под действием синего света. Промежуточные продукты фотоокисления являются свободными радикалами, о чем говорят измерения ЭПР, осуществленные в работах Толлина с соавторами. Связано ли обратимое фотоокисление со степенью восстановления «полуизолированных» двойных связей в молекуле пигмента? Пока ясно лишь то, что наиболее восстановленные соединения окисляют легче как необратимо, так и обратимо.

Фотоокисление пигментов кислородом отличается от описанного «дву» и «одноэлектронного» окисления хинонами. В этом случае наряду с продуктами необратимого деструктивного окисления образуются лабильные соединения, из которых удается регенерировать пигмент действием восстановителей, что лучше всего наблюдается для бактериохлорофилла. После освещения растворов пигментов с кислородом наблюдается хемилюминесценция, изучение которой показало, что она определяется превращениями первично образующегося мольоксида пигмента. Так, в опытах А. А. Крас-

новского мл. и Ф. Ф. Литвина после освещения спиртового раствора хлорофилла при —196° и последующего размораживания можно было наблюдать ряд пиков хемилюминесценции, обусловленных превращениями лабильных продуктов фотоокисления пигмента.

Необратимое фотовосстановление. Аналогично изложенному выше, можно было бы ожидать последовательного фотовосстановления в ряду протохлорофилл — хлорофилл — бактериохлорофилл. Хорошо известно, что при освещении этиолированных листьев протохлорофиллид с высоким квантовым выходом превращается в хлорофилл. Однако в растворах протохлорофилла фотовосстановление аскорбиновой кислотой происходит с образованием промежуточного продукта с максимумом поглощения при 470 нм, и образование хлорофиллоподобного продукта (670 нм) идет с небольшим квантовым выходом. Недавно М. И. Быстрова и Ф. Ланг в нашей лаборатории выделили этот хлорофиллоподобный продукт и идентифицировали его путем тонкослойной хроматографии и спектральных измерений; продукт по свойствам близок к хлорофиллу *а*, и его выход в оптимальных условиях достигает 20% от исходного протохлорофилла. Существенно, что при фотовосстановлении хлорофилла образуются продукты, поглощающие в более короткой области (в том числе «красная» восстановленная форма), но не бактериохлорофилл.

В отличие от этого в ряду порфиринов при фотовосстановлении в кислой среде удается наблюдать образование хлорина и, вероятно, бактериохлорина с изомеризацией промежуточных восстановленных форм.

«Двухэлектронные» превращения такого рода более интересны при исследовании биосинтеза пигментов, но не их участия в переносе электрона при фотосинтезе. Здесь гораздо важнее обратимые «одноэлектронные» превращения пигментов.

Обратимое фотовосстановление. Эту реакцию нам удалось наблюдать у всех аналогов и производных хлорофилла, имеющих в центре молекулы водород, магний или цинк, в том числе и у бактериохлорофилла, обладающего полностью восстановленными полуизолированными связями. Обратимая реакция связана с восприятием электрона системой сопряженных двойных связей. Обратная реакция идет в темноте с регенерацией исходного пигмента или соответствующего феофитина.

Первичный процесс связан с образованием пары ион-радикалов, о чем говорят измерения ЭПР и инициирования полимеризации мономеров в системе пигмент — донор электрона. Реакция фотовосстановления связана с побочно идущим образованием феофитина. Изучение фотофеофитинизации в нашей лаборатории показало, что реакция связана с более легкой феофитинизацией промежуточных продуктов фотовосстановления.

Итак, за последние годы накопился обширный материал о способности взаимодействия возбужденных молекул пигментов с молекулами разных типов, что показано ниже.

Донор электрона при фотовосстановлении хлорофилла	Акцептор электрона при фотоокислении хлорофилла
Аскорбиновая кислота	Кислород
Диэнолы	Хиноны: *п*-бензохинон, убихиноны,
Сернистый натрий	пластохиноны
Восстановленные пиридиннуклеотиды	Нитросоединения
Гидрохинон	Соединения окисного железа
Соединения закисного железа	Виологены
Триптофан	

О фотохимической реакции судили, главным образом, путем спектральных измерений. При этом следует иметь в виду, что сравнительно медленные изменения являются индикатором быстрых изменений, регистрируемых с помощью импульсной спектроскопии.

Важен вопрос о потенциальных возможностях триплетных возбужденных состояний, который обычно пытаются решить, варьируя величину редокс-потенциала молекулы-партнера; пока не ясно, может ли, например, триплетная молекула хлорофилла воспринять электрон от молекулы воды (т. е. претерпеть обратимое фотовосстановление) и может ли фотоокисленная молекула пигмента воспринять электрон воды.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

Фотосенсибилизированный перенос электрона наблюдался в тройной системе: донор электрона — пигмент — акцептор электрона. При освещении в области поглощения пигмента происходит окисление донора электрона и восстановление акцептора. Эти реакции изучались в нашей лаборатории в органических растворителях, водных растворах детергентов, гомогенатах листьев и суспензиях хлоропластов. В качестве доноров и акцепторов электрона использовали вещества, перечисленные выше. Однако не все пары веществ пригодны для наблюдения реакции. Наиболее удобны для изучения необратимые процессы, в которых либо акцептор электрона восстанавливается необратимо (например, азокрасители, цитохромы), либо донор электрона необратимо окисляется, что, по-видимому, имеет место при использовании аскорбиновой кислоты.

Эти соображения относятся к реакциям, запасающим энергию света, т. е. идущим с увеличением свободной энергии. При термодинамически возможных «брутто» процессах, к которым относится сенсибилизированное окисление многих веществ молекулярным кислородом, образуются устойчивые продукты окисления; иначе говоря, первичные лабильные продукты окисления дисмутируют с образованием устойчивых соединений.

Так, например, в водных растворах детергента тритона Х-100 хлорофилл сенсибилизирует восстановление цитохромов в анаэробных условиях и фотоокисление в присутствии кислорода. Эта реакция ускоряется каталитическими добавками рибофлавина, действующего как промежуточная окислительно-восстановительная система.

При использовании в качестве донора электрона тиомочевины или цистеина в опытах Г. П. Брин и А. Н. Луганской наблюдалось фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена, что может служить моделью первой фотосистемы фотосинтеза с использованием виологена вместо ферредоксина.

Механизм изученных реакций не связан с переносом энергии от возбужденных синглетных или триплетных молекул пигмента-сенсибилизатора к донорам или акцепторам электрона, так как большинство молекул этих соединений, реагирующих при реакции, согласно известным данным, не обладает синглетными или триплетными уровнями, расположенными ниже, чем соответствующие уровни хлорофилла и его аналогов, что является необходимым условием переноса энергии по механизму Теренина — Ермолаева; этот механизм, вероятно, работает в случае ингибирования фотореакций хлорофилла каротином и тетраценом.

Опыты показывают, что элементарный механизм изученных реакций включает первичное «одноэлектронное» фотовосстановление или фотоокисление пигмента-сенсибилизатора, сопровождающееся темновой стадией взаимодействия между первичными фотопродуктами и донорами или акцепторами электрона. Доминирование данного типа реакции зависит от природы среды и свойств реагирующих соединений.

Наряду с этим механизмом сенсибилизации существует возможность участия в промежуточных реакциях активных продуктов, образующихся при сенсибилизированном фотоокислении некоторых доноров водорода. Так, в нашей лаборатории установлено, что при использовании тиомоче-

вины в качестве донора электрона сенсибилизированное восстановление метилвиологена, рибофлавина, сафранина и азокрасителей идет гораздо глубже в присутствии кислорода. Оказалось, что при фотоокислении тиомочевины образуются активные соединения, способные в «темноте» восстанавливать метилвиологен и другие красители и участвовать в фотовосстановлении хлорофилла в отсутствие другого акцептора электрона. Так, в водном растворе детергента в присутствии кислорода и тиомочевины удается наблюдать фотовосстановление хлорофилла с образованием «красной» формы.

При фотосенсибилизированном фотоокислении в присутствии кислорода конкурируют два элементарных процесса: фотовосстановление хлорофилла субстратом окисления и образование мольоксида при взаимодействии триплетного хлорофилла с кислородом. Об образовании и превращении этого мольоксида можно судить по хемилюминесценции, возникающей после освещения растворов хлорофилла в присутствии кислорода. Доноры электрона, в особенности тиомочевина, чрезвычайно активно тушат эту фотохемилюминесценцию хлорофилла, что свидетельствует об их взаимодействии с мольоксидом, тогда как тушение хемилюминесценции окислителями — акцепторами электрона связано с их преимущественным взаимодействием с возбужденным (триплетным) хлорофиллом. В тех растворителях, где фотохемилюминесценция хлорофилла мала, можно ожидать реакции растворителя с мольоксидом хлорофилла.

В отличие от хлорофилловых пигментов фикобилины обладают малым фотосенсибилизирующим действием, сильно возрастающим при денатурации теплом, мочевиной и др. Это согласуется с общепринятыми представлениями, что нативные фикобилины играют роль «антенны», передающей энергию возбужденному хлорофиллу.

Итак, механизм изученных модельных реакций фотохимического переноса водорода связан с обратимыми фотохимическими превращениями мономерных молекул пигмента-сенсибилизатора. Вопрос в том, какой механизм работает в живых организмах. Для решения этого вопроса нужно знать, в каком состоянии находятся пигменты в фотосинтезирующих организмах.

АГРЕГИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ПИГМЕНТОВ

Самосборка агрегированных форм пигментов в клетках. Состояние пигментов в организмах отличается от состояния их в растворе, где преобладают мономерные сольватированные молекулы пигментов. Обычно спектры поглощения и флуоресценции пигментов в клетках сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с их положением в растворах; это явление особенно выражено у бактериальных пигментов.

Много лет тому назад мы наблюдали, что пигменты в твердых пленках и коллоидных водных растворах обнаруживают те же типы агрегации, которые имеют место в живых клетках. Иначе говоря, при достижении высокой концентрации пигмента происходит самосборка агрегатов, молекулярная структура которых зависит от химической структуры пигмента и типа полярных молекул в среде.

Так, например, твердые пленки хлорофилла *а* (полученные при испарении эфирных растворов) имеют главный максимум поглощения при 680 нм, в парах воды появляется «плечо» при 705—715 нм, нагревание до 50° ведет к «переупаковке» с образованием кристаллической формы пигмента, поглощающей при 740—745 нм. Пары метанола, этанола, ацетальдегида и аммиака ведут к тому же эффекту при комнатной температуре, вероятно из-за связывания с центральными магниевыми атомами хлорофилла с образованием «мостиков» между молекулами в агрегате. Твердые пленки бак-

териохлорофилла обычно обладают двумя максимумами поглощения при 800 и 860 нм; в парах воды, спиртов, ацетальдегида, содержащих эфир, появляется длинноволновой максимум при 900—920 нм.

Пленки бактериовиридина дают тот же длинноволновой сдвиг, что и пигмент в зеленых бактериях (760 нм), тогда как растворенный пигмент поглощает при 665 нм, как и хлорофилл *а*. Более короткий фарнезоловый «хвост» молекулы бактериовиридина по сравнению с фитолом хлорофилла облегчает агрегацию. Подобные эффекты наблюдаются и при измерении низкотемпературных спектров флуоресценции агрегированных пигментов. Изучение тонкой структуры спектров поглощения и люминесценции агрегированных пигментов в клетках и в твердых пленках пигментов указывает на их чрезвычайное сходство.

Таким образом, химическая структура молекулы пигмента и наличие низкомолекулярных аддендов определяют способ самосборки агрегированных форм пигментов в хлоропластах и хроматофорах.

Агрегированные формы пигментов образуются в клетках по мере биосинтеза пигментов. Так, постепенный переход от мономерных к агрегированным формам хлорофилла наблюдается в процессе биосинтеза хлорофилла при освещении этиолированных листьев; этот вопрос изучен в цикле работ нашей лаборатории. Возникает вопрос, в чем специфика действия света на агрегированные формы пигментов.

Фотодезагрегация. Энергия взаимодействия между молекулами в агрегированных формах не превышает 10 кал, поэтому в процессе деградации энергии возбуждения (не менее 40 кал) фотодезагрегация вполне возможна. Мы предположили, что деструктивное выцветание (фотоокисление) агрегированных форм пигментов в хлоропластах идет путем промежуточной дезагрегации. Это явление удалось наблюдать наиболее отчетливо при освещении дефицитных по хлорофиллу листьев мутантов кукурузы в работах Ф. Ланга и Л. М. Воробьевой в нашей лаборатории. Освещение листьев в вакууме приводит к сильному увеличению флуоресценции; при поступлении воздуха происходит быстрое падение флуоресценции вследствие выцветания мономерной формы хлорофилла. Чтобы наблюдать дезагрегацию, следует тщательно избегать кислорода, быстро взаимодействующего с мономерными формами хлорофилла. Явление фотодезагрегации удалось наблюдать и при освещении агрегированных форм феофитина в присутствии кислорода.

Фотосенсибилизация. Более двадцати лет тому назад в нашей работе с Г. П. Брин обнаружено фотосенсибилизирующее действие кристаллических фталоцианинов. Фотосенсибилизирующее действие агрегированных форм наиболее удобно наблюдать для необратимых реакций, таких, как фотовосстановление азокрасителя аскорбиновой кислотой или восстановление цитохромов. В коллоидных водных растворах хлорофилла и бактериовиридина удается найти условия преимущественного образования двух типов агрегированных форм с максимумами поглощения при 680 и 740 нм. Измерение квантового выхода фотовосстановления метилового красного показало одинаковую эффективность обеих форм. Аналогичные результаты получены с коллоидами бактериовиридина. Однако квантовый выход сенсибилизации мономерными формами пигментов в растворе гораздо выше.

Элементарные фотопроцессы в агрегированных формах. Уже давно в опытах А. Н. Теренина и Нельсона была обнаружена фотопроводимость твердых пленок хлорофилла. Ф. Ф. Литвин и В. В. Звалинский, изучая квантовый выход фотопроводимости твердых пленок хлорофилла и его аналогов, нашли, что квантовый выход у длинноволновых квазикристаллических форм пигментов выше, чем у коротковолновых; те же закономерности наблюдались в пленках хлоропластов и хроматофоров бактерий. Изучая фотоэффект на границе твердая пленка

пигмента — раствор, В. Б. Евстигнеев и А. Н. Теренин нашли, что знак фотопотенциала зависит от природы веществ, находящихся в растворе. Механизм действия агрегированных форм можно представить аналогичным действию неорганических полупроводников: восприятие электрона молекулой-акцептором на фазовой границе, уравновешенное отдачей электрона молекулой-донором в «дырку», также мигрирующую к фазовой границе. Этот элементарный механизм осложняется явлением миграции энергии от коротковолновых к длинноволновым формам. Таким образом, при работе этого механизма происходит обмен электрона, и трудно ожидать образования более устойчивых фотопродуктов на фазовых границах, как это имеет место в реакциях, идущих в растворе.

Следовало, однако, изучить раздельные реакции агрегированных пигментов с донорами и акцепторами электрона в твердых пленках и коллоидных растворах пигментов. При этом, однако, следовало учесть то, что в этом случае возможна фотодезагрегация и реакция молекулы-партнера с мономерным пигментом.

Твердые пленки пигментов обладают весьма слабой флуоресценцией при комнатной температуре, тогда как замораживание до температуры жидкого азота ведет к большому усилению длинноволновой флуоресценции агрегированных форм. В работе с М. И. Быстровой показано, что в вакууме твердые пленки обладают люминесценцией при комнатной температуре, а поступление воздуха (кислорода) приводит к тушению этого длинноволнового свечения. Однако это тушение наблюдается под лучом света, возбуждающим флуоресценцию, и происходит в течение нескольких секунд, являясь, таким образом, не «физическим» тушением, а фотохимической реакцией с кислородом. Существенно то, что активнее реагируют с кислородом более длинноволновые формы пигментов, построенные, вероятно, наиболее рыхло. В связи с этим следует указать на то, что А. Н. Теренин и В. Е. Холмогоров наблюдали сигнал ЭПР в твердых пленках пигментов в присутствии воды и кислорода.

В водных коллоидных растворах пигментов удается наблюдать фотовосстановление аскорбатом лучше всего в присутствии детергентов, но и здесь могут работать мономерные формы пигментов, находящиеся в растворе или образованные при фотодезагрегации.

Итак, изложенные нами данные показывают, что мономерные и агрегированные формы пигментов после светового возбуждения способны к обратимому окислению-восстановлению и сенсибилизации окислительно-восстановительных реакций, моделирующих фрагменты цепи фотосинтетического переноса электрона.

Возникает вопрос, в какой степени эти свойства пигментов определяют их действие при фотосинтезе.

Исследования фотохимических превращений пигментов непосредственно в живых организмах методами дифференциальной и импульсной спектроскопии обнаружили спектральные изменения, которые обычно приписываются триплетным состояниям, окислительно-восстановительным и кислотно-основным превращениям, связанным с переносом электрона и протона. Предполагается, что этим превращениям подвергаются наиболее длинноволновые пигментные агрегаты, связанные с белками и липоидами в активном центре, и эти превращения сопряжены с редокс-превращениями ближайшего биокаталитического звена в цепи фотосинтетического переноса электрона — цитохромов, хинонов и др. Эти представления достаточно хорошо согласуются с результатами исследования свойств пигментов в изолированных системах.

Более подробное изложение рассмотренных вопросов можно найти в обзорах в представленном списке литературы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А.* 1965. Преобразование энергии света в цепи фотосинтетического переноса электрона. — В сб. «Биохимия и биофизика фотосинтеза». М., «Наука», стр. 26.
2. *Красновский А. А.* 1966. Фотохимия хлорофилла и его аналогов. — В сб. «Элементарные фотопроцессы в молекулах». М — Л., «Наука», стр. 213.
3. *Красновский А. А.* 1970. Фотохимия хлорофилла и молекулярная организация пигментной системы организмов. — В сб. «Функциональная биохимия клеточных структур». М., «Наука», стр. 15.
4. *Евстигнеев В. Б.* 1966. Исследование фотосенсибилизации окислительно-восстановительных реакций хлорофиллом и его аналогами электрометрическими методами. — В сб. «Элементарные фотопроцессы в молекулах». М. — Л., «Наука», стр. 243.
5. *Krasnovsky A. A.* 1969. The principles of light energy conversion in photosynthesis: photochemistry of chlorophyll and the state of pigments in organisms. Progress in Photosynthesis Research, 11, 709, Ed. H. Metzner, Tübingen.

THE PHOTOCHEMISTRY OF CHLOROPHYLL

A. A. Krasnovsky

Summary

Excited molecules of chlorophyll, bacteriochlorophyll, bacterioviridin and their analogues are capable to reversible interaction with electron donors and electron acceptors. In the process a pair of ion-radicals are primarily formed, and more stable products differ in the number of accepted or donated electrons and protons. The photoreaction of pigments in the presence of oxygen is accompanied by chemiluminescence. In the triple system: electron donor—chlorophyll—electron acceptor illumination in the region of pigment absorption leads to sensibilized electron (hydrogen) transport from donor to acceptor. In the elementary photoact of the reaction a primary interaction is possible between chlorophyll and the electron donor or electron acceptor with subsequent dark stages leading to the ultimate regeneration of the pigment molecule. In photosynthetizing organisms chlorophyll and its analogues are present mainly in aggregated forms bound with the proteins and lipoids of membranes. These forms are photochemically active and are able to photofer desaggregation and photobleaching in the presence of oxygen. The reversible conversions of pigments in the active centre are associated with their participation in the photosynthetic electron transer chain.

International Union for Pure and Applied Biophysics

Международный Союз Теоретической и Прикладной Биофизики

Academy of Sciences of the USSR

Академия Наук СССР

INTERNATIONAL BIOPHYSICS CONGRESS

IV

МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ КОНГРЕСС

SYMPOSIAL PAPERS

ДОКЛАДЫ СИМПОЗИУМОВ

PUSHCHINO
ПУШИНО

1973

ФОТОХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА

А.А. Красновский

(Вступительное слово к заседанию I)

Институт биологической химии им.Баха АН СССР, Москва, СССР

При фотосинтезе происходит преобразование энергии квантов света в потенциальную химическую энергию конечных продуктов фотосинтеза - органических соединений и кислорода.

В цепи реакций, составляющих процесс фотосинтеза, образуется целый ряд промежуточных активных продуктов, обладающих длительностью жизни от 10^{-8} сек. до нескольких секунд.

Уже давно высказывались предположения, что первичные продукты фотосинтеза, запасающие энергию света, являются свободными радикалами. Задача заключается в том,чтобы экспериментально обнаружить эти нестойкие соединения и показать их участие в цепи реакций фотосинтеза.

Исследования проводились во встречных направлениях: с одной стороны,изучались продукты фотохимических превращений хлорофилла - фоторецептора, поглощающего кванты света, с другой стороны,изучалось образование светоиндуцированных свободных радикалов непосредственно в живых организмах.

Мне хотелось бы очень коротко резюмировать те знания, которые накопились в настоящее время в исследовании этой проблемы.

При поглощении кванта света молекула хлорофилла переходит в синглетное возбужденное состояние, которое в растворе живет около 10^{-8} сек; синглетное возбужденное состояние спонтанно переходит в триплетное состояние, которое по существу является бирадикалом, обладая двумя неспаренными электронами.

Около 30 лет тому назад А.Н.Теренин в СССР и Дж.Льюис в США указали на особое значение триплетных состояний фотохимии вследствие их высокой реакционной способности как бирадикалов.

В настоящее время образование триплетных состояний хлорофилла в растворах изучено методом электронного парамагнитного резонанса, а также путем измерений фосфоресценции и замедленной флуоресценции хлорофилла и его аналогов. Измерениями флеш-фотолиза обнаружен высокий квантовый выход триплетных состояний хлорофилла.

Возбужденные молекулы хлорофилла и его аналогов обладают способностью воспринимать электрон от молекулы донора или отдавать электрон молекуле акцептора. При этом образуются пара ион-радикалы. Этому были посвящены работы нашей

лаборатории.

При освещении этих систем непосредственно в резонаторе радиоспектрометра вначале были обнаружены продукты восстановления акцептора электрона - семихиноны или продукты окисления донора электрона - дегидроаскорбиновая кислота.

Впоследствии в ряде лабораторий удалось обнаружить сигналы радикальных форм пигмента, и этому вопросу посвящен ряд докладов на сегодняшнем заседании.

Радикальные продукты, по-видимому, участвуют в процессе переноса электронов, то есть в механизме фотосенсибилизации. Следует указать на то, что в фотосинтезирующих организмах доминируют агрегированные формы пигментов, освещение которых приводит к появлению сигналов ЭПР. Таким образом, действие света на пигменты в модельных системах приводит к появлению неспаренных электронов.

Возникает вопрос, можно ли обнаружить подобные продукты при освещении живых фотосинтезирующих клеток. В этом случае картина является гораздо более сложной, так как наряду с продуктами превращения пигментов образуется целый ряд промежуточных продуктов, входящих в энзиматические стадии реакций.

Сложная структура сигналов ЭПР при освещении живых клеток была обнаружена в ряде лабораторий; применение низких температур позволило изолировать радикальные образования в первичном фотопроцессе, однако их природа, или,вернее, природа молекулы, несущей неспаренный электрон, является предметом дискуссии.

Сравнение спектра ЭПР бактериохлорофилла в растворе и в клетках фотосинтезирующих бактерий указывает на большую вероятность того, что первично образуется продукт фотоокисления бактериохлорофилла.

Одним из путей выяснения природы сигнала в клетках является разделение I и II фотосистем и раздельное исследование спектра ЭПР каждой из этих фракций в более простых системах. Этому вопросу посвящены доклады на данном симпозиуме.

Резюмируя известный экспериментальный материал, мы убеждаемся, что при действии света на фотосинтезирующие организмы и их пигментные системы действительно образуются свободные радикалы. Задача состоит в том, чтобы выяснить их природу и с большей определенностью показать их участие в процессе фотосинтеза.

Эти положения можно кратко резюмировать следующим образом:

Гипотеза - Конверсия кванта света при фотосинтезе идет путем промежуточного образования свободных радикалов.

Опыты - Долгоживущий возбужденный хлорофилл-бирадикал (триплетное состояние); фотохимические редокс реакции хлорофилла ведут к образованию пары ион-радикалов; при освещении клеток фотосинтезирующих организмов наблюдается появление сигналов ЭПР.

Проблемы - Какие молекулы несут неспаренный электрон? Участвуют ли они действительно в фотосинтетическом переносе электрона?

Я надеюсь, что в результате работы нашего Симпозиума будет внесена значительная ясность в решение этой проблемы. Желаю успехов всем участникам этого собрания. Благодарю за внимание.

PHOTOCHEMISTRY OF CHLOROPHYLL

A.A.Krasnovsky

(Introductory Speech to Session I)

Bakh Institute of Biological Chemistry, Acad.Sci. USSR,
Moscow, USSR

On the photosynthesis the conversion of light energy into potential chemical energy of final products, organic compounds and molecular oxygen occurs. In the chain of reactions comprising the photosynthesis a number of active intermediates are formed having lifetime from 10^{-9}sec up to a few seconds.

It has long been proposed that products storing light energy are free radicals. The problem is to find out experimentally these unstable compounds and demonstrate their participation in the chain of photosynthetic reactions.

The investigations were conducted in both directions. On the one hand, primary products of photochemical conversions of chlorophyll, the photoreceptor absorbing light quanta were studied, on the other hand, light-induced unpaired electrons immediately in living organisms.

I would like to resume shortly the knowledge accumulated nowadays in the investigation of this problem.

The chlorophyll molecule absorbing light quantum is converted into a singlet excited state which lives in solution for about 10^{-9}sec. The singlet excited state changes spontaneously to a metastable triplet excited one which is essentially a free biradical possessing two unpaired electrons. About 40 years ago G.N.Terenin in the USSR and G.N.Lewis in the USA demonstrated a peculiar role of triplet states in photochemistry due to their high chemical activity as biradicals.

The formation of triplet states of chlorophyll is currently studied by the ESR method as well as by measuring the phosphorescence and delayed fluorescence of chlorophyll and its analogs. Using the flash-photolysis a high quantum yield of chlorophyll triplet states.

Excited molecules of chlorophyll and its analogs are capable of accepting the electron from the donor molecule or donating the electron to the acceptor molecule. These types of reactions have been extensively studied in our laboratory for many years. An ion-radical pair is formed in the primary reaction. After illumination of reacting systems immediately in the resonator of the radiospectrometer there were revealed first the products of reduction of electron acceptor, semiquinones, or products of oxida-

tion of electron donor, monodehydroascorbic acid.

Afterwards in some laboratories singlet signals of pigment radicals were revealed and this will be discussed today.

Radical products are presumably involved into the process of electron transfer, i.e. in the mechanism of photosensitization. It should be noted that in photosynthetic organisms aggregated forms of pigments dominate whose illumination in the presence of oxidants leads to the appearance of ESR singlet signals. Thus, the illumination of pigments in different model systems causes the appearance of unpaired electrons.

The question arises whether it is possible to reveal such products by illumination of living photosynthesizing cells. In this case the picture appeared to be more complicated as along with products of pigment transformations, a number of intermediates are formed participating in enzymatic stages of the overall process.

The complicated structure of ESP signals after illumination of living cells was studied in many laboratories. The use of low temperatures facilitated isolation of primary radicals but their chemical nature or rather the nature of the molecule carrying the unpaired electron is a subject of discussion until now.

The comparison of photoreactions of bacteriochlorophyll and photosynthetic bacteria cells points to a possibility that primarily a product of bacteriochlorophyll photooxidation is formed.

One of possible ways to investigate the nature of ESR signals in cells is to resolve the organized photosynthetic electron transfer chain into fragments - I and II photosystems and to study photochemically active fractions in more simple systems; this question will be discussed today.

Resuming the known experimental data we conclude that the action of light on photosynthetic organisms and their pigment systems does give rise to free radicals. The problem is to clear up their nature and to demonstrate convincingly their participation in the process of photosynthesis.

These prepositions may be resumed shortly as follows:
Hypothesis: The conversion of light quantum occurs through intermediate formation of free radicals.
Experiments: Long-lived excited chlorophyll-biradical (triplet state); photochemical redox reactions of chlorophyll give rise to a pair of ion-radicals; after illuminating the cells of photosynthesizing organisms the ESR signal is observed.
Problems: What molecules carry the unpaired electron? Do they really participate in the photosynthetic electron transfer?

I am sure that the work of our Symposium will greatly contribute to the elucidation of the problem. I wish every success to all the participants.

ЭКЗОБИОЛОГИЯ

EXOBIOLOGY

Ed. by C. Ponnamperuma

Amsterdam — London, North-Holland, 1972, 485 p.

Рецензируемая книга представляет собой сборник обзорных статей, написанных крупными специалистами.

Сборник открывается статьей А. И. Опарина «Появление жизни во вселенной». В статье рассматриваются условия абиогенного образования углеводородов и других органических соединений на первичной Земле, образования полимерных соединений из мономеров, появление коацерватов как открытых систем и пути эволюции пробионтов к первичным организмам.

Для того чтобы получить экспериментальные данные о ранее существовавших формах жизни, важны геологические исследования. В статье J. W. Schopf разбирается палеобиология докембрия. Описаны сохранившиеся ископаемые микроструктуры и результаты химического анализа органических включений в древних породах, в которых обнаружены углеводороды, изопреноиды, жирные кислоты, аминокислоты, сахароподобные соединения и порфирины. Наличие изопреноидов и порфиринов указывает на то, что фотосинтезирующие организмы могли существовать $3 \cdot 10^6$ лет назад. Об этом свидетельствует также отношение содержания изотопов углерода C_{13}/C_{12} в древних органических соединениях.

В статье P. C. Sylvester-Bradley «Геология ювенильного углерода» рассматривается история углерода при образовании планет и в разные геологические периоды их формирования.

В вышеприведенных обзорах резюмируется экспериментальный материал, который, однако, не содержит прямых данных о путях химической эволюции. Поэтому приходится обращаться к модельным экспериментам в условиях, имитирующих обстановку на первичной Земле.

В статье N. W. Gabel и C. Ponnamperuma «Первичная органическая химия» дан обзор модельных абиогенных синтезов в системах, имитирующих состав первичной атмосферы Земли. Обсуждаются действие короткого ультрафиолета и электрических разрядов на простые молекулы первичной атмосферы (метан, азот, аммиак, вода) и возможность синтеза сложных органических молекул: аминокислот, пуринов и пиримидинов, углеводородов, нуклеозидов и нуклеотидов, полипептидов, фосфорных эфиров и порфиринов.

В статье B. Pullmann «Электронные факторы биохимической эволюции» говорится о влиянии электронной структуры на отбор молекул в процессе биохимической эволюции. Особое внимание уделяется отбору молекул, обладающих системой сопря-

женных двойных связей. Рассматриваются термодинамическая, радиационная и фотохимическая устойчивость этих молекул, условия внутри- и межмолекулярных превращений и связь этих свойств с условиями мутагенеза.

W. A. Bonner сообщает о возможных путях возникновения молекулярной асимметрии в небиологических условиях, т. е. в процессе химической эволюции и в связи с проблемой возникновения жизни.

Статья D. O. Shah посвящена проблеме происхождения мембран и связанных с этим поверхностных явлений. Разбираются современные представления о молекулярной структуре мембран и монослоев липидов на поверхности воды, образовании мицелл и добиологических мембранных систем, в том числе коацерватов.

Обзор M. O. Dayhoff касается эволюции белков. Сопоставление последовательности аминокислот в белках древних и ныне существующих организмов может служить для филогенетических построений. Автор предлагает филогенетические схемы, основанные на результатах анализа последовательности аминокислот в молекулах цитохрома с и ферредоксина.

В статье C. B. Woese «Появление генетической организации» обсуждаются возможные пути эволюции структуры макромолекул и механизмов трансляции. Часть I сборника завершается статьей L. Margulis, в которой излагаются вопросы начальной эволюции клетки.

Часть II сборника посвящена вопросам внеземной жизни. Эта часть открывается статьей S. J. Rasool «Атмосфера планет». Рассматривается возможность захвата газов при их образовании гравитационным полем планет, главным образом водорода и гелия, и в малых количествах водяных паров, неона, метана и аммиака. В процессе геологического развития происходила потеря легких газов — водорода и гелия, а кислород мог образоваться за счет фотолиза воды. В атмосфере Марса и Венеры преобладает углекислый газ, а в атмосфере Юпитера — метан, аммиак, вода, водород и гелий. Возможность образования углекислоты и азота при фотоокислении метана и аммиака кислородом пока не выяснена. Так, аммиак, поглощая короткий ультрафиолет, мог препятствовать фотолизу паров воды.

В статье C. Chang и K. Kvenvolden сообщается о распространении углеродных соединений Луны по данным анализа проб «Аполлон-11». Авторы отмечают, что органических соединений на Луне достоверно не обнаружено.

В статье B. Donn «Органические молекулы в космосе» рассматриваются органические вещества в кометах, в межзвездном пространстве, указывается на обнаружение ряда свободных радикалов неорганических и органических молекул.

В статье H. P. Klein «Возможные цели в поисках внеземной жизни» описываются преимущественно планеты солнечной си-

стемы; в статье K. Sagan «Жизнь вне солнечной системы» обсуждается возможность возникновения жизни в Галактике. В качестве приложения приводится программа Первой всесоюзной конференции по «Внеземной цивилизации и межзвездным сообщениям» (Бюрокан, 20—24 мая, 1964 г.) и оглавление выпущенного в СССР сборника «Внеземные цивилизации — проблема межзвездных контактов» (1969 г.).

В заключение следует отметить, что статьи, составляющие сборник, отражают все возрастающий интерес к исследованию проблемы происхождения жизни на Земле и во Вселенной. Новые экспериментальные данные, содержащиеся в докладах, бесспорно будут интересны для широкого круга исследователей разных специальностей.

Книга имеется
во ВГБИЛ

Чл.-корр. АН СССР
А. А. Красновский

Доклады Академии наук СССР
1973. Том 211, № 4

УДК 577.31

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. М. БОКУЧАВА, Н. Н. ДРОЗДОВА

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

Новый бактериальный хлорофилл был открыт Аймеллен и Йенсен ([1], [2]) в группе пурпурных несерных бактерий и назван бактериохлорофиллом b. Химическая структура его неизвестна ([3]).

В настоящей работе описаны результаты исследования фотохимических превращений бактериохлорофилла b в сравнении с изученными ранее в нашей лаборатории фотохимическими свойствами бактериохлорофилла a.

Использовали штамм Rhodopseudomonas viridis, любезно предоставленный нам проф. Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской (кафедра микробиологии Московского университета). Условия выращивания культуры соответствовали описанным ранее ([1]); клетки собирали центрифугированием и выделяли пигмент по методике, принятой для получения бактериохлорофилла a и видоизмененной с учетом большой лабильности нового пигмента. Экстракцию пигмента из клеток бактерий проводили при 0° метанолом, содержащим незначительное количество сернистого натрия (при сохранении pH 7). Все процедуры по выделению и хроматографию проводили при затемнении и по возможности быстро. Освещение растворов производили красным светом киноламы 300 вт через конденсор и светофильтр КС-19, пропускающий свет длиннее 700 мμ. Максимальная интенсивность света в опытах 10^5 эрг/(см^2·сек). Источником синего света служил осветитель ОИ-18 (линии возбуждения ртутной лампы 404 и 436 мμ) с фильтрами ФС-1, БС-8 и СЗС-7. Спектры поглощения регистрировали на модифицированном спектрофотометре СФ-14, чувствительном в близкой инфракрасной области (до 900 мμ). Измерение окислительно-восстановительного потенциала при фотореакции наблюдали по методике, принятой в нашей лаборатории.

При фотоокислении бактериохлорофилла b кислородом воздуха в спирте, толуоле и ацетоне при 20 и — 70° наблюдались следующие спектральные изменения: за 25—30 сек. освещения происходило уменьшение поглощения в области главного максимума пигмента и появление новых полос поглощения в области 440, 500—600 и 680 мμ. При добавлении в темноте аскорбиновой кислоты происходила регенерация исходного бактериохлорофилла (до 30—40%). Реакция с бактериохлорофиллом a в тех же условиях идет в 2—3 раза медленнее с образованием продуктов, поглощающих при 430, 550—700 мμ. Регенерация исходного пигмента аскорбиновой кислотой в этом случае более полная (до 80%); не удается наблюдать образования хлорофиллоподобного продукта, с максимумом поглощения при 680 мμ, с чем, очевидно, и связана большая обратимость реакции. В этих опытах была обнаружена, наряду с продуктами обратимого окисления, значительная склонность бактериохлорофилла b к быстрому необратимому фотоокислению с образованием устойчивого продукта «680»: это свойство характерно лишь для бактериохлорофилла b.

Исследование взаимодействия бактериохлорофилла *b* с *о*-хиноном показало, что пигмент обладает значительно большей реакционной способ-

ностью, чем бактериохлорофилл a в тех же условиях. Окисление проводили по описанной ранее методике ([4], [5]). В ацетоне при 20° наблюдали световое (25—30 сек.) окисление бактериохлорофилла b, которое проявлялось в полном исчезновении главного максимума пигмента (795 мμ) и появлении новых полос поглощения при 440 и 680 мμ. При этом весь бактериохлорофилл b превращался в хлорофиллоподобное соединение (рис. 1). При использовании толуола в качестве растворителя и концентраций *о*-хинона от 10^{-3} до 10^{-5} *М* происходило мгновенное окисление пигмента в темноте с образованием соединения типа хлорофилла («680»), обладающего интенсивной флуоресценцией при 695мμ. Других новых максимумов ни в спектрах поглощения, ни флуоресценции обнаружено не было. Образование зеленого окисленного продукта бактериохлорофилла a наблюдали в нашей лаборатории под действием *п*- и *о*-хинонов ([6], [7]). Несмотря на спектральное сходство этих промежуточных соединений, продукт окисления бактериохлорофилла b очень устойчив и не подвергается дальнейшему изменению, в то время как при фотоокислении бактериохлорофилла a мы отмечали ступенчатый механизм реакции, ведущей к появлению соединения типа протохлорофилла ([6]).

п-Хинон при освещении красным светом также окислял бактериохлорофилл b в ацетоне при 20° в течение 30 сек. до хлорофиллоподобного продукта, в то время как с бактериохлорофиллом a эта же реакция наблюдалась при длительном освещении (25—30 мин.) и окисление было неполным. Так как скорость окисления бактериохлорофилла b неизмеримо выше, чем бактериохлорофилла a, на рис. 1*Б* масштаб времени дан в логарифмическом выражении.

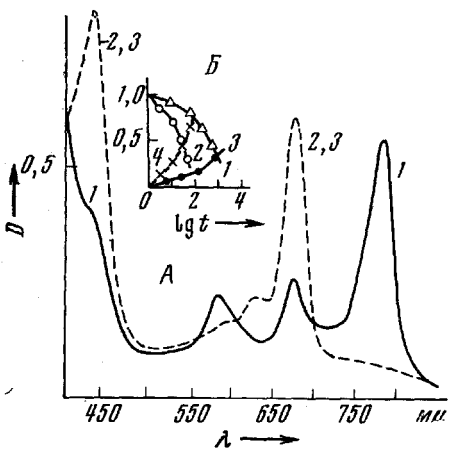


Рис. 1. *А* — необратимое фотохимическое окисление бактериохлорофилла b *о*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*) в ацетоне при 20°: *1* — исходный спектр, *2* — после освещения в течение 30 сек., *3* — после стояния в темноте; *Б* — скорость фотоокисления бактериохлорофиллов a и b *п*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*) в ацетоне при 20°. Изменение оптической плотности при 770 и 795 мμ и при 680 мμ. Бактериохлорофилл a (*1*); бактериохлорофилл b (*2*); хлорофиллоподобный продукт, образующийся при фотоокислении бактериохлорфилла a (*3*) и бактериохлорофилла b (*4*)

Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла b удалось наблюдать при реакции пигмента с *п*-хиноном в смеси этилового спирта и глицерина при их объемном соотношении 2,5 : 1,5 при — 70°. Взаимодействие между пигментом и окислителем наблюдалось под действием света и сопровождалось падением главного максимума бактериохлорофилла b и появлением окисленной формы пигмента в области 450 мμ. Обратная реакция шла медленно в темноте, но значительно ускорялась под действием синего света (рис. 2), который, вероятно, активировал первичные фотопродукты, поглощающие в синей области спектра. Обратимые изменения окислительно-восстановительного фотопотенциала, полученные в системе бактерихлорофилл b — убихинон (Q_0) в вязкой спирто-глицериновой среде при 20°, представлены на рис. 3. Появление положительного потенциала свидетельствовало об образовании окисленной формы пигмента, взаимодействующей с электродом. При выключении света наблюдалась обратная реакция. Величина ΔE при повторном освещении системы постепенно умень-

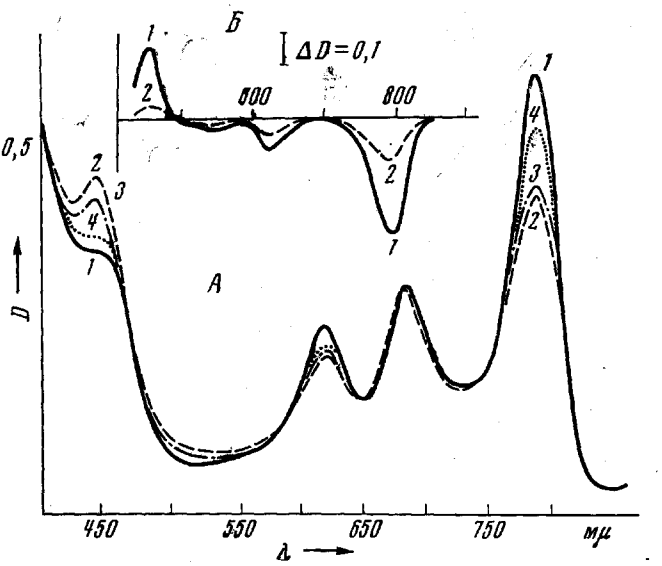


Рис. 2. Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла b *n*-бензохиноном (10^{-4} *M*) при —70° в спирто-глицериновой среде. *А*: *1* — исходный спектр, *2* — после освещения красным светом в течение 3 мин., *3* — после стояния в темноте при —70° в течение 10 мин., *4* — после освещения синим светом в течение 2 мин.; *Б* — дифференциальные спектры *1* (*2*—*1*), *2* (*4*, *1*)

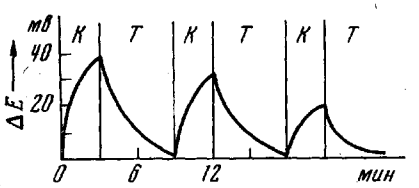


Рис. 3

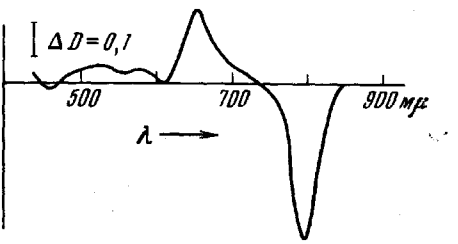


Рис. 4

Рис. 3. Изменение фотопотенциала в системе: бактериохлорофилл b — убихинон при освещении красным светом (бактериохлорофилл b (10^{-5} *M*), убихинон (10^{-3} *M*), спирт: глицерин 2,5 / 1,5). *к* — красный свет, *т* — темнота

Рис. 4. Дифференциальный спектр свет — темнота при фотовосстановлении бактериохлорофилла b сернистым натрием (2 мг) в пиридине в присутствии 2—3% воды при 20°

шалась, так как, наряду с обратимым фотоокислением и образованием лабильной формы пигмента происходило и необратимое образование хлорофиллоподобного продукта «680». По мере того как изменение фотопотенциала системы уменьшалось, происходило накопление устойчивого продукта необратимого окисления «680», который, в свою очередь, обнаружил способность к обратимому взаимодействию с окислителем. Этот продукт мало активен при взаимодействии с убихиноном, и поэтому в качестве акцептора электрона при окислении этого соединения пришлось использовать *n*-хинон, обладающий большей величиной окислительно-восстановительного потенциала. В работах нашей лаборатории ([7–9]) было показано, что бактериохлорофилл a обратимо взаимодействует с акцепторами электрона; при этом осуществлялся «одноэлектронный» процесс, сопровождающийся появлением лабильной окисленной формы пигмента «430». Таким образом, фотопотенциометрические исследования подтвердили ре-

зультаты спектральных изменений бактериохлорофилла b при взаимодействии с акцепторами электрона.

Представляло интерес также исследовать возможность взаимодействия бактериохлорофилла b с донорами электрона. Мы использовали в качестве донора электрона сернистый натрий по методике, описанной ранее ([10]). Реакцию проводили в вакууме, растворителем служил пиридин. Освещение системы красным светом в течение 1—2 мин. вызывало значительное уменьшение главного максимума и появление фотовосстановленной формы пигмента с максимумом поглощения при 660 мμ. Образование этого продукта восстановления сопровождалось незначительным увеличением поглощения в области 440, 490—590 мμ. При обратной реакции в темноте мы наблюдали практически полную регенерацию бактериохлорофилла b (90—92%), которая заметно ускорялась при встряхивании (рис. 4). Понижение температуры (— 10, — 30°) не изменяло хода реакции, сказываясь только на скорости: прямая реакция замедлялась, а обратная практически не шла. Впуск воздуха в трубку приводил к быстрой регенерации исходного пигмента.

Обратимое фотовосстановление бактериохлорофилла a с образованием сходного промежуточного соединения наблюдали в работах нашей лаборатории ранее ([10]).

Результаты работы позволяют заключить, что бактериохлорофиллы a и b обладают наряду с общими фотохимическими свойствами существенными различиями, которые обусловлены значительно большей реакционной способностью нового бактериального хлорофилла.

Приносим глубокую благодарность проф. Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской за предоставление исходной культуры Rhodopseudomonas viridis и ценные советы по выращиванию.

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

Поступило
4 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] K. Eimhjellen, O. Aasmundrud, A. Jensen, Biochim. Biophys. Res. Commun., 10, 232 (1963). [2] A. Jensen, O. Aasmundrud, K. Eimhjellen, Biochim. et biophys. acta, 88, 466 (1964). [3] G. Drews, P. Giesbrecht, Arch. Mikrobiol., 53, 255 (1966). [4] А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [5] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова, ДАН, 177, 1225 (1967). [6] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. М. Бокучава, ДАН, 190, 464 (1970). [7] А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963). [8] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). [9] Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский и др., ДАН, 183, 221 (1968). [10] А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, 92, 381 (1953).

Доклады Академии наук СССР
1973. Том 213, № 6

УДК 581.132

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ НЕОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛУПРОВОДНИКАМИ

При рассмотрении возможных путей химической эволюции в качестве первичных фоторецепторов обычно называют порфирины, абиогенное образование которых из пиррола и формальдегида происходит самопроизвольно ([1]). Однако в путях химической эволюции могли также участвовать некоторые неорганические соединения, присутствующие в земной коре ([2]); фотосенсибилизирующее действие этих соединений подобно действию порфиринов. Мы нашли, что с помощью окислов цинка, титана и вольфрама удается моделировать реакцию Хилла, соответствующую фотосистеме II в хлоропластах фотосинтезирующих организмов ([3]). При действии близкого ультрафиолетового излучения (365 мμ) на водные взвеси перечисленных полупроводников в присутствии акцепторов электрона (соединений окисного железа, хинонов) наблюдалось выделение кислорода с квантовым выходом около 1%. Эти реакции идут в окислительной области в пределах E_0' от 0,3 до 0,8 в, т. е. достигают потенциала кислородного электрода. Следовало выяснить, удастся ли с помощью этих фотокатализаторов осуществить реакции переноса электрона в восстановительной области, с конечным потенциалом системы, близким к E_0' водородного электрода (—0,42 в), т. е. получить модели фотосистемы I. Ранее мы детально изучили условия сенсибилизированного восстановления метилвиологена хлорофиллом — реакции, которая моделирует фотосистему I ([4]). В настоящей работе исследовали возможность использования при фотокатализе в качестве конечного акцептора электрона метилвиологена, обладающего E_0', близким к водородному электроду. Фотосенсибилизированное окисью цинка восстановление ряда красителей — метилового красного, сафранина и др.— было обнаружено Бауром ([5]). Мы производили опыты в вакуумной трубке Тунберга специальной формы, в которую вводили суспензию окиси цинка, двуокиси титана или вольфрамовой кислоты, содержащую водорастворимые доноры и акцепторы электрона. Спектры поглощения снимали в сфере Ульбрихта спектрофотометра СФ-14. Вакуумную трубку освещали линиями ртути 365 мμ (интенсивностью 10^5 эрг/см^2·сек) лампы СВД-120 А. В качестве доноров электрона использовали глицин и гидразин, абиогенное образование которых возможно в газовых смесях, моделирующих первичную атмосферу Земли ([6]). В качестве акцепторов электрона использовали метилвиологен и сафранин. О восстановлении метилвиологена судили по появлению характерного максимума поглощения при 605 мμ, о восстановлении сафранина — по падению максимума поглощения при 520 мμ, которое происходит при восстановлении красителя. Если после освещения, приводящего к восстановлению акцептора электрона, пустить в трубку воздух, восстановленные формы метилвиологена и сафранина окисляются и спектры поглощения возвращаются к исходному виду. Система контрольных опытов показала, что в отсутствие полупроводников не наблюдалось восстановления метилвиологена и сафранина при освещении ультрафиолетовым светом. Рассмотрим поведение отдельных неорганических полупроводников в этих реакциях.

Окись цинка. На рис. 1*А* показана зависимость изменения оптической плотности в характерных максимумах поглощения метилвиологена и сафранина от времени освещения суспензии окиси цинка. Метилвиологен восстанавливается в присутствии гидразина и глицина с большей скоростью, чем без них. Окись цинка сенсибилизирует восстановление сафранина с большей скоростью в присутствии глицина. С гидразином и без добавления экзогенных доноров электрона скорость восстановления сафранина ниже. Во всех случаях после пуска воздуха в освещенную суспензию восстановленный метилвиологен и сафранин обратимо окисляются. Следует отметить, что фотовосстановление метилвиологена и сафранина

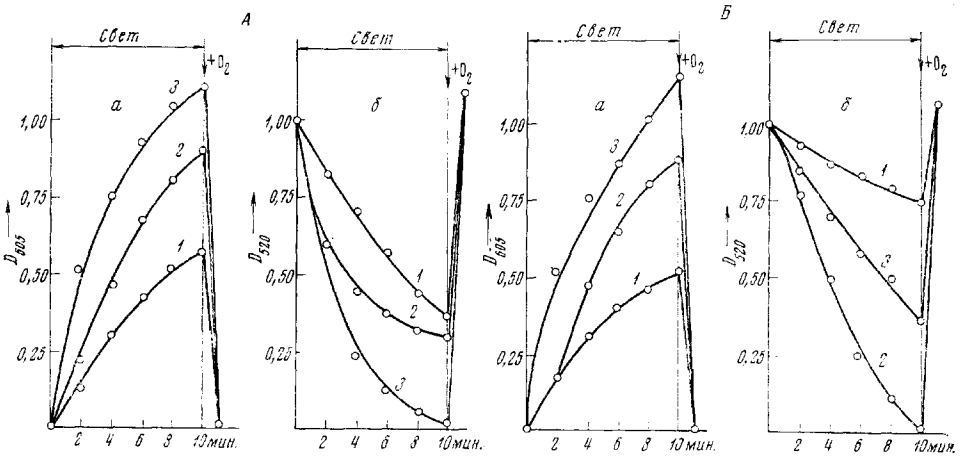


Рис. 1. Фотосенсибилизированное окисью цинка (*А*) и двуокисью титана (*Б*) восстановление метилвиологена (*а*), сафранина (*б*). H_2O 5 мл, ZnO_2 15 мг, TiO_2 5 мг. *1* – без экзогенных доноров электрона, *2* – с гидразином (10^{-2} *М*), *3* – с глицином (10^{-2} *М*)

наблюдается в водной суспензии фотокатализатора и без введения экзогенных доноров электрона.

Двуокись титана. Скорость восстановления метилвиологена в присутствии двуокиси титана без экзогенных доноров электрона оказалась такой же, как с окисью цинка (рис. 1*Б*). Также близки скорости восстановления метилвиологена в присутствии глицина и гидразина для реакций с окисью цинка. Восстановление сафранина в водной суспензии двуокиси титана идет значительно медленнее, чем с окисью цинка, и то же наблюдается в присутствии глицина как донора электрона. В присутствии гидразина двуокись титана особенно активно фотосенсибилизирует восстановление виологена.

Вольфрамовая кислота. В этом случае не удалось наблюдать восстановление метилвиологена и сафранина как в присутствии экзогенных доноров электрона, так и без них. В то же время вольфрамовая кислота достаточно хорошо сенсибилизирует выделение кислорода в присутствии окислителей (соли трехвалентного железа, хиноны). Это указывает на возможность иного механизма сенсибилизированного выделения кислорода в случае вольфрамовой кислоты ([3]). Однако использование меченной по кислороду воды показало, что в опытах с окисью цинка, двуокисью титана и вольфрамовой кислотой изотопный состав выделяющегося кислорода соответствует составу воды ([7]). Весьма существенно то, что в водных суспензиях окиси цинка и двуокиси титана без введения экзогенных доноров электрона наблюдается эффективное восстановление метилвиологена. В контрольных опытах без фотосенсибилизаторов реакция не шла. Возникает вопрос: за счет какого донора электрона восстанавливается

метилвиологен в водных суспензиях полупроводников? Можно представить, что в реакциях такого типа роль донора электрона могут играть либо молекулы воды, либо молекулы самого красителя (метилвиологена или сафранина), поскольку нет данных о том, что сами сенсибилизаторы — окись цинка или двуокись титана могут быть донорами электрона в этих реакциях. Если донорами электрона служат молекулы воды, то устойчивыми продуктами ее окисления могут быть либо молекулярный кислород, либо перекись водорода. Если выделяется молекулярный кислород, то, реагируя с восстановленным метилвиологеном, он также образует перекись водорода. Поэтому следовало определить возможность образования перекиси водорода в реагирующей системе в случае проведения опыта в вакууме. Для выяснения этой возможности мы применили крайне чувствительный метод определения следов перекиси водорода путем измерения хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы ([8]). Для измерения хемилюминесценции люминола мы использовали установку, описанную нами ранее ([9]). Опыты ставили следующим образом. В вакуумную трубку Тунберга (с боковым отводом) вводили суспензию двуокиси титана или окиси цинка в водном растворе метилвиологена и освещали линиями ртути (365 мμ) в условиях, описанных выше. В боковой отвод помещали раствор люминола с пероксидазой и после 10 мин. освещения трубки приливали раствор люминола к реакционной смеси в темноте в камере фотоумножителя. В этих условиях не удалось наблюдать хемилюминесценции люминола, тогда как после пуска воздуха в трубку наблюдалась интенсивная люминесценция за счет окисления восстановленного метилвиологеном кислорода воздуха и образования при этом перекиси водорода. Таким образом эти опыты показывают, что в системе в вакууме не образуется перекись водорода.

При фотоокислении воды образуются нестойкие промежуточные продукты, которые могут реагировать с присутствующими в системе органическими соединениями. Промежуточными продуктами фотоокисления молекулы воды могут быть радикалы OH, приводящие к гидроксилированию органических соединений. Было показано ([10]), что в суспензиях окиси цинка и других сенсибилизаторов происходило гидроксилирование бензола и салициловой кислоты. В наших опытах часть молекул акцептора электрона также могла подвергаться гидроксилированию, либо деструктивному окислению OH-радикалами. Гидроксилирование, вероятно, не сказывалось на способности этих молекул к фотовосстановлению. Действительно, при фотосенсибилизированном восстановлении сафранина без экзогенных доноров электрона удалось наблюдать восстановление до 60% присутствующего пигмента. После пуска воздуха происходила не только полная регенерация пигмента, но даже увеличение оптической плотности в максимуме поглощения сафранина на 5—7% по сравнению с исходной величиной; быть может, молярная экстинкция гидроксилированного красителя несколько выше, чем у исходного соединения. В случае метилвиологена в отсутствие экзогенных доноров электрона удалось наблюдать фотовосстановление около 40% исходного соединения. После пуска воздуха происходила 100% регенерация метилвиологена, судя по измерению оптической плотности при 605 мμ. Возможно, что часть метилвиологена подвергается гидроксилированию. Уже указывалось, что первичный механизм действия сенсибилизатора связан с образованием электрона и дырки на фазовой границе полупроводник/раствор; они служат местом первичного окисления и восстановления. Общую схему изученных реакций в водных суспензиях можно представить следующим образом.

1. Фотовосстановление метилвиологена (MV) в присутствии экзогенных доноров электрона (D) (D_{ox} — окисленный донор):

$$D+MV \xrightarrow{TiO_2,h\nu} D_{ox}+MV^{-}.$$

2. Фотовосстановление метилвиологена без экзогенных доноров электрона:

$$MV+H_2O \xrightarrow{TiO_2,h\nu} MV^- + H^+ + \cdot OH,$$

$$MV+ \cdot OH \longrightarrow MVOH.$$

Судя по стехиометрии, реакция должна сопровождаться выделением водородных ионов. Предварительные опыты показали, что при освещении описанной системы действительно происходит изменение pH в «кислую» сторону на 0,5—0,6 единиц. Однако стехиометрическое соответствие количества гидроксилированного продукта и образования H^+ не установлено и должно составить предмет дальнейшего исследования. Таким образом, в водных суспензиях, содержащих неорганические сенсибилизаторы, удается осуществить фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена — реакцию, сходную с действием так называемой I фотосистемы фотосинтеза.

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

Поступило
31 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, А. В. Умрихина, ДАН, 155, 691 (1964). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, В сборн. Молекулярная фотоника, «Наука», Л., 1970, стр. 161. [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 168, 1100 (1966). [4] Г. П. Брин, А. А. Красновский, ДАН, 204, 1253 (1972). [5] E. Baur, A. Rebmann, Helv. chim. acta, 4, 256 (1921). [6] Т. Е. Павловская, А. Г. Пасынский, В сборн. Проблемы эволюционной и технической биохимии, «Наука», 1964, стр. 70. [7] Г. В. Фомин, Г. П. Брин и др., ДАН, 212, № 2 (1973). [8] M. J. Cormier, P. M. Prichard, J. Biol. Chem., 243, 4706 (1968). [9] Г. П. Брин, З. Ш. Алиев, А. А. Красновский, Физиол. раст., 18, 455 (1971). [10] Г. А. Корсуновский, ЖФХ, 34, 510 (1960).

Доклады Академии наук СССР
1973. Том 212, № 1

УДК 541.14.+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМА С В ПРИСУТСТВИИ ХИНОНОВ; ДЕЙСТВИЕ СВЕТА

Изучая фотосенсибилизированные хлорофиллом окислительно-восстановительные превращения цитохрома с ([1], [2]), мы нашли, что хиноны наряду с флавинами являются активными кофакторами этой реакции.

При постановке контрольных опытов с растворами цитохрома, содержащими хиноны (без хлорофилла), мы заметили, что восстановление цитохрома идет в темноте и белый свет активирует эту реакцию.

Самовосстановление водных растворов цитохрома с и f было описано ранее ([3–5]); эта реакция идет наиболее активно при щелочных pH, и при-

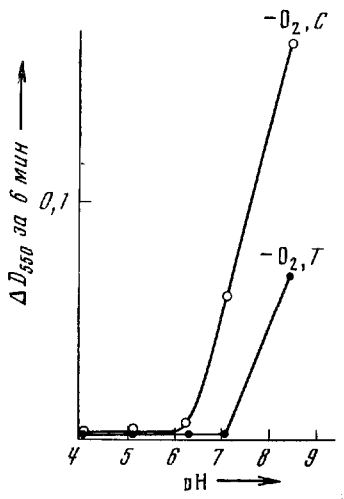


Рис. 1

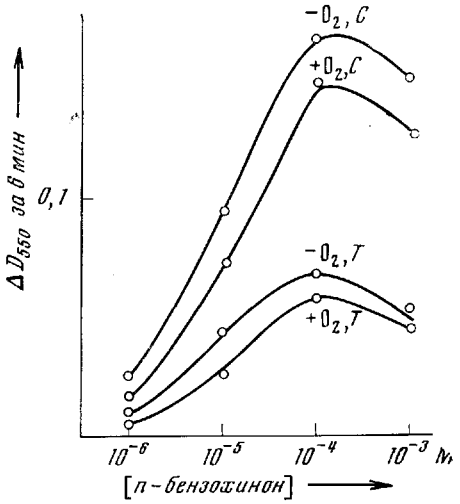


Рис. 2

Рис. 1. Влияние pH на восстановление цитохрома с в присутствии *n*-бензохинона (10^{-4} *M*). Реакция в вакууме, *T* — в темноте, *C* — при освещении

Рис. 2. Влияние концентрации *n*-бензохинона на восстановление цитохрома с. Опыты на воздухе ($+O_2$) и в вакууме ($-O_2$) в темноте (*T*) и на свету (*C*)

сутствие кислорода воздуха не препятствует восстановлению цитохрома. Предполагается ([4], [5]), что восстановление центрального атома железа внутри молекулы цитохрома происходит самопроизвольно за счет электронодонорных группировок полипептидной цепи (например гистидин, триптофан). Мы подтвердили эти данные с использованием доступных нам препаратов цитохрома с. Так, при стоянии в темноте в течение 48 час. растворов цитохрома с (2,3 мг в 5 мл фосфатного буфера 0,03 *M*, pH 8,4) оптическая плотность *D* в максимуме восстановленной формы (550 мμ) увеличивалась на 0,03—0,04 при использовании препаратов «Biomed — Krakow» и BDH Lab. Chem. Div. (90—100%, с содержанием железа не менее 0,43%). Препарат фирмы «Schuchardt» (88,5%, свободный от гистамина) в этих условиях давал увеличение *D* до 0,12; при этом наблюдалось появление в спектре максимума 550 мμ. Освещение белым светом в тече-

ние 4 час. в вакууме слабо активирует реакцию, увеличение D при 550 мμ составляет 0,02—0,03, тогда как на воздухе за это время увеличение D было незначительным. Предварительное нагревание раствора цитохрома при 40° в течение 10 мин. ускоряет процесс самовосстановления, по-видимому, за счет конформационных изменений в молекуле белка.

В настоящей работе исследовалось обнаруженное нами активирующее влияние хинонов на восстановление цитохрома. Большинство опытов проводилось с препаратами «Biomed»; сходные результаты получены с другими препаратами цитохрома.

Использовали свежевозогнанный *n*-бензохинон. Опыты проводили в трубках Тунберга, допускающих спектрофотометрические измерения в водных растворах, содержащих фосфатный буфер 0,03 *M* при концентрации цитохрома с $3{,}5 \cdot 10^{-5}$ *M*. Растворы освещали белым светом лампы накаливания на термостатируемой установке, описанной ранее ([1], [2]), при 20°, интенсивность света $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек.

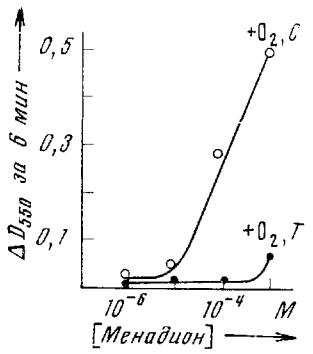


Рис. 3

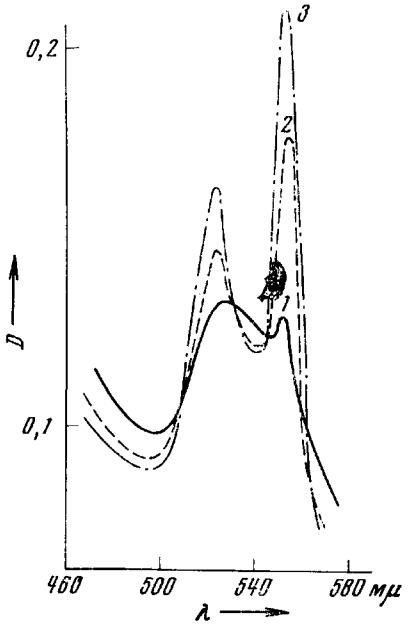


Рис. 4

Рис. 3. Влияние концентрации менадиона на восстановление цитохрома с. Опыты на воздухе в темноте (*T*) и на свету (*C*)

Рис. 4. Изменение спектра поглощения раствора цитохрома с в присутствии *n*-бензохинона 10^{-4} *M* pH 8,4, фосфатный буфер 0,03 *M*, на воздухе. *1* — Цитохром с после введения *n*-бензохинона, *2* — после стояния в темноте 24 мин., *3* — после освещения белым светом 24 мин. (*3*)

Прежде всего мы исследовали влияние pH (при постоянной концентрации *n*-бензохинона 10^{-4} *M*). Опыты проводили в вакууме в темноте и на свету. Полученные данные представлены на рис. 1. Активность реакции достигает максимума в щелочном pH, что соответствует данным ([3], [4], [5]) для растворов цитохрома, не содержащего хинон. Освещение активирует реакцию уже при pH 7,1, т. е. в условиях, когда темновая реакция практически не идет, а при pH 8,4 свет ускоряет реакцию более чем в два раза.

Влияние концентрации *n*-бензохинона (см. рис. 2) изучалось при постоянном значении pH 8,4. Опыты проводили на воздухе и в вакууме. Максимальная активность реакции достигается при концентрации *n*-бензохинона 10^{-4} *M* и падает как при увеличении, так и при уменьшении его концентрации. Без хинона за время опыта D при 550 мμ не изменяется. В вакууме реакция идет быстрее, чем на воздухе. Белый свет отчетливо ускоряет реакцию. Изменения спектра поглощения цитохрома см. на рис. 4.

Мы испытали действие других хинонов. Так, менадион мало влияет на темновое восстановление цитохрома с, восстановление наблюдается

только при концентрации этого хинона 10^{-3} *M*. Однако освещение приводит к чрезвычайно эффективному восстановлению. Свет активирует реакцию уже при концентрации менадиона 10^{-5} *M* (рис. 3). Антрахинон не активен в темноте и при освещении.

2,3-диметоксипарабензохинон (10^{-4} *M* при pH 8,4) чрезвычайно ускоряет темновую и световую реакцию, тогда как 2,3-диметокси-5-метилпарабензохинон в тех же условиях был неактивен в темноте и мало активен при освещении.

Так как наши опыты с хлорофиллом проводятся в водном растворе тритона X-100, в котором происходит солюбилизация цитохрома и хлорофилла, мы испытали действие этого детергента на реакцию хинона с цитохромом. Опыты показали, что наличие детергента в концентрации до 1% не приводит к заметному активированию реакции.

Таким образом, хиноны активируют восстановление цитохрома с в темноте и при освещении. Этой реакции благоприятствует та конформация молекулы белка и степень ионизации электронодонорных групп, которая достигается при щелочных значениях pH. Действие света на эту реакцию чрезвычайно отчетливо, особенно в случае менадиона. Трудно сомневаться в том, что фоторецепторами-фотосенсибилизаторами являются молекулы хинона, которые практически закрывают поглощение полосы Соре; при этом собственная фотохимическая активность цитохрома ничтожна.

Наиболее вероятно, что возбужденные светом молекулы хинона играют роль переносчиков электрона от электронодонорных групп молекул белка к центральному атому железа. Такой же механизм мы предполагали в случае фотосенсибилизированных превращений цитохрома под действием красного света, поглощаемого хлорофиллом.

Удивительно относительно слабое влияние кислорода на эту реакцию. По-видимому, при внутримолекулярном процессе кислород не может подойти к активному центру, спрятанному в скрученной полипептидной цепи. Аналогичное явление — отсутствие тушения флуоресценции фикобилинов кислородом наблюдалось ранее в нашей лаборатории ([6]).

Специфика действия отдельных хинонов, по-видимому, связана с величиной их окислительно-восстановительного потенциала и с их молекулярной конфигурацией, позволяющей войти в нужную «щель» молекулы белка.

Таким образом, молекулы хинонов обладают каталитическим действием в процессе восстановления цитохрома с, а при освещении проявляется их фотосенсибилизирующее действие. Подобное действие возможно не только в растворах, но и в клетках фотосинтезирующих организмов.

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

Поступило
25 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, **185**, 938 (1969). [2] А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, **194**, 953 (1970). [3] E. Boeri, Sci. Med. Ital., **4**, 321 (1955). [4] R. S. Brady, T. Flatmark, J. Mol. Biol., **57**, 529 (1971). [5] H. S. Garewal, A. R. Wasserman, Biochim. et biophys. acta, **275**, 437 (1972). [6] А. А. Красновский, Л. Г. Ерохина, ДАН, **183**, 470 (1968).

Доклады Академии наук СССР
1973. Том 213, № 3

УДК 582.232

БИОХИМИЯ

В. П. ОЩЕПКОВ, К. А. НИКИТИНА, М. В. ГУСЕВ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ВЫДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА КУЛЬТУРАМИ СИНЕЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Выделение молекулярного водорода как фактор регуляции анаэробного энергетического метаболизма клетки имеет широкое распространение в природе ([1]). Особый интерес в этом отношении представляют фотосинтезирующие организмы, так как изучение этого явления позволяет выявить взаимосвязь механизма фотосинтеза с процессом образования водорода, а также исследовать механизм фиксации атмосферного азота. Установлена способность фотообразования водорода у зеленых водорослей ([2]) и у фотосинтезирующих бактерий в анаэробных условиях ([3, 4]). Многие фотосинтезирующие организмы способны также к темновому образованию водорода ([1]). Синезеленые водоросли по целому ряду морфологических и биохимических признаков занимают промежуточное положение между бактериями и зелеными водорослями ([5]). В литературе имеются сообщения о наличии гидрогеназы в клетках синезеленых водорослей ([6–8]). Однако способность образовывать молекулярный водород клетками синезеленых водорослей на свету или в темноте in vivo до сих пор не была обнаружена. Хотя большинство представителей Cyanophyta считаются облигатными фототрофами, в отсутствие освещения они осуществляют целый ряд процессов, идущих с поглощением O_2 ([9]).

Целью настоящей работы явилось исследование возможности образования молекулярного водорода клетками синезеленых водорослей in vivo. В качестве объекта исследования обычно использовали культуру Anabaena variabilis, выращенную на минеральной среде С Кратца и Майерса ([10]) в колбах на 250 мл со 100 мл среды в люминостате при 35–37°. Интенсивность освещения от люминесцентных ламп была 1500–2000 лк. Сравнительные опыты ставили на культурах Plectonema borianum и Anacystis nidulans, выращенных на минеральных средах. Клетки собирали в середине логарифмического роста, осаждали центрифугированием, дважды промывали 0,05 *М* фосфатным буфером pH 6,8, после чего суспендировали в том же буфере, доводя оптическую плотность объекта при 680 мμ до 2,0. В опыт брали 1 мл. Для регистрации выделения газов, сопровождающих метаболизм водорослей, использовали газохроматографический метод. Принципиальная схема установки приведена в работе ([11]). Методика в подробном изложении будет описана в другой работе. Условия анализа: колонка из нержавеющей стали 67×0,6 см с насадкой, молекулярные сита 5 А (60–80 меш); газ-носитель аргон V=85 мл/мин; температура анализа комнатная (22±2°), детектор катарометр, ток моста 120 ма. Шкала самописца 2 мв, время пробега шкалы 1 сек. На выходе после детектора ставилось игольчатое сопротивление газовому потоку, так что давление на входе колонки составляло 0,45 ати.

Исследование возможности фотообразования H_2. Ранее ([2, 11]) была изучена способность к фотообразованию H_2 у зеленой водоросли Chlorella pyrenoidosa. Было показано, что выделение H_2 и O_2 в регистрируемых количествах при освещении суспензии хлореллы в анаэробных условиях происходит альтернативно. Переход от O_2 к H_2 у зеленых водорослей может быть вызван снижением интенсивности света, добавлением

глюкозы, диурона (10^{-6} *M*), динитрофенола (10^{-4} *M*), нагреванием до 40°, светом с $\lambda > 700$ мμ. Поскольку синезеленые водоросли, по современным представлениям, обладают принципиально тем же механизмом переноса электрона при фотосинтезе, что и зеленые водоросли, представлялось целесообразным проверить влияние перечисленных выше факторов на возможность перехода от регистрируемого выделения O_2 к H_2. Оставляя в стороне описание влияния этих факторов на функцию выделения O_2 синезелеными

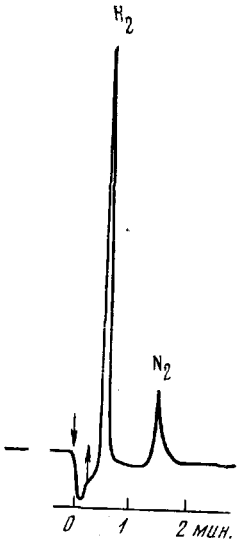


Рис. 1

Рис. 1. Хроматограмма темнового эндогенного выделения водорода культурой A. variabilis после 12-часовой анаэробной инкубации в ячейке. Стрелками указано переключение потока газа-носителя на кювету и отключение кюветы от линии

Рис. 2. Кинетика темнового выделения молекулярного водорода культурой A. variabilis в анаэробных условиях при добавлении глюкозы (10^{-2} *M*) после предварительной 12-часовой инкубации объекта в кювете (*1*) и одновременно с внесением объекта в кювету (*2*)

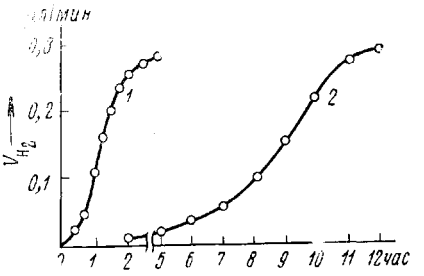


Рис. 2

водорослями, следует констатировать, что ни один из них не приводил к фотообразованию молекулярного водорода. Можно рассматривать эти отрицательные результаты косвенным аргументом в пользу сделанного вывода ([11]) о сходстве механизмов фотообразования H_2 у зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий.

Исследование возможности темнового образования H_2. Клетки указанных видов синезеленых водорослей не обнаруживали эндогенного выделения молекулярного водорода в пределах чувствительности метода (0,01 μл) в течение нескольких часов в анаэробных условиях. Однако, если объект оставался в кювете на 12—14 час., то, как можно видеть на хроматограмме рис. 1, выделение H_2 легко регистрировалось. Количество выделившегося H_2 в среднем составляло 0,5 μл. Хотя кювета с объектом присоединена через 4-ходовой кран к линии газа-носителя герметично, все же за 12—14 час. диффузионное натекание атмосферного воздуха в ячейку значительно превосходит пределы детектирования по O_2 и N_2. В отличие от аналогичных хроматограмм с фосфатным буфером, но без клеток синезеленых водорослей, на которых отсутствовал пик H_2, на хроматограмме рис. 1 отсутствует пик O_2. Это указывает на наличие темновых процессов, идущих с интенсивным потреблением O_2, в то время как фиксация N_2 при низких парциальных давлениях последнего, вероятно, отсутствует или малоэффективна.

Стационарная скорость выделения H_2 теми же клетками, все же ниже чувствительности метода. Если к тому же объекту добавить глюкозу в концентрации 10^{-2} мол/л, то наблюдается быстрое развитие реакции темнового выделения H_2. Кинетика этого процесса представлена на рис. 2, *1*. Скорость выделения H_2 достигала обычно за 2 час. 30 мин. величины порядка 0,3 μл/мин и сохранялась практически постоянной в течение многих часов. Тот же процесс развивался значительно медленнее, если глюкоза добавля-

лась не после 12—14-часовой инкубации объекта в анаэробной атмосфере в кювете, а одновременно с внесением объекта (рис. 2, *2*). Процесс выделения H_2 клетками синезеленых водорослей также хорошо развивался при добавлении формиата. В специальных опытах на колонке 120×0,6 см с насадкой полисорб-1 (60—80 меш) было показано, что выделение водорода сопровождается выделением CO_2. Хотя условия анализа нестерильны и возможность бактериального заражения в процессе опыта не исключается, до

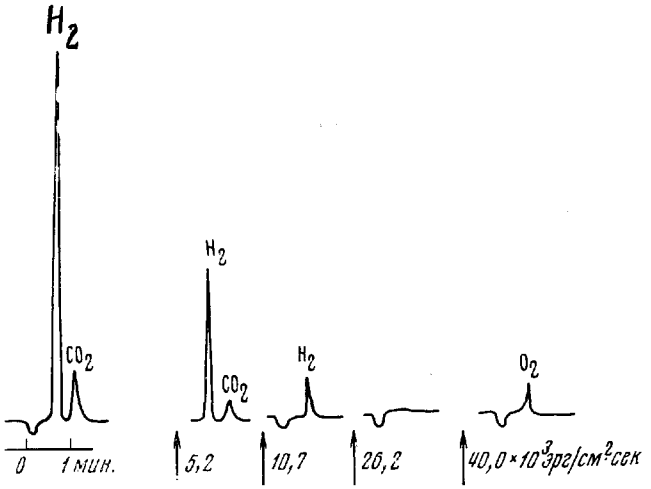


Рис. 3. Хроматограммы выделения H_2, CO_2 и O_2 культурой A. variabilis в зависимости от интенсивности действующего света при наличии глюкозы. Запись производилась через 10 мин. экспозиции. Стрелками обозначена смена интенсивности действующего света, цифры — интенсивность света

опыта и после опыта проводился микробиологический контроль на заражение посторонней микрофлорой. Опыты с фосфатным буфером при добавлении глюкозы или формиата в концентрации 10^{-2} мол/л были всегда отрицательны по выходу H_2, в то время как в присутствии клеток синезеленых водорослей эффект выделения H_2 постоянно воспроизводился. Культуры синезеленых водорослей, выращенные при дефиците железа в среде выделяли H_2 в сравнительных опытах приблизительно в 100 раз меньше нормально выращенных культур. Если кроме глюкозы или формиата в кювету добавлялось двукратное против нормы количество $FeCl_3$ или $FeSO_4$ в опытах с дефицитными по железу культурами, то даже после 12—14-часовой анаэробной инкубации выделение H_2 увеличивалось всего в 2—3 раза.

Влияние интенсивности и спектрального состава света. Объект освещали белым светом от лампы накаливания (осветитель ОИ-19) через светофильтр СЗС-26 (полоса пропускания 400—750 мμ) в диапазоне интенсивностей $5{,}2 \cdot 10^3$—$4{,}0 \cdot 10^5$ эрг/см^2·сек. Свет малой интенсивности уменьшал темновое образование H_2 и CO_2 клетками синезеленых водорослей (рис. 3). При увеличении интенсивности действующего света на хроматограммах вначале исчезает пик CO_2, затем H_2, в дальнейшем регистрируется только пик O_2 (чувствительность по CO_2, O_2 и N_2 более чем на порядок ниже чувствительности по H_2). На рис. 3 представлены записи выделения H_2, CO_2 и O_2 через 30 мин. после каждого воздействия, полученные на колонке 120×0,6 см с полисорбом-1. Выделение H_2 и O_2 контролировалось на колонке с молекулярными ситами 5 А, а CO_2 на колонках с активированным углем и окисью алюминия. Аналогичное действие оказывал монохроматический свет в диапазоне 400—750 мμ, полученный при пропускании белого света от источника через интерференционные светофильтры

с полушириной пропускания 10 мμ. Интенсивность монохроматического света менялась от $0{,}5 \cdot 10^3$ до $2{,}4 \cdot 10^4$ эрг/см^2·сек. При интенсивностях ниже $1 \cdot 10^3$ эрг/см^2·сек свет не оказывал заметного ингибирования темнового выделения H_2 и CO_2. Ни в одном из наших опытов освещение объекта в указанных диапазонах длин волн и интенсивностей не приводило к увеличению эффекта выделения H_2 и CO_2.

Действие ингибиторов. Темновое субстратзависимое выделение молекулярного водорода клетками синезеленых водорослей ингибировалось на 50% гипофосфитом, азидом и динитрофенолом в концентрации 10^{-3}, 10^{-5} и $5 \cdot 10^{-5}$ мол/л соответственно. Арсенит в концентрации 10^{-3} мол/л практически не оказывал влияния. Диурон, ингибитор фотосинтетического выделения O_2, в концентрации 10^{-5} мол/л также не оказывал влияния на выделение H_2, причем последующее освещение объекта в этом случае уже не вызывало указанных выше эффектов.

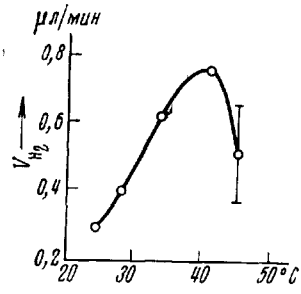


Рис. 4. Зависимость скорости выделения молекулярного водорода культурой A. variabilis от температуры в присутствии глюкозы

Влияние температуры. Нагревание объекта в процессе опыта (теплым воздухом из фена) приводило к увеличению скорости выделения H_2 (рис. 4). Оптимум эффекта находится при 41—42°. Коэффициент Вант-Гоффа Q_{10} в диапазоне 24—34° составляет 2,1±0,1. Нагревание объекта до 45° приводило к необратимой инактивации функции выделения H_2. Глубина инактивации зависела от времени воздействия такого нагревания.

Влияние атмосферы N_2. В настоящей работе вопрос фиксации N_2 синезелеными водорослями специально не исследовался. Замена газа-носителя, а следовательно и газовой фазы в кювете с объектом, с Ar на N_2 приводила к 50% ингибированию темнового субстратзависимого выделения H_2, указанными видами синезеленых водорослей. Q_{10} в том же диапазоне температур 24—34° уменьшался до 1,5±0,1. Обратная замена газа-носителя с N_2 на Ar восстанавливала прежнюю скорость выделения H_2 и Q_{10}. Операция замены газа-носителя занимала 1 час. Все параметры опыта и чувствительность по H_2 были одинаковы в том и другом случае. Ток моста детектора в N_2 125 ма. Баллоны Ar и N_2 были подключены к линии газа-носителя на входе параллельно, так что при замене газов не происходила разгерметизация линии. Содержание O_2 в Ar и N_2 (по паспортным данным) не превосходило 10^{-3} об.%. Так как оба баллона подключены до трубки с поглотителем следов O_2 (Ni—Cr катализатор), концентрация O_2 в ячейке в любом случае не превышала 10^{-5} об.%.

Таким образом, ингибирующее влияние на выделение водорода связано с присутствием азота. Хотя у An. nidulans азотфиксирующая способность не установлена, явление ингибирования темнового выделения водорода в атмосфере азота указывает на целесообразность дальнейшего развития этой работы.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 VII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] G. T. Gray, H. Gest, Science, **148**, 186 (1965). [2] H. Gaffron, J. Rubin, J. Gen. Physiol., **26**, 219 (1942). [3] H. Gest, M. D. Kamen, Science, **109**, 558 (1949). [4] И. Н. Гоготов, Е. Н. Кондратьева, ДАН, **175**, 714 (1967). [5] М. В. Гусев, Биология синезеленых водорослей, М., 1968. [6] A. W. Frenkel, Biol. Bull., **97**, 261 (1949). [7] A. Hattori, In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo, 1963, p. 485. [8] Y. Fujita, J. Myers, Plant Physiol., Suppl., **39**, 12 (1964). [9] М. В. Гусев, К. А. Никитина, Т. Г. Корженевская, Микробиология, **40**, в. 6, 956 (1971). [10] W. A. Kratz, J. Myers, Am. J. Bot., **42**, 282 (1955). [11] В. П. Ощепков, А. А. Красновский, Физиол. раст., **19**, в. 5, 1090 (1972).

СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫЕ СИГНАЛЫ ЭПР ПРИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ И ФОТООКИСЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

А. В. УМРИХИНА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Ордена Ленина Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Показано образование свободных радикалов пигментов, донора и акцептора электронов при фотохимическом взаимодействии хлорофилла, бактериохлорофилла, феофитинов и порфиринов с аскорбиновой кислотой, гидрохиноном и хиноном. Условия наблюдения разных типов радикалов зависят от природы пигмента, донора и акцептора электронов, природы среды и температуры ЭПР-измерений. Обсуждается возможный механизм реакции.

Работами многих авторов показано возникновение светоиндуцированных сигналов ЭПР в растениях, фотосинтезирующих бактериях, суспензиях хлоропластов и хроматофоров (см., например, обзор [1]). Однако из-за многокомпонентности живых систем интерпретация сигналов ЭПР в них часто затруднена. Поэтому пониманию механизма фотопревращений, связанных с образованием свободных радикалов, могут помочь исследования фотореакций пигментов в модельных системах.

Мы наблюдали возникновение дублетного сигнала ЭПР при фотовосстановлении хлорофилла и других порфиринов аскорбиновой кислотой в пиридине и пиперидине [2]. Появление этого сигнала было приписано образующейся в реакции окисленной форме аскорбиновой кислоты — монодегидроаскорбиновой кислоте. Согласно стехиометрии реакции, в данной системе должны были образоваться также анион-радикалы пигментов, но они не были обнаружены в то время методом ЭПР. В работах Толлина и соавторов по фотоокислению хлорофилла и других порфиринов хиноном и фотовосстановлению гидрохиноном в разных средах был обнаружен в широком диапазоне температур только сигнал семихинона [3].

Однако еще в ранних работах нами были получены данные об образовании пигментных радикалов при фотовосстановлении порфиринов с помощью метода инициирования полимеризации [4, 5]. На образование свободнорадикального состояния пигментов указывают и данные, полученные методом ЭПР. Мы наблюдали синглетную линию ЭПР при температуре жидкого азота и освещении растворов пигментов с донором электрона [6, 7]. В работе Евстигнеева имеются указания на образование в системе хлорофилл-хинон в спирте при освещении наряду с семихинонным радикалом также радикала с синглетной линией ЭПР-поглощения, который можно приписать радикалу хлорофилла [8]. Синглетную линию наблюдали Теренин и Холмогоров [9] при действии света на твердые образцы хлорофилла; другие авторы регистрировали синглетную линию при освещении концентрированных и замороженных растворов хлорофилла [10]. Тем не менее появление синглетной линии ЭПР нельзя было однозначно объяснить образованием пигментных радикалов в результате фотохимического взаимодействия пигмента с донором или акцептором электрона.

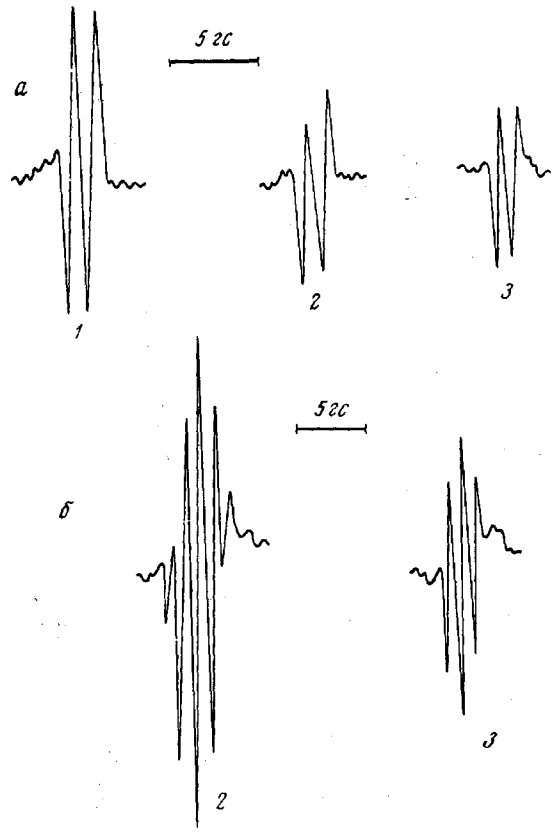


Рис. 1. Спектры ЭПР, наблюдаемые при фотовосстановлении в вакууме (10^{-3} *мм* рт. ст.) пигментов

а — аскорбиновой кислотой (насыщенный раствор) в пиридине и *б* — гидрохиноном (10^{-2} *М*) в этаноле; *1* — гематопорфирин; *2* — хлорофилл *а*; *3* — бактериохлорофилл

В связи с этим нами было проведено исследование фотовосстановления и фотоокисления хлорофилла и его аналогов методом ЭПР с целью найти условия наблюдения наряду с радикалами донора и акцептора электронов также радикалов пигмента.

Измерения спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре типа РЭ-1301. Образцы освещали в резонаторе фокусированным светом лампы ДКСШ-200 через водный фильтр и стеклянные цветные светофильтры, выделяющие спектральную область поглощения исследуемого пигмента. Термостатирующее устройство позволяло изменять температуру в резонаторе ЭПР-спектрометра в пределах от —196 до +50° С и выше с точностью до 1±0,5° С *.

Как и в нашей предыдущей работе, в реакции пигментов с аскорбиновой кислотой (рис. 1, *а*) при освещении образцов в резонаторе ЭПР-спектрометра при комнатной температуре регистрировали дублетную линию с $g=2{,}00$ и $\Delta H=1{,}8$ *гс*, принадлежащую монодегидроаскорбиновой кислоте, так как такой же сигнал наблюдается при термическом взаимодействии аскорбиновой кислоты с пиперидином в аэробных условиях в отсутствие пигмента. Светоиндуцированный сигнал исчезал после выключения света. Взаимодействие хлорофилла *а* и бактериохлорофилла (рис. 1, *б*) с гидрохиноном в этаноле и в этаноле с добавкой пиридина при комнатной температуре на свету в соответствии с данными Толлина [11] приводило к возникновению сигнала ЭПР семихинона. Этот сигнал также исчезал после выключения света.

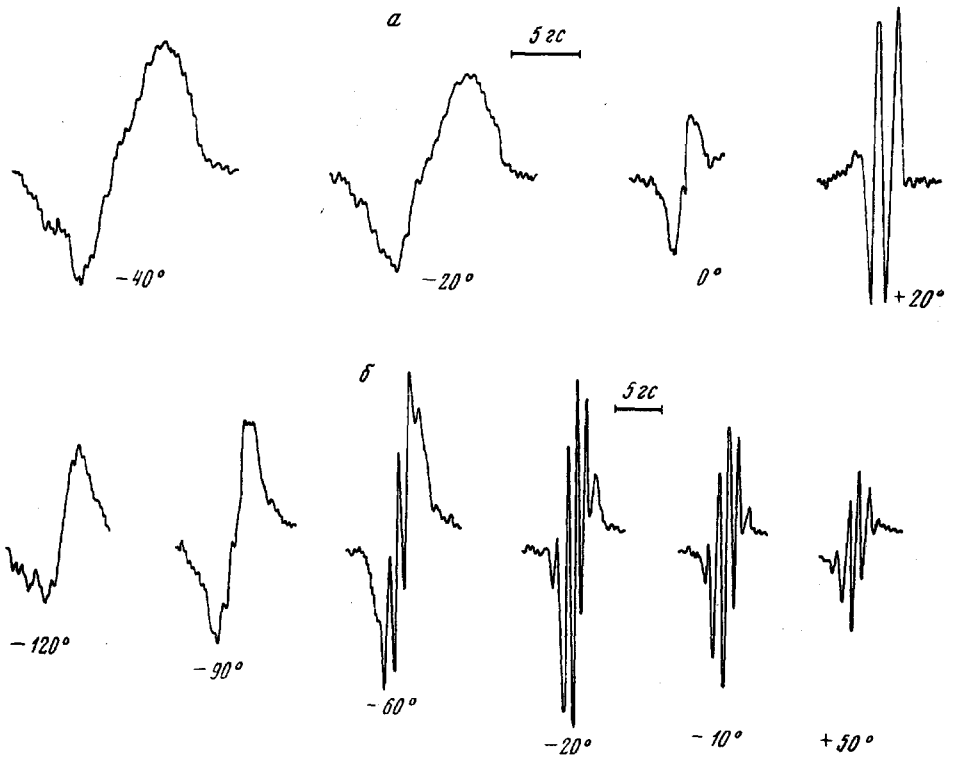


Рис. 2. Температурная зависимость светоиндуцированных сигналов ЭПР при фотовосстановлении хлорофилла *а* аскорбиновой кислотой в пиридине (*а*) и гидрохиноном в этаноле (*б*)

Исследование температурной зависимости показало наличие двух разных сигналов в исследуемых системах. При отрицательных температурах, но выше температуры замерзания образцов регистрировали в системе с аскорбиновой кислотой синглетную линию с $\Delta H=8$—10 *гс* и $g=2{,}00$ (рис. 2, *а*). Повышение температуры приводило к появлению сложного спектра, представлявшего сумму двух сигналов — дублетного и синглетного. При дальнейшем повышении температуры синглетная линия полностью исчезала из регистрируемого спектра и наблюдали хорошо разрешенную дублетную линию. Еще более отчетливая картина смены сигналов ЭПР была получена при применении в качестве доноров электрона гидрохинона (рис. 2, *б*). Сравнение параметров наблюдаемой синглетной линии с аналогичными сигналами в системах, содержащих пигменты, как in vitro, так и in vivo позволил предположить, что наблюдаемая нами синглетная линия обусловлена образованием в системе восстановленной радикальной формы пигмента.

* Авторы выражают глубокую признательность В. Н. Бегичеву за конструирование и монтаж термостатирующей установки.

Фотохимическое окисление хлорофилла *а* хиноном протекало аналогично фотовосстановлению этого пигмента гидрохиноном: при температуре размораживания растворителя и несколько выше регистрируется только синглетная линия, принадлежащая, как мы считаем, радикальной форме пигмента, затем наблюдается как синглетная линия, так и линия восстановленного акцептора и затем, наконец, только линия восстановленного акцептора — семихинона (рис. 3, *а*).

Результаты опытов по окислению бактериохлорофилла отличались от окисления хлорофилла *а* хиноном (рис. 3, *б*). В этом случае почти во всем диапазоне температур наблюдали только синглетную линию, которую удалось регистрировать даже при температуре —10° С *. Освещение образцов при температуре выше —10° С не приводило к возникновению измеримого сигнала ЭПР. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в нашей лаборатории, о том, что бактериохлорофилл может подвергаться либо одноэлектронному обратимому окислению, либо двуэлектронному необратимому окислению [12]. В наших опытах процесс был полностью обратим, так как спектр бактериохлорофилла после реакции с хиноном соответствовал спектру бактериохлорофилла до реакции. В отсутствие хинона освещение растворов бактериохлорофилла в этаноле в вакууме во всем диапазоне температур (от —130° до —10° и концентрации пигмента 10^{-4} *М*) не приводило к появлению какого-либо сигнала ЭПР. Добавка 1% пиридина в раствор бактериохлорофилла с хиноном в этаноле приводила к тому, что в значительном диапазоне температур наряду с синглетной линией наблю-

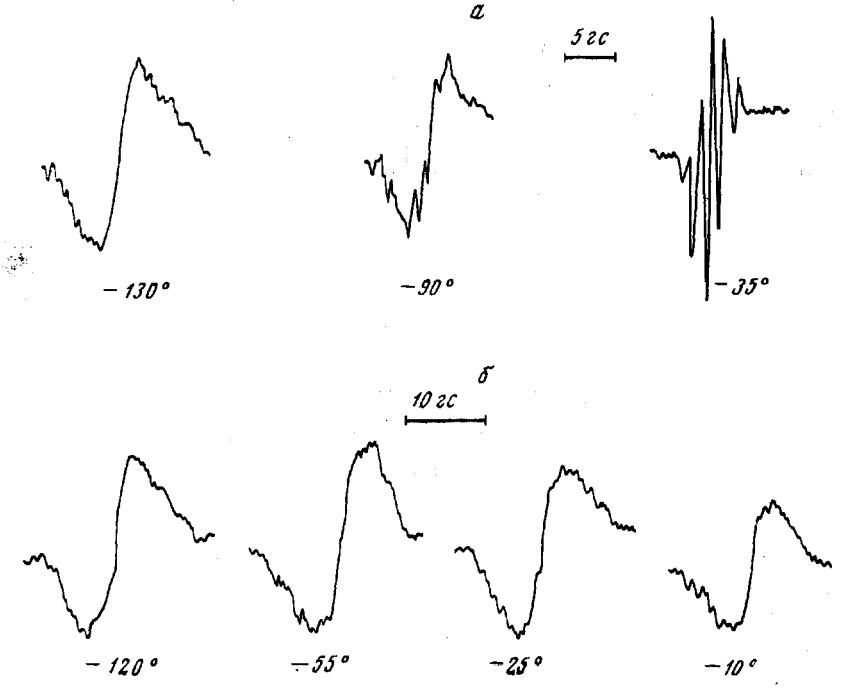


Рис. 3. Температурная зависимость светоиндуцированных сигналов ЭПР при фотоокислении в этаноле хиноном
а — хлорофилла *а* и *б* — бактериохлорофилла

дали спектр семихинона, как и при окислении хлорофилла. Возможно, в присутствии пиридина происходит восстановительное взаимодействие бактериохлорофилла с присутствующим в системе в равновесных количествах гидрохиноном.

Таким образом, оба процесса — фотовосстановление и фотоокисление сопровождаются образованием радикалов пигмента и радикалов донора и акцептора электронов. Особенность заключается в том, что пигментные радикалы удается регистрировать методом ЭПР при значениях температуры более низких, чем те, при которых можно наблюдать радикалы донора и акцептора электрона. Нами было предложено следующее объяснение механизма реакции фотовосстановления пигментов протондонорными восстановителями — аскорбиновой кислотой и гидрохиноном. Мы исходили из допущения, что гидрированная форма свободного радикала претерпевает дисмутацию быстрее, чем негидрированная. Поэтому если процесс переноса электрона и протона разделен во времени, то в результате первичного переноса электрона образуется пара радикалов,

* Синглетную линию ЭПР наблюдали также при окислении бактериохлорофилла иодом при 77° К [13].

один из которых претерпевает более быструю дисмутацию (а именно радикал донора электрона). После осуществления стадии переноса протона более быстрой дисмутации подвергается другой радикал (в данном случае радикал пигмента).

Обратимое окисление порфиринов, по-видимому, возможно только на стадии переноса электрона. Перенос протона, а также второго электрона ведет к образованию необратимых продуктов окисления. В связи с этим условия наблюдения радикальных форм, образующихся при фотовосстановлении и фотоокислении порфиринов, различаются у пигментов разной природы и зависят от температуры и природы среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weaver E. C., Annual Rev. Plant. Physiol. 1968, **19**, 283.
2. Бубнов Н. Н., Красновский А. А., Умрихина А. В., Цепалов В. Ф., Шляпинтох В. Я., Биофизика, **5**, 121, 1960.
3. Tollin G., Chatterjee K. K., Green G., Photochem. Photobiol., **4**, 593, 1965; **5**, 315, 1966; **14**, 15, 1971.
4. Красновский А. А., Умрихина А. В., Докл. АН СССР, **104**, 882, 1955.
5. Красновский А. А., Умрихина А. В., Биофизика, **3**, 547, 1958.
6. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **163**, 491, 1965.
7. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., Биофизика, **11**, 796, 1966.
8. Евстигнеев В. Б., Садовникова Н. А., Грибова З. П., Костиков А. П., Каюшин Л. П., Биофизика, **16**, 431, 1971.
9. Теренин А. Н., Холмогоров В. Е., в сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», М., стр. 5, 1965.
10. Brody S. S., Newell G., Castner T., J. Phys. Chem., **64**, 554, 1960.
11. Cho D., Tollin G., Photochem. Photobiol., **8**, 317, 1968.
12. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР, **158**, 730, 1964.
13. McElroy J. D., Feher G., Mauzerall D. C., Biochim. et biophys. acta, **172**, 180, 1969.

Поступила в редакцию
18.X.1972

LIGHT-INDUCED EPR SIGNALS IN PHOTOCHEMICAL OXIDOREDUCTION OF CHLOROPHYLL AND ANALOGS

A. V. UMRIKHINA, N. V. BUBLITCHENKO, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Free radicals of pigments, electron donors and acceptors were observed by photointeraction of chlorophyll, bacteriochlorophyll, pheophytin and porphyrins with ascorbic acid, hydroquinone and quinone. The observation of different types of radicals depends on the nature of pigment, donor, and acceptor molecules, the nature of media and temperature of EPR measurement. The mechanism of reactions studied is discussed.

Доклады Академии наук СССР
1973. Том 212, № 2

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Г. В. ФОМИН, Г. П. БРИН, М. В. ГЕНКИН, А. К. ЛЮБИМОВА,
Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОРАЗЛОЖЕНИЯ ВОДЫ В СИСТЕМЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЙ СЕНСИБИЛИЗАТОР — АКЦЕПТОР ЭЛЕКТРОНА

В качестве химической модели реакции фоторазложения воды при фотосинтезе была предложена система — суспензия неорганического полупроводника-фотосенсибилизатора в водном растворе, содержащем соединения с выраженными электроноакцепторными свойствами, в качестве которых использовали соединения окисного железа, *n*-бензохинон ([1–4]). Установлено выделение кислорода при освещении таких систем с квантовым выходом до 1%. Стехиометрические соотношения количества восстановленного акцептора электрона, выделенного кислорода и образованных ионов водорода указывали на то, что выделяющийся при реакции кислород принадлежал молекулам воды ([3]).

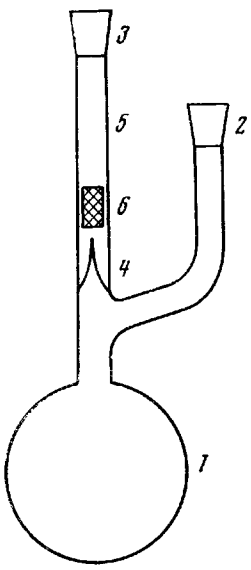


Рис. 1

В настоящей работе это положение доказано в прямых опытах с использованием меченой по кислороду воды (H_2O^{18}). Реакцию проводили в сосудах, представленных на рис. 1. В шар *1* заливали исследуемую суспензию, из которой через отвод *2* удаляли воздух вакуумированием до 10^{-3} мм рт. ст. с трехкратным повторением цикла замораживание — размораживание, после чего отвод запаивали. Реакционную смесь освещали либо полным спектром лампы ДРШ-1000 (10^6 эрг/см^2·сек) в течение 30 мин., либо через светофильтр ЖС-10 в течение часа ($\lambda > 400$ мμ). Для анализа состава летучих компонентов над суспензией применяли масс-спектроскопический метод (масс-спектрометр МХ 1203). Образцы через отвод *3* присоединялись к входному объему масс-спектрометра. Шар *1* помещался или в жидкий азот, или в смесь ацетона с сухим льдом ($t = -40 - 77°$ С). Для ввода летучих компонентов в масс-спектрометр игла *4* разбивалась специальным стальным бойком *6*, который можно было перемещать вдоль трубки *5* с помощью магнита. В качестве акцепторов электрона применяли феррицианид калия (марки х.ч.) и парабензохинон. Последний очищали с помощью возгонки. Использовали неорганические полупроводники: окись цинка (для люминофоров), вольфрамовую кислоту (марки ч.), вольфрамовый ангидрид (для спектрального анализа). Навески порошка полупроводника — 500 мг на 10 мл водного раствора электронного акцептора. Концентрации феррицианида $6 \cdot 10^{-3}$ мол/л, парабензохинона ($C_6H_4O_2$) $9 \cdot 10^{-3}$ мол/л. Для определения процентного состава тяжелокислородной воды ее разлагали электрохимически в описанных выше сосудах, в которые дополнительно были впаяны платиновые электроды. Масс-спектрометрически исследовали состав выделяющегося кислорода. Оказалось, что соотношение $O^{16}O^{18} / O_2^{16} = 15$, отсюда $H_2O^{18} / H_2O^{16} = 7{,}5\%$.

Эксперименты показали, что во всех случаях при освещении исследуемых систем полным светом лампы ДРШ-1000 наблюдается выделение кислорода, изотопный состав которого близок к составу воды. В табл. 1 приведена серия из девяти опытов, в число которых включены как прямые опыты для определения изотопного состава кислорода, так и некоторые специальные — для выяснения деталей механизма его образования. Основные массы, по которым проводили измерения, были: $M = 28$ (N_2 и CO), $M = 32$ (O_2^{16}), $M=34$ ($O^{16}O^{18}$), $M=44$ (CO_2).

ΔI — интенсивность (приращение над фоном) линии, соответствующей определенной массе. $\Delta I_{28}(N_2)$ — абсолютная интенсивность азотной линии, получена вычитанием из интенсивности линии ΔI_{28} интенсивности, которую обычно имеет спутник (соответствующий CO) линии с $M = 44$ (CO_2). $\Delta I_{32} / \Delta I_{28}(N_2)$ характеризует выделение или поглощение кислорода. Для воздуха $I_{32} / I_{28} \sim 25\%$, $\Delta I_{34} / \Delta I_{32}$ — изотопный состав кислорода.

Таблица 1

№ опыта	Условия опытов	ΔI_{28}	$\Delta I_{28}(N_2)$	ΔI_{32}	ΔI_{34}	ΔI_4	$\Delta I_{32}/\Delta I_{28}(N_2)$, %	$\Delta I_{34}/\Delta I_{32}$, %
1	$ZnO+K_3Fe(CN)_6$	75	75	250	40	0	330	16
		80	80	220	32	4	280	15
2	$ZnO+K_3Fe(CN)_6$ фильтр ЖС-10	52	52	12	0	1	22	0
		51	51	18	0	0	35	0
3	$H_2WO_4+K_3Fe(CN)_6$	93	38	153	25	690	410	16
		150	140	200	26	170	140	13
4	$WO_3+K_3Fe(CN)_6$	70	60	230	37	120	380	16
		61	55	76	11	75	138	15
5	$WO_3+K_3Fe(CN)_6$ фильтр ЖС-10	140	130	120	14	140	90	12
		54	50	50	7	42	100	14
6	$ZnO+C_6H_4O_2$	370	200	84	10	2200	42	12
		330	130	64	7	2200	50	11
		240	140	64	8	1700	46	13
7	$ZnO+C_6H_4O_2$ фильтр ЖС-10	33	16	4	0	220	25	0
		230	150	50	0	980	33	0
8	$ZnO+C_6H_4O_2+C_6H_6$	150	110	4	0	440	4	0
9	$ZnO+K_3Fe(CN)_6$ H_2O—9 мл C_2H_5OH—1 мл	5	5	0	0	5	0	0

Данные опытов №№ 1, 3—6 свидетельствуют о выделении кислорода воды, а не сенсибилизатора. Наблюдавшиеся небольшие отличия в изотопном составе воды и выделяющегося кислорода связаны, по-видимому, с неполным удалением из образцов кислорода воздуха. Следует заметить, что при быстром обмене кислорода воды и сенсибилизатора изотопные измерения теряют смысл, так как в этом случае изотопные составы кислорода воды и окисла должны совпадать. Однако, как следует из работы [5], такого обмена в условиях опыта ($t = 20°$ C) практически не происходит. При использовании WO_3 в качестве сенсибилизатора наблюдается частичное восстановление поверхности с образованием вольфрамовой сини. Специальные опыты с вольфрамовой синью, полученной восстановлением гидросульфитом, а затем тщательно промытой от его избытка, показали, что выделение кислорода на вольфрамовой сини не происходит, так что возможное предположение об участии ее в качестве фотосенсибилизатора следует исключить.

Можно высказать два следующих альтернативных предположения о детальном механизме изучаемого процесса. Известно [6–8], что гомогенные растворы ряда акцепторов электрона при освещении способны окислять воду с образованием химически чрезвычайно активных OH-радикалов,

которые во вторичных реакциях взаимодействуют с растворенными соединениями, что препятствует образованию молекулярного кислорода. Одна возможность заключается в том, что в исследуемых суспензиях первичными окислителями воды являются возбужденные состояния электронных акцепторов, а роль поверхности заключается только в стабилизации радикалов OH и облегчении их рекомбинации с образованием в конечном итоге молекулярного кислорода.

Другая возможность заключается в первичном фотовозбуждении полупроводника (т. е. возбуждении электронов из валентной зоны в зону проводимости), с последующим окислением его молекулой электронного акцептора. Непосредственным окислителем воды в этом случае должны выступать «дырки», образующиеся на поверхности полупроводника.

Данные опытов №№ 1, 2 и 6 для суспензий ZnO свидетельствуют в пользу второго предположения. Так, при освещении образцов светом с $\lambda > 400$ мμ, свет поглощается только молекулами электронного акцептора, при этом происходит фотоокисление воды с образованием OH-радикалов ([6–8]), но образования молекулярного кислорода не наблюдается. Выделение кислорода наблюдается при освещении областью спектра, в которой поглощают свет окись цинка и двуокись титана ($\lambda < 400$ мμ). Для вольфрамового ангидрида, у которого длинноволновая граница поглощения лежит около 500 мμ, освещение в полосе с $\lambda > 400$ мμ приводит к выделению кислорода (опыты №№ 4, 5).

Фотоокисление воды с выделением одной молекулы кислорода требует переноса 4 электронов, который можно представить следующими реакциями:

$$4OH^- \xrightarrow{-4\bar{e}} 4\dot{O}H \rightarrow 2H_2O + O_2, \qquad (1)$$

$$2OH^- \xrightarrow{-2\bar{e}} H_2O_2 \xrightarrow{-2\bar{e}} O_2 + 2H^+, \qquad (2)$$

$$2OH^- \xrightarrow{-2\bar{e}} 2\dot{O}H \xrightarrow{-2\bar{e}} O_2 + 2H^+. \qquad (3)$$

Во всех этих случаях можно предполагать либо одновременный перенос электронов с образованием кислорода или относительно долгоживущего промежуточного продукта — перекиси водорода, либо последовательную передачу электронов с образованием активных частиц (OH и O). Например, в предположении о промежуточном образовании перекиси водорода (реакция (2)) одновременный перенос двух электронов можно представить в реакционном комплексе, включающем две молекулы воды и два рядом расположенных активных центра («дырки») на поверхности катализатора; таким образом, происходит окисление сразу двух молекул воды с образованием перекиси водорода. Такой процесс является не радикальным и энергетически более выгоден, так как в элементарном акте происходит образование новой связи (O—O).

Опыты с введением эффективных акцепторов гидроксильных радикалов — бензола, этанола (опыты №№ 8, 9), трет.-бутанола, в которых наблюдалось полное ингибирование выделения O_2, показали, что образование кислорода (или перекиси водорода) сопровождается появлением в качестве промежуточных продуктов активных радикальных частиц.

Известно ([9]), что под действием реактива Фентона ($Fe^{2+} + H_2O_2$), который является источником гидроксильных радикалов ([10]), парабензохинон подвергается глубокой деструкции вплоть до двуокиси углерода. Действительно, в системе, содержащей бензохинон, наблюдается высокий выход CO_2 в согласии с ранними наблюдениями ([3]).

Таким образом, поверхность сенсибилизатора является не только первичным окислителем воды, но и, по всей вероятности, способствует образованию молекулярного кислорода. Роль поверхности в последнем процессе

может заключаться, с одной стороны, в сорбции и стабилизации первично возникающих активных радикалов, с другой — в облегчении их направленной рекомбинации по слою структурированной на поверхности воды.

Институт химической физики
Академии наук СССР

Поступило
11 IV 1973

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **139**, 142 (1961). [2] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **147**, 656 (1962). [3] А. А. Красновский, Г. П. Брин, в сборн. Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 161. [4] А. А. Красновский, Г. П. Брин, З. Ш. Алиев, ДАН, **199**, 952 (1971). [5] Л. А. Касаткина, Кандидатская диссертация, МХТИ, 1963. [6] Г. В. Фомин, В. А. Римская, В сборн. Состояние и роль воды в биологических объектах, 1967, стр. 133. [7] С. И. Шолина, Г. В. Фомин, Л. А. Блюменфельд, ЖФХ, **18**, 800 (1969). [8] В. А. Кузьмин, Кандидатская диссертация, МГУ, 1971. [9] H. Kawasaki, J. Chem. Soc. Japan, **67**, 1554 (1964). [10] У. Уотерс, Механизм окисления органических соединений, М., 1966.

УДК 576.343

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТООКИСЛЕНИЯ АНАЛОГОВ ХЛОРОФИЛЛА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ДЕТЕРГЕНТОВ

М. Г. ШАПОШНИКОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Проводилось сравнительное изучение реакции необратимого фотоокисления аналогов хлорофилла (хлорофилл *b* протохлорофилл, бактериовиридин, бактериохлорофилл) кислородом воздуха в водных растворах неионогенного детергента тритон Х-100 и в органических растворителях. С хлорофиллом *a* реакцию окисления изучали также в анионо- и катионоактивных детергентах. Все пигменты хорошо солюбилизируются в растворе тритона при концентрации выше критической концентрации мицеллообразования, образуя мономерные формы, обладающие большой фотохимической активностью. Скорость фотоокисления всех пигментов зависит от концентрации детергента и интенсивности света; изменение pH среды не оказывало существенного влияния на скорость реакции. Был измерен квантовый выход необратимого фотоокисления хлорофилла и его аналогов в водном растворе тритона Х-100 и в органических растворителях. По данным этих измерений, эффективность фотоокисления уменьшается в ряду: бактериохлорофилл ($2{,}4 \cdot 10^{-3}$), бактериовиридин ($2{,}0 \cdot 10^{-3}$), хлорофиллы *b* ($1{,}3 \cdot 10^{-4}$) и *a* ($1{,}1 \cdot 10^{-4}$), протохлорофилл ($5{,}3 \cdot 10^{-5}$) (в скобках указаны величины квантового выхода деструктивного окисления в растворе тритона Х-100). Описаны спектральные изменения в ходе реакции.

Хлорофилл и его аналоги хорошо растворяются в органических растворителях, поэтому фотохимические свойства пигментов изучены преимущественно в таких растворах. При освещении этих растворов в присутствии кислорода происходит разрушение пигментов, причиной которого является их фотоокисление.

Применение водных растворов поверхностно-активных веществ (детергентов), солюбилизирующих хлорофилл и его производные, позволяет изучать фотохимические свойства пигментов в водной среде. Большое количество воды в мицеллах детергентов, их форма и свойства позволяют создать условия, моделирующие состояние и особенности пигментного комплекса в хлоропластах. В присутствии детергентов хлорофилл образует прозрачные, стабильные растворы со спектрами поглощения, подобными спектрам в органических растворителях; растворы обладают сильной флуоресценцией и большой фотохимической активностью. Все это свидетельствует о том, что хлорофилл находится в мицеллах детергентов преимущественно в мономерном состоянии.

Исследованию фотохимических реакций хлорофилла *a* в водных растворах различных детергентов посвящен ряд работ. В предыдущей работе [1] нами было изучено необратимое фотоокисление хлорофилла *a* кислородом воздуха в водных растворах неионогенного детергента тритон Х-100. Однако сравнительного изучения поведения аналогов хлорофилла в этих условиях не проводилось. Целью настоящей работы являлось изучение необратимого фотоокисления аналогов хлорофилла в водных растворах детергентов, позволяющее к тому же выявить значение структуры молекул пигментов в проявлении их фотохимических свойств. Изучались хлорофиллы *a* и *b* зеленых растений, бактериохлорофилл и

бактериовиридин фотосинтезирующих бактерий и протохлорофилл. Исследовали зависимость скорости реакции окисления от природы детергента и растворителя, концентрации детергента, pH среды, интенсивности света.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали хлорофиллы *a* и *b*, выделенные из сухих листьев крапивы, бактериохлорофилл и бактериовиридин — из фотосинтезирующих бактерий (*Rhodospirillum rubrum, Chloropseudomonas ethylicum*), протохлорофилл — из оболочек семян тыквы обычными методами с конечным хроматографическим разделением на колонках из сахарозы. Условия опытов и техника получения водных детергентных растворов пигментов описаны в нашей предыдущей работе [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фотоокисление в неионогенном детергенте тритон X-100. Все исследованные нами пигменты при введении их в воду (без детергента) в виде ацетоновых растворов образуют агрегаты, при освещении которых в условиях наших опытов фотовыцветания практически не происходит. Но добавление уже небольшого количества тритона (0,005%) приводит к солюбилизации пигмента, что выражается спектрально в появлении максимума поглощения, соответствующего мономерной форме пигмента, и в ускорении реакции фотоокисления. Бактериохлорофилл солюбилизируется хуже — спектр агрегированных форм сохраняется и в 0,01%-ном растворе тритона. С увеличением концентрации детергента возрастает красная полоса поглощения, которая достигает максимальной величины в районе критической концентрации мицеллообразования (ККМ) [2]. С изменением концентрации детергента меняется и фотохимическая активность пигментов. При изучении зависимости необратимого фотоокисления аналогов хлорофилла от концентрации тритона в растворе были получены результаты, аналогичные тем, которые были нами описаны для хлорофилла *a* [1]: скорость реакции возрастала при увеличении концентрации тритона до 0,1% (концентрация, соответствующая ККМ), а затем оставалась постоянной при увеличении концентрации детергента до 2%.

При сравнительном изучении скорости фотоокисления различных пигментов мы использовали 0,5%-ный раствор тритона. При такой концентрации детергента хлорофиллы *a* и *b* и бактериовиридин быстро солюбилизируются, тогда как величина поглощения в максимуме протохлорофилла и бактериохлорофилла достигает наибольшего значения примерно через 30 *мин* после добавления пигментов в раствор тритона. Скорость окисления пигментов в тритоне различна — наиболее быстро выцветают растворы бактериохлорофилла и бактериовиридина, значительно медленнее — растворы хлорофиллов *a* и *b*, и особенно протохлорофилла (см. измерение квантового выхода реакции).

При изучении действия pH на необратимое фотоокисление аналогов хлорофилла использовали 1/15 *M* фосфатные буферы. Как и в случае хлорофилла *a* [1], изменение pH от 4 до 9 не оказывало существенного влияния на скорость окисления. Но при окислении бактериальных пигментов в кислой среде спектрально обнаруживается больше устойчивых промежуточных продуктов, чем в щелочной.

Для всех пигментов исследовалась также зависимость фотоокисления от интенсивности света. При окислении бактериовиридина и бактериохлорофилла насыщение реакции происходит при интенсивности света $\sim 10^6$ *эрг/см²/сек*, тогда как при окислении хлорофиллов *a* и *b*, и особенно протохлорофилла, в пределах условий опыта (максимальная интенсивность света $4 \cdot 10^6$ *эрг/см²/сек*) сохраняется в основном линейная зависимость от интенсивности света, что свидетельствует о протекании реакции не по двухквантовому механизму.

Фотоокисление в ионогенных детергентах. Опыты проводились с хлорофиллом *а* в катионоактивном детергенте — цетилтриметиламмониумбромиде (ЦТАБ) и в анионоактивном — лаурилсульфате натрия (ЛСН). Хлорофилл *а* солюбилизируется в ЦТАБ при концентрации выше ККМ так же хорошо, как в тритоне, и гораздо хуже в ЛСН. Полная солюбилизация хлорофилла в ЛСН происходит только при высокой концентрации детергента. Возможно, это объясняется тем, что коллоидные частицы хлорофилла, полученные при смешивании ацетонового раствора с водой, отрицательно заряжены, и этот заряд отталкивает отрицательно заряженные молекулы ЛСН, вследствие чего солюбилизация хлорофилла подавляется [2]. В растворе ЛСН, несмотря на увеличение концентрации детергента до 3%, сохранялась агрегированная форма хлорофилла, не изменяющаяся при освещении. В 3%-ном растворе ЛСН появлялась мономерная форма хлорофилла и наблюдалось фотовыцветание растворов; выше 4% происходило значительное ускорение реакции. Скорость реакции была сравнима со скоростью окисления в тритоне лишь при использовании концентрированных растворов ЛСН (до 10%). В ЦТАБ хлорофилл солюбилизировался уже в 0,005%-ном растворе детергента, но только при концентрации, превышающей 0,5%, наблюдалось выцветание хлорофилла. В 5%-ном растворе ЦТАБ реакция протекала с той же скоростью, что и в тритоне (рис. 1).

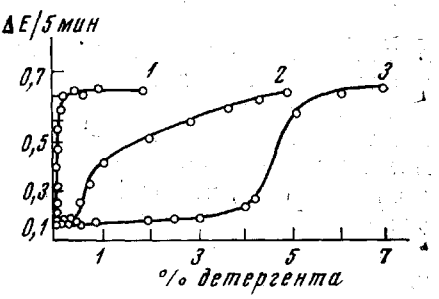


Рис. 1. Зависимость скорости фотоокисления хлорофилла *а* от концентрации детергентов

1 — тритон Х-100; *2* — цетилтриметиламмонийбромид; *3* — лаурилсульфат натрия

В работе Массини и Вурна [2] было показано, что, если к раствору хлорофилла в ионогенном детергенте добавить нейтральный электролит в высокой концентрации, то фотохимические свойства пигмента проявляются при значительно меньшем содержании детергента. В наших опытах добавление 0,2 *М* NaCl к растворам ЦТАБ и ЛСН также оказывало существенное влияние на солюбилизацию хлорофилла. Без NaCl в 0,1%-ном растворе ЦТАБ и в 0,5%-ном растворе ЛСН фотовыцветание хлорофилла было незначительным. После добавления NaCl скорость реакции в ЛСН возрастала в 4 раза, а в ЦТАБ — в 9 раз, достигая скорости окисления в 0,5%-ном тритоне (табл. 1). Добавление NaCl к раствору тритона не вызывало существенного изменения в скорости окисления хлорофилла, так как соли сравнительно слабо влияют на ККМ растворов неионогенных детергентов, причем это влияние не связано с электрическим взаимодействием, как в случае ионогенных детергентов [3].

Таблица 1

Влияние NaCl на скорость фотоокисления хлорофилла *а* в растворах детергентов

Детергент	без NaCl	+0,2 *М* NaCl
0,5%-ный ЛСН	60	270
0,1%-ный ЦТАБ	75	670
0,01%-ный тритон	80	130
0,5%-ный тритон	680	630

Примечание: Приведенные величины представляют изменение оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла за 5 *мин*, умноженное на 1000.

Изменение концентрации водородных ионов, как и в тритоне, не вызывало существенного изменения скорости реакции окисления в ионогенных детергентах. Существенно то, что скорость реакции после добавления фосфатных буферов (независимо от pH) увеличивалась по сравнению с незабуференными растворами. Очевидно, добавление фосфатов,

как и добавление NaCl, приводит к снижению ККМ и увеличению солюбилизирующей способности детергента.

Следует отметить, что при увеличении концентрации детергента меняется pH водного раствора. При изменении концентрации ЦТАБ от 0,1 до 2,5% pH уменьшается от 6,3 до 5,4. В случае ЛСН pH увеличивается от 7,6 (0,5%-ный раствор) до 9,2 (10%-ный раствор). Такое изменение pH практически не оказывало влияния на спектральные свойства хлорофилла. Если же в ЛСН добавлять спиртовый, а не ацетоновый раствор хлорофилла, то уже в темноте через 5 *мин* в спектре поглощения появляются максимумы, характерные для феофитина. В работе Кима [4] феофитинизация бактериохлорофилла в растворе ЛСН объясняется следующим образом: каждая молекула ЛСН имеет восемь неподеленных электронных пар, которые легко образуют лиганды с центральным атомом магния бактериохлорофилла, и это взаимодействие является достаточно сильным, чтобы удалить магний из бактериохлорофилла, превратив его в бактериофеофитин.

Фотоокисление в органических растворителях. Скорость фотоокисления существенно зависит от природы растворителя [1, 5]. Более полярная среда и наличие воды увеличивают склонность хлорофилла к окислению [6, 7]. Чтобы выявить специфику свойств растворов детергентов, мы изучали фотоокисление также в органических растворителях: ацетоне, этиловом спирте и смеси спирта (30%) с глицерином (70%). В случае хлорофиллов *a* и *b* и протохлорофилла скорость окисления в спирто-глицериновой среде, как и в тритоне, значительно превышала скорость реакции в ацетоне и спирте, тогда как бактериальные пигменты в органических растворителях окислялись так же быстро, как в детергенте. Во всех случаях наибольший выход выцветания пигментов наблюдался в вязкой спирто-глицериновой среде.

Измерение квантового выхода фотоокисления. Известно, что в разных средах относительный квантовый выход выцветания хлорофилла *a* при действии красного света изменяется от 10^{-6} до 10^{-3} [8—10], а бактериохлорофилла — от 10^{-5} до 10^{-3} [11]. Мы измеряли квантовый выход фотоокисления хлорофилла и его аналогов в 0,5%-ном растворе тритона, в ацетоне, спирте и в смеси спирта с глицерином. Для расчета квантового выхода реакции измеряли с помощью калиброванного термостолбика количество квантов света, поглощенных раствором пигмента за определенный промежуток времени и количество молекул пигмента в растворе, претерпевших фотохимические изменения за то же время. Измерения проводили на линейном участке световой кривой. О скорости деструктивного фотоокисления судили по изменению оптической плотности в красном максимуме поглощения; с протохлорофиллом измерения проводили в области полосы Соре. Растворы освещали красным светом, используя различно светофильтры. Результаты измерений представлены в таблице 2.

Таблица 2

Квантовый выход фотоокисления различных пигментов в водном растворе тритона X-100 и в органических растворителях

Пигмент	Светофильтры	Интенсивность света (*эрг/см²/сек*)	Квантовый выход			
			0,5%-й тритон	ацетон	спирт	спирт + глицерин
Протохлорофилл	ОС-13	$4 \cdot 10^6$	$5{,}3 \cdot 10^{-5}$	$1{,}8 \cdot 10^{-5}$	$2{,}1 \cdot 10^{-5}$	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$
Хлорофилл *b*	КС-11	$4 \cdot 10^6$	$1{,}3 \cdot 10^{-4}$	$8{,}0 \cdot 10^{-5}$	$8{,}0 \cdot 10^{-5}$	$3{,}5 \cdot 10^{-4}$
Хлорофилл *a*	КС-11	$4 \cdot 10^6$	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$5{,}3 \cdot 10^{-5}$	$5{,}3 \cdot 10^{-5}$	$2{,}6 \cdot 10^{-4}$
Бактериовиридин	КС-11	$3 \cdot 10^5$	$2{,}0 \cdot 10^{-3}$	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$	$6{,}0 \cdot 10^{-3}$
Бактериохлорофилл	НС-6, НС-8 КС-19, НС-9	$8 \cdot 10^4$	$2{,}4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}8 \cdot 10^{-3}$	$1{,}8 \cdot 10^{-3}$	$3{,}7 \cdot 10^{-3}$

Из приведенных данных видно, что эффективность фотоокисления возрастает в ряду: протохлорофилл, хлорофиллы *a* и *b*, бактериовиридин, бактериохлорофилл.

Спектральные изменения при фотоокислении. Все изученные пигменты отличаются характерными спектрами поглощения, на структуру которых сильно влияет степень восстановления «полуизолированных» двойных связей молекул пигментов. При фотоокислении хлорофилла и его аналогов происходит исчезновение красного максимума, что свидетельствует о нарушении системы сопряженных связей пигментов. Природа растворителя обычно мало влияет на вид спектра, но положение

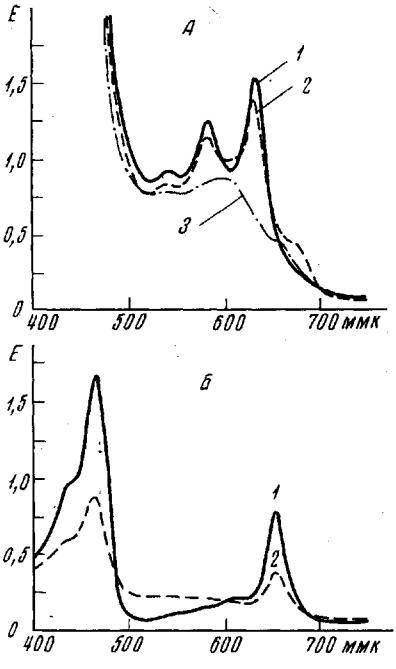


Рис. 2. Спектры поглощения протохлорофилла (*А*) и хлорофилла *b* (*Б*) в 0,5%-ном растворе тритона Х-100

1 — исходный; *2* — после 5 *мин* освещения; *3* — после 50 *мин* освещения

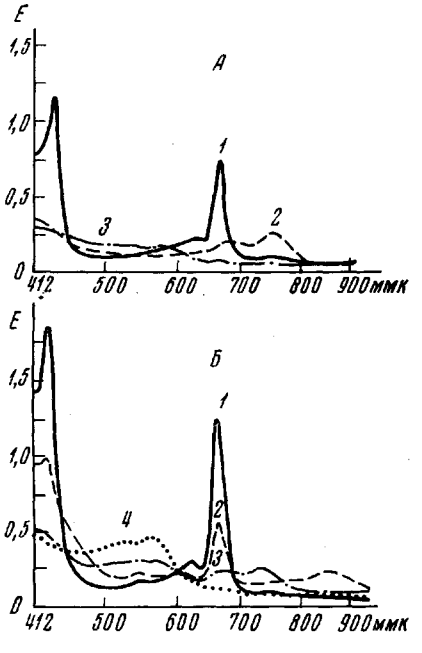


Рис. 3. Спектры поглощения бактериовиридина

А — в 0,5%-ном растворе тритона Х-100, *Б* — в ацетоне; *1* — исходный; *2* — после 5 *мин* освещения; *3, 4* — изменения в темноте (после освещения)

главных максимумов поглощения пигментов в растворе тритона и в смеси спирта с глицерином несколько сдвинуто в длинноволновую часть спектра по сравнению с ацетоновыми и спиртовыми растворами. Вид спектров поглощения промежуточных продуктов, образующихся при реакции, зависит от природы растворителя [11—13].

При фотоокислении протохлорофилла наблюдается уменьшение поглощения в главных максимумах и образование новой полосы поглощения при 670—680 *ммк* (рис. 2, *А*), что согласуется с ранее полученными данными [14]. Положение нового максимума зависит от природы растворителя. При продолжительном освещении растворов протохлорофилла в тритоне, спирте и спирте с глицерином полоса поглощения 670—680 *ммк* исчезает; в ацетоне продукт окисления более устойчив — его максимум лишь незначительно падает.

При фотоокислении хлорофилла *a* в разных растворителях происходит падение красного максимума и увеличение поглощения в области 500—600 *ммк*. При освещении растворов красным светом в наших усло-

виях опытов не удалось обнаружить окрашенных продуктов фотохимического окисления хлорофилла, описанных рядом авторов [10, 12, 15]. Но при освещении спирто-глицеринового раствора хлорофилла *а* синим светом образуется красный фотопродукт с характерным спектром, в котором выражены максимумы поглощения при 410, 507, 538 и 573 *ммк*.

Фотоокисление хлорофилла *b* приводит к тем же спектральным изменениям, что и окисление хлорофилла *а* — происходит падение главных максимумов и увеличивается поглощение в области 500—600 *ммк*. В тритоне и в смеси спирта с глицерином удается наблюдать образование красного фотопродукта (рис. 2, *Б*). Образование фотопродукта в спирто-глицериновой среде происходит эффективнее, чем в тритоне.

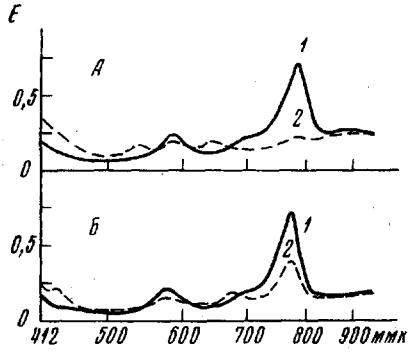


Рис. 4. Спектры поглощения бактериохлорофилла

А — в 0,5%-ном растворе тритона Х-100, *Б* — в ацетоне; *1* — исходный; *2* — после 5 *мин* освещения

Бактериовиридин отличается от хлорофилла большей скоростью фотоокисления в растворе, что приближает его к бактериохлорофиллу. При окислении виридина образуются промежуточные соединения, обладающие характерными максимумами поглощения в близкой инфракрасной области спектра. Положение максимума фотопродукта зависит от природы растворителя и температуры [13]. При проведении реакции окисления в тритоне, в спирте и в смеси спирта с глицерином происходит образование фотопродукта с максимумом поглощения при 750 *ммк*, тогда как в ацетоне максимум поглощения сдвинут в длинноволновую сторону (855 *ммк*). Промежуточные соединения, образующиеся при освещении бактериовиридина, нестабильны, и при стоянии растворов в темноте происходит изменение спектров окисленных продуктов; в тритоне, спирте и в спирте с глицерином длинноволновая полоса поглощения исчезает и увеличивается поглощение в области 500—600 *ммк* (рис. 3, *А*). В ацетоне вместо максимума 855 *ммк* появляется максимум при 740 *ммк*, который затем тоже исчезает и одновременно увеличивается поглощение в зеленой области спектра (рис. 3, *Б*). Все растворы при этом приобретают розовую окраску. Подобные спектральные изменения наблюдаются при добавлении к растворам бактериовиридина после фотоокисления восстановителей. Их действие можно объяснить восстановлением фотоокисленной формы с разрывом сопряжения по кругу и образованием «линейного» тетрапиррольного соединения [13]. Возможно, что и при окислении разрушение пигмента происходит тем же путем.

В работах нашей лаборатории была установлена способность бактериохлорофилла к быстрому фотохимическому окислению кислородом воздуха и *о*-бензохиноном с образованием хлорофилло- и протохлорофиллоподобных продуктов [16, 17]. При фотоокислении бактериохлорофилла в растворе тритона, в спирте и в спирте с глицерином наблюдается падение поглощения в красном максимуме и появление новых полос поглощения в области 400—700 *ммк* (430, 544, 585, 650 *ммк*) (рис. 4, *А*), что соответствует спектральным изменениям, описанным ранее [11, 13]. При окислении бактериохлорофилла в ацетоне образуется промежуточный продукт с максимумами поглощения при 440 и 680 *ммк* (рис. 4, *Б*), что также согласуется с известными данными [11]. С помощью тонкослойной хроматографии было установлено [18], что максимум поглощения при 680 *ммк* принадлежит пяти продуктам, мало различающимся по спектрам поглощения и флуоресценции. Все эти продукты давали положительную фазовую пробу, но природа их не была

выяснена. При освещении в максимуме фотопродукта (светофильтр КС-17, $\lambda > 670$ *ммк*) нам не удалось наблюдать образования протохлорофиллоподобного продукта, происходящего при окислении бактериохлорофилла *о*-хиноном.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакцию необратимого фотоокисления удается наблюдать у всех исследованных пигментов. По данным измерения квантового выхода, эффективность окисления уменьшается в ряду: бактериохлорофилл, бактериовиридин, хлорофиллы *b* и *a*, протохлорофилл. Такой же ряд пигменты составляют в порядке уменьшения выхода обратимого фотоокисления хинонами и другими акцепторами электронов. Поскольку фотоокислению подвергаются все аналоги хлорофилла, можно полагать, что способность к фотоокислению определяется не какой-либо боковой группой, а структурным скелетом молекул — системой сопряженных по кругу двойных связей порфиринового типа. Но боковые группы, очевидно, оказывают существенное влияние на скорость окисления, изменяя реакционную способность молекул в результате взаимодействия с системой сопряжения.

Хотя все пигменты находятся в растворе тритона и в органических растворителях в мономерной форме, состояние пигментов в детергенте, очевидно, отличается от их состояния в истинных растворах. В тритоне, по-видимому, происходит изменение конформации молекул пигментов, не сопровождающееся, однако, изменением спектров поглощения. Определенная организация пигментов в мицеллах детергента способствует более активному проявлению фотохимических свойств пигментов. При фотоокислении хлорофиллов *a* и *b* и протохлорофилла скорость реакции в тритоне значительно выше, чем в ацетоне или спирте, а бактериальные пигменты одинаково быстро разрушаются во всех растворителях. При окислении всех пигментов в вязкой спирто-глицериновой среде наблюдается наибольший выход выцветания. Этот факт позволяет предположить, что проявлению фотохимической активности пигментов в тритоне способствует локальная вязкость мицелл детергента, в которых идет реакция.

Скорость уменьшения поглощения в максимуме существенно не зависит от концентрации водородных ионов, но изменение pH среды влияет на количество устойчивого фотопродукта, образующегося при окислении бактериальных пигментов. При окислении бактериовиридина и бактериохлорофилла в тритоне в кислой среде накапливается больше продукта, чем в щелочной. Очевидно, кислая среда способствует стабилизации промежуточных продуктов окисления; уже отмечалось [12], что с увеличением концентрации водородных ионов заметно возрастает скорость превращения хлорофилла *a* в красный фотопродукт.

Образование разных промежуточных соединений при фотоокислении также связано и со структурными различиями в строении пигментов. Появление максимумов поглощения в близкой инфракрасной области при фотоокислении молекул бактериовиридина может происходить в результате присоединения кислорода по месту «полуизолированной» двойной связи второго пиррольного кольца с появлением спектра поглощения «бактериохлоринового» типа. Нарушением «полуизолированных» двойных связей, очевидно, объясняется и появление длинноволнового максимума при окислении протохлорофилла [14]. В молекуле бактериохлорофилла «полуизолированные» двойные связи восстановлены, и присоединение кислорода ведет к другим спектральным изменениям. В этом случае реакция, очевидно, идет по месту группировок в системе сопряженных по кругу двойных связей, о чем свидетельствует исчезно-

вение «бактериохлоринового» максимума и появление системы максимумов в средней части видимого спектра. У хлорофилла одним из потенциальных центров окисления являются два подвижных атома водорода в положении 7 и 8, и действие кислорода, возможно, заключается в отщеплении этих водородных атомов с образованием в молекуле пигмента второй «полуизолированной» двойной связи, что обусловливает переход от хлориновой к порфириновой структуре [12, 19]. Появление длинноволновой полосы поглощения (740 *ммк*) при окислении хлорофилла кислородом в вязкой спирто-глицериновой среде [20] указывает на возможность присоединения кислорода и по месту двойной «полуизолированной» связи. Показано также, что присоединение кислорода приводит к разрыву метиновых мостиков, связывающих четыре пиррольных кольца в молекуле хлорофилла [15]. На основании всех этих работ можно предположить, что при реакции хлорофилла с кислородом образуется не один, а несколько продуктов окисления, соответствующих присоединению кислорода в разных частях молекулы пигмента. Выход этих продуктов, очевидно, зависит от природы пигмента и среды. Красные промежуточные продукты, обнаруживаемые при фотоокислении хлорофилла, являются первыми идентифицируемыми соединениями, путем образования которых, вероятно, проходит разрушение хлорофилла в желтеющих осенних листьях. Следует отметить, что феофитин не появляется как продукт деградации [15].

Фотохимическая реакция хлорофилла и его аналогов с кислородом приводит к выцветанию пигментов, связанному с их деструктивным окислением. Хотя этот процесс необратим, отдельные его стадии могут быть связаны с той функцией пигментов, которую они выполняют при фотосенсибилизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шапошникова М. Г., Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, **36**, 704, 1971
2. Massini P., Voorn G., Biochim. et biophys. acta, **153**, 589, 1968
3. Шинода К. и др., Коллоидные поверхностно-активные вещества, «Мир», М., 1966
4. Kim Y. D., Arch. Biochem. and Biophys., **140**, 354, 1970
5. Jen J. J., Mackinney G., Photochem. Photobiol., **11**, 297, 1970
6. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **89**, 523, 1953
7. Кутюрин В. М., Соловьев В. П., Григорович В. И., Докл. АН СССР, **169**, 479, 1966
8. Porret D., Rabinowitch E. Nature, **140**, 321, 1937
9. Livingston R., in: Photosynthesis in Plants, p. 179, Iowa State College Press, Ames, 1949
10. Aronoff S., Mackinney G., J. Amer. Chem. Soc., **65**, 956, 1943
11. Goedheer J. C., Biochim. et biophys. acta, **27**, 478, 1958
12. Дилунг И. И., Укр. хим. ж., **24**, 202, 1958
13. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Сапожникова И. М., Докл. АН СССР, **172**, 727, 1967
14. Гуринович И. Ф., Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Таугер С. М., Докл. АН СССР, **164**, 201, 1965
15. Jen J. J., Mackinney G., Photochem. Photobiol., **11**, 303, 1970
16. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР, **81**, 879, 1951
17. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Бокучава Е. М., Докл. АН СССР, **190**, 464, 1970
18. Kim W. S., Biochim. et biophys. acta, **112**, 392, 1966
19. Huennekens F. M., Calvin M., J. Amer. Chem. Soc., **71**, 4024, 1949
20. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, **30**, 605, 1965

Поступила в редакцию
23.VIII.1971

COMPARATIVE INVESTIGATION OF PHOTOOXIDATION OF CHLOROPHYLL ANALOGS IN AQUEOUS DETERGENT SOLUTIONS

M. G. SHAPOSHNIKOVA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A comparative study was made of the reaction of irreversible photooxidation of chlorophyll analogs (chlorophyll *b*, protochlorophyll, bacterioviridin, bacteriochlorophyll) by air oxygen in aqueous solutions of nonionic detergent, Triton X-100, and in organic solvents. In the case of chlorophyll *a*, the reaction of oxidation was studied also in anionic and cationic detergents. All pigments are solubilized well in Triton solutions at concentrations above the critical micelle concentration with formation of monomeric forms possessing a high photochemical activity. It is shown that the rate of photooxidation of all pigments depends on the detergent concentration and light intensity; changes in medium pH did not affect substantially the reaction rate. Quantum yield of irreversible photooxidation of chlorophyll and its analogs was measured in micellar solution of Triton X-100 and in organic solvents. As evidenced from these determinations, photooxidation efficiency decreases according to the following sequence: bacteriochlorophyll ($2{,}4 \cdot 10^{-3}$), bacterioviridin ($2{,}0 \cdot 10^{-3}$), chlorophylls *b* ($1{,}3 \cdot 10^{-4}$) and ($1{,}1 \cdot 10^{-4}$), protochlorophyll ($5{,}3 \cdot 10^{-5}$). (The figures in brackets represent the values of quantum yield of pigment destructive oxidation in Triton X-100 solutions.) A report is given of spectral changes in the course of reaction.

PHOTOSYNTHETICA 7 (4): 330–337, 1973

Light-induced Changes in the Fluorescence Yield of Particles Obtained by Digitonin Fragmentation of Chloroplasts*

N. V. KARAPETYAN, V. V. KLIMOV and A. A. KRASNOVSKIĬ

Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R., and Institute of Photosynthesis, U.S.S.R. Academy of Sciences, Pushchino, Moscow District, U.S.S.R.

Abstract

Variable fluorescence (ΔF) has been found in the heavy and light fractions of chloroplast particles obtained by digitonin fragmentation and differential centrifugation. The capacity of the heavy fraction enriched in photosystem 2 (PS 2) for ΔF is by two orders of magnitude higher than that of the light fraction enriched in photosystem 1 (PS 1). In the light fragments ΔF is related not only to the contamination of PS 2 but probably to its own PS 1-dependent ΔF. This is indicated by the difference in the time-course of the dark recovery of ΔF in both types of particles in the presence of ascorbate. Besides, methyl viologen, PMS and low concentrations of ferricyanide, which activate the absorption changes at 702 nm (ΔA_{702}), increase ΔF of light particles; ascorbate accelerates the dark recovery of both ΔF and ΔA_{702} of these particles. In light fragments the fast components of ΔF and ΔA_{702} show a similar pattern of dependence on the PMS concentration and irradiance. These ΔF seem to be associated with the enhancement of the fluorescence of PS 1-chlorophyll *a* induced by P_{700} photooxidation.

Recent investigations have demonstrated that chlorophyll *a* of photosystem 2 (PS 2) is primarily responsible for the light-induced changes in the fluorescence yield (ΔF) of plants (DUYSENS and SWEERS 1963). However, plants do not exhibit significant light-induced absorption changes (ΔA) in the red region of the spectrum connected with the chlorophyll functioning in the reaction centre of PS 2. Despite the presence of ΔA at 702 nm (ΔA_{702}) caused by phototransformations of chlorophyll molecules (P_{700}) in the reaction centre of photosystem 1 (PS 1) and own fluorescence (F) of PS 1, no ΔA_{702}-correlated ΔF have been found (VREDENBERG and DUYSENS 1965). It appears difficult to record light-induced ΔF of PS 1 because of the superimposition of intense ΔF of PS 2. Therefore, it was interesting to study ΔF of chloroplast fragments enriched in different photosystems. It has been shown that the F yield and its light-induced changes correlate with the content of PS 2 in various fractions (VREDENBERG and SLOOTEN 1967; BRIANTAIS 1969; PARK *et al.* 1971). At the same time no F related to the function of PS 1 has been revealed, evidently due to an insufficiently high accuracy of ΔF measurements.

As shown previously (KARAPETYAN and KLIMOV 1971; KARAPETYAN 1972) the apparatus we have devised can help record the ΔF time-course without interference effects of actinic radiation. Using this instrument, we have examined the capacity of chloroplast fragments enriched in PS 1 or PS 2 for ΔF. On the basis of the behaviour of ΔF of chloroplast fragments under the influence of different agents an attempt has been made to reveal ΔF of light particles related to the function of PS 1 and to compare them with the behaviour of ΔA_{702}.

* *Received* 24 April 1973.

METHODS

The procedure of isolating chloroplasts from pea leaves was described by KARAPETYAN and KLIMOV (1973). Chloroplast fragments were isolated according to ANDERSON and BOARDMAN (1966), using differential centrifugation of chloroplast suspension, incubated with 0.5% digitonin. The fractions frozen with 10% glycerol and stored in liquid nitrogen retained their activity for a long time. The content of chlorophyll *a* and *b* in the fractions was estimated according to ARNON (1949).

Photoinduced ΔF were measured in a previously described apparatus (KARAPETYAN and KLIMOV 1971). At first the initial (constant) level of the integral F with $\lambda > 660$ nm and then its changes (ΔF) after irradiance were determined. The region of 600—700 nm (150 W m^{-2}) which can be effectively absorbed by PS 2 (irradiance 2) and the region of $\lambda > 710$ nm (1 700 W m^{-2}) which can be effectively absorbed by PS 1 (irradiance 1) were used as actinic radiation. Photoinduced ΔA in the red region of the spectrum was also measured in that apparatus. In order to exclude registration of F during ΔA recordings, interference filters were placed in the way of the monochromatic beam in front of the photomultiplier.

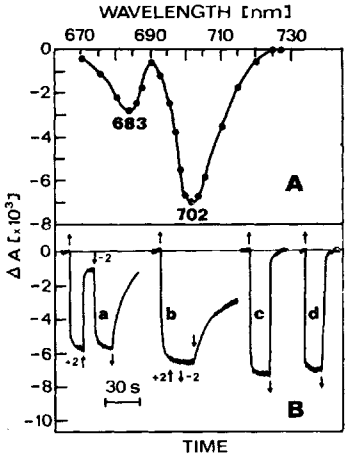


Fig. 1. *A* — Difference absorption spectrum of chloroplasts in the region of 670—730 nm (irradiance 1; 10^{-5} M DCMU, 2×10^{-4} M methyl viologen, and 2×10^{-3} M ascorbate). *B* — Kinetics of light-induced ΔA_{702} of chloroplasts in the presence of 10^{-4} M methyl viologen (*a*) and after the subsequent addition of 10^{-5} DCMU (*b*), DCMU and 2×10^{-3} M ascorbate (*c*), DCMU and 10^{-5} M PMS (*d*). Arrows ↑ and ↓ indicate the light switching on and off, respectively. Figures +2 and −2 near the arrows indicate the additional actinic irradiance 2 and its switching off.

It should be noted that the signal we measured at 702 nm was actually related to the absorption decrease due to P_{700} photooxidation. This is suggested by the pattern of the difference spectrum (Fig. 1*A*), the inhibitory effect of additional irradiance 2 (Fig. 1*B*, curve *a*), the lack of this effect in the presence of DCMU (curve *b*) as well as the acceleration of the dark recovery of ΔA_{702} after the addition of ascorbate or PMS (curves *c* and *d*). The recording of ΔA_{702} was not affected by ΔF of PS 2, since the enhancement of F after irradiance 2 should have simulated an increment of negative ΔA whereas irradiance 2 caused a decrement of the values of these ΔA_{702} related to the P_{700}^{+} photoreduction by PS 2.

The activity of PS 2 was assayed as the photoreduction rate of 2,6-dichlorophenol indophenol (DCIP) and that of PS 1 as the photooxidation rate of reduced DCIP (KE 1967). All determinations were carried out in a medium containing 0.015 M tris-HCl buffer (pH 7.8), 0.035 M NaCl and 0.002 M $MgCl_2$. The content of chlorophylls in the suspension of chloroplasts and fragments was 0.01 mg ml^{-1}, when measuring ΔF, DCIP photoreduction and DCIP-H_2 photooxidation, and 0.05 mg ml^{-1}, when measuring ΔA_{702}. The level at which F varies after the sample irradiance indicated the value of initial F.

RESULTS

Characteristics of chloroplast fragments

The fractions of the fragments we obtained differ greatly in their spectral properties. In the low-temperature spectrum of F of the heavy fraction one can easily discriminate in addition to F peaks at 685 nm ($F685$) and 735 nm ($F735$), another peak at 696 nm attributed to the emission of chlorophyll *a* of PS 2 (KREY and GOVINDJEE 1964) whereas this peak is absent from the spectrum

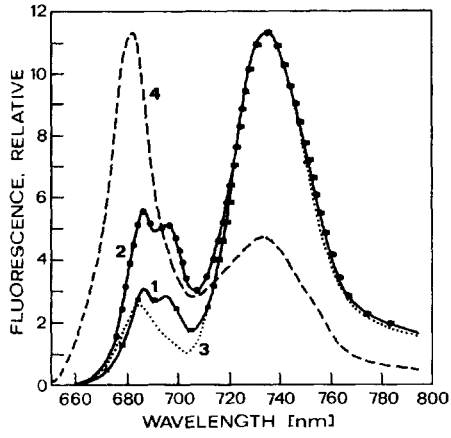


Fig. 2. Fluorescence spectra of chloroplasts (*1*), the 10 000 × *g* fraction (*2*), the 144 000 × *g* fraction (*3*), and the 144 000 × *g* supernatant fraction at liquid nitrogen temperature (*4*) (without corrections for the spectral sensitivity of the photomultiplier). Spectra *1*—*3* are standardized at 735 nm.

of F of the light fraction (Fig. 2). In the low temperature F spectrum the $F735/F685$ ratio of chloroplasts is 3.75, in the 10 000 × *g* fraction — 2.05 and in the 144 000 × *g* fraction — 4.7. In the 144 000 × *g* supernatant the short-wavelength peak of F is situated near 681 nm ($F681$) and the $F735/F681$ ratio is 0.41.

The resultant fractions differ substantially in the photochemical activity as well (Table 1). The rate of DCIP photooxidation in the 144 000 × *g* fraction is nearly by one order of magnitude higher than that of the 10 000 × *g* fraction. The capacity for DCIP photoreduction is significantly inhibited both in chloroplasts in the presence of digitonin and in isolated fractions. However, if in the 10 000 × *g* fraction this capacity increases substantially after the addition of hydroxylamine — an artificial donor of electrons of PS 2 (KATOH *et al.* 1970), then in the 144 000 × *g* fraction no photoreduction of DCIP occurs even in the presence of hydroxylamine. The ΔA_{702} value in the 144 000 × *g* fractions is 6× higher than in the 10 000 × *g* fraction. Thus, the data concerning the pigment composition and photochemical activity of the resultant fractions, according to ANDERSON and BOARDMAN (1966), indicate that the 144 000 × *g* fraction is really enriched in PS 1 whereas the 10 000 × *g* fraction is enriched in PS 2.

Capacity of chloroplast fragments for ΔF

Light induced ΔF are minimal in the 144 000 × *g* fraction, maximal in chloroplasts and significantly activated in the 10 000 × *g* fraction after the addition of hydroxylamine (Table 1). After irradiance of chloroplasts and their fragments in the presence of hydroxylamine F reaches the same maximum level (F_{max}) as in the presence of dithionite. In the presence of hydroxylamine ΔF of the 10 000 × *g* fraction is 100 × greater than that of the 144 000 × *g* fraction. The $\Delta F/F$ ratio is 7.0 in the 10 000 × *g* fraction and 0.1 in the 144 000 × *g* fraction. F_{max} of the 10 000 × *g* fraction is 11× higher than in the 144 000 × *g* fraction. It should be noted that ΔF is minimal in the 144 000 × *g* supernatant which is characterized by the highest F. Thus, the 10 000 × *g* fraction enriched in PS 2 has the most intense variable F value.

Table 1

The pigment composition, photochemical activity and values of F, ΔF, F_{max} and ΔA_{702} of chloroplasts and particles. — DCIP content in all experiments 2.5×10^{-5} M. Photooxidation rate of DCIP, reduced by 3×10^{-5} M ascorbate, was measured in the presence of 10^{-4} M methyl viologen and 10^{-5} M DCMU. F_{max} was measured in the presence of 0.5 mg ml^{-1} dithionite.

Sample	Chlorophyll a/b	A_{702} [$\times 10^3$]	DCIP-H_2 photooxidation [μmol mg^{-1} (chl) h^{-1}]	DCIP photoreduction [μmol mg^{-1} (chl) h^{-1}]		Values of F and ΔF				F_{max}
						$-NH_2OH$		+5 mM NH_2OH		
				$-NH_2OH$	+5 mM NH_2OH	F	ΔF	F	ΔF	
Chloroplasts	2.69	6.8	106	104	84	14.5	72	14.5	75	90
Chloroplasts + digitonin	2.61	7.0	98	28	76	21.0	28	21.0	63	86
Sediment 10 000 × g	2.07	3.2	15	40	128	17.5	33	18.0	126	145
Sediment 50 000 × g	2.98	12	48	0	16	13.0	4.5	13.5	11	26
Sediment 144 000 × g	4.69	19.5	136	0	0	12.0	1	12.0	1.1	13
Supernatant 144 000 × g	3.15	4.8	82	0	0	76.0	0.5	75.0	0.5	76

Kinetics of ΔF of chloroplast fragments

Fig. 3 presents the data on the effect of various agents upon the kinetics and value of ΔF of the heavy and light fractions. The addition of Na ascorbate as well as hydroxylamine to the 10 000 × *g* fraction activates *F* almost to F_{max} (Fig. 3, *top*, curves *2* and *3*). The half-time of dark recovery increases from 1.6 s to 9.4 and 8.8 s after the addition of hydroxylamine or ascorbate, respectively. The initial level of *F* remains unchanged after the addition of these agents and increases after the addition of DCMU to the level of close to F_{max} which is accompanied by a decrease of ΔF (curve *4*). ΔF of the 10 000 × *g* fraction is substantially inhibited after the addition of ferricyanide and

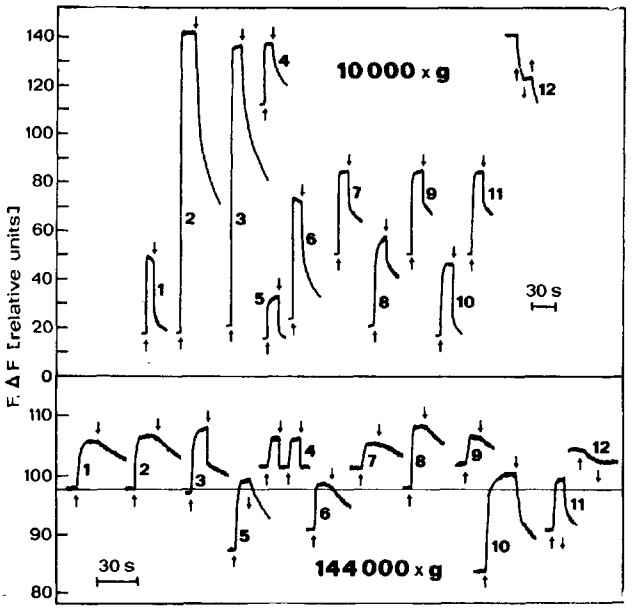


Fig. 3. Kinetics of ΔF after irradiance 2 of the 10 000 × *g* fraction (*top*) and the 144 000 × *g* fraction (*bottom*): without admixtures (*1*), in the presence of 5×10^{-3} M hydroxylamine (*2*), 2×10^{-3} M ascorbate (*3*), 2×10^{-3} M ascorbate and 10^{-5} M DCMU (*4*), 10^{-5} M ferricyanide (*5*), 10^{-5} M ferricyanide and 10^{-5} M DCMU (*6*), 10^{-5} M DCMU (*7*), 2×10^{-4} M methyl viologen (*8*), 2×10^{-4} M methyl viologen and 10^{-5} M DCMU (*9*), 10^{-5} M PMS (*10*), 10^{-5} M PMS and 10^{-5} M DCMU (*11*), 0.5 mg ml^{-1} dithionite (*12*). When measuring ΔF of the 144 000 × *g* fraction, an amplification that was 8× as high as in the 10 000 × *g* fraction was used.

then activated by DCMU (curves *5* and *6*), but does not decline in the presence of methyl viologen or PMS (curves *8* and *10*). The half-time of dark recovery of ΔF of the 10 000 × *g* fraction in the presence of ferricyanide is 0.4 s. The addition of dithionite brings about a dark increase of *F* to F_{max}; irradiance 2 induced an irreversible decrease of *F* (curve *12*), whereas irradiance 1 does not affect F_{max}.

Light induced ΔF of the 144 000 × *g* fraction (Fig. 3, bottom) are in part similar to ΔF of the 10 000 × *g* fraction. They decline after the addition of DCMU due to the growth of the initial *F* value; in the presence of dithionine *F* rises almost to $F + \Delta F$ (curve *12*). However, ΔF of light particles can be activated by hydroxylamine only by 10—20% and by ascorbate by 30—40% (curves *2* and *3*). The kinetics of ΔF recovery in the presence of ascorbate shows a fast component (with the half-time less than 1 s versus 30—40 s in the absence of ascorbate). This component

comprising up to 50% of the value of the total decline persists in the presence of DCMU (curve *4*). This agent added without ascorbate can only delay the recovery of ΔF (curve *7*).

The value of ΔF of the 144 000 × *g* fraction increases upon the addition of ferricyanide (10^{-5} M), methyl viologen (10^{-4} M) and PMS (10^{-5} M) (curves *5*, *8*, and *10*). The half-time of dark recovery of ΔF decreases about two-fold after the addition of ferricyanide, ten-fold after the addition of PMS and remains almost unaltered after the addition of methyl viologen. The addition of PMS causes a significant decrease of *F*, this being particularly large after the addition of PMS and 10^{-4} M ascorbate. The subsequent addition of ferricyanide at a concentration sufficient to oxidate ascorbate enhances *F* and ΔF almost to the level recorded after the addition of PMS alone. On the other hand, ΔF of the 144 000 × *g* fraction declines more than twice after the addition of 5×10^{-4} M ferricyanide.

Kinetics of photoinduced ΔA_{702}

The above described properties of ΔF of the 144 000 × *g* fraction are also typical of ΔA_{702} of this fraction (Fig. 4). Hydroxylamine does not practically affect the value and time of the dark recovery of ΔA_{702} (curve *2*), whereas addition of ascorbate enhances ΔA_{702} and reduces the half-time of dark recovery from 100—120 s to 1 s or less (curve *3*). A rise of ΔA_{702} also takes place after the addition of 10^{-4} M methyl viologen (curve *6*) or 10^{-5} M ferricyanide (curve *4*), however, the time of the recovery changes little in these cases. After the addition of ferricyanide at a concentration over 5×10^{-4} M ΔA_{702} disappears (curve *5*). Methyl viologen and ascorbate added together activate ΔA_{702} to a higher extent than each of them taken separately (curve *7*). The addition of PMS causes the activation of ΔA_{702} as well (curve *8*). At the same time the addition of PMS in combination with ascorbate decreases ΔA_{702} (curve *9*). The addition of DCMU does not influence ΔA_{702} of the 144 000 × *g* fraction.

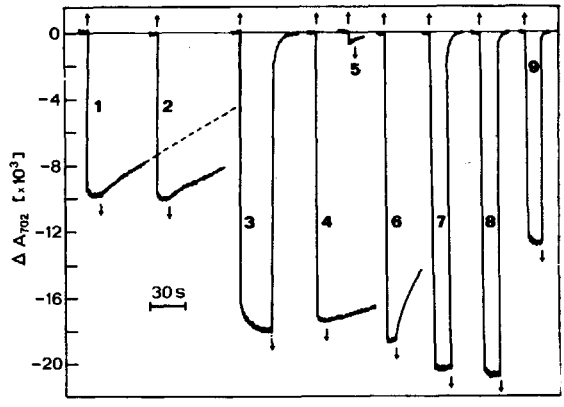


Fig. 4. Kinetics of ΔA_{702} upon irradiance 2 of the 144 000 × *g* fraction: without additives (*1*), in the presence of 5×10^{-3} M hydroxylamine (*2*), 2×10^{-3} M ascorbate (*3*), 10^{-5} M ferricyanide (*4*), $5 \times$ $\times 10^{-4}$ M ferricyanide (*5*), 10^{-4} M methyl viologen (*6*), 10^{-4} M methyl viologen and $2 \times$ $\times 10^{-3}$ M ascorbate (*7*), 10^{-5} M PMS (*8*), 10^{-5} M PMS and 2×10^{-3} M ascorbate (*9*).

Interaction between ΔF and ΔA_{702} of the 144 000 x *g* fraction

With an increase of the PMS concentration to 5×10^{-6} M, ΔF and ΔA_{702} grew in parallel to reach a level that was twice as high as the initial one. At concentrations of more than 5×10^{-5} M PMS caused a decrease of both ΔF and ΔA_{702}. Besides, they were saturated at the same irradiance (Fig. 5). However, if the ΔA_{702}-irradiance dependence forms a monotonous curve, then the dependence of total ΔF can be characterized by a biphasic curve. This may be related to the occur-

rence of two components of ΔF which are saturated at different levels of irradiance. In the kinetics of ΔF of the light fraction we discriminated in the presence of PMS two components — fast and slow (Fig. 3, *bottom*, curve *10*). The dependence of the ΔF fast component and ΔA_{702} upon irradiance coincide, whereas the slow component is saturated at a far lower irradiance. Therefore, a linear relationship of the fast component of ΔF and ΔA_{702} of the 144 000 × *g* has been established in the presence of PMS at different levels of irradiance.

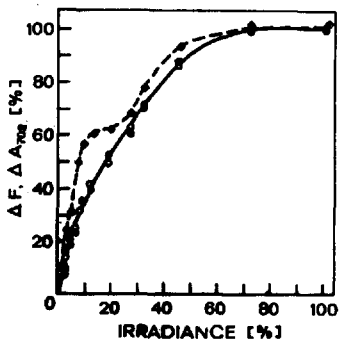


Fig. 5. Dependence of the values of light-induced ΔA_{702} (○——○), general ΔF (♦——♦) and fast component of ΔF (●——●) of the 144 000 × *g* fraction on irradiance in the presence of 10^{-5} M PMS.

DISCUSSION

The correlation of the capacity of chloroplast fragments for ΔF and their content of PS 2 convincingly proves that ΔF of chloroplasts is mainly related to the function of PS 2. This is also indicated by a ΔF decrease after the addition of ferricyanide and the enhancement after a subsequent addition of DCMU, hydroxylamine activated F, dark enhancement of F in the presence of dithionite to F_{max}, as well as the acceleration of the ΔF recovery after the addition of ferricyanide and its delay in the presence of ascorbate or hydroxylamine. ΔF of light fragments show a somewhat similar behaviour, suggesting that these ΔF occur due to PS 2 contamination. However, the acceleration of the dark recovery of ΔF after the addition of ascorbate along with the enhancement of light-induced ΔF after the addition of PMS or methyl viologen give evidence that these ΔF are in part associated with ΔF of PS 1 itself. This suggestion finds support in a similar effect of the above compounds on ΔF and ΔA_{702} of the 144 000 × *g* fraction. It should be noted that we found these ΔF of PS 1 because we achieved a substantial decline of ΔF of PS 2 by physical separation of the two photosystems.

The enhancement of light-induced ΔA_{702} and ΔF of light particles after the addition of PMS seems to be brought about by stimulation of the cyclic electron flow by PS 1 (VERNON and KE 1966). Oxidized PMS acts as an artificial electron acceptor of PS 1. Reduced PMS may donate electrons to PS 1, contributing to an accumulation of dark-reduced P_{700} that can undergo oxidation after irradiance. In the presence of excessive ascorbate PMS reduces effectively photooxidized P_{700}, thus decreasing ΔA_{702}. It is possible that the activation of ΔF of the 144 000 × *g* fraction is related to the diminution of the initial level of F after the addition of PMS or ferricyanide. Reduced PMS quenches F of the light fraction since the quenching enhances after the addition of ascorbate and reverses after a subsequent addition of ferricyanide. This quenching may be caused by the photoreduction of oxidized P_{700}. However, the quenching does not develop in the presence of ascorbate alone which may activate light-induced ΔA_{702} and ΔF. It is very likely that the quenching of ΔF and the activation of ΔF and ΔA_{702} in the presence of PMS may be brought about by independent processes.

The similarity of ΔF and ΔA_{702} of the 144 000 × *g* fraction is particularly distinct with respect to their identical relationship to PMS concentrations and irradiance. The requirement for higher

irradiances to saturate ΔA_{702} and the fast component of ΔF as compared to the slow component of ΔF may be related to the stimulation of the cyclic electron flow of PS 1 in the presence of PMS. The proportionality between ΔF and ΔA_{702} gives evidence of the relationship between ΔF of chlorophyll *a* of PS 1 and phototransformation of P_{700}. The *F* yield of chlorophyll may increase due to the fact that oxidized P_{700} cannot act any longer as an energy trap for the electron excitation of bulk chlorophyll. Having in view the linear relationship between the fast component of ΔF and ΔA_{702} at different irradiances, a monocentral model of reaction centres of PS 1 has been proposed in the fragments tested, which is in agreement with JOLIOT *et al.* (1968).

REFERENCES

ANDERSON, J. M., BOARDMAN, N. K.: Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. — Biochim. biophys. Acta **112**: 403—421, 1966.

ARNON, D. I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. — Plant Physiol. **24**: 1—15, 1949.

BRIANTAIS, J.-M.: Séparation physique et arrangement mutuel des deux systèmes photochimiques des chloroplastes. — Physiol. vég. **7**: 135—180, 1969.

DUYSENS, L. N. M., SWEERS, H. E.: Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. — In: ASHIDA, J. (ed.): Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria. Pp. 353—372. Univ. Tokyo Press, Tokyo 1963.

JOLIOT, P., JOLIOT, A., KOK, B.: Analysis of the interactions between the two photosystems in isolated chloroplasts. — Biochim. biophys. Acta **153**: 635—652, 1968.

KARAPETYAN, N. V.: Light induced fluorescence changes of photosynthetizing organisms. — In: FORTI, G., AVRON, M., MELANDRI, A. (ed.): Photosynthesis, Two Centuries after Its Discovery by Joseph Priestley. Pp. 180—186. Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague 1972.

KARAPETYAN, N. V., KLIMOV, V. V.: Ustanovka dlya izmereniya kinetiki indutsirovannykh svetom izmenenii vykhoda fluorestsentsii u fotosinteziruyushchikh organizmov. [A device for measurements of the kinetics of the light-induced changes in fluorescence yield of photosynthetizing organisms.] — Fiziol. Rast. **18**: 223—228, 1971.

KARAPETYAN, N. V., KLIMOV, V. V.: Priroda obratimogo i neobratimogo umen'sheniya fluorestsentsii pri osveshchenii khloroplastov v vostanovitel'nykh usloviyakh. [The nature of reversible and irreversible decrease of fluorescence during chloroplast illumination under reductive conditions.] — Fiziol. Rast. **20**: 545—553, 1973.

KATOH, S., IKEGAMI, I., TAKAMIYA, A.: Effects of hydroxylamine on electron-transport system in chloroplasts. — Arch. Biochem. Biophys. **141**: 207—218, 1970.

KE, B.: Photoreduction sites for 2,6-dichlorophenolindophenol in chloroplasts. — Plant Physiol. **42**: 1310—1312, 1967.

KREY, A., GOVINDJEE: Fluorescence changes in *Porphyridium* exposed to green light of different intensity: a new emission band at 695 mμ and its significance to photosynthesis. — Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. **52**: 1568—1572, 1964.

PARK, R. B., STEINBACK, K. E., SANE, P. V.: Distribution of variable fluorescence among subchloroplasts fractions. — Biochim. biophys. Acta **253**: 204—207, 1971.

VERNON, L. P., KE, B.: Photochemistry of chlorophyll *in vivo*. — In: VERNON, L. P., SEELY, G. R. (ed.): The Chlorophylls. Pp. 569—607. Academic Press, New York—London 1966.

VREDENBERG, W. J., DUYSENS, L. N. M.: Light-induced changes in absorbancy and fluorescence of chlorophyllous pigments associated with pigment systems 1 and 2 in blue-green algae. — Biochim. biophys. Acta **94**: 355—370, 1965.

VREDENBERG, W. J., SLOOTEN, L.: Chlorophyll *a* fluorescence and photochemical activities of chloroplast fragments. — Biochim. biophys. Acta **143**: 583—594, 1967.

УДК 577.12

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТООКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *b* ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS*

Е. М. БОКУЧАВА, Н. Н. ДРОЗДОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследованы спектральные свойства и окислительно-восстановительные превращения бактериохлорофилла *b* под действием света в сравнении с бактериохлорофиллом *a*. Бактериохлорофилл *b* отличается чрезвычайной чувствительностью к кислороду и светолабильностью, что проявляется в быстром разложении пигмента с образованием хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения при 680 *нм*. Обнаружена способность бактериохлорофилла *b* вступать в реакции необратимого и обратимого фотоокисления. В отличие от бактериохлорофилла *a* при фотоокислении кислородом воздуха бактериохлорофилла *b* происходит образование зеленого продукта необратимого окисления наряду с продуктами обратимого окисления. Скорость фотоокисления бактериохлорофилла *b* гораздо выше, чем у бактериохлорофилла *a*; в противоположность бактериохлорофиллу *a*, вступающему в реакцию ступенчатого «двухэлектронного» фотоокисления *n*-бензохиноном с образованием хлорофилло- и протохлорофиллоподобных продуктов, этот пигмент в аналогичных условиях образует только соединение типа хлорофилла с максимумом поглощения при 680 *нм*, не подвергающееся дальнейшему окислению. При изучении фотоокисления бактериохлорофилла *b* *n*-бензохиноном в спирто-глицериновой среде при —70° наблюдали обратимые превращения пигмента, сопровождающиеся появлением полосы поглощения при 450 *нм*; фотопродукты активировались синим светом. Измерение окислительно-восстановительных фотопотенциалов в системе бактериохлорофилл *b* — убихиноном при 20° подтвердило способность бактериохлорофилла *b* к обратимой отдаче и принятию электрона в присутствии акцептора.

Недавно Аймеллен и Йенсен [1, 2] сообщили об открытии нового бактериального хлорофилла в группе пурпурных несерных бактерий. Новый вид фотосинтезирующих бактерий был идентифицирован ими как *Rhodopseudomonas species*, а пигмент, выделенный из клеток культуры, назван бактериохлорофиллом *b*. Изучение структуры клеток бактерий вида *R. spec.* показало [3], что независимо от возраста культуры главный максимум поглощения клеток лежит в области 1020 *нм*. Такое положение главного максимума поглощения является наиболее длинноволновым по сравнению с другими фотосинтезирующими бактериями. Эти же авторы, обобщая важнейшие морфологические и физиологические признаки, упорядочили таксономию данной культуры; бактерии определены как облигатные, анаэробные и фототрофные. В качестве видового наименования предложено *Rhodopseudomonas viridis*. Густая суспензия клеток обладает зеленой окраской, которая по мере старения культуры становится коричневой. Бактерии *Rhodopseudomonas viridis* обладают полосами поглощения при 400, 451, 483 и 1020 *нм* [3—6]. Опубликован ряд работ, посвященных некоторым первичным фотохимическим реакциям фотосинтезирующих бактерий нового типа и выделению их реакционного центра [7—9]. Холт и Клейтон [7] показали, что реакционный центр клеток *Rh. viridis* содержит P985, P830 и пигмент, поглощающий при 685 *нм*, появление которого связано с окислением бактериохлоро-

филла *b*. Бактериохлорофилл *b* как в органических растворах, так и в связанных структурах очень чувствителен к свету и кислороду [4], в связи с чем при выделении пигмена из клеток культуры необходимо соблюдать ряд предосторожностей [1—3], а именно: все растворители для экстракции и хроматографии насыщать сероводородом и все процедуры проводить по возможности в темноте при 0—5°.

Тем не менее при хроматографии смеси пигментов обычно получают две, иногда три нечетко отделенных друг от друга зоны зеленого цвета. Зона бактериохлорофилла *b* зеленовато-голубого оттенка, спектр поглощения эфирного раствора, соответствующий этой зоне, обладает максимумами при 407, 368 *нм* (линия Соре) и 794 *нм*. Спектр поглощения элюата в эфире, соответствующий травянисто-зеленой зоне на хроматограмме, имеет максимумы при 440 и 676—678 *нм* и представляет собой продукт разложения бактериохлорофилла *b*, которое объясняется неизбежным действием света во время выделения [1—4]. На необычайную чувствительность к свету и кислороду бактериохлорофилла *b* в растворах указывается во всех работах, в которых проводилось выделение чистого пигмента из бактериальных клеток. Аймеллен и Йенсен [1] наблюдали даже разложение бактериохлорофилла *b* непосредственно в спектрофотометре во время регистрации спектра поглощения, которое сопровождалось уменьшением пика при 794 *нм* и увеличением поглощения при 675 *нм*. Таким образом, бактериохлорофилл *b* существенно отличается от всех известных бактериальных хлорофиллов. Химическая структура данного бактериохлорофилла неизвестна [4], и в литературе полностью отсутствуют сведения о фотохимических свойствах этого нового пигмента в противоположность достаточно хорошо изученному в нашей лаборатории бактериохлорофиллу *a*.

Настоящая работа посвящена выделению, спектральной характеристике нового бактериального хлорофилла и изучению фотохимических окислительных превращений бактериохлорофилла *b* по сравнению с уже известной способностью к фотоокислению бактериохлорофилла *a*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штамм *R. viridis*, любезно предоставленный нам Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской (кафедра микробиологии МГУ). Среда для выращивания культуры включала 0,5%-ный дрожжевой экстракт, 0,5%-ный $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15%-ный сукцинат Na в 0,01 *М* фосфатном буфере, pH 6,8—7,2. Культура росла в световом блоке (1000 *лк*) при 25—28°. Клетки культуры собирали центрифугированием. Клетки *R. viridis*, промытые в 0,01 *М* фосфатном буфере, обладали максимумами поглощения при 400, 451, 485 и 1020 *нм*, что соответствует литературным данным [3—5].

Для выделения пигментов использовали методику, принятую в нашей лаборатории для получения бактериохлорофилла *a*, но видоизмененную с учетом большой чувствительности к свету и кислороду воздуха бактериохлорофилла *b*. Клетки культуры растирали с тальком и экстрагировали пигменты метанолом (перегнанным и содержащим некоторое количество Na_2S, pH 7) при 0°. Пигменты переводили из метанола в серный эфир (свободный от перекисей) при добавлении 10%-ного водного раствора NaCl. После 3-кратного промывания водным раствором эфирный экстракт пигментов сушили Na_2SO_4 (безводным, прокаленным) и концентрировали в вакууме при комнатной температуре. Хроматографию проводили на колонках с сахарозой, используя смесь серный эфир: гексан (1 : 4). При хроматографии получали обычно две зеленых зоны хлорофиллов, нечетко отделенных друг от друга [1, 3, 4], из которых первая, сине-зеленая, состояла в основном из бактериохлорофилла *b* (главный максимум 795 *нм*), а вторая, травянисто-зеленая, принадлежала продукту окисления пигмента с максимумами поглощения при 440 и 676 *нм*.

На рис. 1 представлены спектры поглощения и флуоресценции бактериохлорофилла *b* и продукта его окисления. Все процедуры по выделению проводили при затемнении комнаты и по возможности быстро. Для работы использовали зону, содержащую бактериохлорофилл *b*, и хранили пигмент на сахарозе в вакууме, элюируя его серным эфиром непосредственно перед опытом. В качестве растворителей использовали перегнанные ацетон (х. ч.), этиловый спирт (ректификат), толуол (ос. ч., стинтилляционный), глицерин (ч. д. а.).

Освещение растворов производили красным светом киноламы 300 *вт* через конденсор и светофильтр КС-19, пропускающий свет с длиной волны больше 700 *нм*. Интен-

сивность света в большинстве опытов 10^5 *эрг/см²/сек*. При освещении растворов синим светом использовали осветитель ОИ-18 (линии возбуждения ртутной лампы 404 и 436 *нм*) с фильтрами ФС-1, БС-8 и СЗС-7. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-14, приспособленном для измерения спектров в близкой инфракрасной области (до 900 *нм*). Спектры поглощения измеряли при +20° и —70°; в последнем случае трубку с раствором помещали в прозрачный сосуд Дьюара, содержащий смесь спирта с углекислотой и закрепленный непосредственно в колодке спектрофотометра. Осветитель был закреплен на подставке к спектрофотометру и свет сфо-

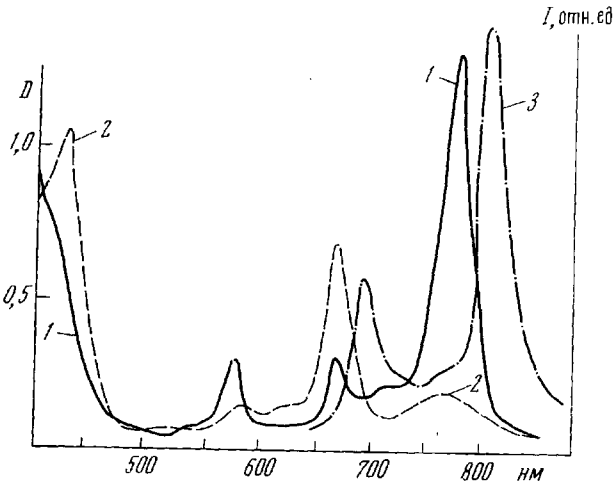


Рис. 1. Спектры поглощения (*1*, *2*) и флуоресценции (*3*) бактериохлорофилла *b* и продукта его разложения, полученных при хроматографии

1 — бактериохлорофилл *b* в серном эфире; *2* — продукт его разложения в серном эфире; *3* — бактериохлорофилл *b* в серном эфире, —196°

кусирован через водяной фильтр на образец, находящийся в колодке спектрофотометра. Для возбуждения флуоресценции использовали лампу ДРШ-250 со светофильтрами С-3, СЗС-13 и УФС-2, выделяющими линии ртути 365 и 404 *нм*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Необратимое фотохимическое окисление бактериохлорофилла

Кислород. Фотохимическое окисление бактериохлорофилла *b* кислородом воздуха в спирте, толуоле и ацетоне исследовали при +20 и —70°. Полученные данные сравнивали с данными по фотоокислению бактериохлорофилла *a* кислородом, полученными ранее [10—13]. За 25—30 *сек* освещения наблюдали падение поглощения в области главного максимума и появление новых полос в области 440, 500—600 и 680 *нм*. При добавлении 10—15 *мг* аскорбиновой кислоты происходила темновая регенерация исходного бактериохлорофилла (до 30—40%) и одновременное увеличение поглощения при 440 и 680 *нм*. Соответствующие спектральные изменения представлены на рис. 2. Фотоокисление бактериохлорофилла *a* в этих же условиях происходит в 2—3 раза медленнее с образованием продуктов, поглощающи хпри 430, 550—700 *нм*. Регенерация исходного пигмента в случае бактериохлорофилла *a* более полная (80%). Образования продукта необратимого окисления, поглощающего при 680 *нм*, здесь не происходит. Очевидно, глубина обратной реакции зависит от присутствия образовавшегося в прямой реакции хлорофиллоподобного продукта; чем больше накопление этого соединения в реакционной смеси, тем меньше обратимость реакции.

Контрольные опыты без кислорода показали, что бактериохлорофилл *b* устойчив при освещении в спирте, ацетоне и толуоле.

***о*-Бензохинон.** Окисление свежеприготовленным раствором *о*-хинона проводили в ацетоне и толуоле при +20 и —70° по методике, описанной ранее для бактериохлорофилла *а* [14, 15]. *о*-Хинон получали непосредственно перед опытом в головке вакуумной трубки Тунберга при взаимодействии окиси серебра и пирокатехина, растворенного в соответствующем растворителе. При концентрации *о*-хинона $2 \cdot 10^{-4}$ *М* темнового окисления бактериохлорофилла *b* в ацетоне при +20° не происходило. Освещение реакционной смеси в течение 25—30 *сек* приводило к полному исчезновению главного максимума при 795 *нм* и появлению полос поглощения при 440 и 680 *нм*; весь бактериохлорофилл *b* превращался

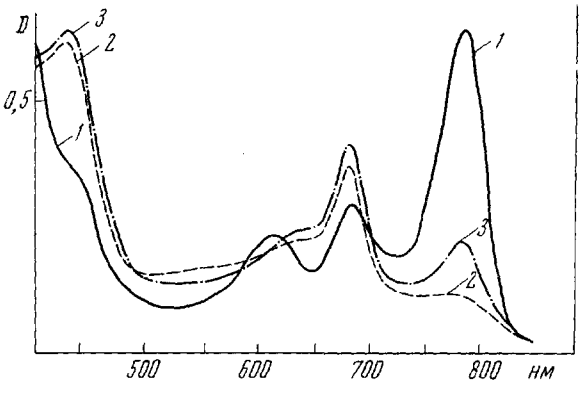


Рис. 2. Фотохимическое окисление бактериохлорофилла *b* кислородом воздуха в спирте при 20°

1 — исходный спектр; *2* — после освещения в течение 30 *сек*; *3* — после добавления 15 *мг* аскорбиновой кислоты и стояния в темноте в течение 30 *мин*

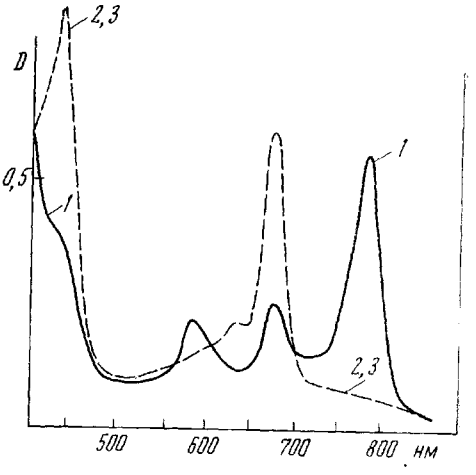


Рис. 3. Необратимое фотохимическое окисление бактериохлорофилла *b* *о*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*) в ацетоне при +20°

1 — исходный спектр; *2* — после освещения в течение 30 *сек*; *3* — после стояния в темноте

в хлорофиллоподобный продукт (рис. 3). Бактериохлорофилл *а* окисляется в этих же условиях очень медленно; за 40 *мин* освещения удается наблюдать незначительное образование продукта, поглощающего при 680 *нм*. В случае проведения этой реакции при низкой температуре (—70°) обратимых изменений в максимуме бактериохлорофилла *b* мы не обнаружили. Даже в этих условиях происходило необратимое окисление исходного пигмента, но с меньшей скоростью. Эти результаты противоположны данным по фотоокислению бактериохлорофилла *а* *о*-хиноном при —70° [14], где наблюдали четкое обратимое взаимодействие пигмента с окислителем. При использовании толуола в качестве растворителя *о*-хинона и в концентрациях от 10^{-3} до 10^{-5} *М* происходило мгновенное окисление пигмента в темноте с изменением исходного спектра поглощения: главный максимум поглощения полностью исчезал и появлялись полосы поглощения при 440 и 680 *нм*, соответствующие зеленому хлорофиллоподобному продукту необратимого окисления. Других новых максимумов в спектрах поглощения и флуоресценции обнаружить не удалось. Хлорофиллоподобный продукт, образующийся в этой реакции, обладает интенсивной флуоресценцией при 695 *нм*. Освещение в максимуме этого соединения (через светофильтр КС-17, $\lambda > 670$ *нм*) не привело к спектральным изменениям. Этот продукт очень стабилен. Несмотря на почти полную идентичность спектров поглощения и флуоресценции фотопродукта, поглощающего при 680—685 *нм*, свойства этого соединения, образующегося при фотоокислении бактериохлорофилла *b*, отличаются от свойств соответствующего продукта окисления бактерио-

хлорофилла *a*, который подвергается дальнейшему окислению с образованием продукта, являющегося аналогом протохлорофилла.

Согласно механизму этой реакции, предложенному ранее [14, 15] для бактериохлорофилла *a*, образование первого фотопродукта (типа хлорофилла) сопровождается отнятием двух атомов водорода в положении 3, 4, а последующий отрыв еще двух водородных атомов в положении 7, 8 приводит к превращению этого продукта в соединение типа протохлорофилла.

***n*-Бензохинон.** Необратимое окисление растворов бактериохлорофилла *b* *n*-хиноном мы наблюдали в ацетоне и толуоле при +20° в анаэробных условиях. При концентрации *n*-хинона ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*) в темноте реакция практически не идет. За 30 *сек* освещения весь бактериохлорофилл *b* превращался в продукт, поглощающий при 680 *нм* (максимум в синей области спектра при 440 *нм*). Спектры поглощения и флуоресценции

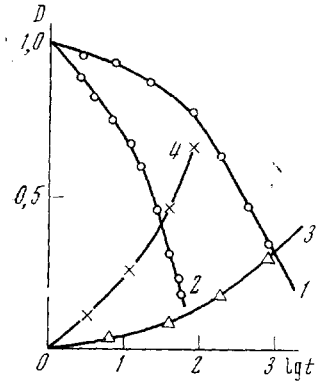


Рис. 4. Скорости фотоокисления бактериохлорофиллов *a* и *b* *n*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*) в ацетоне при 20° и образования хлорофиллоподобного продукта. Изменение оптической плотности в главных максимумах поглощения пигментов при 770 и 795 *нм* и в полосе поглощения при 680 *нм*

1 — бактериохлорофилл *a*; *2* — бактериохлорофилл *b*; *3* — хлорофиллоподобный продукт, образующийся при фотоокислении бактериохлорофилла *a*; *4* — хлорофиллоподобный продукт, образующийся при фотоокислении бактериохлорофилла *b*

этого соединения совпадают со спектральными характеристиками продукта необратимого окисления бактериохлорофилла *b* *o*-хиноном, приведенными на рис. 3. Эта же реакция с бактериохлорофиллом *a* наблюдалась при очень длительном освещении (25—30 *мин*), и окисление пигмента было не полное. На рис. 4 приведено сравнение скоростей фотоокисления бактериохлорофиллов *a* и *b* в этих условиях и образования хлорофиллоподобного продукта в ходе реакции. Так как скорость фотоокисления бактериохлорофилла *b* неизмеримо выше, чем бактериохлорофилла *a*, масштаб времени дан в логарифмическом выражении. В толуоле бактериохлорофилл *a* практически не окислялся, в то время как реакция с бактериохлорофиллом *b* шла, но не так глубоко, как в ацетоне. Изменение температурных условий и освещение растворов бактериохлорофилла *a* с *n*-бензохиноном в ацетоне при —70° приводило к обратимому, «одноэлектронному» фотопроцессу, сопровождающемуся появлением промежуточного продукта с поглощением при 430 *нм* [14]. В случае бактериохлорофилла *b* проведение данной реакции при —70° не давало обратимых эффектов. В этих условиях, как и при комнатной температуре, реакция шла с образованием продукта необратимого окисления, но с меньшей скоростью.

Таким образом, исследование необратимого фотоокисления бактериохлорофилла *b* *o*- и *n*-бензохинонами показало, что в тех условиях, где реакция с бактериохлорофиллом *a* не идет или идет очень медленно, бактериохлорофилл *b* проявляет значительную реакционную способность; в продуктах реакции наблюдаются существенные различия.

Обратимое фотохимическое окисление бактериохлорофилла *b*

В работах нашей лаборатории, посвященных обратимым взаимодействиям бактериохлорофилла *a* с акцепторами электрона под действием света, было показано [16—18], что пигмент вступает в обратимую фото-

химическую реакцию с хинонами, убихинонами и кислородом в определенных условиях; при этом осуществлялся обратимый «одноэлектронный» фотопроцесс, сопровождающийся появлением лабильной окисленной формы пигмента с максимумом поглощения при 430 *нм*. Трудность изучения способности бактериохлорофилла *b* к обратимым окислительно-восстановительным превращениям заключается в том, чтобы исключить возможность светового образования продукта необратимого окисления, который в некотором количестве всегда содержится в исходном растворе бактериохлорофилла *b*. Сравнительное изучение обратимых окислительных превращений исследуемых пигментов показало, что в то

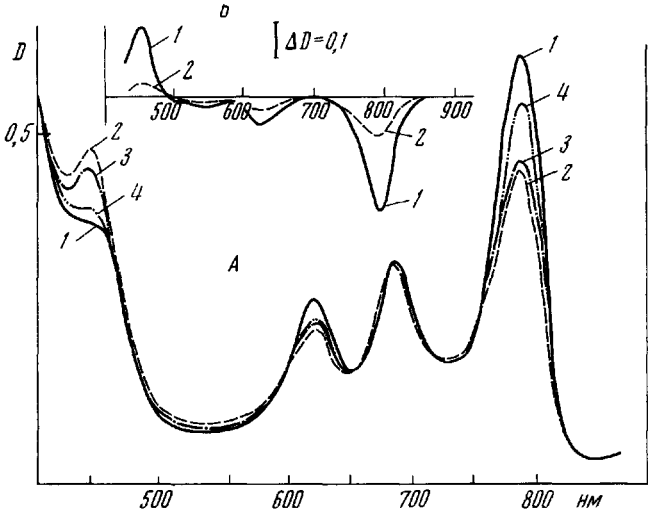


Рис. 5. Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла *b* *n*-бензохиноном (10^{-7} *M*) при —70° в спирто-глицериновой среде (*А*) и дифференциальные спектры (*Б*)

А: *1* — исходный спектр; *2* — после освещения красным светом в течение 3 *мин*; *3* — после стояния в темноте при —70° в течение 10 *мин*; *4* — после освещения синим светом в течение 2 *мин*. *Б*: *1*—(*2*—*1*); *2*—(*4*—*3*)

время как обратимое окисление бактериохлорофилла *a* *о*- и *n*-бензохинонами наблюдалось при низких температурах в ацетоне, бактериохлорофилл *b* в этих же условиях медленно окислялся с образованием продукта необратимого окисления типа хлорофилла. Нам удалось подавить склонность бактериохлорофилла *b* к быстрому необратимому окислению путем проведения реакции в вязких средах при низкой температуре. Только в этих условиях мы наблюдали спектрофотометрически обратимые взаимодействия пигмента с окислителем (*n*-бензохинон).

Реакцию проводили в смеси этилового спирта с pH 5,6 и глицерина при их объемном соотношении 2,5 : 1,5. В этой среде пигмент находится в мономерной форме с максимумом поглощения при 795 *нм*. После проведения реакции проверяли значение pH реакционной смеси. Хорошая обратимость наблюдалась только в тех опытах, где значение pH не превышало 7,0—7,2. В темноте не происходило взаимодействия между пигментом и окислителем, которое наблюдалось после освещения и сопровождалось падением главного максимума поглощения бактериохлорофилла *b* и появлением новой полосы поглощения при 450 *нм*. Никаких изменений поглощения при 680 *нм* при этом не происходило. После выключения света обратная реакция шла очень медленно, однако она значительно ускорялась под действием синего света (рис. 5); очевидно, происходила активация продукта фотоокисления, поглощающего в синей области спектра [19]. На рис. 6 приведено изменение оптической плот-

ности в максимумах поглощения бактериохлорофилла *b* и продукта обратимого окисления, отражающее действие синего света на обратную реакцию.

Результаты спектрофотометрических измерений подтверждаются изменениями окислительно-восстановительного фотопотенциала под действием света при обратимом фотоокислении бактериохлорофилла *b*. Обратимые изменения фотопотенциала наблюдались в системе бактериохлорофилл *b* — убихинон в спирте с глицерином при +20°. Из рис. 7, *А* видно, что освещение этой системы красным светом ($\lambda > 700$ *нм*) приводило к появлению положительного фотопотенциала, свидетельствующего о вероятном образовании катион-радикала пигмента при взаимодействии его с окислителем. При выключении света наблюдалась обратная реакция. Параллельные измерения спектров поглощения показали, что наряду с обратимым фотоокислением и образованием лабильной формы пигмента происходит и необратимое образование хлорофиллоподобного продукта, поглощающего при 680 *нм*. Этим, очевидно, и можно объяснить постепенное уменьшение величины ΔE в потенциометрических опытах. По мере того как изменение фотопотенциала системы уменьшалось (при последовательном включении и выключении света), в системе происходило накопление параллельно образующегося стабильного хлорофиллоподобного соединения. Можно было ожидать, что этот продукт реакции также способен к обратимому взаимодействию с акцептором электрона. Для проверки этого предположения мы провели следующий опыт: освещая систему бактериохлорофилл *b* — убихинон в максимуме поглощения бактериохлорофилла *b*, мы получили окисленный устойчивый продукт реакции, а затем освещали красным светом в максимуме этого соединения, но изменения потенциала не наблюдали. Мы объяснили это тем, что величина окислительно-восстановительного потенциала убихинона ($E_0 = +0{,}122$ *в*) недостаточна для окисления хлорофиллоподобного продукта, и для проверки этого предположения провели опыты с *n*-бензохиноном в качестве окислителя ($E = +0{,}3$ *в*). При этом мы наблюдали быстрое изменение фотопотенциала в положительную сторону, обратимое в темноте (рис. 7, *Б*). Таким образом, фотопотенциометрические исследования подтвердили результаты спектральных изменений, свидетельствующих о том, что бактериохлорофилл *b* и хлорофиллоподобный продукт, образующийся в результате его окисления, способны к обратимым взаимодействиям с акцепторами электрона.

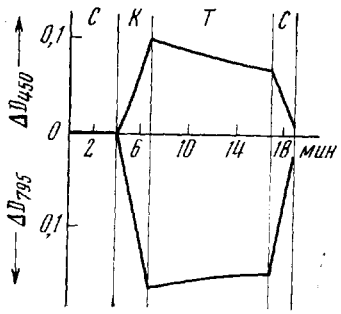


Рис. 6. Действие синего света на обратную реакцию после фотоокисления бактериохлорофилла *b* *n*-бензохиноном

К — красный свет; *С* — синий свет; *Т* — темнота

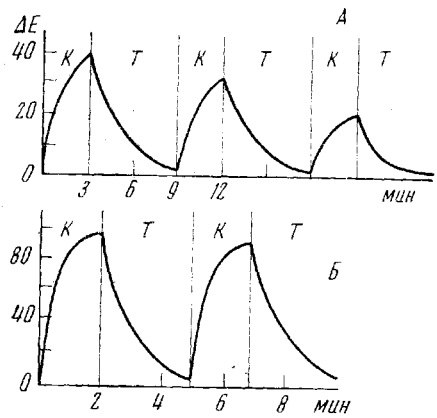


Рис. 7. Изменения фотопотенциала в системах А и Б

А: бактериохлорофилл *b* — убихинон при освещении красным светом $\lambda > 700$ *нм*; бактериохлорофилл *b* (10^{-5} *М*), убихинон (10^{-3} *М*), спирт: глицерин 2,5 : 1,5, pH 5,7. *Б* — хлорофиллоподобный продукт окисления бактериохлорофилла *b* — *n*-бензохинон при освещении красным светом $\lambda > 650$ *нм* в спирте, pH 5,6; *n*-бензохинон (10^{-3} *М*)

Агрегированные формы бактериохлорофилла *b* в вязких средах

В работах нашей лаборатории было установлено, что бактериохлорофилл *a* обладает способностью образовывать в вязких средах при увеличении концентрации глицерина до 90% агрегированные формы, которые обладают фотохимической активностью. При этом были получены две формы этого пигмента с максимумами поглощения при 790 и 850 *нм* [20]. Нам представлялось интересным проверить способность к агрегации в соответствующих условиях бактериохлорофилла *b*, который в клетках бактерий обладает лишь одним максимумом поглощения при 1020 *нм*. Бактериохлорофилл *b* находился в мономерной форме в смеси этилового спирта и глицерина при их соотношении по объему 3 : 7. При увеличении количества глицерина до 90% происходила агрегация пигмента с образованием длинноволновой формы, поглощающей при 875 *нм* (рис. 8); аналогичную форму мы получили при испарении эфирного раствора бактериохлорофилла *b*. Охлаждение раствора до —70° приводило к значительному росту этого максимума и некоторому сдвигу его в длинноволновую область (до 880 *нм*). Измерение спектра флуоресценции при +20° показало наличие максимумов при 700 и 820 *нм*, характерных для растворенного пигмента (первый максимум соответствует продукту окисления бактериохлорофилла *b*, содержащемуся в некотором количестве в исходном растворе пигмента). Мы исследовали способность длинноволновой формы бактериохлорофилла *b* к фотоокислению кислородом воздуха. При освещении реакционной смеси при +20° происходило медленное (в течение 20—25 *мин*) увеличение поглощения при 690 *нм* и появление полосы поглощения при 450 *нм* при одновременном уменьшении главного максимума поглощения пигмента. Нужно отметить, что мы не исключаем возможность световой дезагрегаци длинноволновой формы пигмента, предшествующей фотоокислению кислородом. При низкой температуре (—70°) реакция шла еще медленнее. Таким образом, независимо от формы нахождения пигмента в растворе — мономерной или агрегированной — при фотоокислении бактериохлорофилла *b* кислородом воздуха образуется дается при фотоокислении бактериохлорофилла *a* в аналогичных условиях.

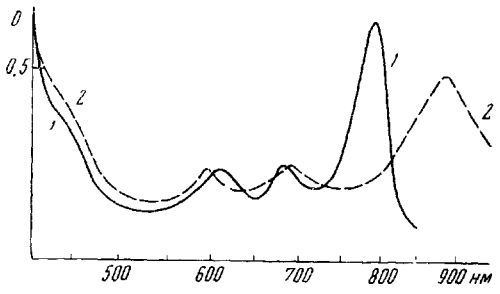


Рис. 8. Спектры поглощения мономерной (*1*) и агрегированной (*2*) форм бактериохлорофилла *b*

1 — в спирте; *2* — в спирте с глицерином в соотношении по объему 1 : 9

Таким образом, сравнение исследованных свойств бактериохлорофиллов *a* и *b* на основе изложенного экспериментального материала позволяет заключить, что эти бактериальные пигменты обладают как рядом общих фотохимических свойств, так и существенным различием в реакционной способности, обусловленным чрезвычайной лабильностью и склонностью к фотоокислению бактериохлорофилла *b*.

Приносим глубокую благодарность Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской за предоставление исходной культуры *Rhodopseudomonas viridis* и ценные советы при выращивании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eimhellen K., Aasmundrud O., Jensen A., Biochem. and Biophys. Res. Communs, **10**, 232, 1963

2. Jensen A., Aasmundrud O., Eimhellen K., Biochim. et biophys. acta, **88**, 466, 1964
3. Drews G., Giesbrecht P., Arch. Mikrobiol., **52**, 242, 1965
4. Drews G., Giesbrecht P., Arch. Mikrobiol., **53**, 255, 1966
5. Drews G., Giesbrecht P., Arch. Mikrobiol., **55**, 91, 1966
6. Giesbrecht P., Drews G., Arch. Mikrobiol., **54**, 296, 1966
7. Holt A., Clayton R., Photochem. Photobiol., **4**, 829, 1965
8. Thornber J., Olson J., Photochem. Photobiol., **14**, 329, 1971
9. Thornber J., Olson J., Clayton R., Biochim. et biophys. acta, **172**, 351, **1969**
10. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР, **81**, 879, 1951
11. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Сапожникова И. М., Докл. АН СССР, **172**, 727, 1967
12. Goedheer J., Biochim. et biophys. acta, **27**, 478, 1958
13. Goedheer J., Bacterial Photosynthesis, Yellow Springs, Ohio, p. 397, 1963
14. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Сапожникова И. М., Докл. АН СССР, **177**, 1225, 1967
15. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Бокучава Е. М., Докл. АН СССР, **190**, 464, 1970
16. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР, **150**, 1378, 1963
17. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР, **158**, 730, 1964
18. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, **30**, 605, 1965
19. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Докл. АН СССР, **188**, 1384, **1969**
20. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Докл. АН СССР, **195**, 1222, 1970

Поступила в редакцию
27.VII.1972

STUDY OF PHOTOOXIDATION OF BACTERIOCHLOROPHYLL *B* FROM PHOTOSYNTHETIC BACTERIA *RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS*

E. M. BOKUCHAVA, N. N. DROZDOVA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Spectral changes in light-induced oxidation-reduction of bacteriochlorophyll *b* were studied and compared with those of bacteriochlorophyll *a*. Bacteriochlorophyll *b* was found to be extremely sensitive to oxygen and light, which resulted in the rapid pigment degradation and the formation of the chlorophyll-like product with absorption maximum at 680 *nm*. Bacteriochlorophyll *b* was capable to undergo reversible and irreversible photooxidation. Inlike bacteriochlorophyll *a*, photooxidation of bacteriochlorophyll *b* by air oxygen resulted in the formation of both a green product of irreversible oxidation and products of reversible oxidation. The oxidation rate of bacteriochlorophyll *b* was considerably higher than that of bacteriochlorophyll *a*. In contrast to bacteriochlorophyll a which forms chlorophyll- and protochlorophyll-like products in the reaction of stepwise «two-electron» photooxidation by *p*-benzoquinone, bacteriochlorophyll *b* forms in this reaction only chlorophyll-like product with the absorption maximum at 680 *nm*. Reversible transformation of bacteriochlorophyll *b*, accompanied by the appearance of the absorption band at 450 *nm*, was observed under photooxidation by *p*-benzoquinone in alcohol-glycerol medium at —70° C. The photoproducts were activated by blue light. Measurements of oxidation-reduction potentials by illumination of bacteriochlorophyll *b* – ubiquinone system at +20° C verified the capacity of bacteriochlorophyll *b* to reversible donation of electron in the presence of electron acceptor molecules.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 8 1974 Вып. 5

УДК 547.963

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ФОТОХИМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ДЕНАТУРАЦИИ АЛЛОФИКОЦИАНИНА СИНЕ-ЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Л. Г. ЕРОХИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пущино, Московской области, Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Из культуры сине-зеленых водорослей *Anacystis nidulans* выделены фикобилиновые пигменты — аллофикоцианин (АФЦ) и фикоцианин (ФЦ). В 0,5 *М* растворах мочевины и в 4—8%-ных растворах этанола обнаружено превращение молекул АФЦ в пигмент, спектральные и фотохимические свойства которого идентичны ФЦ. При этих условиях денатурации методом электрофореза в полиакриламидном геле показана диссоциация АФЦ по крайней мере на два типа субъединиц, одни из которых по электрофоретической подвижности подобны ФЦ, выделямому из этой же культуры водорослей. Обнаружено, что АФЦ, так же как и ФЦ, слабо взаимодействует с молекулами-тушителями флуоресценции, устойчив к деструктивному фотоокислению и практически неактивен в реакции фотосенсибилизированного восстановления метилового красного.

Фикобилиновые пигменты водорослей играют важную роль в фотосинтезе этих организмов, обеспечивая эффективное использование спектральной области излучения солнца и доставку поглощенной энергии к фотохимически активным молекулам хлорофилла в реакционном центре.

Одним из мало изученных представителей этих пигментов является АФЦ, обладающий наиболее длинноволновым поглощением среди всех других фикобилинов [1]. Для выяснения происхождения полос поглощения и флуоресценции фикоэритрина и ФЦ ранее нами были исследованы изменения спектров поглощения и флуоресценции при различных типах денатурации [2—5]. В настоящей работе этот подход используется для выяснения связи между структурными и спектральными особенностями АФЦ.

МЕТОДИКА

Водоросли выращивали по методу Семененко и Владимировой [6]. Были использованы две среды: Тамийя (с заменой KNO_3 на $NaNO_3$) и Кратца—Майерса *D* [7]. Выделение АФЦ проводили аналогично методу выделения ФЦ, описанному в работе [5]. Обычно использовали растворы АФЦ в 0,01 *М* фосфатном буфере, pH 6,0—6,5. Оптическая плотность (*A*) в максимуме поглощения АФЦ не превышала 0,1—0,15, что соответствовало концентрации белка 0,01—0,02 *мг/мл*. Условия денатурации описаны в работах [2, 5]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах СФ-14 и «Specord uv vis», спектры флуоресценции — на спектрофлуорометре, собранном на основе двух зеркальных монохроматоров SPM-2 в оптическом кабинете Института фотосинтеза АН СССР. Измерения кругового дихроизма проводили на спектрополяриметре

ORD-UV-5 в 2 *см* кювете при 25°. Для разделения растворов АФЦ и ФЦ методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле разделяющий гель готовили по методу Вебера и Осборна [8].

Определение молекулярных весов АФЦ и ФЦ проводили методом гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-200 согласно методике Детермана [9]. На колонку наносили раствор, состоящий из равных объемов декстрана, *R*-фикоэритрина и отдиализованного от солей аммония грубого экстракта из исследуемых водорослей. *R*-фикоэритрин из красных водорослей *Callithamnion rubosum* с мол. весом 2,9—3,0·10^5 [10] использовали как контроль для определения точности.

Для тушения флуоресценции растворов АФЦ и ФЦ был выбран окислитель — *n*-бензохинон, использованный нами для изучения тушения флуоресценции фикоэритрина и ФЦ [3, 5]. Для исследования тушения в растворы АФЦ с оптической плотностью в максимуме поглощения (654 *нм*) ~0,1, что соответствовало концентрации белка ~0,01—0,02 *мг/мл*, добавляли *n*-бензохинон в концентрации 5·(10^{-7}—10^{-5}) *М*. Степень тушения выражали отношением начальной интенсивности флуоресценции (Φ_0) и интенсивности в присутствии тушителя (Φ).

При исследовании фотоокисления использовали две лампы накаливания по 750 *вт*, расположенные на расстоянии 40—45 *см* от объекта. Освещение вели в термостатируемых условиях при 20°. Скорость фотоокисления характеризовали величиной $\Delta A/t$, представляющей собой уменьшение оптической плотности в максимуме поглощения АФЦ — 654 *нм* за 1 *мин* освещения.

Для исследования фотосенсибилизирующей способности была использована реакция фотовосстановления метилового красного (МК) аскорбиновой кислотой. Процедура описана в работе [4].

Растворы в трубке Тунберга освещали светом лампы накаливания 300 *вт* (10^4 *эрг/см·сек*) через светофильтр ОС-14. Реакцию проводили при 20° и pH растворов 6,4—6,5. Для интерпретации полученных данных проводили фотосенсибилизированное восстановление метилового красного ФЦ из тех же водорослей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с прежними данными [1] раствор АФЦ в 0,01 *М* фосфатном буфере, pH 6,5, имел максимум поглощения при 654 *нм* и плечо при 605 *нм*. При низких температурах интенсивность максимума 654 *нм* резко возрастала и, кроме этого, появлялись небольшие максимумы — 605 и 630 *нм* (рис. 1). В спектре флуоресценции были обнаружены максимумы при 663 и 725—730 *нм*. Охлаждение до —196° приводило к резкому сужению полосы флуоресценции и увеличению ее интенсивности без существенных изменений в положении максимумов. Выделенный из тех же водорослей ФЦ имел спектр поглощения, идентичный спектру ранее изученного нами ФЦ [5], а максимум его флуоресценции смещен до 647 *нм*.

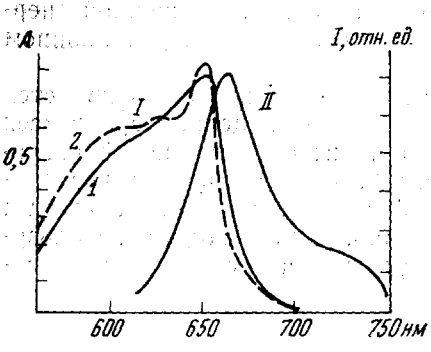


Рис. 1. Спектры поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*) растворов аллофикоцианa: *1* — 20°, *2* — —196°

Измерения кругового дихроизма в видимой области спектра обнаружили две положительные полосы кругового дихроизма в области поглощения хромофоров при 600—610 и 654—660 *нм*.

Спектральные изменения, сопровождающие денатурацию *. *Влияние pH среды.* Наибольшая оптическая плотность и интенсивность флуоресценции отмечена в области pH 6—7 (рис. 2, *II* и *III*). Как видно из

* В этих экспериментах участвовала студентка 5-го курса Воронежского университета Л. Никонова.

рис. 2, *II* и *III*, при изменении значений pH в пределах <6,0 и >7,0 происходило резкое падение поглощения при 654 *нм* и интенсивности флуоресценции при 663 *нм*.

При понижении pH в спектре поглощения исчезал максимум 654 *нм* и проявлялся максимум 620 *нм* (рис. 2, *I*). Понижение pH до 3,0 вело к исчезновению максимума поглощения 620 *нм* и появлению максимума 630 *нм* (рис. 2, *I*, *5*). В щелочных растворах 8,0<pH<9,0 исчезал максимум поглощения АФЦ 654 *нм* и одновременно появлялся максимум поглощения, характерный для ФЦ — 620 *нм*, при pH>9,0 этот максимум смещался до 600 *нм* (рис. 2, *I*). Следовательно, при постепенном подкислении или подщелачивании растворов АФЦ происходило превращение молекул АФЦ в молекулы, спектральные свойства которых харак-

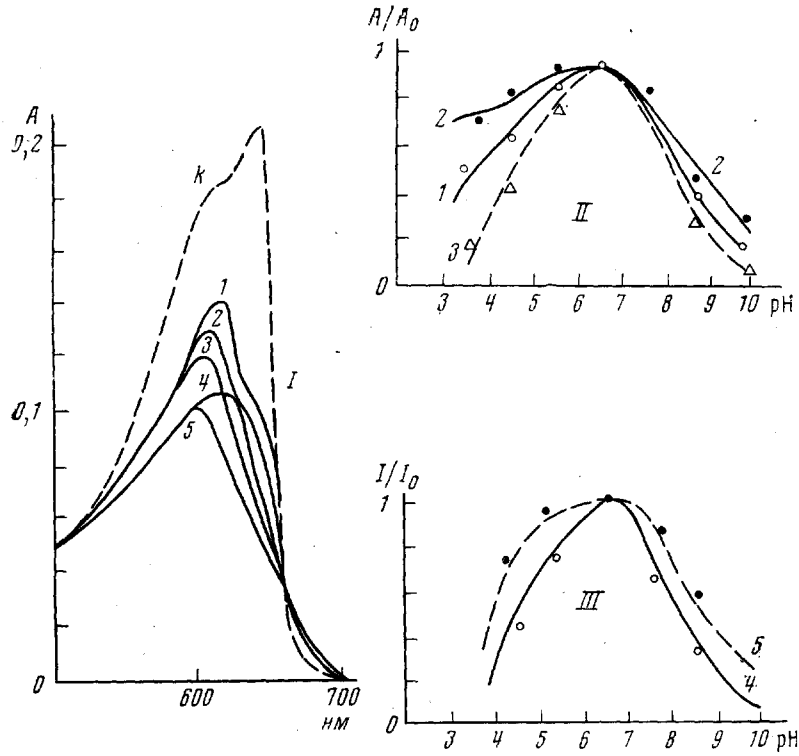


Рис. 2. Влияние pH среды на спектры поглощения (*I*) растворов АФЦ: *к* — pH 6,65; *1* — pH 7,75; *2* — pH 8,7; *3* — pH 4,45; *4* — pH 3,3; *5* — pH 9,8. Зависимость величины поглощения (*II*) и интенсивности флуоресценции (*III*) растворов АФЦ, превращенного и нативного ФЦ: *1* — АФЦ (654 *нм*); *2* — превращенный ФЦ (620 *нм*); *3* — нативный ФЦ (620 *нм*); *4* — АФЦ (663 *нм*); *5* — превращенный ФЦ (647 *нм*). A_0 — величина оптической плотности при pH 6,65

терны для ФЦ. При крайних значениях pH <3,0 и >9,0, спектры поглощения растворов АФЦ сходны со спектрами поглощения тримеров и мономеров ФЦ, описанных в работе [5].

Для сравнения спектральных особенностей растворов нативного ФЦ и превращенного ФЦ, получаемого при денатурации АФЦ, были изучены спектры поглощения и флуоресценции нативных растворов ФЦ при различных pH. Из рис. 2, *II* и *III*, видно, что растворы нативного ФЦ более чувствительны к изменению pH, чем растворы АФЦ.

Действие мочевины. В присутствии 0,5—2 *М* мочевины эффект превращения АФЦ в ФЦ выражен очень четко и проявлялся уже в растворах 0,5 *М* мочевины (рис. 3, *I*). В спектрах поглощения растворов максимум АФЦ 654 *нм* исчезал и появлялся максимум ФЦ 620 *нм*. Увели-

чение концентрации мочевины до 4 *М* вело к снижению этого максимума поглощения, характерного для ФЦ, и к появлению максимума 630 *нм*, характерного для тримерных субъединиц ФЦ [5]. Изменения флуоресценции оказались менее значительными: интенсивность ее падала только в растворах 2 *М* мочевины (рис. 3, *II*). Представленные на рис. 3, *III*, зависимости величины поглощения при 620 *нм* для растворов нативного ФЦ (кривая *3*) и растворов ФЦ, полученных при денатурации АФЦ (кривая *2*), очень сходны; по-видимому, изменения спектров поглощения и флуоресценции растворов АФЦ и ФЦ в концентрированных растворах мочевины идентичны.

Нагревание. При нагревании до 60—70° происходило значительное падение максимума поглощения АФЦ 654 *нм* и постепенное смещение до 620 *нм* (рис. 4, *I* и *II*); при более высоких температурах этот макси-

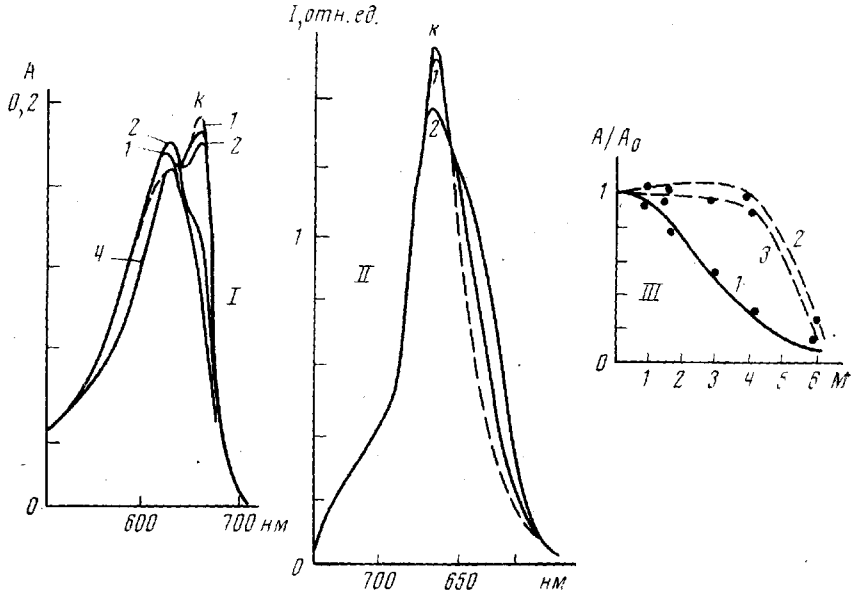


Рис. 3. Влияние мочевины на спектры поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*) растворов АФЦ, *к* — исходный раствор; цифры у кривых — концентрация мочевины в молях. Зависимость величины поглощения (*III*) растворов АФЦ, превращенного и нативного ФЦ: *1* — АФЦ (654 *нм*); *2* — превращенного ФЦ (620 *нм*); *3* — нативного ФЦ (620 *нм*)

мум смещался до 600—610 *нм*. Приведенные на рис. 4, *II* и *III*, кривые температурной зависимости величин оптических плотностей растворов нативного ФЦ и ФЦ, получаемого при денатурации АФЦ, а также кривые температурной зависимости интенсивности их флуоресценции показывают, что резкий спад этих максимумов происходит в узком интервале температур 70—80°. Именно в этом интервале температур появляется максимум поглощения 605—610 *нм*, свидетельствующий о диссоциации ФЦ на мономерные субъединицы [5].

Органические растворители. Добавление до 15% этанола в буферный раствор белка вызывало снижение максимума поглощения 654 *нм* и флуоресценции при 663 *нм* на 40—50% (рис. 5, *I* и *II*). Одновременно несколько увеличивалось поглощение при 620 *нм* и максимум флуоресценции сдвигался к 647 *нм*, причем его интенсивность возрастала до 50% (рис. 5, *IV*). Из рис. 5, *III*, видно, что величина поглощения 620 *нм* нативного ФЦ и превращенного ФЦ одинаково зависят от концентрации этанола.

Таким образом, сопоставляя полученные данные [2—4] по влиянию денатурации на спектральные свойства фикоэритрина, ФЦ и АФЦ —

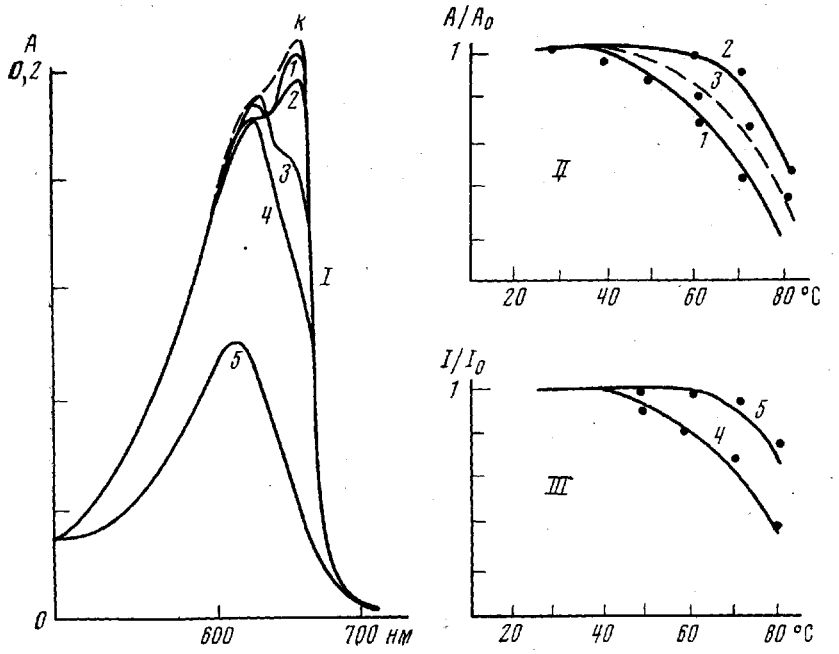


Рис. 4. Влияние нагревания на спектры поглощения (*I*) растворов АФЦ: *к* — исходный раствор; *1* — 30°; *2* — 40; *3* — 50; *4* — 60; *5* — 70°. Зависимость величины поглощения (*II*) и интенсивности флуоресценции (*III*) растворов АФЦ, превращенного ФЦ (620 *нм*) и нативного ФЦ: *1* — АФЦ (654 *нм*); *2* — превращенный ФЦ (620 *нм*); *3* — нативный ФЦ (620 *нм*); *4* — АФЦ (663 *нм*), *5* — превращенный ФЦ (647 *нм*). A_0 и I_0 — величина оптической плотности и интенсивности флуоресценции растворов АФЦ при 20°

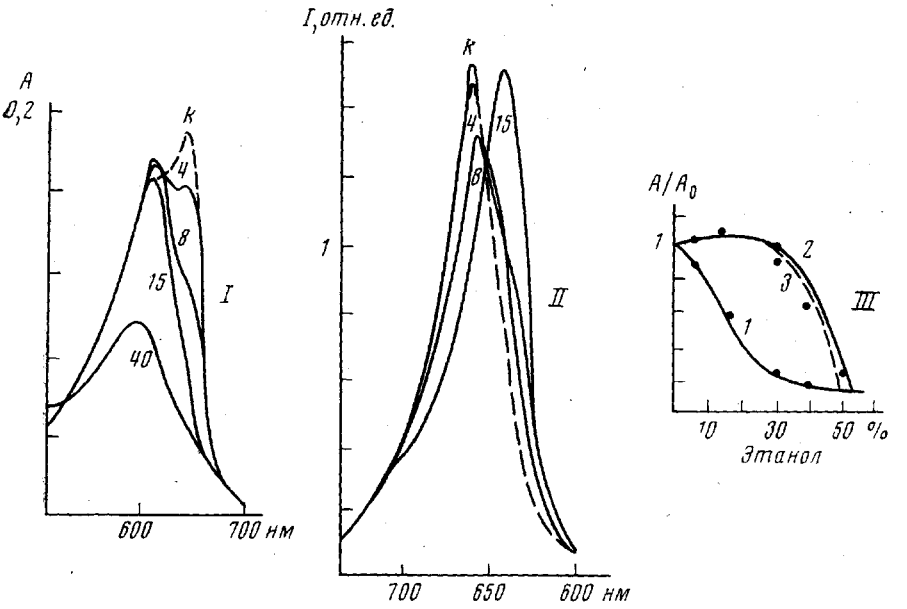


Рис. 5. Влияние этанола на спектры поглощения (*I*) и флуоресценции (*II*) растворов АФЦ. Цифры у кривых соответствуют проценту растворителя. A_0 и I_0 — величина поглощения и интенсивности флуоресценции контрольных растворов. Зависимость величины поглощения (*III*) от концентрации растворителя: *1* — АФЦ; *2* — превращенного ФЦ; *3* — нативного ФЦ

фикобилиновых пигментов красных и сине-зеленых водорослей — можно отметить различную чувствительность пигментов к денатурации. Для диссоциации фикоэритрина на субъединицы требуются более жесткие условия денатурации (pH>10,0, растворы 8 *М* мочевины, нагревание до 80—90°). Структура ФЦ менее стабильна, и диссоциация наступает при более мягких условиях воздействия: pH>9,0 в растворах 2 *М* мочевины при нагревании до 60—70°. В отличие от фикоэритрина, не диссоциирующего на субъединицы даже в растворах 80% этанола, для ФЦ уже при концентрации 40% этанола наблюдается максимум 605 *нм*, характерный для мономерных субъединиц [5]. АФЦ наиболее лабилен: спектральные изменения поглощения и флуоресценции отмечены в 0,5 *М* растворах мочевины, при добавлении 4—8% этанола, при нагревании до 50—60° и 7,7>pH>>4.5.

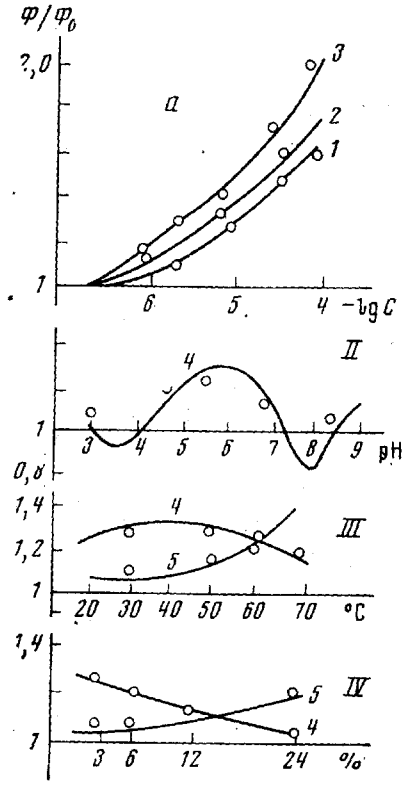


Рис. 6. Тушение флуоресценции растворов АФЦ; *а* — зависимость $Ф/Ф_0$ от логарифма концентрации *п*-бензохинона: *1* — 20, *2* — 60% глицерина, 20°; *3* — то же при —196°; *б* — изменение эффекта тушения (концентрация *п*-бензохинона $5 \cdot 10^{-5}$ *М*) от pH среды (*II*), от температуры (*III*) и от концентрации этанола (*IV*), *4* — АФЦ; *5* — нативный ФЦ

Разделение растворов АФЦ и ФЦ методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Обычно растворы АФЦ при значениях pH 7,5 давали 3 зоны, а растворы ФЦ — 2. Сравнение этих двух электрофореграмм указывало на возможное присутствие в растворах АФЦ молекул ФЦ. Денатурация АФЦ в 1 *М* растворе мочевины и в 8%-ном этаноле приводила к исчезновению зоны АФЦ (зоны 1), в то время как зоны ФЦ не меняли своего положения (зоны 2 и 3). В этих электрофореграммах отмечена слабо выраженная, диффузная зона 4, принадлежащая, по-видимому, субъединицам АФЦ, так как электрофореграммы растворов ФЦ в таких же условиях денатурации показывали, что ФЦ не диссоциирует в этих условиях на субъединицы.

Таким образом, исходя из электрофоретического разделения нативных и денатурированных АФЦ, можно предположить, что этот белок диссоциирует, по-видимому, на два типа субъединиц, один из которых по подвижности идентичен ФЦ.

Определение молекулярных весов АФЦ и ФЦ. Было показано, что в наших опытах молекулярный вес R-фикоэритрина равнялся $2{,}9 \cdot 10^5$, что совпадает с данными других авторов, молекулярный вес АФЦ — $1{,}4—1{,}5 \cdot 10^5$ и ФЦ — 10^5.

Исследование условий тушения флуоресценции растворов АФЦ и ФЦ. Из рис. 6 видно, что эффект тушения зависел от вязкости среды: тушение флуоресценции растворов в вязкой, водно-глицериновой среде (отношение 2 : 3) несколько выше тушения флуоресценции водных растворов. Замораживание водно-глицериновых растворов до —196° вело к резкому увеличению тушения. Подобные же эффекты наблюдались и для других фикобилиновых пигментов — фикоэритрина и ФЦ. Ранее было установлено [3, 5], что тушение флуоресценции фикоэритрина и ФЦ увеличива-

лось при денатурации. Зависимость тушения флуоресценции АФЦ имела сложный характер. При нагревании до 60° тушение практически не изменяется. При нагревании свыше 60°, т. е. в условиях превращения АФЦ в ФЦ, отмечалось его уменьшение. Эффект тушения уменьшается по мере увеличения концентрации этанола до 20%; добавление до 24% этанола, вызывающее появление молекул ФЦ, снимало тушение флуоресценции раствора АФЦ *п*-бензохином. Эффект тушения, наблюдаемый при нейтральных pH среды, уменьшался по мере изменения pH по обе стороны от этих значений. Сильнокислые (pH<3) и сильнощелочные (pH>8,0) условия ведут к увеличению тушения (рис. 6, *б*). Таким образом, показано, что при различных условиях денатурации АФЦ по мере превращения молекул АФЦ в молекулы ФЦ величина тушения уменьшается. Более жесткие условия денатурации, ведущие к диссоциации ФЦ на субъединицы, вызывали увеличение тушения.

Влияние денатурирующих воздействий на фотохимические свойства пигментов. АФЦ так же, как фикоэритрин и ФЦ, оказался очень устойчивым к фотоокислению. Заметное выцветание удалось наблюдать только при интенсивности света порядка 10^6 *эрг/см·сек*. Непрерывное освещение нативных растворов в течение 9 *час* вызывало равномерное падение оптической плотности в видимой области спектра со скоростью $\sim 0{,}05 \cdot 10^{-2}$ в 1 *мин*. Фотосенсибилизирующее действие, исследованное на нативных растворах АФЦ и ФЦ, для последнего оказалось несколько выше. Увеличение скорости восстановления МК отмечено только при денатурации АФЦ в растворах 4 *М* мочевины. В растворах 4%-ного этанола и 1 *М* мочевины эффект не наблюдался. В 25%-ном растворе этанола скорость восстановления практически была равна исходной (таблица). Характерная для растворов ФЦ низкая скорость восстановления МК резко увеличивалась в растворах 1—4 *М* мочевины, а также при добавлении 25% этанола.

Влияние денатурации на скорость $\Delta A/t$ фотосенсибилизированного АФЦ и ФЦ восстановления МК аскорбиновой кислотой

Условия опытов	АФЦ	ФЦ	Контроль (МК без пигмента)
Исходный раствор, pH 6,5	0,03	0,05	0,01
4%-ный этанол	0,04	0,08	0,04
25%-ный этанол	0,07	0,11	0,05
1 *М* мочевина	0,03	0,23	0,05
4 *М* мочевина	0,14	0,30	0,10

Таким образом, АФЦ, так же как и другие фикобилиновые пигменты водорослей [4], мало активен в реакции фотосенсибилизированного восстановления МК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, спектры поглощения различны у хромопротеидов, выделенных из разных типов водорослей, это послужило характеристикой для разделения их по классам. Спектры поглощения и флуоресценции выделенных хромофорных групп резко отличны от спектров их поглощения и флуоресценции в молекулах хромопротеидов, т. е. спектральные особенности нативных белков обусловлены особым состоянием хромофорных групп в этих белках.

В данной работе было обнаружено, что при некоторых условиях денатурации растворов АФЦ происходит постепенное падение максимумов

поглощения при 654 *нм* и флуоресценции 663 *нм* и одновременное появление характерных для ФЦ максимумов поглощения при 620 *нм* и флуоресценции 647 *нм*. Такие денатурированные растворы АФЦ фотохимически мало активны и имеют сильную флуоресценцию, которая незначительно тушится молекулами тушителей. Полученные спектральные данные, а также результаты электрофоретического разделения растворов денатурированных и нативных молекул АФЦ и ФЦ в полиакриламидном геле позволяют предположить, что молекулы АФЦ при денатурации в растворах 0,5—2 *М* мочевины и в 4—8%-ных водных растворах этанола превращаются в молекулы ФЦ.

Ранее нами было проведено изучение спектральных изменений, сопровождающих денатурацию фикоэритрина и ФЦ. Сопоставление обнаруженных при диссоциации спектральных изменений со спектрами поглощения субъединиц, мономерных и агрегированных в пленках форм билинов, позволило заключить, что положение полос поглощения нативных пигментов и их флуоресценция определяются возникновением межхромофорного взаимодействия.

В связи с этим необходимо отметить сходство спектров поглощения растворов АФЦ и ФЦ при тех условиях денатурации, которые вызывают диссоциацию ФЦ на мономерные субъединицы. Это может указывать на возможную диссоциацию АФЦ на субъединицы и на идентичность спектров поглощения растворов субъединиц этих двух белков.

Структура АФЦ не изучена, и даже в оценке молекулярных весов имеется разногласия. Тем не менее, исходя из установленного нами соотношения молекулярных весов АФЦ и ФЦ, а также из результатов электрофоретического исследования этих белков, трудно рассматривать АФЦ как агрегат, состоящий из двух молекул ФЦ. В свете данных Ли и Бернса [11] агрегация молекул ФЦ с коэффициентом седиментации 11S до агрегатов с коэффициентов 19 и 27S не вызывает смещения или появления новых максимумов поглощения и флуоресценции.

Исходя из этого, можно предположить, что возникновение и характер межхромофорного взаимодействия, обусловливающий положение полос поглощения различных типов фикобилиновых пигментов, зависит от способа упаковки мономерных субъединиц в глобуле белка.

В заключение считаем своим долгом выразить благодарность Б. В. Громову за предоставление культуры водорослей, В. Е. Семененко, М. Г. Владимировой и М. Г. Зверевой за помощь и консультации по выращиванию водорослей, аспиранту Института фотосинтеза АН СССР А. А. Москаленко за проведение опытов по электрофоретическому разделению белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. E'hEocha C., in «Comparative Biochemistry of Photoreactive System», New York, 1960.
2. Ерохина Л. Г., Красновский А. А., Мол. биол., **2**, 550, 1968.
3. Красновский А. А., Ерохина Л. Г., Докл. АН СССР, **183**, 470, 1968.
4. Красновский А. А., Ерохина Л. Г., Докл. АН СССР, **193**, 6, 1970.
5. Ерохина Л. Г., Красновский А. А., Мол. биол., **5**, 399, 1971.
6. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Райков Н. И., Игнатьевская М. А., в кн. «Биология сине-зеленых водорослей», Изд-во МГУ, 1969.
7. Kratz W. A., Myers J., Am. J. Bot., **42**, 282, 1955.
8. Weber K., Osborn M., J. Biol. chem., **244**, 4408, 1969.
9. Детерман Г. В кн. «Гель-хроматография», стр. 164, «Мир», 1970.
10. Красновский А. А., Евстигнеев В. Б., Брин Г. П., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **82**, 947, 1952.
11. Lee I., Berns D., Biochem. J., **110**, 465, 1968.

Поступила в редакцию
27.X.1972

STUDY OF SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF ALLOPHYCOCYANIN FROM BLUE-GREEN ALGA IN THE COURSE OF DENATURATION

L. G. EROKCHINA and A. A. KRASNOVSKII

Institute of Photosynthesis, Academy of Sciences of the USSR, Poustchino, Moscow Region, and Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Allophycocyanin and C-phycocyanin were isolated from a blue-green alga *Anacystis nidulans*. Their absorption spectra were measured at room and liquid nitrogen temperature. At — 196° the main absorption maxima of allophycocyanin at 654 *nm* increases and maxima at 580—590, 605 and 630 *nm* appear; fluorescence intensity increases without any changes in maximum position. The addition 0.6 *M* urea and 4—8% ethanol results in a conversion of allophycocyanin into a pigment identical to C-phycocyanin in spectral and photochemical properties. Under denaturation conditions the dissociation of allophycocyanin into two subunits was revealed by polyacrylamide gel electrophoresis. One of these subunits possesses mobility similar to that of C-phycocyanin isolated from the same source. Solutions of both allophycocyanin and C-phycocyanin were stable to destructive photooxidation and practically inactive in photosensitised reduction of methyl red. The fluorescence quenching by oxydants was very small for both pigments.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А. Н. БАХА

А. А. КРАСНОВСКИЙ

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Доложено на двадцать девятом ежегодном Баховском чтении 19 марта 1973 г.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
МОСКВА
1974

УДК 581.132.1

Президиум Академии наук СССР постановил в ознаменование 50-летия существования перекисной теории А. Н. Баха проводить ежегодно в день рождения академика А. Н. Баха, 17 марта, научные чтения, посвященные крупным вопросам биохимии

Красновский А. А. **Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы.** 29-е Баховское чтение. М., «Наука», стр. 1—64.

В работе излагаются современные представления о природе первичных фотохимических реакций при фотосинтезе и молекулярной организации пигментного аппарата фотосинтезирующих организмов, основанные на результатах исследований, проводимых в лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

Книга может быть полезна научным работникам и студентам, работающим в области биохимии, фотохимии и физиологии растений.

Илл. 19. Библ. 181 назв.

Ответственный редактор
академик А. И. ОПАРИН

К $\frac{21005—061}{055(02)—74}$ 904—74

© Издательство «Наука», 1974 г.

ВВЕДЕНИЕ

Алексей Николаевич Бах более 70 лет тому назад сформулировал общепринятое ныне представление о том, что фотосинтез является активированным светом, окислительно-восстановительным процессом. Исследования лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР связаны с этой исходной идеей, так как мы нашли, что уже ранние этапы преобразования энергии света связаны с фотохимическими окислительно-восстановительными превращениями возбужденного светом хлорофилла.

Алексей Николаевич Бах пришел в биологию из сферы химии с характерным для химика строем мышления; естественным его желанием было разделение слаженного биологического процесса на ряд простых химических реакций, механизм которых изучался с позиций химии (такова перекисная теория окисления, исследование фиксации азота в бесклеточных системах и многое другое).

Основатель нашей лаборатории Александр Николаевич Теренин и автор настоящего чтения пришли в биологию из сферы физической химии, и поэтому нам были особенно близки подходы А. Н. Баха к изучению биохимических процессов. Вначале мы изучали молекулярный механизм фотосинтеза с помощью фотохимических моделей, имитирующих элементарные процессы, текущие в живой клетке. Первые результаты работы нашей лаборатории А. Н. Теренин изложил в VI Баховском чтении [1].

За долгие годы работы в Институте биохимии мы все глубже входили в сферу биологии, и исследования интактных клеток и биохимических систем стали занимать все большее место в наших работах.

С другой стороны, уже в самых ранних работах мы использовали сравнительный биохимический подход, изучая пигментную систему фотосинтезирующих бактерий, водорослей и высших растений наряду с моделями, имитирующими стадии химической эволюции фотосинтеза.

Мы приступили к своей работе непосредственно после окончания Великой Отечественной войны, когда во всем мире только начинались работы по исследованию фотосинтеза на моле-

кулярном уровне. Разработка совершенной техники спектральных исследований, появление изотопных методов в связи с развитием ядерной физики дало возможность использования всего этого арсенала физико-химических методов в биологических исследованиях и во многом определило достижения этой науки.

Хотелось бы (по возможности в историческом плане) изложить основные направления работы нашей лаборатории, логическая последовательность которых теперь кажется ясной. В действительности, как всякое научное исследование, работы развивались, заводя нас в тупики, откуда с трудом приходилось выбираться на более перспективные пути.

Главная проблема, которая нас интересовала,— выяснение механизма преобразования энергии света при фотосинтезе в химическую энергию. Главными путями к изучению этой проблемы были исследования простых фотохимических реакций хлорофилла с постепенным усложнением модельных систем и их приближением к функции биологических фотосинтетических структур. Наряду с моделированием фотосинтетической функции мы разбирали фотосинтетические структуры на более простые компоненты, пытаясь понять суть их молекулярной организации и функционального сопряжения. Наконец, все возрастающее внимание уделялось изучению первичных процессов непосредственно в интактных фотосинтезирующих организмах.

Невозможно дать в кратком чтении обзор нескольких сотен работ, выпущенных лабораторией фотобиохимии за истекшие 30 лет. Мы хотели лишь отразить в этом чтении главные направления исследования, круг интересов лаборатории. Все эти годы работа лаборатории развивалась в общем потоке исследований фотосинтеза, проводимых у нас в Советском Союзе и во всем мире. Однако мы не ставим своей задачей дать обзор литературы в интересующих нас направлениях исследования, тем более, что это уже сделано в опубликованных ранее обзорах [2—8]. Здесь мы хотели бы изложить главным образом работы нашей лаборатории, лишь изредка прибегая к цитированию немногих работ других лабораторий.

Как преобразуется энергия света в химическую энергию продуктов фотосинтеза растений? Эта главная проблема, над которой работали сотни исследователей за истекшие два столетия.

Опыт Пристли ознаменовал собой начало эры экспериментальных исследований фотосинтеза. До этого в познании фотосинтеза растений доминировали наблюдения и умозрения, оторванные от направленного эксперимента. Так, например, античные авторы считали, что растения всасывают пищу из почвы. Наиболее четко эти представления были сформулированы в трудах Аристотеля (IV в. до н. э.). Эти представления без ревизии принимались средневековой наукой и существовали почти две тысячи лет.

Ван Гельмонт в начале XVII века поставил один из первых количественных экспериментов: ива выращивалась в песке, вес которого проверялся до и после опыта. Иву поливали водой и взвешивали после того, как выросло небольшое деревце. Так как вес песка не изменился, то был сделан вывод, что вещество ивы образовалось из воды.

Мысль о воздушном питании растений высказывалась в работах английского ученого Гейлса (1727 г.). М. В. Ломоносов в своем сочинении «Слово о явлениях воздушных, от электрической силы происходящих» (1753 г.) писал, что деревья «жирными листами жирный тук из воздуха впитывают, ибо из бессочного песку столько смоляной материи в себя получить им невозможно». Однако нужны были количественные эксперименты.

В 1771 г. Джозеф Пристли поставил свой классический эксперимент: в замкнутом пространстве, где горит свеча, портится воздух; растение его освежает — «дефлогистонирует» (в терминологии того времени), т. е. выделяется кислород. Интересно, что опыты Пристли не всегда могли воспроизвести его современники и даже он сам, потому что еще не была выяснена роль света в этом процессе.

Вскоре Ингенхауз показал в эксперименте, что растение выделяет кислород лишь при освещении, а в темноте — поглощает. Сенебье установил, что растение поглощает углекислоту и выделяет кислород. Уже в опытах Ингенхауза было показано, что лишь освещение зеленых частей растения ведет к выделению кислорода.

Почти через 50 лет после опытов Пристли зеленое вещество растений выделили Пелетье и Кавенту (1818 г.) и назвали его «хлорофиллом» от греческих слов «хлорос» — зеленый и «филлон» — лист. Это название закрепилось в последующей литературе.

Бурное накопление экспериментального материала продолжалось в течение XIX века. Через 100 лет после открытия Пристли в классических опытах К. А. Тимирязева было показано, что спектр действия фотосинтеза соответствует спектру поглощения хлорофилла; прямой эксперимент доказал, что свет, поглощенный хлорофиллом, используется для фотосинтеза. Это положение теперь кажется очевидным, однако в те времена оно было предметом оживленной дискуссии. К. А. Тимирязев первый отнес фотосинтез к классу фотосенсибилизированных реакций, в которых свет, поглощенный окрашенным хлорофиллом, используется для превращения неокрашенных воды и углекислоты. Применение этого термина основывалось на работах современника К. А. Тимирязева немецкого химика Фогеля, который в 70-х годах XIX века открыл явление фотосенсибилизации бромистого серебра красителями.

Французский физик Эдмон Беккерель показал возможность фотосенсибилизации бромистого серебра хлорофиллом, а К. А. Тимирязев демонстрировал этот эффект в своей Крунианской лекции («Космическая роль растения») с использованием хлорофиллина натрия. К. А. Тимирязев считал, что нет принципиального различия между действием синтетических красителей и хлорофилла в качестве оптических сенсибилизаторов.

Любопытно отметить, что сын Эдмона Беккереля, известный физик Анри Беккерель, изучал действие флуоресцирующих веществ на фотопластинки, в том числе солей урана и хлорофилла; обнаружив действие солей урана через черную светонепроницаемую бумагу, он, как известно, открыл радиоактивность этого соединения. Таким образом, радиоактивность и фотосенсибилизирующее действие хлорофилла были обнаружены одновременно.

В 70-х годах XIX века А. М. Бутлеров нашел, что при полимеризации формальдегида образуются сахароподобные вещества. Эти опыты послужили основанием теории Байера о том, что первичным продуктом фотосинтеза является формальдегид, что соответствует стехиометрии взаимодействия воды и углекислоты с выделением кислорода:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows HCOH + O_2$$

Такие взгляды излагались в учебниках почти 100 лет, и лишь применение углекислоты, меченной изотопами углерода, позволило внести ясность в эту проблему.

Однако до конца XIX века химическая структура хлорофилла оставалась неизвестной. Предполагалось, что в его состав входит железо. Лишь в 1913 г. в работах Вильштеттера была расшифрована структура хлорофилла, а в лаборатории Фишера были осуществлены основные этапы синтеза этого соединения, завершенные в недавних работах Вудворда. Применение хроматографического метода М. С. Цвета позволило выделить в чистом виде различные аналоги хлорофилла и изучить их структуру.

Вопрос о способе участия хлорофилла в процессе фотосинтеза был предметом ряда гипотез. Так, например, Вильштеттер и Штоль, а затем и Варбург предполагали, что CO_2 и H_2O непосредственно связываются молекулой хлорофилла, и в этом комплексе при возбуждении светом происходят все химические превращения.

Роберт Хилл показал в 1937 г., что стадию выделения кислорода можно отделить от восстановления углекислоты; он нашел, что хлоропласты при освещении выделяют кислород в присутствии окислителей (солей окисного железа).

В 1939 г. группа Рубена и Камена в США применила для исследования продуктов фотосинтеза углекислоту, меченную

короткоживущим изотопом углерода ^{11}C. Было показано, что углекислота фиксируется в карбоксильной группе органического соединения, которое, однако, не является хлорофиллом. Используя в опытах долгоживущий радиоактивный изотоп углерода ^{14}C, Кальвин с сотрудниками установили, что фиксация и восстановление углекислоты является циклическим процессом, непосредственно не связанным с хлорофиллом. Углекислота входит в углеродный цикл, энзиматически связываясь с рибулёзодифосфатом.

В 1941 г. в лаборатории А. П. Виноградова (СССР) и в группе Рубена и Камена (США) использование тяжелого изотопа кислорода ^{18}O позволило установить, что выделяющийся при фотосинтезе кислород принадлежит молекуле воды. Следовательно, при фотосинтезе происходит перенос водорода от воды к углекислоте, очевидно, за счет энергии света, поглощенного хлорофиллом.

В нашей лаборатории в 1949 г. была показана возможность восстановления пиридиннуклеотидов за счет энергии света, поглощенного хлорофиллом. Двумя годами позже в США в лабораториях Очоа, Гаффрона и Арнона была установлена возможность восстановления пиридиннуклеотидов хлоропластами. В 1954 г. Арнон показал, что этот перенос водорода в хлоропластах может быть сопряжен с образованием аденозинтрифосфата.

Еще К. А. Тимирязев выдвинул предположение, что участие хлорофилла в фотосинтезе может быть связано с его обратимыми окислительно-восстановительными превращениями, и обосновал это предположение экспериментами с восстановлением хлорофилла металлическим цинком; продукт восстановления под действием кислорода превращается в исходный зеленый пигмент. Представления об обратимых превращениях хлорофилла при фотосинтезе развивались в предвоенные годы в работах Джеймса Франка, Е. Рабиновича и Р. Ливингстона.

А. Н. Теренин в 1943 г., а также Дж. Н. Льюис в 1944 г. обосновали ныне общепринятые представления о том, что фотохимически активным является долгоживущее триплетное бирадикальное состояние органических молекул. Эти представления применимы и к хлорофиллу. Возбужденные молекулы хлорофилла в растворе «живут» очень мало времени: синглетные — около 10^{-8} сек., а триплетные — до 10^{-3} сек.

Обычный «зеленый» хлорофилл в «основном» состоянии довольно малоактивное вещество, однако возбужденный светом хлорофилл совершенно непохож на этот зеленый пигмент. Даже «окраска» возбужденного хлорофилла отличается от зеленого цвета обычного хлорофилла. Применение импульсной спектроскопии позволило измерить спектр поглощения триплетных возбужденных молекул: они обладают «размазанным» максимумом поглощения около 460 нм, т. е. имеют красно-корич-

невую «окраску» в отличие от обычного зеленого хлорофилла Применение лазерной техники, вероятно, позволит измерить спектр поглощения синглетных возбужденных молекул хлорофилла.

Если хлорофилл включается в цепь фотосинтетического переноса электрона, то следует искать его обратимые превращения под действием света. Именно обратимые, потому что иначе хлорофилл не мог бы работать, не изменяясь в конце процесса.

Как оказалось, возбужденная молекула хлорофилла может отдать электрон подходящему акцептору или воспринять электрон от молекулы-донора. Эти реакции сопровождаются «запасанием» энергии света в первичных продуктах. Обратные «темновые» реакции идут очень быстро. Чтобы наблюдать процесс, нужна либо особая техника измерения нестойких промежуточных продуктов, либо создание искусственных условий, ведущих к стабилизации промежуточных продуктов.

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ХЛОРОФИЛЛА

Процесс фотосинтеза начинается с поглощения кванта света молекулами хлорофилла; при этом образуются возбужденные состояния, свойства которых во многом определяют дальнейшие пути преобразования энергии света в химическую энергию.

ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ

Эта проблема детально разбирается в книге А. Н. Теренина [9]. Общепринятая ныне схема энергетических уровней органических молекул применима для хлорофилла и его аналогов (рис. 1). Молекула хлорофилла «в темноте» находится на нижнем синглетном состоянии S; заселенность колебательных уровней на схеме не изображается. В свете современных исследований отдельные полосы в спектре поглощения молекулы хлорофилла принадлежат различным электронным переходам; на схеме изображены два перехода, соответствующие красному ($S \rightarrow S^*$) и синему ($S \rightarrow S_1^*$) максимумам поглощения молекулы хлорофилла. Хорошо изучены безызлучательные переходы ($S_1^* \rightarrow S^*$) с более высоких возбужденных уровней на нижний уровень S с испусканием кванта света флуоресценции ($S^* \rightarrow S$), безызлучательный переход с образованием триплетного состояния ($S^* \rightarrow T$) и поглощение кванта света долгоживущим состоянием T с образованием возбужденного состояния T^*, несущего энергию двух квантов света.

Об образовании метастабильного триплетного состояния хлорофилла свидетельствует фосфоресценция хлорофилла в замороженных до —196° растворах [10].

Недавно было показано, что спектры возбуждения фосфоресценции протохлорофилла и хлорофилла отличаются от спектра возбуждения флуоресценции; отсюда был сделан вывод, что наиболее интенсивной фосфоресценцией обладают лишь определенные типы сольватов пигмента, возможно связывающего две молекулы растворителя по центральному атому магния [11, 12].

Удалось измерить полосу электронного резонанса триплетных состояний хлорофилла *b* в спирте при —196°; наряду с этим наблюдалось образование радикальных форм [13].

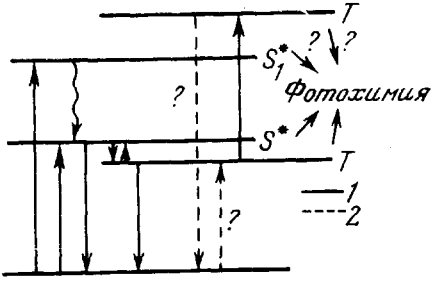


Рис. 1. Схема электронных уровней хлорофилла

Переходы: *1* — изученные; *2* — неизученные

Прямой маловероятный переход $S \rightarrow T$ должен проявляться в виде полосы поглощения в близкой инфракрасной области в концентрированных растворах хлорофилла. Нам удалось наблюдать такие полосы поглощения в области 720—850 нм, но более вероятно, что они принадлежат агрегированным формам пигментов.

В ряде лабораторий с помощью импульсной спектроскопии при комнатной температуре удалось наблюдать переходы $T \rightarrow T^*$ и взаимодействие метастабильных молекул *T* с донорами и акцепторами электрона.

В молекуле пигмента при включении в цепь сопряжения гетероатома с неподеленной электронной парой (азот, кислород) возможны наряду с $\pi \rightarrow \pi^*$-переходами в сопряженной системе связей также $n \rightarrow \pi^*$-переходы, в результате которых электронная вакансия («дырка») может быть локализована на атоме азота или кислорода. Наличие адденда, связывающего неподеленную электронную пару (наиболее отчетливо — протона в кислых средах), приводит к снижению вероятности $n \rightarrow \pi^*$-перехода. До сих пор неясно, какие полосы поглощения в спектре хлорофилла можно приписать $n \rightarrow \pi$-переходу. Предположение Каша и Бекера [14] о том, что этим переходам отвечают полосы, появляющиеся в неполярных растворителях, нельзя считать обоснованным; известно, что неполярные среды благоприятствуют агрегации и предполагаемые $n \rightarrow \pi$-переходы в действительности являются полосами поглощения агрегированных форм (димеров).

Наличие полосы поглощения может быть связано с обратимым переносом электрона с участием координационно связанного адденда. Так, полосы поглощения сольватированных ионов давно рассматривались школой Дж. Франка как спектры переноса электрона. Таким же образом интерпретируются спектры поглощения светочувствительных комплексов неорганических ионов с органическими молекулами.

Однако до сих пор достоверно не установлена возможность интерпретации отдельных полос в спектре поглощения хлорофилла, относящихся к комплексам с переносом заряда. Известные полосы поглощения в спектрах хлорофилла следует приписать электронным переходам с колебательными подуровнями [15].

Таким образом, спектроскопические наблюдения показывают образование всех типов возбужденных состояний, изображенных на схеме,— синглетных S^*, S_1^* и триплетных T и T^*.

Наиболее важно получить сведения о химических свойствах возбужденных состояний, коренным образом отличающихся от свойств молекулы в нижнем невозбужденном состоянии. Все типы возбужденных состояний — это новые неустойчивые активные молекулярные конфигурации, несущие большую часть энергии кванта света. Они способны претерпевать химические превращения либо отдавать свою энергию или электрон подходящему акцептору, т. е. участвовать в процессах миграции энергии. А. Н. Теренин подчеркивал, что роль триплетных состояний в фотохимии определяется большой длительностью их жизни и химической ненасыщенностью (свойствами бирадикала) из-за наличия неспаренного электрона.

Известно, что оба типа возбужденных состояний хлорофилла эффективно инактивируются (тушатся) молекулами-окислителями и весьма малоэффективно — восстановителями. Следует полагать, что тушение реализуется в комплексе возбужденный пигмент — тушитель, предшествуя «истинному» фотохимическому процессу, когда партнеры, получившие и отдавшие электрон, расходятся в виде самостоятельно диффундирующих молекулярных образований.

Рассмотрим теперь, как реализуется фотохимический процесс при реакции возбужденных пигментов с донорами и акцепторами электрона, ведущей к образованию более долгоживущих фотопродуктов.

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Способность возбужденных светом молекул хлорофилла, его аналогов и производных к реакции обратимого фотовосстановления (обратимому фотохимическому взаимодействию с молекулами восстановителя — донорами электрона) была обнаружена в 1948 г. [16]. При фотореакции образуются восстановленные

формы пигментов, различающиеся по спектральным свойствам и реакционной способности в зависимости от числа воспринимаемых электронов и протонов и условий кислотно-основного равновесия в среде. После выключения света реакция идет в обратном направлении с различной скоростью в зависимости от природы среды, свойств донора электрона (АН) и наличия в системе акцептора электрона. Предложенная в нашей первой работе схема обратимого фотовосстановления хлорофилла (Хл) и его аналогов в триплетном возбужденном состоянии с промежуточным образованием ион-радикалов была подтверждена в последующих работах нашей и других лабораторий [16, 17].

$$Хл + h\nu \rightarrow Хл^* \rightarrow \cdot Хл \cdot ; \quad \cdot Хл \cdot + АН \rightleftarrows \cdot Хл^- + \cdot АН^+$$

Воспринимаемый в первичном акте электрон, по-видимому, делокализован в системе сопряженных двойных связей молекулы пигмента; локализация атомов водорода в восстановленных формах не установлена с полной определенностью и является предметом дискуссии [18—20].

В качестве доноров электрона при фотовосстановлении пигментов используются аскорбиновая кислота и другие диэнолы, фенилгидразин, соединения двухвалентного железа.

Любопытно, что восстановленные пиридиннуклеотиды ($НАД \cdot H_2$) и их аналог N-бензилникотинамид (БНА·Н) не приводят к фотовосстановлению хлорофилла при освещении красным светом, т. е. в области поглощения хлорофилла, но приводят к фотовосстановлению хлорофилла при возбуждении близким ультрафиолетом в области поглощения $НАД \cdot H_2$ — при 340 нм. При этом образуется «красная» восстановленная форма хлорофилла, а $НАД \cdot H_2$ необратимо окисляется [21].

В. Б. Евстигнеев [22], изучая механизм фотовосстановления, нашел, что двухступенчатый механизм реакции особенно удобно наблюдать в случае феофитина; проводя фотовосстановление при —40°, удается наблюдать спектроскопически образование «первичной» формы пигмента, долгоживущей в этих условиях и переходящей при нагревании в более устойчивую «красную» форму. В серии опытов было показано, что эта «первичная» форма определяет появление фотопотенциала и фотопроводимости в растворах хлорофилла и его аналогов [23]. В измерениях А. К. Чибисова [24] с помощью импульсной спектроскопии было показано, что в системе феофитин — аскорбиновая кислота при —40° образуется «первичная» форма с поглощением при 460—470 нм с длительностью жизни в несколько миллисекунд. Это указывает на то, что более долгоживущая «первичная» форма феофитина, изученная В. Б. Евстигнеевым, вероятно, образуется из первичного ион-радикала.

Для прямых определений свободных радикалов, образующихся при реакции, применяли методы инициирования цепной

полимеризации и измерения электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Так, система хлорофилл — донор электрона энергично фотосенсибилизирует полимеризацию метилметакрилата, поэтому реакция сопровождается образованием свободных радикалов; освещение системы в резонаторе ЭПР-спектрометра приводило к появлению сигнала [25]. С помощью метода ЭПР удалось найти сигнал образующейся при реакции монодегидроаскорбиновой кислоты [26]. Освещая замороженные системы, содержащие пигмент и растворитель, удалось измерить синглетный сигнал, по-видимому, вызванный переходом электрона от матрицы-растворителя к возбужденной молекуле пигмента [27, 28].

При фотовосстановлении в пиридине образуются достаточно устойчивые окрашенные фотовосстановленные формы: у хлорофилла и бактериовиридина — красного цвета, у бактериохлорофилла — зеленого (рис. 2). Фотовосстановление в спирте обычно ведет к обратимому падению «красного» максимума поглощения без образования окрашенных восстановленных форм.

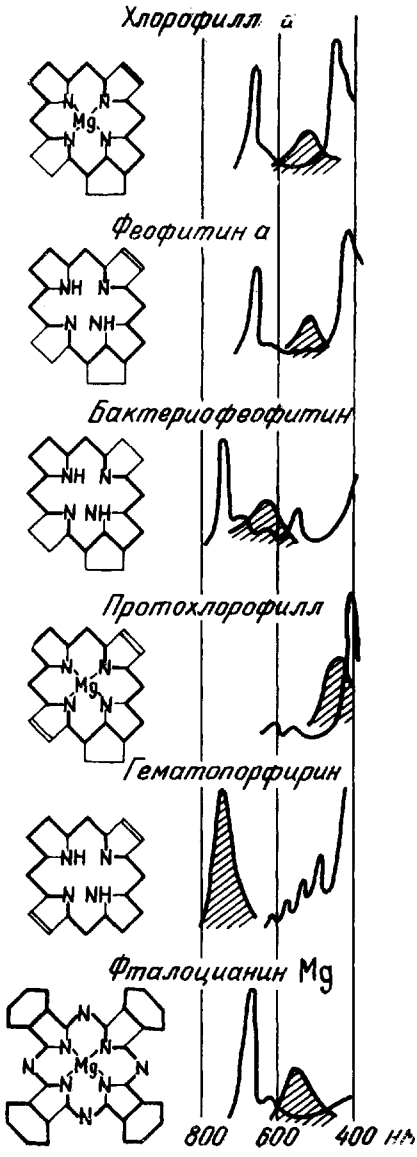


Рис. 2. Изменения спектров поглощения хлорофилла и его аналогов при фотовосстановлении аскорбиновой кислотой в пиридине (структура молекул пигментов показана схематично)

Кривые — спектры поглощения пигмента до реакции и после обратной реакции; заштрихованы спектры поглощения промежуточных фотовосстановленных форм

Фотовосстановление наблюдается и в кислых средах. Так, например, порфирины восстанавливаются аскорбиновой кислотой в водном растворе серной кислоты с образованием ряда взаимопереходящих фотовосстановленных форм [29]. Промежуточные формы могут изомеризоваться с образованием хлорина и бактериохлорина. При освещении порфиринов в кислом замороженном спирте наблюдается синглетный сигнал ЭПР [27], который следует приписать ион-радикалу восстановленной спиртом молекулы пигмента. Течение реакции зависит от свойств среды.

С фотовосстановленными формами хлорофилла и его аналогов реагирует широкий круг соединений — пиридиннуклеотиды, N-бензилникотинамид, соединения окисного железа, различные красители (сафранин Т, рибофлавин, метиловый красный и др.), хиноны и кислород.

При фотореакции в тройной системе донор электрона — пигмент — акцептор электрона наблюдается сенсибилизированное восстановление молекул-акцепторов и блокирование реакции фотовосстановления.

Резкое торможение фотовосстановления хлорофилла каротином [30] не укладывалось в описанную схему, поскольку нам не удалось обнаружить продукты фотосенсибилизированного восстановления каротина. Эти опыты побудили к систематическому изучению влияния полиенов и циклических соединений с различной структурой на фотовосстановление хлорофилла. Мы изучали влияние разных соединений: каротиноидов и их аналогов с различной длиной сопряженных двойных связей; молекул полиметиновых красителей, в которых полиеновая цепь сочетается с гетероциклом; полициклических углеводородов (нафталин, антрацен, тетрацен); гетероциклических соединений, содержащих в цепи сопряжения атомы азота и кислорода (эти соединения лежат в основе структуры обратимо восстанавливающихся красителей).

Надежно действующая электронная «ловушка» представляет собой сочетание полиеновой цепочки с гетероциклом. Эти соединения не только воспринимают электрон, но могут образовывать более устойчивые и долгоживущие восстановленные продукты [6].

Необратимое фотовосстановление. Можно было бы ожидать необратимое ступенчатое восстановление в ряду: протохлорофилл — хлорофилл — бактериохлорофилл. Хорошо известно, что при освещении этиолированных листьев протохлорофилл превращается в хлорофилл с высоким квантовым выходом. Но в растворах протохлорофилла наблюдается обратимое фотовосстановление аскорбиновой кислотой с образованием промежуточного продукта, обладающего максимумом поглощения при 470 нм; хлорофиллоподобный продукт обычно образуется при этом с ничтожно малым квантовым выходом [31]. Фотовосстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой при использовании в качестве растворителя пиридина, обработанного металлическим

натрием, приводит к необратимому образованию хлорофиллоподобного пигмента (до 20%) [32]. Возможно, что образованный Na-дипиридил используется в качестве промежуточной редокс-системы, которая облегчает фотовосстановление полуизолированных двойных связей молекулы хлорофилла. В процессе фотовосстановления хлорофилла образуется несколько коротковолновых промежуточных продуктов, включая красную восстановленную форму, но не бактериохлорофилл.

Фотофеофитинизация. Реакция феофитинизации представляет собой замещение центрального атома магния в молекуле пигмента на два атома водорода и обычно наблюдается в кислых средах.

$$\text{Хлорофилл} + 2H^+ \rightarrow \text{феофитин} + Mg^{2+}$$

Скорость образования феофитинов из соответствующих магниевых комплексов — аналогов хлорофилла — соответствует убывающему ряду: бактериовиридин > хлорофилл *a* > протохлорофилл > бактериохлорофилл > хлорофилл *b* [33, 34].

Различия в степени восстановления полуизолированных двойных связей в молекуле пигмента не оказывают влияния на реакцию; упрочение связи магния следует приписать наличию электроотрицательных заместителей (альдегидная группа у хлорофилла *b*).

Действие света иллюстрируют следующие результаты, показывающие время полупревращения (в минутах) пигментов в феофитины (растворитель: пиридин + 10% воды, без воздуха; щавелевая кислота — $2 \cdot 10^{-2}$ М; красный свет — 10^5 эрг/см^2·сек).

Пигмент	Темнота	Свет
Бактериовиридин	60	14
Хлорофилл *a*	180	12
Протохлорофилл	600	10
Хлорофилл *b*	1400	9

Из приведенных данных видно чрезвычайное ускорение феофитинизации на свету. Реакция фотофеофитинизации, так же как и фотовосстановление, блокируется акцепторами электрона — метиловым красным, рибофлавином, сафранином, а также β-каротином и тетраценом. Блокирующее действие этих соединений, вероятно, определяется обратимой реакцией с промежуточной восстановленной формой пигмента, конкуренцией за возбужденную молекулу пигмента (путем обратимого фотоокисления) или дезактивацией триплетных состояний пигмента. Трудно сомневаться в том, что в основе изученной реакции лежит обратимое фотовосстановление хлорофилла экзогенными донорами электрона или молекулами растворителя, сопровождающееся быстрой феофитинизацией промежуточных фотовосстановленных форм пигмента.

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Фотореакции с кислородом. Давно известно, что при интенсивном освещении растворов хлорофилла на воздухе происходит деструктивное фотоокисление. Мы нашли, что наряду с продуктами необратимого окисления хлорофилла и фталоцианина магния образуются промежуточные лабильные продукты, из которых частично регенерируется пигмент при добавлении восстановителей. Эти процессы наиболее отчетливо идут в спиртовых растворах [35]. Явление обратимости очень ярко выражено в опытах с бактериохлорофиллом [36]. Исследовалось фотохимическое окисление хлорофиллов *a* и *b*, бактериохлорофилла, бактериовиридина, протохлорофилла и феофитина кислородом воздуха в спиртоглицериновых растворах. Явный эффект обратимости наблюдается только после добавления некоторого количества аскорбиновой кислоты при освещении или до начала освещения [37].

Понижение температуры до —70° приводит к ускорению фотоокисления в опытах с хлорофиллом *a* и незначительному замедлению — с бактериохлорофиллом и бактериовиридином. Возможно, что хлорофилл *a* при низких температурах склонен вступать в темновое взаимодействие с кислородом с образованием лабильного молекулярного комплекса, внутри которого и осуществляется перенос электрона при поглощении кванта света [37].

В нашей лаборатории [38] было детально исследовано фотоокисление хлорофилла и его аналогов в водных растворах детергентов. Квантовый выход необратимого окисления соответствовал убывающему ряду: бактериохлорофилл ($2{,}4 \cdot 10^{-3}$), бактериовиридин ($2{,}0 \cdot 10^{-3}$), хлорофиллы *b* ($1{,}3 \cdot 10^{-4}$) и *a* ($1{,}1 \cdot 10^{-4}$), протохлорофилл ($5{,}3 \cdot 10^{-5}$) (в скобках указаны величины квантового выхода деструктивного окисления).

После освещения хлорофилла в присутствии кислорода воздуха возникает слабая хемилюминесценция в результате превращений, запасающих световую энергию промежуточных продуктов (перекисей) [39]. После освещения замороженных растворов хлорофилла при низкой температуре и последующего размораживания наблюдается термолюминесценция в результате последующих реакций первичной перекиси хлорофилла (рис. 3) [40]. Доноры электрона, особенно тиомочевина, сильно тушат фотохемилюминесценцию, что указывает на их взаимодействие с перекисью хлорофилла. С другой стороны, окислители — акцепторы электрона тушат хемилюминесценцию, взаимодействуя с возбужденным синглетным и триплетным хлорофиллом. Механизм реакции включает следующие стадии: триплетный возбужденный хлорофилл взаимодействует с кислородом, образуя первичную фотоперекись; темновые стадии превращения первичной перекиси приводят к образованию синглетных возбужденных молекул, продуктов фотоокисления, которые испускают кванты хемилюминесценции [39, 40].

Рассмотрим теперь реакции с другими акцепторами электрона, отличными от кислорода.

Рабинович и Вейс [41] нашли, что реакция хлорофилла с соединениями окисного железа представляет собой обратимое окисление, и свет ускоряет эту реакцию.

В опытах В. Б. Евстигнеева и А. Н. Теренина [42] измерялись фотопотенциалы пленок пигментов, нанесенных на металлический электрод и опущенных в раствор электролита, содержащего окислитель или восстановитель. При освещении было обнаружено обратимое изменение потенциала, что свидетельствует о способности пигментов обратимо отдавать или воспринимать электрон.

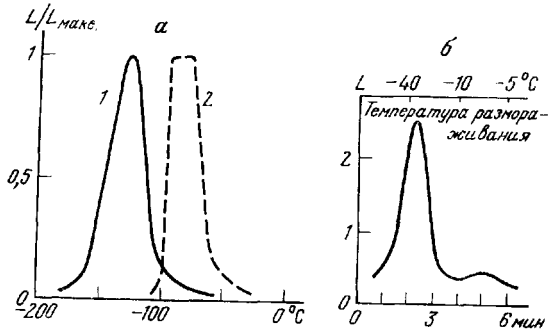


Рис. 3. Термохемилюминесценция растворов хлорофилла

а — в зависимости от температуры освещения: *1* — в этаноле, *2* — в ацетоне; *б* — кинетика термохемилюминесценции после освещения в ацетоне при —90°

А. А. Качан и Б. Я. Даин [43], освещая хлорофилл ультрафиолетовым светом в «жестких» средах при температуре — 196°, нашли изменения поглощения хлорофилла, которые они объяснили элементарным фотоокислением. Линшитц и Реннерт [44] освещали хлорофилл красным светом при температуре жидкого азота в смеси эфир — изопентан — спирт и выяснили, что при этом происходит выцветание, которое усиливается в присутствии хинона и объясняется фотоокислением. Процесс обратим при размораживании раствора. Толлин и Грин [45] наблюдали при освещении системы хлорофилл — хинон в той же «жесткой» среде появление сигнала ЭПР со спектром семихинона, что указывает на одновременно идущее одноэлектронное фотоокисление хлорофилла. Эти результаты можно также интерпретировать как сенсибилизированное хлорофиллом восстановление хинона с использованием компонентов растворителя в качестве донора электрона.

Н. Н. Дроздова исследовала фотореакции хлорофилла с хинонами [37, 46, 47]. В присутствии *п*-бензохинона в спиртоглицериновой среде при —70° удается обнаружить обратимое выцве-

тание хлорофилла и его аналогов. Ниже показано обратимое изменение оптической плотности в «красном максимуме» поглощения при окислении пигментов *n*-бензохиноном ($\Delta D \cdot 1000$). Минус — падение интенсивности за 2 мин. света (С), плюс — возрастание за 2 мин. темноты (Т).

Пигмент	Световая реакция (Т—С), $-\Delta D$	Темновая обратная реакция (Т—С), $+\Delta D$	Регенерация пигмента, %
Бактериохлорофилл	170	140	82
Бактериовиридин	140	110	82
Хлорофилл *a*	120	110	90
Хлорофилл *b*	50	30	60
Протохлорофилл	30	20	33
Феофитин *a*	0	0	0

Мы проверяли возможность взаимодействия разных хинонов с хлорофиллом *a*. Опыты ставили по той же методике при температуре —70°. Обратимая фотореакция наблюдалась с *n*-бензохиноном, 2,3-диметокси-5-метилбензохиноном; с антрахиноном реакцию наблюдать не удалось.

Следует указать на отсутствие корреляции между тушением флуоресценции перечисленных пигментов *n*-хиноном и глубиной обратимой фотореакции [48]. Ниже приводится концентрация *n*-бензохинона при «половинном» тушении флуоресценции пигментов в ацетоне и пиридине.

Пигмент	Ацетон, м/л	Пиридин, м/л
Бактериовиридин	0,0030	0,0138
Хлорофилл *a*	0,0090	0,0120
Хлорофилл *b*	0,0120	0,0200
Феофитин *a*	0,0138	0,0210
Протохлорофилл	0,0182	—
Бактериохлорофилл	0,0145	0,0260

По-видимому, акт тушения флуоресценции связан с электронным обменом в «клетке» пигмент-тушитель, тогда как фотореакция измеряется после того, как фотопродукты вышли из «клетки», где происходил первичный электронный процесс.

При действии красного света происходит обратимое фотохимическое взаимодействие пигмента (Хл) с хиноном (Хин) и образование семихинона согласно реакции:

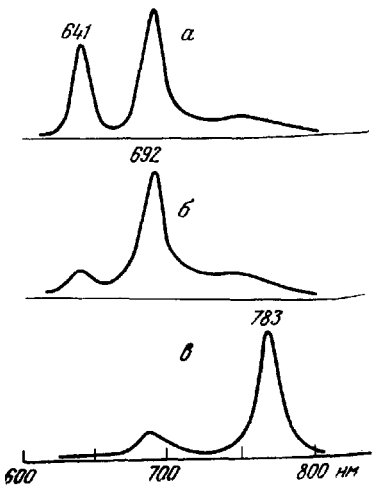
$$Хл^* + Хин \underset{\text{синий}}{\overset{\text{красный}}{\rightleftharpoons}} Хл^+ + \cdot Хин^-$$

Обратимый эффект в этой реакции наблюдается при действии «красного» света. В белом свете лампы накаливания мы не уловили обратимых эффектов. Действительно, синий свет ускоряет обратную реакцию, вероятно, путем фотоактивации избытка хинона, окисленной формы хлорофилла или семихинона.

В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова [49, 50] нашли, что в кислом спирте реакция окисления хлорофилла *n*-бензохиноном идет глубже, чем реакция в вязких спиртоглицериновых средах, описанная в наших опытах. Одновременно удается наблюдать изменение фотопотенциала в положительную сторону, что приписывается образованию семихинона хлорофилла, тогда как в вязких средах при —70° невозможно провести измерения потенциала ввиду малой подвижности ионов. Эффект кислой среды определяется, по-видимому, увеличением окислительного потенциала хинона в этих условиях. В кислом спирте видны те же типы спектральных изменений, которые мы наблюдали в спиртоглицериновой среде при —70°.

Во время окисления бактериохлорофилла хинонами при 20° происходит преимущественно необратимая реакция «двухэлектронного» окисления с отнятием двух атомов водорода в положениях 3, 4 и образованием хлорофиллоподобного продукта. В отличие от этого, проводя фотореакцию при низкой температуре, удается наблюдать обратимое, вероятно «одноэлектронное», окисление, ведущее к появлению промежуточного продукта с поглощением при 430 нм. Следует полагать, что эти два типа фотореакций могут быть независимыми, либо продукт «680» может образоваться путем промежуточного образования продукта «430» [51].

При взаимодействии в вакууме бактериохлорофилла со свежеобразованным раствором *о*-хинона (полученным при окислении пирокатехина окисью серебра) в темноте образуется некоторое количество хлорофиллоподобного пигмента. Освещение в максимуме поглощения бактериохлорофилла приводит практически к полному его превращению в хлорофилловый пигмент, который в свою очередь превращается в протохлорофилловый пигмент при последующем освещении красным светом (в полосе поглощения «хлорофилла») [52] (рис. 4).



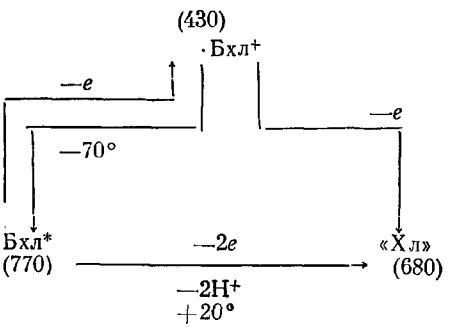


Рис. 4. Спектры флуоресценции продуктов фотоокисления бактериохлорофилла *о*-хиноном в толуоле

а — протохлорофилл+хлорофилл, *б* — хлорофилл, *в* — бактериохлорофилл

Изложенное можно выразить гипотетической схемой, где Бхл *— возбужденный бактериохлорофилл, «Хл» — хлорофиллоподобный продукт с максимумом поглощения при 680 нм, Бхл +— промежуточный продукт окисления бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 нм.

В опытах с водными растворами пигментов в детергенте (тритон Х-100) и в суспензии хлоропластов не удалось обнаружить заметных спектральных изменений, но можно было наблюдать отчетливый эффект появления отрицательного потенциала инертного электрода под действием света. Появление отрицательного фотопотенциала, не зависящего от pH в этих системах, обусловлено, по-видимому, тем, что в этом случае с электродом взаимодействует только восстановленная форма окислителя, которая находится в непосредственном контакте с электродом [53].

В связи с развитием техники дифференциальной спектроскопии в литературе оживленно обсуждается вопрос о наличии в живых фотосинтезирующих организмах фотохимически измененных форм хлорофилла и его аналогов. В таких поисках может помочь знание диффе-

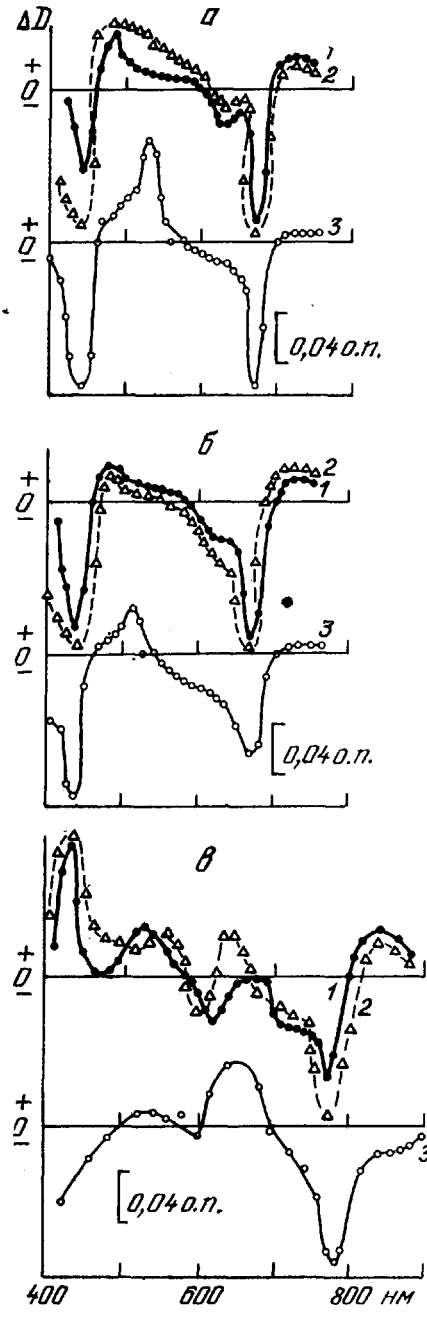


Рис. 5. Дифференциальные спектры поглощения при фотохимическом окислении и восстановлении хлорофилла *а* (*а*), бактериовиридина (*б*) и бактериохлорофилла (*в*)

1 — окисление *п*-бензохиноном; *2* — окисление кислородом; *3* — восстановление аскорбиновой кислотой (при восстановлении бактериохлорофилла применяли сернистый натрий)

ренциальных спектров поглощения продуктов фотохимического взаимодействия пигментов с окислителями и восстановителями. Эти измерения проведены в вязкой спиртоглицериновой среде при реакции пигментов с хиноном и кислородом и в пиридинглицериновой среде при реакции с аскорбиновой кислотой (рис. 5).

Были сопоставлены дифференциальные спектры поглощения в спиртоглицериновых средах при —70° и в спирте при +20° с помощью импульсной спектроскопии. Спектры промежуточных

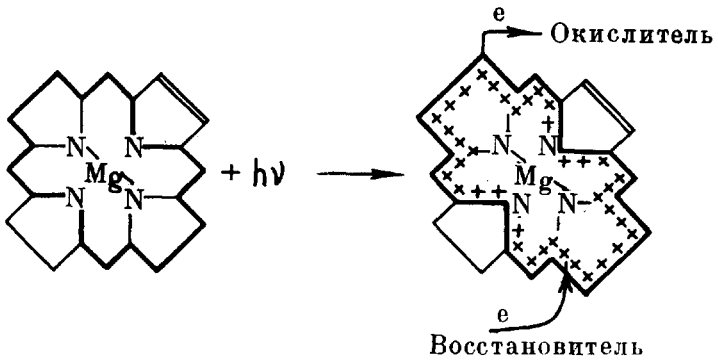


Рис. 6. Схема элементарных фотореакций возбужденного хлорофилла

соединений оказались идентичными [54]. Таким образом, оба метода приводят к наблюдению одних и тех же первичных продуктов.

Заметно сходство дифференциальных спектров поглощения при обратимом окислении пигментов хиноном и преимущественно при необратимом окислении кислородом. Большое сходство окисленных и восстановленных форм указывает на то, что в обоих случаях происходит нарушение системы сопряженных по кругу двойных связей в молекуле пигмента.

Итак, проведенные исследования показывают, что возбужденные молекулы хлорофилла и его аналогов могут играть роль доноров и акцепторов электрона, что показано на схеме (рис. 6).

Рассмотрим теперь фотохимические свойства тройных систем, состоящих из хлорофилла, донора и акцептора электрона.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

Давно известно фотосенсибилизирующее действие хлорофилла. Еще в 20-х годах нашего столетия в лабораториях Баура, Варбурга, Гаффрона был изучен ряд случаев сенсибилизации окислительно-восстановительных реакций хлорофиллом. В качестве доноров электрона применяли фенилгидразин и органиче-

ские амины, а в качестве акцепторов электрона — разнообразные красители и кислород воздуха.

В нашей лаборатории изучались окислительно-восстановительные реакции, сенсибилизированные хлорофиллом и аналогами, идущие в органических растворителях и в водных растворах. Суть реакции заключается в том, что возбужденная молекула хлорофилла играет роль переносчика электрона (водорода) от молекулы донора к молекуле акцептора. В результате реакции донор электрона окисляется, а акцептор восстанавливается, тогда как молекулы пигмента-сенсибилизатора практически не изменяются в процессе реакции. Ниже дается краткая сводка экспериментального материала, полученного в лаборатории.

Пигменты-сенсибилизаторы. Фотосенсибилизирующим действием обладают хлорофиллы *a* и *b*, бактериохлорофилл, бактериовиридин, феофитины, протохлорофилл, разнообразные порфирины и фталоцианины, содержащие в центре молекулы атомы магния, водорода или цинка.

Доноры электрона. Аскорбиновая кислота оказалась универсальным донором электрона, действующим в широком диапазоне условий. Применяли другие диэнолы, фенилгидразин, цистеин, триптофан, а также восстановленный N-бензилникотинамид. В ряде реакций пользовались соединениями двухвалентного железа, в том числе цитохромом *c*.

Акцепторы электрона. Применялся широкий круг соединений: кислород, метиловый красный и другие азокрасители, различные хиноны, рибофлавин, НАД и НАДФ, N-бензилникотинамид, метилвиологен. Таким образом, акцепторами электрона служат системы, обладающие широчайшим пределом редокспотенциалов,— от кислородного до водородного электрода (метилвиологен).

Природа среды. Молекулы среды-растворителя, взаимодействуя с молекулами, участвующими в реакции, приводят к изменению их электронодонорных и электроноакцепторных свойств. Так, основные среды (пиридин) вызывают усиление электронодонорных свойств аскорбиновой кислоты, облегчая тем самым реакции фотосенсибилизированного восстановления. Применение водных кислых сред позволяет использовать соединения двухвалентного железа (наряду с аскорбиновой кислотой) в качестве донора электрона при сенсибилизированном восстановлении азокрасителей.

Хлорофилл и его аналоги нерастворимы в воде. В нашей лаборатории была показана большая фотохимическая активность водных коллоидных растворов хлорофилла, полученных с помощью детергентов [55]. Это явление было детально изучено при различных pH с использованием разных доноров электрона [56]. По-видимому, хлорофилл в мицелле детергента находится в «мономерной» форме, чем объясняется его высокая

активность. Хлорофилл, адсорбированный на цитохроме *c*, в водном растворе фотосенсибилизирует окислительно-восстановительные превращения этого соединения [57].

В водных растворах детергентов хлорофилл активно сенсибилизирует восстановление и окисление цитохрома *c* (рис. 7). Эту реакцию чрезвычайно ускоряют кофакторы — флавины, хиноны, которые, по-видимому, включаются в цепь переноса электрона, где исходным донором электрона является электронодонорная группировка белка [58]. Наблюдалось фотосенсибилизированное восстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в водных коллоидных растворах хлорофилла и гомогенатах листьев [59, 60]. В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова [61, 62] изучали фотосенсибилизированное восстановление метилового красного коагулированными коллоидами хлорофилла в адсорбированном состоянии на неорганических и органических адсорбентах и в коацерватах. Вернон [63] изучал фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в водных растворах, содержащих ферментные препараты. Им удалось показать возможность фотосенсибилизированного восстановления пиридиннуклеотидов по типу реакций, изученных нами ранее в органических растворителях [64, 65].

Из всех этих работ можно сделать вывод, что различные формы хлорофилла в гомогенных и гетерогенных условиях обладают фотосенсибилизирующим действием в окислительно-восстановительных реакциях. В тех средах, где пигменты находятся в «мономерных» формах, реакции обычно более эффективны, чем в средах, где участвуют агрегированные формы пигмента.

Влияние вязкости среды. [30, 66]. Были исследованы фотосенсибилизированные хлорофиллом реакции переноса водорода в вязких средах различной природы. Для этой цели использовали систему аскорбиновая кислота — хлорофилл — акцептор электрона. Изучали сенсибилизированное восстановление акцептора электрона (преимущественно метилового красного) в разных средах при температуре от +20 до —70°. В системе спирт — глицерин сенсибилизированное восстановление метилового красного становится все менее эффективным с увеличением вязкости по мере понижения температуры. Реакция при —10° идет медленнее,

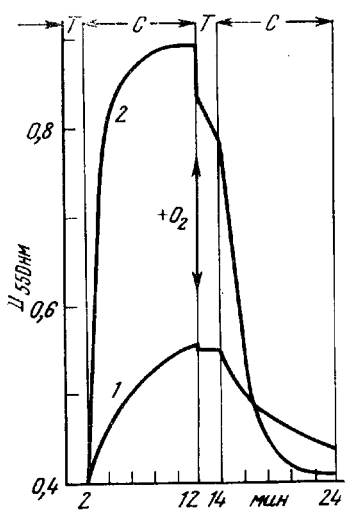


Рис. 7. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление — окисление цитохрома *c* в водном 0,5%-ном растворе тритона X-100 (*1*) и в присутствии 10^{-5} *M* рибофлавина или флавинмононуклеотида (ФМН) (*2*)

С — свет, Т — темнота

чем при +20°, а при —40° в этой системе уже не удается наблюдать сенсибилизированной реакции. Однако в этиловом спирте даже при —70° идет быстрая сенсибилизация. Таким образом, эффект замедления связан не с понижением температуры, а с увеличением вязкости системы при понижении температуры. Сенсибилизированное фотовосстановление метилового красного аскорбиновой кислотой в системе пиридин — глицерин дает ту же картину. В фосфорной кислоте и в смеси фосфорной кислоты с глицерином сенсибилизация идет эффективно при комнатной температуре, а при —20° (в переохлажденной вязкой системе) процесс полностью останавливается. Сенсибилизированное восстановление сафранина и рибофлавина имеет те же закономерности.

Таким образом, фотосенсибилизация в растворах требует диффузии активных продуктов и может быть представлена в виде чередования элементарных стадий, требующих соударений между промежуточными соединениями с вероятным образованием долгоживущих предреакционных комплексов.

Модели I фотохимической системы. В этой системе используется донор электрона с восстановительным потенциалом, близким к потенциалу цитохромов, а ферредоксин является акцептором электрона. В моделях в качестве акцептора электрона использовался метилвиологен с близким к ферредоксину значением восстановительного потенциала ($E_0' = 0{,}43$ в). В водных растворах детергентов можно наблюдать фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление виологена, флавинов, некоторых красителей при использовании в качестве донора электрона аскорбиновой кислоты, цистеина, глютатиона, тиомочевины, гидразина и т. д. [67, 68]. Например, после освещения красным светом водного детергентного раствора, содержащего хлорофилл, цистеин и метилвиологен, появляется синяя окраска восстановленной формы метилвиологена, обратимо окисляющейся после пуска воздуха. Реакции этого типа вообще требуют анаэробных условий, так как кислород является активным акцептором электрона, быстро реагирующим с перечисленными донорами электрона. Брюн и Сан-Пьетро [69] изучили недавно восстановление виологенов, сенсибилизированное хлорофиллином.

Когда в качестве донора электрона используется тиомочевина, то не удается наблюдать сенсибилизированного восстановления метилвиологена в анаэробных условиях. Однако освещение системы тиомочевина — хлорофилл — виологен в присутствии кислорода воздуха приводит к глубокому сенсибилизированному восстановлению виологена [70]. После взбалтывания раствора с воздухом восстановленный виологен окисляется. Эта реакция идет глубже в щелочной среде при pH больше 8 (рис. 8).

Исследование показало, что в зоне освещения происходит фотосенсибилизированное окисление тиомочевины [71], где создаются локально анаэробные условия. Продукт фотоокисления

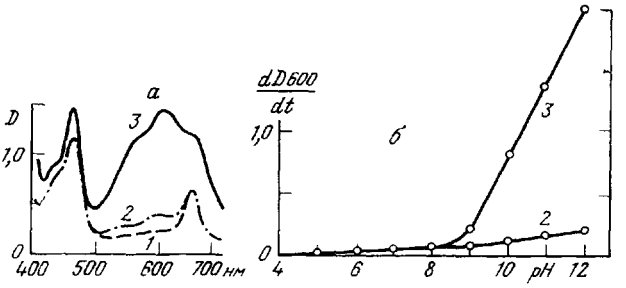


Рис. 8. Фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена в 0,5% водном растворе тритона X-100 при pH 9 в присутствии тиомочевины (*а*) и зависимость скорости реакции от pH раствора (*б*)

1 — спектр до освещения; после освещения; *2* — в вакууме, *3* — на воздухе

тиомочевины является сильным восстановителем, способным восстановить метилвиологен как в «темноте», так и в фотосенсибилизированной реакции.

Рассмотрим теперь возможные молекулярные механизмы фотосенсибилизации.

Перенос энергии от возбужденной молекулы пигмента к молекулам-акцепторам. Длительность жизни возбужденного состояния на несколько порядков выше у триплетной молекулы, чем у синглетной. Переносу энергии благоприятствует длительный контакт между возбужденной молекулой-донором энергии (S^*, T) и молекулой-акцептором энергии (A), определяющийся образованием комплексов типа $S \cdot A$, $S^* \cdot A$ или $T \cdot A$. Известно, что хлорофилл и другие пигменты в растворе могут передавать энергию возбуждения по механизму Вавилова — Перрена [72]. При этом необходимо условие — молекула-акцептор должна иметь электронный уровень, расположенный ниже S^*. При сенсибилизированных хлорофиллом реакциях это условие не соблюдается, так как донор электрона (например, аскорбат) и широкий ряд изученных акцепторов обладают электронными уровнями, расположенными выше, чем электронный уровень хлорофилла, соответствующий красной полосе поглощения. Перенос энергии с коротковолнового электронного уровня хлорофилла S_1^* (синяя полоса поглощения) до сих пор не наблюдали ввиду малой длительности жизни этого возбужденного состояния и эффективной внутримолекулярной деградации энергии до уровня S^* и S.

Условием переноса энергии на триплетном уровне по механизму Теренина — Ермолаева является более низкое расположение Т-уровня молекулы-акцептора энергии. У партнеров сенсибилизированных реакций, которые могут быть акцепторами энергии, недостаточно изучены низшие триплетные уровни.

У большинства этих соединений не удалось найти фосфоресценцию, лежащую в более длинноволновой области, чем фосфоресценция хлорофилла (около 850 нм). Особым случаем является перенос энергии от возбужденного красителя в триплетном состоянии к молекуле кислорода, переходящей в возбужденное синглетное состояние, обладающее высокой химической активностью. Эти представления, которые в первоначальной форме были развиты в работах Каутского, получили развитие в ряде современных работ.

Тушение триплетного состояния в опытах с применением импульсной спектроскопии может быть результатом восприятия энергии молекулой-тушителем или химического взаимодействия триплетной молекулы с тушителем. Эффективное тушение триплетного состояния молекулами-окислителями (хинонами, нитросоединениями) следует приписать химической реакции, так как триплетные уровни этих молекул, вероятно, расположены выше, чем у хлорофилла. Однако имеются данные, что у полиенов и полициклических соединений триплетные уровни могут быть расположены достаточно низко, чтобы объяснить ингибирование реакций хлорофилла этими соединениями.

Элементарные реакции переноса электрона при фотосенсибилизации. Результатом взаимодействия возбужденной молекулы-сенсибилизатора с донором или акцептором электрона может быть элементарное фотоокисление или фотовосстановление. Возникает вопрос — какие из этих процессов реализуются в сенсибилизированных реакциях?

При фотовосстановлении хлорофилла и аналогов в основных средах происходит образование долгоживущих промежуточных продуктов, превращение которых можно наблюдать обычными спектральными методами. Это облегчает изучение механизма реакций в таких средах. Сенсибилизированные реакции переноса водорода от донора к акцептору наблюдались с теми донорами электрона, которые способны к фотовосстановлению хлорофилла; введение в систему акцептора электрона блокирует фотовосстановление (наблюдаемое путем спектроскопии, измерением фотопотенциала и фотопроводимости); в «темновом» акте реакции удается наблюдать обратимое взаимодействие фотовосстановленных форм пигментов с акцепторами электрона.

Описанные опыты указывали на то, что в ряде случаев сенсибилизация может быть связана с промежуточным обратимым фотовосстановлением пигмента-сенсибилизатора в изученных типах реакций, идущих преимущественно в основных средах.

Труднее изучить механизм реакций в тех средах, где не удается наблюдать образования долгоживущих промежуточных продуктов с выраженным спектром поглощения. Мы указывали на вероятность механизмов, связанных с фотовосстановлением пигмента в основных средах, и на фотоокисление в спиртовых средах [73]. Анализируя кинетику сенсибилизированного хлоро-

филлом восстановления метилового красного в спиртовом растворе, Ливингстон с сотрудниками [74] рассмотрели возможность первичного фотовосстановления или окисления пигмента-сенсибилизатора.

Систематическое изучение фотопотенциала на границе твердая пленка пигмента — раствор позволило В. Б. Евстигнееву [23, 75] выяснить условия, благоприятствующие восприятию и отдаче электрона при освещении пленки.

Так, например, в этих опытах было показано, что кислород и метиловый красный в кислых средах наиболее отчетливо обусловливают появление положительного фотопотенциала пленки пигментов, т. е. играют роль акцепторов электрона; в отличие от этого, аскорбат и фенилгидразин способствуют появлению отрицательного фотопотенциала пленки.

При изучении фотосенсибилизированного феофитином восстановления метилового красного В. Б. Евстигнеев с сотрудниками нашли повышение эффективности сенсибилизации в нейтральной и кислой среде, возможно соответствующее элементарному фотовосстановлению и фотоокислению пигмента.

В опытах А. К. Чибисова и А. В. Карякина с применением импульсной спектроскопии удалось наблюдать первичную реакцию триплетной формы хлорофилла и образующихся первичных ион-радикалов пигмента с донорами и акцепторами электрона. Так, например, изучена реакция первичного ион-радикала хлорофилла с полиметиновыми красителями, играющими роль конечного акцептора электрона [76].

Совокупность известного экспериментального материала указывает на возможность механизмов сенсибилизации, связанных с первичным фотовосстановлением или фотоокислением пигментов и вероятным промежуточным образованием комплекса возбужденной молекулы пигмента с донором или акцептором электрона (рис. 9). Оба механизма не исключают друг друга и могут работать одновременно с различной эффективностью [7].

Итак, исследования фотохимии хлорофилла, его аналогов и производных дали сведения, нужные для понимания природы элементарных процессов фотосинтеза. Основным представляется тот вывод, что возбужденный светом хлорофилл и его аналоги участвуют в процессах переноса электрона от молекул доноров к акцепторам путем обратимого восприятия или отдачи электрона. Можно предполагать, что таков путь включения разных форм хлорофилла в каждую из фотохимических стадий фотосинтетической цепи переноса электрона.

В работающей цепи фотосинтетического переноса электрона акты восприятия и отдачи электрона быстро следуют один за другим, что затрудняет обнаружение измененных форм пигментов. Продукты фотохимического превращения хлорофилла могут накапливаться в измеримых количествах лишь при нарушении нормальной системы переноса электрона.

При рассмотрении природы первичного превращения хлорофилла следует указать на аналогию с работой цитохромов в цепи переноса электрона в митохондриях. В работающей циклической или открытой системе теряет значение вопрос о том, что первично — окисление или восстановление цитохрома. При спектроскопическом наблюдении накопление восстановленного или окисленного цитохрома зависит от метаболического режима — наличия субстратов — доноров электрона, степени аэрации. Равным образом наблюдение за накоплением промежуточных

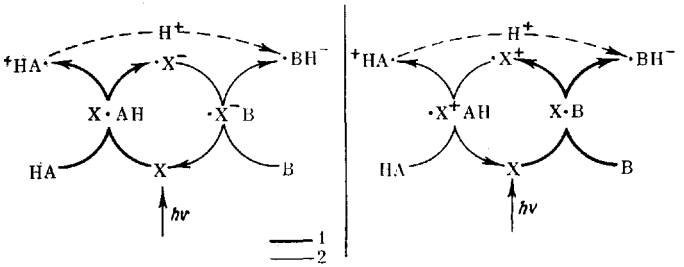


Рис. 9. Схема механизмов фотосенсибилизации

1 — световая стадия; *2* — темновая стадия; X — хлорофилл; AH — донор электрона; B — акцептор

форм хлорофилла будет зависеть от условий эксперимента; восстановительные условия способствуют наблюдению фотовосстановленных форм, окислительные — фотоокисленных. Понятно, работа всей цепи фотосинтетического переноса электрона не зависит от порядка чередования элементарных фотопроцессов. Эти выводы сделаны на основании изучения фотохимических свойств изолированного хлорофилла.

Чтобы понять природу действия пигментов в растениях, нужно выяснить их молекулярную организацию в мембранных структурах хлоропластов и хроматофорах. Вначале рассмотрим спектральные эффекты агрегации (междумолекулярного взаимодействия) в структурах, образуемых путем самосборки молекул пигментов при удалении растворителя.

СВОЙСТВА АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

Растворы хлорофилла и его аналогов в полярных органических растворителях содержат главным образом «мономерные» формы пигментов. Разбавление водой растворов пигментов (в спирте, ацетоне, пиридине, диоксане) и коагуляция (например, хлористым магнием) ведут к агрегации со сдвигом максимума поглощения в длинноволновую область спектра. Изменяя

степень коагуляции и pH раствора, можно получить коллоиды — агрегаты с желаемым положением максимумов поглощения: в случае хлорофилла и бактериовиридина — от 660 до 760 нм и для бактериохлорофилла — от 770 до 900 нм.

В нашей лаборатории [77] и независимо в лаборатории Ливингстона [78] было найдено, что в сухих неполярных органических растворителях, не содержащих полярных примесей, наблюдается частичная агрегация пигментов, вероятно, ведущая к образованию димеров. В концентрированных растворах пигментов в полярных растворителях удается наблюдать полосы поглощения в близкой инфракрасной области спектра, соответствующие агрегированным формам.

При испарении в вакууме растворов хлорофилла и его аналогов образуются твердые пленки, в которых отмечены максимумы поглощения, смещенные в инфракрасную область, соответствующие разным видам упаковки. Так, в твердых пленках бактериохлорофилла мы наблюдали максимумы при 800 и 850—890 нм [79], у бактериовиридина — при 740 нм, соответствующие поглощению пигментов в живых бактериях [80, 81]. Электронографическое исследование показало кристаллическую структуру форм хлорофилла с максимумами при 690 и 740 нм [82]. Применение методов инфракрасной спектроскопии (ИК) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) к изучению агрегации пигментов в неполярных растворителях позволило обосновать представление о механизме пигмент-пигментного взаимодействия, в основе которого лежит образование координационной связи карбонильной группы одной молекулы хлорофилла с центральным атомом магния другой молекулы [83].

Измерение люминесценции твердых пленок при —196° позволило обнаружить ряд максимумов, соответствующих мономерным формам и разным типам агрегации [81, 84]. Соотношение между ними зависело от способа приготовления пленки и степени удаления растворителя. Целый ряд агрегированных форм хлорофилла *а* и сопровождающих пигментов получен в модельных системах — концентрированных растворах, монослоях и пленках пигментов [81].

В твердых пленках удается установить те же максимумы поглощения и люминесценции, что и у пигментов в живых организмах [79—86].

Температурная зависимость люминесценции объясняется условиями межмолекулярной дезактивации возбужденных молекул пигментов. В мономерных формах, где молекулы находятся на расстояниях, исключающих эффективное взаимодействие электронных облаков системы сопряженных связей, понижение температуры действует преимущественно на внутримолекулярные процессы дезактивации (слабое действие). При более плотных упаковках колебания и качания молекул ведут

к межмолекулярной дезактивации за счет перекрывания электронных облаков порфиринового кольца, когда молекулы вступают в контакт при колебаниях. Понижение температуры, уменьшая колебания, ведет к изоляции молекул и, следовательно, к уменьшению межмолекулярной дезактивации и возгоранию люминесценции.

В нашей лаборатории изучали действие паров воды и других соединений на спектральные свойства твердых пленок протохлорофилла, хлорофилла и бактериохлорофилла [87]. Получены следующие результаты.

Хлорофилл *а*. При испарении эфирных растворов обычно получается пленка с максимумом поглощения около 680 нм. Под действием паров воды при комнатной температуре в течение 10—15 час. наблюдается «выпячивание» длинноволнового склона кривой поглощения; на дифференциальном спектре видно образование формы с максимумом поглощения около 715 нм (рис. 10, *а*). При обработке пленок парами воды более 24 час.

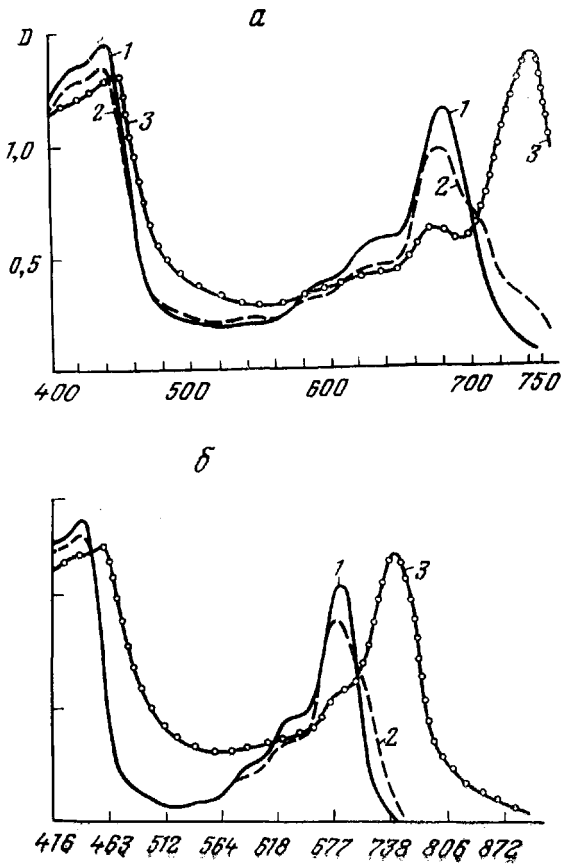


Рис. 10. Спектры поглощения пленки хлорофилла *а*

а — исходной (*1*) и после обработки парами воды при 50° в течение 15 мин. (*2*) и 1,5 час. (*3*); *б* — исходной (*1*), после обработки парами метанола при 19° в течение 10 мин. (*2*) и 55 мин. (*3*); *в* — исходной (*1*), после обработки парами диоксана при 18° в течение 10 мин. (*2*)

удалось наблюдать образование формы пигмента с основным максимумом поглощения около 745 нм. В ряде опытов, нагревая пленку в парах воды при 50° в течение 30—45 мин., также удалось наблюдать образование формы пигмента с максимумом поглощения около 745 нм (рис. 10, *а*). Если удалить воду, то нагревание пленки до 80° приводит к нарушению форм «745» и «715» и возврату коротковолновой формы с поглощением около 675 нм. В водных растворах аммиака, ацетальдегида и формальдегида образование формы «745» наступает скорее, чем в парах воды.

В парах метилового спирта при комнатной температуре через несколько минут образуется форма с поглощением в области 710—715 нм, через 30—60 мин. возникает форма с максимумом поглощения при 745 нм, которая доминирует в спектре (рис. 10, *б*). В парах этилового спирта также образуется форма «745».

Характерные изменения структуры ИК-спектра твердых пленок под действием метанола или этанола позволили предположить, что получение формы 745 нм связано с образованием водородных и координационных межмолекулярных связей, в которых принимают участие кетогруппы циклопентаноновых колец и центральные атомы магния молекул пигмента, а также молекулы спирта (кето-C=O... HO(R)...Mg) [88].

В парах диоксана наблюдается образование «диоксановой» упаковки [87, 89] с максимумом поглощения при 690 нм; обращает на себя внимание «острота» спектральной кривой (рис 10, *в*).

В парах пиридина не видно образования длинноволновых форм. И наоборот, пары пиридина через 10—15 мин. устраняют длинноволновую «выпуклость» в спектре поглощения исходной пленки (695 нм), смещая положение главного максимума в коротковолновую сторону.

Хлорофилл *b*. Образует твердую пленку с максимумом поглощения 658—660 нм. При обработке парами метилового спирта (в течение 1,5 час. при 20°) образуются формы с максимумом поглощения при 670 и 720 нм. Изучение структуры ИК-спектра привело к предположению, что их образование связано с возникновением межмолекулярных связей, в которых участвуют альдегидные (формильные) группы молекул.

Вероятно, у высокоагрегированных форм хлорофилла *b* координационные вакансии центрального атома магния насыщаются в результате взаимодействия с кето- и альдегидной группами двух других молекул (при посредстве низкомолекулярного адденда). Это отличает хлорофилл *b* от хлорофилла *а*, при агрегации которого исключительная роль принадлежит связям, образованным с участием кетогрупп [88].

Протохлорофилл и **4-винилпротохлорофилл,** выделяемые из оболочек семян тыквы, при испарении эфира образуют твердые

пленки с максимумом поглощения ~635 нм [90, 91]. Обработка пленок парами аммиака приводит к образованию формы с максимумом поглощения около 645 нм [90]. В присутствии паров метилового спирта происходит перестройка структуры пленок с образованием формы 650 нм, доминирующей в спектре, которая обладает флуоресценцией с максимумом при 655 нм. Нагревание до 90° вызывает разрушение формы 650 нм, сохраняя коротковолновую форму [92, 93].

Таким образом, в твердых пленках протохлорофилловых пигментов можно моделировать формы, соответствующие по ряду свойств основным формам предшественника хлорофилла в листьях. Получение указанных форм в пленках обусловлено пигмент-пигментным взаимодействием, которое, как показали измерения ИКС, осуществляется при образовании межмолекулярных связей с участием кетогрупп циклопентаноновых колец и центральных атомов магния, а, возможно, и при непосредственном контакте π-электронных систем молекул, например, у формы 635 нм.

В пленках протохлорофилловых пигментов при обработке парами ацетона или серного эфира можно наблюдать образование формы 675—680 нм, которая обнаруживается в спектре вслед за начальным образованием формы 650 нм. Эта форма, по всей вероятности, является структурным аналогом высокоагрегированной, кристаллической формы хлорофилла *а* с крайним длинноволновым поглощением. Ее создание, как и у хлорофилла *а*, связано с межмолекулярным взаимодействием, в котором молекулы низкомолекулярного адденда (воды) играют комплексообразующую роль.

Бактериохлорофилл образует твердую пленку с максимумами поглощения при 800 и 860 нм [79, 88]. Выдерживание в парах воды приводит к сдвигу до 875 нм. Однако при использовании воды, насыщенной серным эфиром, за 30—40 мин. при 50° удается наблюдать длинноволновую форму с максимумом поглощения около 910 нм. Образование формы 900—920 нм наблюдается в парах ацетальдегида и метилового спирта, но лишь в присутствии серного эфира. По-видимому, молекулы эфира сольватируют и расшатывают гидрофобную структуру пленки, делая ее доступной для проникновения паров воды. Таким образом, в модельных системах удается наблюдать наиболее длинноволновые формы бактериохлорофилла, существующие в живых фотосинтезирующих бактериях (рис. 11).

Изменения структуры ИКС твердых пленок в парах воды и серного эфира привели к предположению, что высокоагрегированные формы бактериохлорофилла образуются с участием ацетильных групп и кетогрупп циклопентаноновых колец молекул в межмолекулярных связях следующих разновидностей: ацетил-C=O...Mg; кето-C=O...Mg; кето-C=O...HO(R)...Mg [88].

Изученные полярные соединения, способные к координационному взаимодействию с центральным атомом магния, могут образовывать «мостики» между молекулами пигмента, приводят к возникновению «длинноволновых» агрегированных форм, обладающих более упорядоченной структурой [79].

Совокупность описанных данных свидетельствует о включении молекул воды или других низкомолекулярных полярных

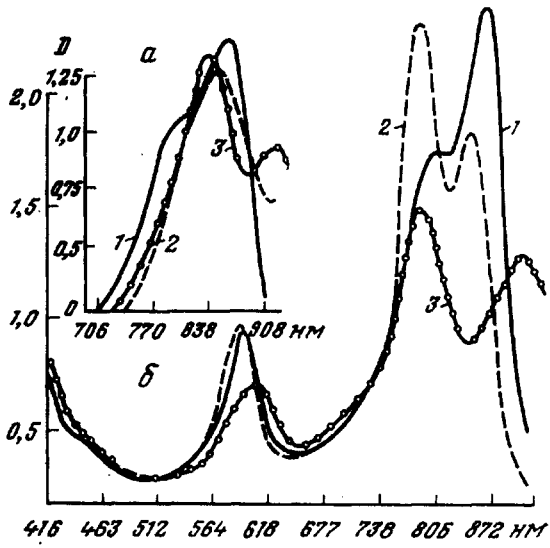


Рис. 11. Спектры поглощения пленки бактериохлорофилла

а — исходной (*1*), после обработки парами воды и серного эфира при 45° в течение 15 мин. (*2*), и при 50° в течение 45 мин. (*3*); *б* — исходной (*1*), после обработки парами серного эфира при 20° в течение 30 мин. (*2*) и с последующей обработкой парами метанола в течение 45 мин. (*3*)

соединений в длинноволновые агрегированные структуры протохлорофилла, хлорофилла и бактериохлорофилла.

Бактериовиридин, более склонный к агрегации, чем хлорофилл *а*, образует твердую пленку с максимумом поглощения ~745 нм при испарении серного эфира [80, 92].

Нагревание (до 90°) не только не приводит к дезагрегации, как у других пигментов, но способствует усилению межмолекулярного взаимодействия и дальнейшему длинноволновому смещению максимума поглощения (до 750—760 нм).

В карбонильной области ИК-спектров твердых пленок отсутствует поглощение свободных кетогрупп (~1700 $см^{-1}$) и доминирует «агрегационный» максимум (1650 $см^{-1}$), который, по всей вероятности, обусловлен образованием непосредственных координационных связей кетогрупп молекул с центральными атомами магния (кето-C=O...Mg) [94].

Откачивание пленок в вакууме и выдерживание в парах воды или других соединений не вызывает изменений в структуре ИК и видимых спектров поглощения.

Таким образом, можно предположить, что бактериовиридин без введения экзогенных комплексообразующих аддендов обра-

зует более прочные по сравнению с хлорофиллом *а* длинноволновые агрегированные структуры с предельно высокой степенью межмолекулярного взаимодействия. Этому, возможно, благоприятствует отсутствие карбометоксильной группы у десятого атома С молекулы бактериовиридина и наличие более короткого заместителя (фарнезола) вместо фитола у седьмого атома С.

Главная масса пигментов в клетках находится в агрегированных формах, поэтому необходимо исследование их фотохимических свойств.

Фотосенсибилизация. В 1946 г. в нашей лаборатории было обнаружено фотосенсибилизирующее действие кристаллических фталоцианинов.

Фотосенсибилизирующее действие агрегированных форм наиболее удобно наблюдать для необратимых реакций, таких, как фотовосстановление азокрасителя аскорбиновой кислотой или восстановление цитохромов. В коллоидных водных растворах хлорофилла и бактериовиридина удается найти условия преимущественного образования двух типов агрегированных форм с максимумами поглощения около 675 нм и 725 нм; измерение квантового выхода фотовосстановления метилового красного показало одинаковую эффективность обеих форм [95]. Аналогичные результаты получены с коллоидами бактериовиридина. Однако квантовый выход сенсибилизации мономерными формами пигментов в растворе гораздо выше.

Элементарные фотопроцессы. А. Н. Теренин и В. Е. Холмогоров [96] наблюдали сигнал ЭПР в твердых пленках хлорофилла в присутствии воды и кислорода, однако путем измерения ЭПР не удалось наблюдать триплетных форм в хлоропластах и твердых пленках, тогда как в этих условиях растворы хлорофилла при освещении дают сигнал ЭПР, соответствующий триплетному состоянию [97].

В опытах А. Н. Теренина, Е. К. Пуцейко и Нельсона была обнаружена фотопроводимость твердых пленок хлорофилла. Ф. Ф. Литвин и В. И. Звалинский [98], изучая квантовый выход фотопроводимости твердых пленок хлорофилла и его аналогов, нашли, что квантовый выход у длинноволновых квазикристаллических форм пигментов выше, чем у коротковолновых; те же закономерности наблюдались в пленках хлоропластов и хроматофоров бактерий. Изучая фотоэффект на границе твердая пленка пигмента — раствор, В. Б. Евстигнеев и А. Н. Теренин в 1951 г. нашли [42], что знак фотопотенциала зависит от природы веществ, находящихся в растворе. Этот эффект был детально изучен в работах В. Б. Евстигнеева [7]. Механизм действия агрегированных форм можно представить аналогичным действию неорганических полупроводников: восприятие электрона молекулой-акцептором на фазовой границе, уравновешенное

отдачей электрона молекулой-донором в «дырку», также мигрирующую к фазовой границе. Этот элементарный механизм осложняется явлением миграции энергии от коротковолновых к длинноволновым формам пигментов.

Обратимые фотореакции агрегированных форм. Твердые пленки пигментов обладают весьма слабой флуоресценцией при комнатной температуре, тогда как замораживание до температуры жидкого азота ведет к большому усилению длинноволновой

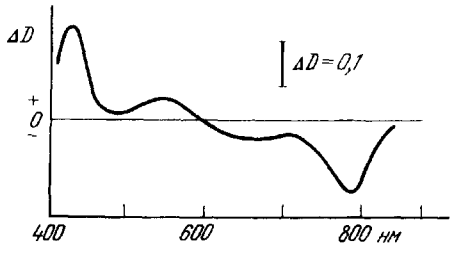


Рис. 12. Дифференциальный спектр (свет—темнота) обратимого фотоокисления агрегированного бактериохлорофилла *n*-бензохиноном

флуоресценции агрегированных форм. В вакууме твердые пленки обладают люминесценцией при комнатной температуре, а пуск воздуха (кислорода) приводит к тушению этого длинноволнового свечения. Однако это тушение наблюдается под лучом света, возбуждающим флуоресценцию, и происходит в течение нескольких секунд, являясь, таким образом, не «физическим» тушением, а фотохимической реакцией с кислородом [99]. Существенно то, что весьма активно реагируют с кислородом длинноволновые формы пигментов, построенные, вероятно, наиболее рыхло. Изучение необратимого выцветания пигментов в процессе зеленения этиолированных листьев показало меньшую устойчивость мономерных форм пигментов.

В вязких спирто-глицериновых растворах, содержащих избыток глицерина (9 : 1), наблюдается образование агрегированных форм хлорофилла и бактериохлорофилла, находящихся в равновесии с малым количеством мономерных форм. Освещение этих растворов с *n*-хиноном показало возможность обратимого фотоокисления агрегированных форм пигментов с образованием промежуточного продукта, идентичного «мономерному» продукту фотоокисления (рис. 12) [45]. Механизм этих реакций пока не ясен: вероятно, промежуточной стадией является фотодезагрегация, возможна также миграция энергии от мономерной к агрегированной форме, которая активна в реакции.

Итак, совокупность изложенного материала указывает на то, что мономерные и агрегированные формы пигментов после светового возбуждения способны к обратимому окислению-восстановлению и сенсибилизации окислительно-восстановительных реакций, моделирующих фрагменты цепи фотосинтетического переноса электрона.

Возникает вопрос, в какой степени эти свойства пигментов определяют их действие при фотосинтезе? Для этого было необходимо изучить свойства хлорофилла и его аналогов в мембранах фотосинтетических структур — хлоропластов и хроматофоров.

РАЗНЫЕ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

Особенности состояния пигментов в листьях были замечены еще в XIX веке. Так, К. А. Тимирязев, обратив внимание на высокую концентрацию хлорофилла в гранулах хлоропластов, предположил, что пигмент находится в «твердом» состоянии. В 1910 г. Д. И. Ивановский, измеряя спектры поглощения водных коллоидных растворов хлорофилла, обратил внимание на то, что в процессе коагуляции максимум поглощения хлорофилла в коллоидах приближается к поглощению хлорофилла в листьях. В 1913 г. Вильштеттер и Штоль, исследуя свойства коллоидных растворов хлорофилла, пришли к такому же заключению. Наблюдали, что при растирании листьев выделяются зеленые белки, содержащие хлорофилл. М. С. Цвет еще в начале века предположил, что хлорофилл в пластидах адсорбирован белками; в 1925 г. В. И. Любименко высказал положение о химической связи хлорофилла с белками. Эту проблему изучали Т. Н. Годнев и О. П. Осипова [100].

Уже давно замечены различия в оптических свойствах пигментов, извлеченных из растений, и пигментов в естественном состоянии (в клетках фотосинтезирующих организмов), наблюдавшиеся в спектрах поглощения, в интенсивности флуоресценции и ее спектре, в фотохимических свойствах пигментов. Так, например, в листьях растений и в клетках водорослей максимумы поглощения хлорофилла обычно лежат при 678—680 нм, тогда как ацетоновая вытяжка — хлорофилл в растворе — обладает максимумами поглощения при 662 и 430 нм, т. е. в живой клетке максимумы поглощения сдвинуты в длинноволновую сторону по сравнению с раствором. Отношение оптической плотности в «синем» и «красном» максимумах в листьях близко к единице, тогда как в растворах хлорофилла эта величина достигает 1,7. Хлорофилл в растворе быстро разрушается, тогда как в клетках пигмент отличается большой устойчивостью к действию света.

Измерение спектров поглощения листьев, хлоропластов и хроматофоров позволяет обнаружить в них разные формы хлорофилла, различающиеся по положению максимума поглощения. Так, например, в спектрах поглощения молодых листьев традесканции удалось наблюдать максимумы поглощения хлорофилла при 670 и 680 нм [55]. Измерение спектров поглощения красных водорослей (филлофора) позволило выявить структуру красной

полосы поглощения хлорофилла с максимумами поглощения при 625—680, 690, 710, 720 нм, тогда как в ацетоновом экстракте наблюдался лишь один максимум поглощения хлорофилла при 663 нм [101]. Пигмент в клетках фотосинтезирующих бактерий обычно обладает тремя отчетливыми максимумами поглощения в близкой инфракрасной области спектра при 800, 850 и 890 нм [102, 103], тогда как бактериохлорофилл, извлеченный из клеток растворителями, например ацетоном, обладает в близкой инфракрасной области лишь одним максимумом поглощения при 770—780 нм.

Таким образом, измерение спектров поглощения фотосинтезирующих органов позволяет выявить несколько максимумов поглощения, принадлежащих, очевидно, разным формам хлорофилла, поскольку в экстрактах обычно обнаруживается лишь один максимум. Замораживание листьев, хлоропластов и суспензии клеток до температуры —196° С позволяет более отчетливо выявить структуру спектра. Так, Френч применил метод записи производных спектров поглощения. Первая производная спектра обнаруживает скрытые в виде плеча максимумы гораздо более отчетливо, чем обычный способ измерения. Вторая производная спектра поглощения выявляет скрытые максимумы в виде отчетливых пиков.

В работах Ф. Ф. Литвина с сотрудниками [81, 104] установлено, что набор форм хлорофилла универсален для фотосинтезирующих организмов всех основных групп. Совокупность нативных форм хлорофилла в клетке имеет свойства целостной системы, закономерно построенной из энергетически взаимодействующих элементов.

Применение производной спектроскопии и ЭВМ в лаборатории Ф. Ф. Литвина позволило определить число нативных форм (для хлорофилла *а* более 10), их относительную концентрацию в хлоропласте и долю участия в поглощении квантов света. Электронные уровни системы форм хлорофилла расположены в виде нисходящей лестницы с расстоянием между «ступеньками» в 0,017 эв. Расчеты ферстеровского интеграла перекрывания спектров показали, что миграция энергии «вниз» возможна между всеми парами форм, «вверх» — только на одну — две ступени. Это свойство системы создает условия для перераспределения поглощенной энергии со стоком на самые длинноволновые формы. При этом эффективность захвата энергии резко повышается по сравнению с обычным гомогенным переносом [104]. Это определяет особую роль длинноволновых форм в качестве трансформаторов всей поглощенной энергии. Действительно, измерения спектров действия фотосинтеза позволили прийти к выводу, что именно длинноволновые формы, имеющие максимум поглощения в области 700—740 нм, обусловливают эффект Эмерсона, служащий показателем взаимодействия двух систем фотосинтеза.

Для того чтобы понять природу формирования и свойства разных форм хлорофилла, мы исследовали их образование в процессе формирования фотосинтетического аппарата в зеленеющих этиолированных листьях.

ОБРАЗОВАНИЕ РАЗНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ ПРИ ЗЕЛЕНЕНИИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

Желая работать с наиболее простыми системами, мы пытались изучить с Л. М. Кособуцкой (Воробьевой) процесс образования хлорофилла в гомогенатах этиолированных листьев. После измельчения и центрифугирования листьев фасоли, выращенных в темноте, получался желтоватый белковый раствор, в котором можно было измерить максимум поглощения протохлорофилла при 630 нм. После кратковременного освещения этого раствора появлялся максимум поглощения хлорофилла при 670 нм, сходный по положению с растворами пигмента в органических растворителях.

Таким образом, была получена бесклеточная система, в которой можно было изучать образование хлорофилла [105]. Случайный выбор листьев фасоли оказался удачным, так как из листьев других растений тогда не удавалось получить столь активные бесклеточные системы. Эти эксперименты легли в основу многочисленных работ по выделению и изучению протохлорофиллобелкового соединения — голохрома, проводимых сначала Джеймсом Смитом в Институте Карнеги, а затем — многими другими исследователями.

Изучение свойств хлорофилла в гомогенатах зеленеющих листьев показало, что по мере образования и накопления пигмента на мембранах хлоропластов происходит постепенный сдвиг максимума поглощения в длинноволновую сторону. Эти опыты отчетливо показали образование и взаимопревращение в процессе биосинтеза хлорофилла в листьях по крайней мере двух форм пигмента, различающихся по спектральным свойствам [90, 106].

Для изучения зеленения этиолированных листьев без нарушения их структуры в наших работах с Ф. Ф. Литвиным на кафедре биофизики Московского университета была применена методика замораживания листьев до температуры жидкого азота с измерением их спектров флуоресценции при низкой температуре. Эта методика дала возможность измерить отдельные стадии на пути образования хлорофилла из протохлорофилла [107, 108].

Прежде всего выяснилось, что в низкотемпературном спектре этиолированных листьев наблюдаются две полосы флуоресценции предшественника хлорофилла при 635 и 655 нм. После крат-

ковременного освещения происходит быстрое превращение формы «655» в форму пигмента с максимумом флуоресценции при 690 нм. Эта форма при дальнейшем освещении переходила в пигмент с максимумом флуоресценции при 680 нм, который можно было приписать мономерной форме хлорофилла. Шибата обнаружил те же промежуточные формы путем измерения спектров поглощения этиолированных листьев [109].

В работах М. И. Быстровой [110, 111] были изучены свойства отдельных форм пигмента в листьях растений и гомогенатах, сопоставлены результаты спектральных измерений с хроматографией пигментных экстрактов. Выяснилось, что при действии нагревания органических растворителей форма 655 нм переходит в форму 630 нм, что сопровождается потерей способности гомогената и листьев к образованию хлорофилла. Для выяснения различия активной формы протохлорофилла «655» и неактивной формы «635» проводилось дифференциальное центрифугирование гомогенатов этиолированных листьев, содержащих эти формы. Оказалось, что форма «655» связана с более крупными клеточными частицами, которые оседали быстрее [111]. Хроматографическое разделение на бумаге показало, что в гомогенатах форма «655» представляет собой преимущественно протохлорофиллид, а форма «635» — смесь протохлорофиллида и протохлорофилла. Таким образом, часть протохлорофиллида следовало считать неактивной.

Нарушение структуры листьев при получении гомогенатов изменяет спектральные свойства пигментов и приводит к коротковолновому сдвигу максимумов поглощения и флуоресценции бесфитольных форм пигментов (протохлорофиллида и хлорофиллида) до положения максимумов поглощения соответствующих фитольных форм. Этим следует объяснить образование при освещении гомогенатов этиолированных листьев хлорофиллида с максимумом поглощения при 670 нм [105].

Сходные изменения наблюдал Батлер [112] при замораживании — оттаивании этиолированных и зеленеющих листьев и объяснил их дезагрегацией упорядоченных длинноволновых форм протохлорофиллида и хлорофиллида.

Исследуя дальнейшие стадии зеленения с помощью флуоресцентной методики, Ф. Ф. Литвин [107] нашел, что в процессе освещения этиолированных листьев спектр флуоресценции при комнатной температуре изменялся незначительно, обладая максимумами при 680 и 720 нм. При длительном освещении и накоплении хлорофилла падала величина мономерного максимума при 680 нм и происходил его сдвиг в длинноволновую область спектра из-за эффекта реабсорбции, что согласуется с данными Френч и Янг [113]. В отличие от этого, в низкотемпературном спектре флуоресценции наблюдался рост максимума при 730 нм и относительно меньший рост «мономерного» максимума [114] (рис. 13).

Было высказано предположение, что замораживание особенно сильно увеличивает флуоресценцию агрегированных форм. Подобным образом росла интенсивность длинноволнового максимума флуоресценции в твердых пленках хлорофилла и его аналогов. Влияние температуры на спектр флуоресценции оказалось удобным критерием агрегации пигментов в модельных системах и в клетках фотосинтезирующих организмов и выделенных из них структур.

Дальнейшие исследования проводились с дефицитными по хлорофиллу мутантами кукурузы, отличающимися характерным набором каротиноидов (дзета-каротиновый и ликопиновый мутанты). Исследование зеленения этиолированных проростков

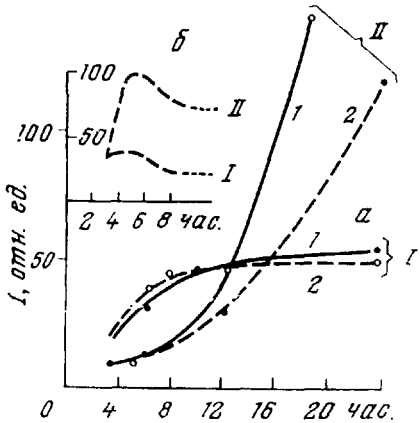


Рис. 13. Изменение интенсивности флуоресценции при —196° в процессе зеленения этиолированных листьев фасоли (*1*) и их гомогенатов (*2*)

а — двенадцатидневные растения; *б* — семидневные; I — при 682 нм; II — при 730 нм

мутантов кукурузы по сравнению с нормальными растениями показало сходную картину стадий процесса [115, 116]. Различия заключались в том, что у дзета-каротиновых мутантов фотохимическую активность проявляла не только форма протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 655 нм, но и форма протохлорофилла с максимумом флуоресценции при 635 нм.

Агрегированные формы хлорофилла, образованные в этих мутантах, несколько отличались по положению максимума флуоресценции от нормальных листьев.

Итак, изучение зеленения этиолированных листьев позволило выявить целый ряд промежуточных форм (мономерных и агрегированных), сменяющих друг друга в процессе онтогенетического развития растения. Необходимо было выяснить, как связана эта смена форм с процессом фотосинтеза.

В нашей лаборатории исследовали связь между накоплением разных форм хлорофилла и способностью этиолированных и зеленеющих листьев к фиксации углекислоты, меченой радиоактивным изотопом углерода C^{14} [117]. Оказалось, что этиолированные листья способны к гетеротрофной ассимиляции углекислоты, и по мере освещения возрастает роль световой фиксации. После

трех часов освещения этиолированных листьев световая фиксация почти в два раза превышает гетеротрофную ассимиляцию углекислоты.

В Институте фотобиологии АН БССР А. А. Шлык с сотрудниками с помощью изотопных методов проводили детальное исследование процессов образования хлорофилла *a* и *b*, природы их предшественников и состояния новообразованных молекул пигмента [118].

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПИГМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Удобным критерием для измерения фотохимической активности отдельных форм пигментов оказалась их способность к деструктивному фотохимическому окислению. В первых работах Л. М. Кособуцкой (Воробьевой) отмечалось, что протохлорофилл и хлорофилл в гомогенатах из листьев на начальных стадиях зеленения этиолированных проростков отличаются фотохимической лабильностью, превращаясь или подвергаясь выцветанию на воздухе, в связи с чем можно было предполагать, что пигмент в полученных белковых комплексах находится в мономерном состоянии.

Проверка полученных данных на целых листьях подтвердила большую скорость выцветания коротковолновой формы хлорофилла с максимумом флуоресценции при 680 нм, образующейся из хлорофиллида [119]. Вследствие быстрой фотодеструкции этой формы пигмента на последних стадиях зеленения можно наблюдать при комнатной температуре флуоресценцию агрегированного хлорофилла, разрушающегося медленнее (рис. 14).

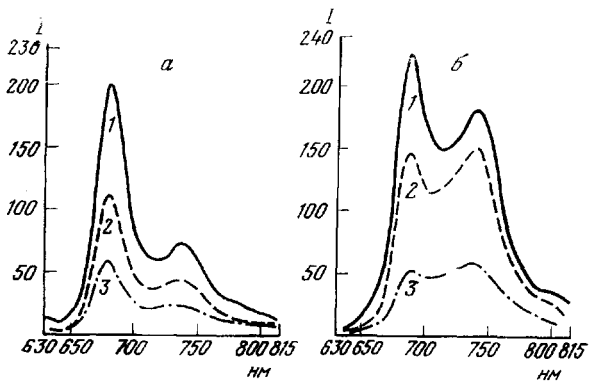


Рис. 14. Спектры флуоресценции (20°) зеленеющих листьев фасоли до и после выцветания

а — 5 мин. зеленения листьев, 30 мин. темноты; *б* — 14 час. зеленения; *1* — исходный спектр; *2*—30 сек. и *3*—5 мин. выцветания

Опыты при температуре жидкого азота показали, что в этих условиях наиболее быстрому выцветанию подвергаются фотохимически активные длинноволновые формы протохлорофиллида (655 нм) и хлорофиллида (690—695 нм). Наименьшей скоростью выцветания обладают агрегированные формы хлорофилла, образующиеся в конце процесса зеленения [120].

Быстровыцветающая форма хлорофилла исследовалась в листьях различных растений, причем оказалось, что, например, в листьях свеклы и лебеды количество этой формы достигает 20—30% от всего количества хлорофилла [121]. А. А. Шлык обратил наше внимание на то, что количество быстровыцветающей формы хлорофилла соответствует активности хлорофиллазы в листьях различных растений. Действительно оказалось, что при растирании листьев увеличивается активность хлорофиллазы, которая без добавления растворителей превращала часть хлорофилла в хлорофиллид [122, 123].

Образованный хлорофиллид фотоокисляется быстрее главной массы хлорофилла. Он способен также к образованию лабильных продуктов фотоокисления, из которых под действием восстановителей удавалось регенерировать малое количество пигментов [60].

Возникал вопрос, существует ли наряду с хлорофиллидом фотохимически лабильная форма хлорофилла в гомогенатах листьев и в суспензиях хлоропластов. Для выяснения этого вопроса Л. М. Воробьевой были поставлены опыты с гомогенатами листьев фасоли, обладающей крайне низкой активностью хлорофиллазы. Чтобы сократить до минимума возможное образование хлорофиллида, все операции производились при низкой температуре, когда образование хлорофиллида заторможено. Оказалось, что и в этом случае наблюдается быстро- и медленновыцветающая форма хлорофилла. Вероятно, хлорофиллаза более активно действует на дезагрегированные формы хлорофилла [119, 122].

ПРЕВРАЩЕНИЕ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА В КЛЕТКАХ

Уже первые наблюдения над состоянием и фотохимической активностью хлорофилла в листьях растений позволили нам предположить схему взаимоперехода разных форм хлорофилла [106]. Суть схемы заключается в следующем. Белковый комплекс протохлорофилла при освещении превращается в свежеобразованную форму хлорофилла, дальнейшее ее накопление ведет к агрегации молекул пигмента, причем агрегированные формы хлорофилла могут различаться по типу связи с белковым носителем. Мы предположили, что существует равновесие между мономерными и агрегированными формами хлорофилла, на которое может влиять нагревание, освещение и разнообразные повреждающие факторы.

В нашей лаборатории систематически изучали влияние перечисленных воздействий на спектральные свойства и фотохимическую активность пигментов в хлоропластах и хроматофорах.

Действие света. Под действием интенсивного освещения происходит выцветание пигментов в клеточных структурах, описанное в предыдущем разделе. Мы предположили, что это явление связано с промежуточной дезагрегацией хлорофилла [124]. При освещении листьев мутантов кукурузы без воздуха было обнаружено явление фотодезагрегации: длинноволновые максимумы агрегированных форм хлорофилла падали, а коротковолновые максимумы мономерных форм увеличивались. После впуска воздуха освещение приводило к быстрому фотовыцветанию мономерных форм хлорофилла [120]. Это явление наиболее отчетливо наблюдалось у мутантов; у нормальных листьев явление дезагрегации было менее отчетливым, что, по-видимому, связано с большей устойчивостью агрегированных форм нормальных растений (рис. 15).

Чтобы изучить механизм фотодезагрегации, мы обратились к более простым системам. Так, Л. М. Воробьевой при освещении водных коллоидных растворов феофитина путем спектральных измерений удалось установить, что при освещении падает полоса поглощения агрегированной формы пигмента, соответственно увеличивается мономерный максимум [125]. Однако исследование показало, что это явление наблюдается только в присутствии кислорода (рис. 16). Оказалось, что дезагрегация сопряжена с обратимым фотоокислением пигмента, причем мономерный феофитин, образующийся в результате обратной темновой реакции фотоокисленных продуктов, спектрально идентичный исходному пигменту, отличается от него положением на тонкослойной хроматограмме из целлюлозы [126]. Подобные явления наблюдались и в случае водных коллоидных растворов хлорофилла [127]. Пока не установлено, связана ли фотодезагрегация хлорофилла в листьях также с присутствием кислорода. Освещение суспензии одноклеточных синезеленых водорослей показало, что под действием света происходит перестройка системы агрегированных форм [128].

Действие растворителей и детергентов. Мы изучали влияние органических растворителей на спектральные и фотохимические свойства хлорофилла, бактериохлорофилла и протохлорофилла в клетках растений, в изолированных хлоропластах и в хроматофорах. При действии возрастающих концентраций растворителей наблюдались следующие стадии: постепенная дезагрегация хлорофилл-белково-липидного комплекса (сдвиг поглощения в коротковолновую сторону), переупаковка агрегированных форм с образованием новых форм, по-видимому, не связанных с белками и липоидами клеточных структур (что чаще всего сопровождается сдвигом поглощения в длинноволновую область спектра),

и, наконец, при достижении около 50% растворителя в воде — извлечение пигмента в растворитель с полным отрывом от белково-липоидного носителя клетки [124, 129].

Особенно отчетливо эти эффекты выражены в случае диоксана и метанола. Добавление около 30% диоксана в суспензию хлоропластов приводит к образованию агрегированной формы с максимумом поглощения при 690 нм. В случае действия метанола переупаковка ведет к появлению формы «740». Способность хлоропластов к реакции Хилла теряется уже на первой стадии воздействия [130].

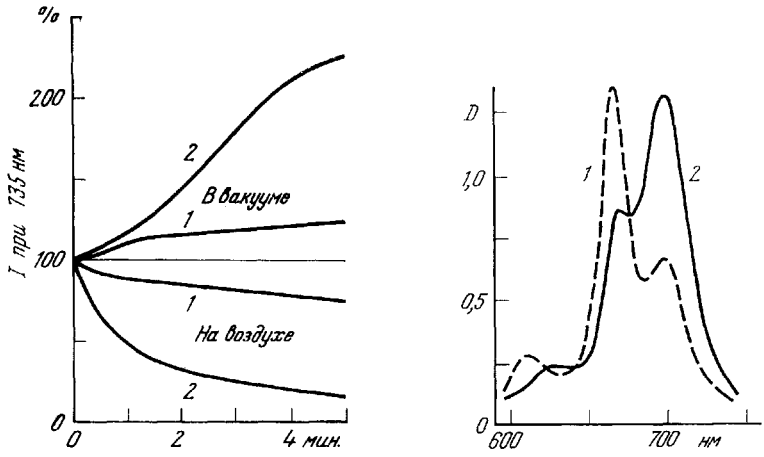


Рис. 15. Фотодезагрегация и фотоокисление хлорофилла в нормальных (*1*) и мутантных (*2*) листьях кукурузы

Рис. 16. Фотодезагрегация феофитина *а* в водно-ацетоновых растворах

1 — до освещения; *2* — после освещения

Детергенты приводят к дезагрегации хлорофилла при концентрации до 0,1%, при этом обычно теряется фотохимическая активность — способность к реакции Хилла. Наблюдается специфика в действии детергентов различной природы — катионоидных, анионоидных и нейтральных [56]. Используя серный эфир, Г. П. Брин наблюдала в опытах, что в предельных концентрациях эфира, соответствующих его растворимости в воде (до 7%), происходит дезагрегация хлорофилла и потеря способности хлоропластов к реакции Хилла (рис. 17). После удаления эфира в вакууме восстанавливалось поглощение хлорофилла и возвращалась способность к реакции Хилла [131]. Эффект самосборки системы после удаления воздействия имеет большое значение для понимания природы молекулярной организации фотосинтетического аппарата. Таким образом, под влиянием воздействий удается наблюдать в некоторых случаях обратимую перестройку системы форм пигментов.

Связь пигментов с белками и липидами. Не подлежит сомнению, что пигменты связаны с белково-липидными структурами мембран. Возникает вопрос о способе связи агрегированных форм пигментов с этими структурами. Ю. Е. Ерохин и О. А. Синегуб в нашей лаборатории исследовали хроматографы фотосинтезирующих бактерий [132, 133]. Желая выяснить, как влияет нарушение структуры белков и липидов на спектральные свойства пигментов, они действовали на хроматофоры протеолитическими ферментами. Оказалось, что протеолитические ферменты (проназа и

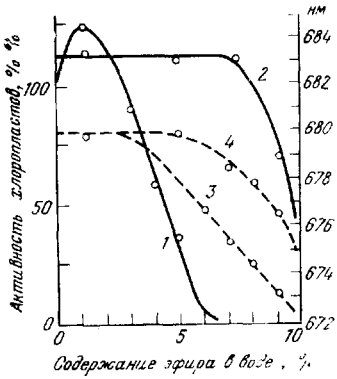


Рис. 17. Влияние этилового эфира на активность хлоропластов (скорость реакции Хилла в %) (*1*, *2*) и на положение максимума поглощения в хлоропластах (в нм) (*3*, *4*)

1, *3* — в присутствии эфира; *2*, *4* — после удаления эфира

другие) приводят к нарушению наиболее длинноволновых форм пигментов в хроматоформах. Обычно разрушались формы бактериохлорофилла с максимумами поглощения при 870—890 нм. В отличие от этого, липолитические ферменты (например, фосфолипаза *а*) приводили к нарушению формы «850» и появлению формы «830». При последовательном нагревании хроматофоров происходило нарушение наиболее длинноволновых форм в температурном интервале, соответствующем денатурации белков. Большие концентрации детергентов и растворителей приводили к солюбилизации бактериохлорофилла, малые концентрации вызывали переупаковку формы «850» в форму «830».

Эти эффекты были объяснены изменениями пигментного взаимодействия при конформационных перестройках белково-липидных структур.

В опытах Ю. Е. Ерохина с сотрудниками с помощью электрофореза на акриламидном геле удалось разделить различные агрегированные формы бактериохлорофилла, связанного с белками и липидами [134]. Эти опыты указывают на то, что определенные конформации белково-липидных структур мембран могут диктовать образование определенных типов молекулярных упаковок агрегированных форм пигментов. Работы по изучению бактериохлорофилл-белково-липидных комплексов продолжаются в лаборатории Ю. Е. Ерохина в Институте фотосинтеза АН СССР.

Влияние конформации на оптические свойства хроматофоров наиболее отчетливо проявляется в случае фикобилинов, у которых хромоформная группа связана ковалентной связью с белком. Л. Г. Ерохина в нашей лаборатории исследовала влияние денатурации на спектральные и фотохимические свойства фикоциана и фикоэритрина, выделенных из синезеленых и красных водорослей [135]. Изучалась денатурация под действием нагревания, мочевины, детергентов и различных органических растворителей. Денатурационные воздействия приводили к значительным изменениям спектров поглощения и флуоресценции, принадлежащей хромофорным тетрапиррольным группировкам молекулы хромопротеида. Одновременно изменялась фотохимическая активность белков и тушение флуоресценции окислителями. Нативные хромопротеиды обладают ничтожной фотохимической активностью, и их флуоресценция практически не тушится кислородом и хинонами. При денатурации увеличивается эффект тушения и фотосенсибилизирующее действие в реакции восстановления метилового красного аскорбиновой кислотой [136]. Этот парадоксальный эффект следует объяснить тем, что в нативных белках хромофоры спрятаны внутри клубка полипептидных цепей, тогда как при денатурации происходит разворачивание клубка, и хромоформные группы становятся доступными для контакта с низкомолекулярными реагентами. Эти опыты соответствуют представлению о том, что фикобилины участвуют в процессах миграции энергии возбуждения к хлорофиллу и, вероятно, не обладают активностью в процессах фотохимического переноса электрона.

Различные формы хлорофилла участвуют в переносе электрона при фотосинтезе, наибольшее развитие получили представления о разделении всей цепи на так называемые I и II фотосистемы, в которых работают разные формы хлорофилла.

ФОТОПЕРЕНОС ВОДОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ И КЛЕТКАХ

Изучая фотохимические реакции пигментов, мы применяли окислительные или восстановительные среды, имея возможность таким образом наблюдать окислительные и восстановительные превращения возбужденного хлорофилла. Те же методические приемы использовались для изучения фотопревращения пигментов в хлоропластах и хроматофорах методом дифференциальной спектроскопии. В окислительных средах все промежуточные переносчики электронов находились в окисленной форме, и соответственно в восстановительных условиях все промежуточные системы, сопряженные с хлорофиллом, были восстановлены. В связи с этим следовало выяснить, как изменяется функция фотосинтеза в окислительных и восстановительных условиях

Для фотосинтеза растений нормальной является атмосфера воздуха, содержащего 20% кислорода, т. е. условия, близкие к редокс-потенциалу кислородного электрода. При этом в локусе восстановления углекислоты реакции идут при потенциале, близком к водородному электроду. Повышение парциального давления кислорода обычно ведет к подавлению фотосинтеза (эффект Варбурга), а введение окислителей реакции Хилла (например, соединения окисного железа) часто приводит к их восстановлению вместо CO_2. Окислители таким образом могут реагировать с промежуточными компонентами фотосинтетического переноса электрона. Мы наблюдали [137], что *n*-бензохинон и красители эффективно ингибируют фотосинтез элодеи. Механизм реакции, по-видимому, заключается в том, что хинон и красители, включаясь в цепь переноса электрона, подвергаются фотовосстановлению и затем обратимо окисляются кислородом, что приводит к шунтированию цепи переноса электрона.

Доноры электрона в ряде случаев могут использоваться вместо воды при фотосинтезе растений, приводя к метаболическому типу бактериального фотосинтеза. Так, в 1939 г. Гаффрон обнаружил, что в атмосфере водорода одноклеточные водоросли способны к фоторедукции углекислоты, а в анаэробных условиях происходит адаптация (с вероятной активацией гидрогеназы), что ведет к выделению водорода [138, 139]. Это явление недавно изучалось в нашей лаборатории [140]. Оказалось, что продувка аргоном суспензии хлореллы ведет к выделению водорода; такое же действие вызывает введение глюкозы и снижение интенсивности света, тогда как повышение интенсивности света ведет к выделению кислорода. Синезеленые водоросли, неспособные к фотовыделению водорода, в темноте выделяли водород [141]. Наиболее примитивным объяснением явления представляется следующее. В условиях дефицита углекислоты и отсутствия кислорода цепь переноса водорода нарушается, не доходя до углеродного цикла, и водород выделяется в молекулярной форме с помощью гидрогеназы. Более вероятно, однако, что выделение водорода происходит с участием цикла Кребса, в котором перерабатываются эндогенные и экзогенные доноры водорода.

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В ХЛОРОПЛАСТАХ

Эти исследования мы начинали, когда еще не были сформулированы представления о первой и второй фотохимической реакциях в цепи фотосинтетического переноса электрона. Нас интересовал вопрос, способны ли гомогенаты листьев и хлоропласты к осуществлению простых фотохимических реакций, изученных нами в модельных системах, и в какой степени способность к таким реакциям связана с нарушением естественного состояния пигментов при действии органических растворителей.

Мы применяли в качестве донора электрона аскорбиновую кислоту, а в качестве акцепторов — различные редокс-красители — метиловый красный, рибофлавин, сафранин, метилвиологен, обладающие различной величиной окислительно-восстановительных потенциалов. В растворах хлорофилла (истинных и коллоидных) метиловый красный необратимо восстанавливается, о чем можно судить, измеряя падение максимума поглощения в синезеленой области спектра.

Оказалось, что гомогенаты листьев и суспензии хлоропластов фотосенсибилизируют восстановление метилового красного в присутствии аскорбиновой кислоты. В этих реакциях вероятно наиболее активен хлорофиллид, образованный за счет действия хлорофиллазы [60, 122].

Восстановление пиридиннуклеотидов в суспензии хлоропластов удалось наблюдать, но оно было более активным в случае нарушения клеточной структуры при действии пиридина [65].

Особый интерес представляло изучение фотовосстановления метилвиологена хлоропластами, так как это соединение обладает величиной редокс-потенциала близкой ферредоксину, который является терминальным акцептором электрона в цепи фотосинтетического переноса электрона. Интактные хлоропласты в присутствии доноров водорода — аскорбата, гидразина — восстанавливают метилвиологен неглубоко. Введение органических растворителей приводит сначала к некоторой активации реакции, затем к ее ингибированию, но после выхода пигмента в раствор, что соответствует приблизительно 50% органического растворителя в воде, реакция идет активно, так же как и в растворах хлорофилла [142].

Было высказано предположение, что восстановление метилвиологена в интактных хлоропластах происходит с участием цепи фотосинтетического переноса электрона, причем использованные доноры электрона — гидразин, аскорбиновая кислота — могут включаться через вторую фотохимическую систему, тогда как виологен воспринимает электрон первой фотосистемы.

В присутствии кислорода воздуха и донора электрона происходит фотосенсибилизированное окисление. Эти реакции обычно идут менее эффективно, чем в растворах хлорофилла, и нарушение структуры хлоропластов ведет к активации этих процессов. Сравнительно малая эффективность простых фотохимических реакций с использованием хлоропластов может быть связана с трудностью диффузии субстратов окисления к активному центру.

Среди реакций хлоропластов наиболее изучена реакция Хилла, в которой выделение кислорода сопряжено с восстановлением экзогенного окислителя — соединений окисного железа, хинонов. При изучении реакции Хилла мы вначале использовали фенолиндофенол. Нас интересовала возможность образования переживающих период освещения активных фотовосстановителей, способных в темноте реагировать с указанными акцепторами

электрона. Действительно, в опытах Л. М. Кособуцкой удалось найти такие соединения [143].

Применяя смеси обычной и тяжелой воды, Г. П. Брин обнаружила, что реакция Хилла замедляется в среде окиси дейтерия. что, по-видимому, связано с участием переноса водорода в этой реакции [144].

Наиболее интересным для нас было выяснить возможность осуществления реакции Хилла в системах менее сложных, чем хлоропласты, гомогенаты и частицы второй фотосистемы. С этой целью изучалось влияние водорастворимых органических растворителей на реакцию Хилла, причем было установлено, что дезорганизация системы ведет во всех случаях к нарушению реакции. Мы уже говорили о том, что, используя серный эфир, удалось наблюдать обратимое ингибирование реакции Хилла [131].

Центральным вопросом является выяснение возможности обратимых фотохимических превращений хлорофилла в процессе его действия непосредственно в клетках фотосинтезирующих организмов, так как только обратимые превращения пигмента могут определить его участие в цепи фотосинтетического переноса электрона. Разработке этой проблемы уделяется большое внимание в нашей лаборатории.

ОБРАТИМЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В КЛЕТКАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ

Исследование изменений пигментной системы непосредственно в клетках растений под действием света требует специальной методики, так как эти изменения незначительны и быстро обратимы. Для этой цели используются разные типы дифференциальных спектрофотометров. Н. В. Карапетян испытал различные варианты дифференциальных спектрофотометров; наиболее удобной оказалась однолучевая схема спектрофотометра с цилиндрическим фосфороскопом. В этом приборе на суспензию клеток (хлоропластов) поочередно действовал сильный световой импульс или монохроматический свет, использованный для измерения. Наиболее существенной была регистрация изменений оптической плотности в красном максимуме поглощения хлорофилла. Оказалось, однако, что при такой схеме опытов измерению оптической плотности мешают значительные изменения флуоресценции под действием сильного светового импульса [145—147]. Эффект увеличения флуоресценции, по-видимому, связан с известным явлением индукции флуоресценции после освещения выдержанных в темноте клеток. Исследование этого явления было осуществлено в работах Н. В. Карапетяна и В. В. Климова.

Изучению природы индукции флуоросценции, обнаруженной Г. Каутским около 40 лет тому назад, был посвящен ряд исследований. Дейзенс [148] предложил схему, связывающую эффект индукции флуоресценции с работой цепи фотосинтетического переноса электрона. Согласно этой схеме, хлорофилл связан с акцептором электронов Q, который тушит флуоресценцию. Его восстановление до соединения QH приводит к возгоранию флуоресценции, что определяет кинетику индукции. Окислительно-восстановительная система $Q—QH$ включается в цепь фотосинтетического переноса электрона. Исследование индукции флуоресценции в хлоропластах показало, что в этом явлении наиболее активна II фотосистема.

Способность к переменной флуоресценции является свойством всех изученных типов фотосинтезирующих организмов [149]. Оказалось, что эти изменения флуоресценции хлорофилла в клетках и изолированных структурах также связаны с первичными процессами фотосинтеза [148, 149], а сложная кинетика этих изменений в растениях и хлоропластах является отражением взаимодействия фотосистем через цепь переноса электронов и сопровождающих процессов [150, 151]. Для более полного описания явления введено представление о дифференциальных спектрах возбуждения флуоресценции, отражающих участие разных форм хлорофиллов в изменении выхода флуоресценции [146, 147].

Изучение влияния окислительной или восстановительной среды на эффекты индукции в хлоропластах позволили сделать выводы о том, что наблюдаемые изменения флуоресценции связаны с работой цепи фотосинтетического переноса электрона и, по-видимому, не связаны непосредственно с изменениями состояния или превращениями хлорофила фотосистемы II.

Измерение кинетики выхода флуоресценции хлорофилла *a* фотосистемы II позволило обнаружить взаимодействие фотосистем через цепь переноса электронов у зеленеющих листьев [152], охарактеризовать фотосистемы мутантов кукурузы [153], а также установить природу различий в кинетике индукции флуоресценции листьев и хлоропластов. Обнаружено избирательное подавление переменной флуоресценции при освещении светом хлоропластов в резко восстановительных условиях (дитионит), которое не затрагивает активности П-700 [154]. Исследование избирательной деструкции фотосистемы II, возможно, позволит понять природу процессов, лежащих в основе фотопревращений хлорофилла *a* в активном центре фотосистемы II.

Кок [155] у высших растений обнаружил фотопревращения молекул хлорофилла *a* в активном центре фотосистемы I (которую обычно обозначают П-700), хотя не было найдено переменной флуоресценции для фотосистемы. I. В нашей лаборатории с использованием оригинального дифференциального флуорометра [156] на фрагментах хлоропластов, обогащенных фото-

системой I, была обнаружена способность хлорофилла *a* фотосистемы I к переменной флуоресценции, которая на два порядка слабее, чем флуоресценция хлорофилла *a* фотосистемы II [157, 158]. При этом установлено, что усиление флуоресценции фотосистемы I на свету связано с фотоокислением П-700 (рис. 18).

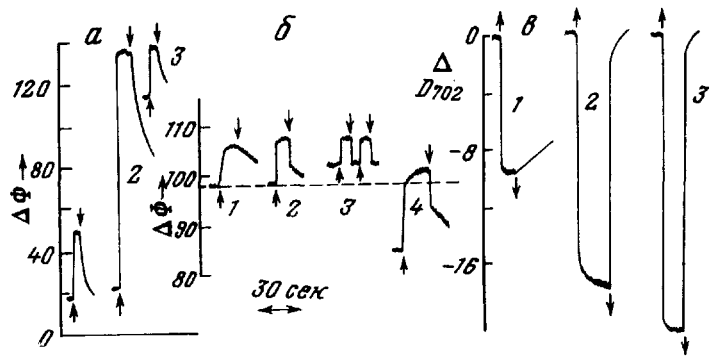


Рис. 18. Кинетика фотоиндуцированных ΔФ (*а*, *б*) и ΔD_{700} (*в*) фракции 10 000 *g* (*а*) и 144 000 *g* (*б*, *в*)

а, *б* — исходная величина ΔФ (*1*) и ΔФ в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М аскорбата (*2*), $2 \cdot 10^{-3}$ М аскорбата (*2*), $2 \cdot 10^{-3}$ М аскорбата и 10^{-5} М диурона (*3*), 10^{-5} М ФМС (*4*); *в* — исходная величина ΔD_{700} (*1*) и ΔD_{700} в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М аскорбата (*2*) или 10^{-5} М ФМС (*3*). Интенсивность света (600—700 нм) $1{,}5 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$; ↑включение, ↓выключение света

Мы уже указывали на то, что измерению дифференциальных спектров поглощения в красной области мешает эффект усиления флуоресценции. Этот эффект менее выражен в случае фотосинтезирующих бактерий, и измерение их оптической плотности действительно связано с изменениями поглощения, которые исследовались в работе Н. В. Карапетяна и И. Н. Крахмалевой с помощью однолучевого дифференциального спектрофотометра.

Фотопревращения форм бактериохлорофилла изучались в средах, различающихся по величине окислительно-восстановительного потенциала. При этом возможны наблюдения фотореакции хлорофилла либо с окисленным и, соответственно, восстановленным звеном цепи переноса электронов, либо с избытком окислителя или восстановителя. Было показано, что в окислительных и восстановительных условиях у бактерий различается вид дифференциального спектра (свет — темнота). При этом изменения флуоресценции, сопровождающие фотоокисление П-890, обнаруживают сложную зависимость от редокс-потенциала среды [151, 159]. Были высказаны предположения, что фотопревращения молекул «валового» бактериохлорофилла «Б-850» могут быть связаны с процессами фотофосфорилирова-

ния [146, 160]. Найдена способность формы «Б-850» к флуоресценции [161], что свидетельствует о том, что эффективность миграции энергии с этой формы на форму «Б-890» не равна 100%, как это считалось ранее. Установлено также, что при нарушении структуры фотосинтетического аппарата, ведущем к подавлению цепи переноса электрона, молекулы «валового» бактериохлорофилла способны к фотоиндуцированным превращениям [162]. У изолированных хроматофоров пурпурных бактерий в восстановительных условиях измерены фотоиндуцированные превращения длинноволновых форм бактериохлорофилла [146, 163].

При исследовании интактных организмов с помощью использованных методов труднее получить определенную информацию о превращении пигментов по сравнению с растворами, так как эти превращения сопряжены с работой цепи переноса электрона. В условиях глубокого замораживания, выключающего работу всей цепи переноса электрона и сохраняющего элементарный процесс переноса электрона между активным центром (П-890) и молекулами ближайшего окружения, в работах ряда авторов обнаружены спектральные изменения, связанные с обратимым фотоокислением бактериохлорофилла. При этом не наблюдалось изменений П-850, которые возможно связаны с индуцированными светом конформационными превращениями этого типа пигментного комплекса.

Фотохимическая хемилюминесценция. Имеется другой подход к изучению элементарных реакций фотосинтеза в интактных организмах. Это — изучение послесвечения — фотосинтетической хемилюминесценции, открытой Стрелером и Арнольдом в 1952 г.

В. А. Шувалов и Ф. Ф. Литвин [164] обнаружили пять компонентов послесвечения, различающихся по кинетике. Это послесвечение, по-видимому, связано с рекомбинацией активных фотопродуктов, образующихся в разных участках цепи фотосинтетического переноса электронов, или иначе говоря, связанных с различной глубиной ловушек, захватывающих электрон. Наиболее короткий, миллисекундный компонент свечения можно было связать с обращением первичных процессов фотосинтеза, и поэтому изучение этого компонента привлекло наше внимание. Прежде всего, следовало выяснить, в каких наименьших по величине структурах сохраняется указанный компонент послесвечения.

В. А. Шувалову удалось показать, что при действии детергентов на хлоропласты с последующим фракционированием фрагменты с молекулярным весом до 100 000 сохраняют способность к миллисекундному послесвечению. Это свечение, вероятно, связано с работой II фотосистемы. В пределах температуры от —160 до +40° не изменяется время жизни спонтанного высвечивания на целых хлоропластах, в частицах, обогащенных

I фотосистемой, также наблюдается послесвечение с длительностью жизни 10^{-2} сек.

Миллисекундное свечение хлоропластов активируется ионами кальция, марганца и магния при —30°. Высказано предположение, что эти ионы активируют перенос молекулы воды к активному центру [165]. Следует указать также, что акцепторы электрона — соединения окисного железа — резко усиливают свечение. Вероятно, все эти явления связаны с рекомбинацией фотоиндуцированных свободных радикалов.

В связи с этим следует указать на то, что изучалась рекомбинация ион-радикалов хлорофилла, образованных при катодном восстановлении и анодном окислении молекулы пигмента. В этой работе получены данные о возможности рекомбинационного свечения хлорофилла [166].

Изучая послесвечение зеленых листьев, В. А. Шувалов обнаружил фосфоресценцию, обладающую спектром возбуждения, соответствующую цинковому комплексу протопорфирина [167]. Оказалось, что это свечение наблюдается в хроматофорах бактерий, митохондриях, дрожжевых клетках, что свидетельствует об универсальном распространении цинк-порфиринов в организмах.

Примечание метода ЭПР. С целью выяснения природы первичных фотопродуктов широко применяется метод электронного парамагнитного резонанса при освещении фотосинтезирующих организмов и отдельных клеточных структур непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра. В нашей лаборатории совместно с лабораторией Л. П. Каюшина Института биофизики Академии наук СССР исследовалось образование фотоиндуцированных сигналов ЭПР в организмах и структурах (см. выше).

Примененная техника регистрации не позволила обнаружить триплетное состояние хлорофилла в клетках, однако при низкой температуре все испытанные объекты — хлоропласты, фотосинтезирующие бактерии и хроматофоры — обнаружили синглетный сигнал, вероятно, соответствующий продуктам первичного фотопревращения хлорофилла.

В работе Мозерола и соавторов [168] синглетный сигнал, наблюдаемый при освещении клеток бактерий, был близок по структуре сигналу продукта окисления бактериохлорофилла иодом. Наконец, данные импульсной спектроскопии хроматофоров бактерий также приводят к заключению, что первичным фотопродуктом является радикал, образованный при фотоокислении бактериохлорофилла. Следует отметить, что обратимое фотоокисление бактериохлорофилла в модельных системах было впервые обнаружено в работах нашей лаборатории [36, 47].

Итак, под действием света происходит окислительно-восстановительные превращения компонентов цепи фотосинтетического переноса электрона, сопряженные с фотохимическими превращениями хлорофилла и бактериофилла в активном центре.

Идентификация первичных фотопродуктов, образующихся в интактной живой клетке, представляет ряд трудностей, так как под действием кванта света наблюдается миграция энергии возбуждения в пигментной системе от главной массы хлорофилла к сравнительно малому количеству пигмента в активном центре, превращения которого сопряжены с работой цепи переноса электрона; на этом пути образуются продукты, обладающие различной длительностью жизни.

Изучение первичных фотопродуктов, запасающих энергию света непосредственно в функционирующей клетке фотосинтезирующего организма, является задачей первостепенной важности.

Для того, чтобы понять возникновение запасающих свет систем, мы обратились к проблеме эволюции фотосинтеза.

МОДЕЛИ ХИМИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ ФОТОСИНТЕЗА

А. И. Опарин [169] обосновал положение, что фотосинтез не является первичным типом обмена веществ, а возник путем эволюционного развития гетеротрофных организмов, которые использовали органическое вещество абиогенного происхождения.

Мы уже указывали на то, что исследования фотохимических свойств и состояния пигментов проводились в нашей лаборатории в сравнительном филогенетическом плане. Сопоставлялись свойства пигментов фотосинтезирующих бактерий, водорослей и высших растений. Это сопоставление позволило выявить характерные черты функционирования пигментов, обладающих порфириновым циклом или линейной тетрапиррольной системой.

Совокупность данных палеоботаники, цитологии, морфологии, биохимии организмов позволила получить представления о путях биологической эволюции фотосинтетиков, хотя здесь многое остается неясным. Высказывались предположения, что из неизвестного, ныне не существующего первичного фотосинтетика, возникли фотосинтезирующие бактерии и синезеленые водоросли — наиболее древние типы ныне существующих фотосинтезирующих организмов. Синезеленые водоросли обнаружены в древнейших докембрийских породах, в кварцевых включениях с возрастом до 3 млрд. лет.

По-видимому, красные, бурые, диатомовые, а затем и зеленые водоросли возникли на пути дальнейшей эволюции из синезеленых водорослей или их предшественников. Наиболее вероятно, что высшие растения возникли из зеленых водорослей. Эволюция высших растений изучена гораздо лучше. Здесь голосеменные предшествуют покрытосеменным.

Неясными являются пути химической эволюции фотосинтеза и ее перехода в эволюцию биологическую. Результаты, получен-

ные при геологических, космических и астрономических исследованиях, пока не позволили прийти к определенным заключениям, хотя опубликованы данные о наличии порфиринов в древнейших породах. Следы порфиринов, обнаруженных на поверхности луны американскими исследователями, как оказалось, образуются химическим путем в выхлопных газах ракеты.

Наиболее обещающие результаты получены путем модельных экспериментов. Хорошо известны эксперименты Теренина, Миллера, Павловской и Пасынского, Поннамперумы, в которых были обнаружены разнообразные аминокислоты и многие другие органические соединения при действии ультрафиолетового излучения на смесь газов, имитирующих состав первичной бескислородной атмосферы Земли. Порфирины могут также образоваться из простых органических молекул, возникающих при абиогенных синтезах [170].

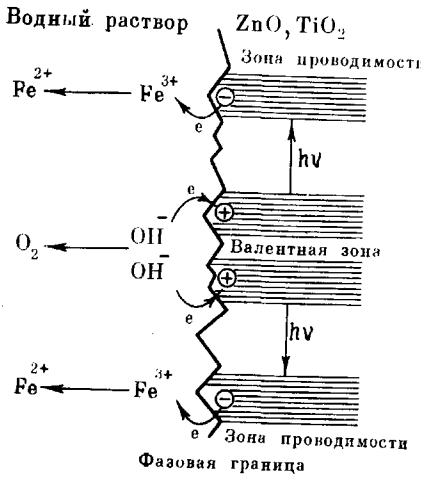


Рис. 19. Схема элементарных процессов при фотокатализе

Ротемунд в 1936 г. нашел, что порфирин образуется при конденсации пиррола и формальдегида. Изучая самопроизвольную конденсацию порфиринового кольца из пиррола и формальдегида, в нашей лаборатории было показано, что при реакции образуются, кроме порфирина, также хлорин и бактериохлорин [171]. Реакции способствует наличие кислорода и окислителей. Двуокись титана, кремнезем, окись алюминия и другие неорганические соединения катализировали синтез порфирина; среди органических соединений наиболее активным был триптофан [172]. Эти опыты указывают на то, что в поисках пигментов-сенсибилизаторов в недрах Земли и на других планетах следует учесть возможность образования наряду с порфирином также хлорина и бактериохлорина.

Большинство авторов считает порфирины первичными пигментами-фотосенсибилизаторами, которые участвовали в химической эволюции и перешли затем в эволюцию биологическую. Мы нашли, что фотосенсибилизирующим действием, столь же активным, как и порфирины, обладают неорганические фотосенсибилизаторы, являющиеся компонентами земной коры: окислы титана, цинка и вольфрама.

Так, в нашей лаборатории удалось осуществить фотосенсибилизированное этими соединениями выделение кислорода воды,

сопряженное с восстановлением экзогенных окислителей — соединений окисного железа и хинонов [173, 174]. Таким образом, удалось создать неорганические модели реакции Хилла, в которых в роли сенсибилизатора вместо хлоропластов используются окислы металлов, активные в близкой ультрафиолетовой области спектра. В совместной работе нашей лаборатории с Институтом химической физики (с применением воды, меченной тяжелым изотопом кислорода ^{18}O) было подтверждено, что выделяющийся кислород действительно принадлежит молекуле воды [175]. Кроме того, указанные окислы способны к фотосенсибилизации переноса водорода в восстановительной области: мы наблюдали фотосенсибилизированное этими окислами восстановление метилвиологена [176]. Механизм изученных реакций следует представить следующим образом (рис. 19). При действии кванта света на кристаллическую решетку фотосенсибилизатора-полупроводника электрон переходит в зону проводимости, оставляя за собой электронную вакансию — дырку. Реагирующие молекулы и ионы адсорбируются на поверхности частиц полупроводника на потенциальных электронно-донорных и электронно-акцепторных активных центрах, где происходит элементарный процесс восприятия и отдачи электрона. Образованные радикалы рекомбинируют на поверхности фотокатализатора. Этот гипотетический механизм фотовыделения кислорода показан на схеме.

При рассмотрении путей химической эволюции следует учесть возможность использования в качестве первичных фоторецепторов окислов титана, цинка, вольфрама. Использование таких соединений могло быть тупиковой ветвью эволюции на Земле, однако эту возможность следует учесть при рассмотрении путей химической эволюции на других планетах.

На Земле эволюция фотосенсибилизаторов и катализаторов пошла по пути включения ионов металлов в центр порфиринового кольца: все ныне существующие аналоги хлорофилла являются магниевыми комплексами, а в темновом переносе электрона участвуют железные комплексы порфиринов — цитохромы.

По мере исчерпания «готового» органического вещества абиогенного происхождения происходило включение пигментов в цепь энзиматического переноса электрона с постепенным переходом к автотрофному способу существования за счет использования энергии света.

Было высказано предположение [177], что на пути от гетеротрофного к автотрофному способу жизни существовали промежуточные стадии, в которых энзиматические реакции могли активироваться действием света; так, давно известна фотохимическая активность флавиновых коферментов. Мы нашли, что восстановленные пиридиннуклеотиды фотохимически активны под действием ультрафиолетового излучения в максимуме их поглощения (340 нм), и они способны к восстановлению ряда

акцепторов электрона, в том числе виологена и ферредоксина, т. е. реакциям, идущим с некоторым запасанием энергии света [178].

$$\text{НАД}\cdot\text{H}^* + \text{виологен} \overset{365\ \text{нм}}{\rightleftharpoons} \text{НАД} + \text{восст. виологен}$$

Недавно в нашей лаборатории было обнаружено фотосенсибилизирующее действие хинонов в реакциях фотовосстановления цитохромов, что также может служить вероятной моделью фотохимической активации биокаталитических систем [179].

Описанные эксперименты могут быть полезными при построении гипотетической схемы химической эволюции фотосинтеза. В согласии с гипотезой А. И. Опарина мы хотели бы здесь указать на возможность следующих стадий этого процесса:

1. Световая активация гетеротрофного обмена без «запасания» энергии света в продуктах реакции (фотокатализ).

2. Включение пигментов-фотосенсибилизаторов в цепь переноса электрона гетеротрофных организмов и фотосенсибилизация с «запасанием» энергии света, ее преобразованием в химическую энергию (первичный фотосинтез).

3. Образование блока фотосенсибилизатор — биокатализатор в реакциях переноса электрона от донора к акцептору; возникновение циклического переноса электрона, сопряженного с фосфорилированием.

4. Использование воды в качестве исходного донора электрона: сопряжение двух или даже трех фотокаталитических блоков.

Возникает вопрос, какие из этих стадий были уделом химической или биологической эволюции? На этот вопрос можно ответить лишь условно, так как мы не обладаем достоверными экспериментальными материалами. Можно думать, что на пути химической эволюции были образованы первичные фотосенсибилизаторы и катализаторы, были осуществлены простые типы сопряжения пигмента-сенсибилизатора и каталитических систем, которые мы моделируем в лабораторных условиях. Эти сопряженные системы могли использоваться первичными организмами-протобионтами, обладающими механизмами репликации, и по существу, с этого началась биологическая эволюция, в процессе которой происходило дальнейшее усовершенствование пигментных и каталитических систем и способов их сопряжения. Совокупность этих вопросов рассматривалась в ряде публикаций [180, 181].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теперь хотелось бы резюмировать главные результаты экспериментальных работ лаборатории.

Обнаружена и исследована способность возбужденного светом хлорофилла, его аналогов и производных к обратимому восстановлению, т. е. восприятию электрона (водорода) от молекулы-донора, и к обратимому окислению, т. е. отдаче электрона (водорода) молекуле-акцептору, с первичным образованием пары ион-радикалов. Установлена способность возбужденного хлорофилла и его аналогов к фотосенсибилизированному переносу электрона (водорода) с использованием в качестве конечных акцепторов электрона редокс-систем с потенциалом, близким к водородному электроду (НАД, виологены). В основе способности хлорофилла к фотопереносу электрона лежит его первичное фотоокисление или фотовосстановление. Фотореакции такого типа могут лежать в основе преобразования энергии света в химическую энергию при фотосинтезе.

Сравнительное изучение спектральных свойств пигментов в интактных фотосинтезирующих организмах и в агрегированных формах, образованных путем самосборки, показали, что клетки содержат различные формы бактериохлорофиллов, хлорофилла и протохлорофилла, отличающиеся типами молекулярной упаковки и связыванием низкомолекулярных аддендов. Определенные типы агрегации в мембранах фотосинтетических структур контролируются способами связи пигментов с белково-липидным комплексом и его конформацией.

Изучение формирования пигментного аппарата в процессе зеленения этиолированных листьев позволило обнаружить последовательное образование разных форм хлорофилловых пигментов и постепенную агрегацию хлорофилла в структурах хлоропластов. При этом удалось осуществить световую стадию образования хлорофилла в бесклеточных препаратах листьев, что открыло пути к выделению протохлорофилл-голохрома и изучению его свойств.

Изучая фотохимическую активность хлорофилла в процессе формирования фотосинтетического аппарата, удалось наблюдать формы пигментов, отличающиеся по своей фотохимической активности, что вошло в число явлений, доказывающих наличие двух фотосистем. Обнаружены изменения состояния пигментов в организмах под действием света (фотодезагрегация), растворителей, поверхностно-активных веществ (детергентов), нагревания, что указывает на функциональную лабильность пигментной системы организмов.

Разработаны методы изучения обратимых превращений пигментов непосредственно в клетках фотосинтезирующих организмов путем измерения дифференциальных спектров (свет — темнота), индукции флуоресценции и послесвечения. Установлено,

что наблюдаемые эффекты связаны с работой цепи фотосинтетического переноса электрона и проявляются в виде окислительно-восстановительных превращений пигмента в активном центре и в конформационном изменении пигментно-белково-липидных комплексов. Наблюдение первичного образования свободных радикалов под действием света связывает результаты опытов в модельных системах и в интактных организмах.

Исследование возможных путей химической эволюции фотосинтеза в модельных системах позволило установить пути абиогенного образования порфина, хлорина и бактериохлорина из пиррола и формальдегида, фотохимическую активность биохимических редокс-систем: хинонов и восстановленных пиридиннуклеотидов. Удалось показать, что неорганические фотокатализаторы — полупроводники, окислы цинка, титана и вольфрама обладают фотохимической активностью, сравнимой с порфиринами. С их помощью удалось моделировать I и II фотосистемы фотосинтеза при возбуждении фотокатализаторов в близкой ультрафиолетовой области спектра.

В заключение следует указать, что работы нашей лаборатории, так же как и многих других лабораторий, послужили обоснованию следующей картины первичных процессов преобразования энергии света при фотосинтезе, которая получила всеобщее распространение.

При фотосинтезе свет, поглощенный хлорофиллом, используется для осуществления окислительно-восстановительных процессов против градиента химического потенциала. Преобразование энергии света происходит в цепи фотосинтетического переноса электрона, где фотохимические реакции хлорофилла сопряжены с действием энзиматических систем.

Превращение энергии возбуждения хлорофилла в форму запасенной химической энергии происходит путем различных типов переноса электрона. В эти реакции вовлекаются невозбужденные молекулы-партнеры, являющиеся донорами и акцепторами различных участков всей цепи фотосинтетического переноса электрона. Непосредственное участие в переносе электрона принимает небольшое количество хлорофилла и бактериохлорофилла в активном центре, где агрегированный пигмент связан с ближайшими энзиматическими партнерами (цитохромы, пластохиноны и др.) в белковолипидных структурах мембран. Главная масса хлорофилла и бактериохлорофилла, поглощающая энергию света, участвует в процессах миграции энергии возбуждения со стоком энергии к наиболее длинноволновым активным центрам. Таким образом, переносу электрона предшествует образование возбужденных соединений, обладающих различной длительностью жизни. Инициируемый светом процесс переноса электрона осуществляется в структурах мембран и сопряжен с транслокацией ионов (протонов), что может быть связано с работой энзиматических систем, синтезирующих АТФ.

Трудно переоценить необходимость выяснения молекулярного механизма преобразования световой энергии в химическую в процессе фотосинтеза, так как вся жизнь на Земле основана на реализации этого процесса. Можно надеяться, что окончательное выяснение природы и способов сопряжения этого процесса с разнообразными путями метаболизма растений позволит управлять их деятельностью, и, с другой стороны, полученные данные приведут к построению искусственных фотохимических систем, эффективно использующих энергию Солнца.

Исследование молекулярного механизма фотосинтеза ведется во многих лабораториях мира с помощью различных методов и с использованием различных рабочих гипотез.

Физики-спектроскописты изучают первичные процессы возбуждения и миграции энергии в пигментной системе, которые разыгрываются за время до 10^{-9} сек.; фотохимики изучают первичные продукты, образованные в результате поглощения кванта света; биохимики изучают многообразные процессы в цепи переноса электрона и последующих углеродных циклов; физиологи и биохимики растений изучают разнообразные метаболические пути, в которых первичные процессы фотосинтеза связаны с обменом азота, серы, фосфора, накоплением метаболитов в разных органах растения, фотосинтетическим и дыхательным обменом. Агрохимики и агрономы изучают пути реализации процесса фотосинтеза в форме хозяйственно важных продуктов—зерна, клубней, корнеплодов. Геологи и геохимики изучают пути участия фотосинтеза в формировании биосферы, и, наконец, изучение фотосинтеза тесно связано с проблемами происхождения жизни и эволюции организмов.

Это краткое и неполное перечисление указывает на чрезвычайно широкий фронт исследований фотосинтеза, в котором находят место представители самых разных научных дисциплин.

В этом чрезвычайно широком фронте исследований нашу лабораторию интересует установление природы первичных фотобиохимических процессов, в которых преобразуется энергия света. Окончательное решение этой проблемы потребует больших усилий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *А. Н. Теренин.* Фотохимия хлорофилла и фотосинтез. VI Баховское чтение М., Изд-во АН СССР, 1951.
2. *А. А. Красновский.* В сб. «Физиология сельскохозяйственных растений». Изд-во МГУ, 1, 149, 1967.
3. *A. A. Krasnovsky.* Ann. Rev. Plant Physiol., **11**, 363, 1960.
4. *А. А. Красновский.* В сб. «Биохимия и биофизика фотосинтеза». М., «Наука», 26, 1965.
5. *A. A. Krasnovsky.* Biophys. J., **12**, 749, 1972.
6. *А. А. Красновский.* В сб. «Элементарные фотопроцессы в молекулах». М.— Л., «Наука», 213, 1966.
7. *В. Б. Евстигнеев.* В сб. «Элементарные фотопроцессы в молекулах». М.— Л., «Наука», 243, 1966.
8. *А. А. Красновский.* В сб. «Функциональная биохимия клеточных структур». М., «Наука», 1970.
9. *А. Н. Теренин.* Фотоника молекул красителей. Л., «Наука», 1967.
10. *А. Н. Теренин.* В сб. «Проблемы фотосинтеза». М., Изд-во АН СССР, 9, 1959.
11. *А. А. Красновский* (мл.), *В. А. Шувалов, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **199**, 1181, 1971.
12. *А. А. Красновский* (мл.), *В. А. Романюк, Ф. Ф. Литвин.* Докл. АН СССР, **209**, 965, 1973.
13. *Г. Т. Рихирева, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин, А. В. Умрихина, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **159**, 196, 1964.
14. *R. S. Becker, M. Kasha.* J. Am. Chem. Soc., 77, 3669, 1955.
15. *Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев.* Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск, «Наука и техника», 1968.
16. *А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **60**, 421, 1948.
17. *А. А. Красновский.* Успехи химии, **29**, 736, 1960.
18. *Г. П. Гуринович.* В сб. «Биохимия и биофизика фотосинтеза». М., «Наука», 83, 1965.
19. *G. Seely.* Photochemistry and Photobiology, **3**, 195, 1964.
20. *А. Н. Сидоров.* Успехи химии, **35**, 366, 1966.
21. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **153**, 211, 1963.
22. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.* Докл. АН СССР, **95**, 841, 1954.
23. *В. Б. Евстигнеев.* Биофизика, **8**, 664, 1963.
24. *А. К. Чибисов.* Исследование фотореакций пигментов методом импульсного фотолиза и кинетической спектроскопии. Канд. дисс. М., ГЕОХИ, 1964.
25. *А. А. Красновский, А. В. Умрихина.* Биофизика, **3**, 547, 1958.
26. *Н. Н. Бубнов, А. А. Красновский, А. В. Умрихина, В. В. Цепалов, В. Я. Шляпинтох.* Биофизика, **5**, 191, 1960.
27. *Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский, Л. П. Каюшин.* Докл. АН СССР, **156**, 1451, 1964.
28. *Г. Т. Рихирева, А. В. Умрихина, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **163**, 491, 1965.

29. *А. В. Умрихина, Г. А. Юсупова, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **175**, 1400, 1967.
30. *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова.* Биохимия, **26**, 859, 1961.
31. *А. А. Красновский, К. К. Войновская.* Докл. АН СССР, **66**, 663, 1949.
32. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, Ф. Ланг.* Докл. АН СССР, **194**, 1441, 1970.
33. *Е. В. Пакшина, А. А. Красновский.* Биохимия, **29**, 1132, 1964.
34. *Е. В. Пакшина, М. И. Быстрова, А. А. Красновский.* Молек. биология, **1**, 154, 1967.
35. *А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **58**, 835, 1947.
36. *А. А. Красновский, К. К. Войновская.* Докл. АН СССР, **81**, 879, 1951.
37. *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова.* Докл. АН СССР, **150**, 1378, 1963.
38. *М. Г. Шапошникова, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский.* Биохимия, **36**, 704, 1971.
39. *А. А. Красновский* (мл.), *Ф. Ф. Литвин.* Молек. биология, **1**, 699, 1967.
40. *А. А. Красновский* (мл.), *Ф. Ф. Литвин.* Молек. биология, **3**, 282, 1969.
41. *E. Rabinowitch, J. Weiss.* Proc. Roy. Soc., **162**, 251, 1937.
42. *В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин.* Докл. АН СССР, **81**, 223, 1951.
43. *А. А. Качан, Б. Я. Даин.* Докл. АН СССР, **80**, 619, 1951.
44. *H. Linschitz, J. Rennert.* Nature, **169**, 193, 1952.
45. *G. Tollin, G. Green.* Biochim. et biophys. acta, **60**, 524, 1962.
46. *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский.* Биохимия, **30**, 605, 1965.
47. *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова.* Докл. АН СССР, **158**, 730, 1964.
48. *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский.* Молек. биология, **1**, 395, 1967.
49. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.* Докл. АН СССР, **165**, 1435, 1965.
50. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.* Биофизика, **11**, 593, 1966.
51. *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова.* Докл. АН СССР, **177**, 1225, 1967.
52. *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. А. Бокучава.* Докл. АН СССР, **190**, 464, 1970.
53. *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **195**, 1222, 1970.
54. *А. К. Чибисов, А. В. Карякин, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **175**, 273, 1967.
55. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **63**, 163, 1948.
56. *Г. П. Брин, А.А. Красновский.* Биохимия, **22**, 776, 1957.
57. *А. А. Красновский, К. К. Войновская.* Биофизика, **1**, 120, 1956.
58. *А. А. Красновский, Е. С. Михайлова.* Докл. АН СССР, **185**, 938, 1969.
59. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биохимия, **21**, 126, 1956.
60. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биохимия, **23**, 760, 1958.
61. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.* Биофизика, **4**, 641, 1959.
62. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова.* Биофизика, **5**, 599, 1960.
63. *L. P. Vernon.* Acta Chem. Scand., **15**, 1651, 1961.
64. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **67**, 325, 1949.
65. *Г. П. Брин, А. А. Красновский.* Биохимия, **24**, 1085, 1959.
66. *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова.* Докл. АН СССР, **153**, 721, 1963.
67. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **163**, 761, 1965.
68. *Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **174**, 221, 1967.
69. *D. Brune, A. San Pietro.* Arch. Biochem. and Biophys., **141**, 371, 1970.
70. *А. А. Красновский, А. Н. Луганская.* Докл. АН СССР, **183**, 1441, 1968.
71. *А. Н. Луганская, А. А. Красновский.* Молек. биология, **4**, 848, 1970.
72. *А. Н. Теренин.* Успехи физиол. наук, **43**, 347, 1951.
73. *А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская.* Докл. АН СССР, **69**, 393, 1949.
74. *R. Livingston, R. Pariser.* J. Amer. Chem. Soc., **71**, 1510, 1948.
75. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, И. Г. Савкина.* Докл. АН СССР, **151**, 227, 1963.
76. *А. К. Чибисов, А. В. Карякин, М. Е. Зубрилина.* Докл. АН СССР, **161**, 483, 1965.

77. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР **66**, 1133, 1949.
77а. *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **70**, 261, 1950.
78. *R. Livingston, W. F. Watson, J. McArdle.* J. Amer. Chem. Soc., **71**, 1542, 1949.
79. *А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая.* Докл. АН СССР, **85**, 389, 1952.
80. *А. А. Красновский, Е. В. Пакшина.* Докл. АН СССР, **127**, 913, 1959.
81. *Ф. Ф. Литвин.* В сб. «Биохимия и биофизика фотосинтеза». М., «Наука», 96, 1965.
82. *Е. В. Белавцева, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биофизика, **4**, 521, 1959.
83. *J. J. Katz, G. L. Closs, F. C. Pennington, M. R. Thomas.* J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3801, 1963.
84. *Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский.* Биофизика, **7**, 578, 1962.
85. *А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун Юй-цюнь.* Докл. АН СССР, **143**, 456, 1962.
86. *А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Б. А. Гуляев.* Докл. АН СССР, **152**, 1231, 1963.
87. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова.* Докл. АН СССР, **174**, 480, 1967.
88. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева.* Докл. АН СССР, **204**, 1473, 1972.
89. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **95**, 611, 1954.
90. *А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская.* Докл. АН СССР, **92**, 1201, 1953.
91. *М. И. Быстрова, А. А. Красновский.* Молек. биология, **1**, 362, 1967.
92. *М. И. Быстрова, А. А. Красновский.* Молек. биология, **6**, 77, 1972.
93. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, Ф. Ланг.* Докл. АН СССР, **201**, 1485, 1971.
94. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева.* Докл. АН СССР, **189**, 885, 1969.
95. *М. И. Быстрова, А. А. Красновский.* Молек. биология, **5**, 291, 1971.
96. *А. Н. Теренин, В. Е. Холмогоров.* В сб. «Биохимия и биофизика фотосинтеза». М., «Наука», 5, 1965.
97. *Г. Т. Рихирева, А. В. Умрихина, Л. П. Каюшин, А. А. Красновский.* Биофизика, **11**, 769, 1966.
98. *Ф. Ф. Литвин, В. И. Звалинский.* Биофизика, **13**, 241, 1968.
99. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова.* Докл. АН СССР, **182**, 211, 1968.
100. *Т. Н. Годнев.* Хлорофилл, его строение и образование в растениях. Минск, Изд-во АН БССР, 1963.
101. *А. А. Красновский, Е. А. Нестеровская, А. Б. Гольденберг.* Биофизика, **1**, 328, 1956.
102. *E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrenstein.* Enzymologia, **7**, 113, 1939.
103. *C. S. French.* J. Gen. Physiol., **23**, 483, 1940.
104. *Ф. Ф. Литвин.* В сб. «Современные проблемы фотосинтеза». Изд-во МГУ, 175, 1973.
105. *А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая.* Докл. АН СССР, **85**, 177, 1952.
106. *А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая.* Докл. АН СССР, **91**, 343, 1953.
107. *Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **117**, 106, 1957.
108. *Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский.* Известия АН СССР, **23**, 82, 1959.
109. *K. Shibata.* J. Biochem., **44**, 147, 1957.
110. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова.* Биохимия, **25**, 168, 1960.
111. *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, А. Д. Сорокина.* Докл. АН СССР, **136**, 1227, 1961.
112. *N. L. Butler, W. R. Briggs.* Biochim. Biophys. Acta, **112**, 45, 1966.
113. *C. S. French, V. K. Young.* J. Gen. Physiol., **35**, 873, 1952.
114. *Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский, Г. Т. Рихирева.* Докл. АН СССР, **135**, 1528, 1960.
115. *Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биохимия, **34**, 257, 1969.

116. *Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Молек. биология, **5**, 366, 1971.
117. *Н. Г. Доман, А. А. Красновский, А. К. Романова, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина, З. А. Терентьева.* Физиол. растений, **8**, 3, 1961.
118. *А. А. Шлык.* В сб. «Современные проблемы фотосинтеза». Изд-во МГУ, 85, 1973.
119. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биофизика, **13**, 456, 1968.
120. *Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биофизика, **14**, 245, 1969.
121. *А. А. Красновский, Л. М. Воробьева, Е. В. Пакшина.* Физиол. растений, **4**, 124, 1957.
122. *Л. М. Воробьева, М. И. Быстрова, А. А. Красновский.* Биохимия, **28**, 524, 1963.
123. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский,* Физиол. растений, **13**, 929, 1966.
124. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Биофизика, **12**, 240, 1967.
125. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **189**, 420, 1969.
126. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **195**, 731, 1970.
127. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **205**, 233, 1972.
128. *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Г. А. Каюпова.* Физиол. растений **21**, N 6, 1974.
129. *Л. М. Ворсбьева, А. А. Красновский.* Биохимия, **31**, 573, 1966.
130. *Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский.* Биохимия, **18**, 340, 1953.
131. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **179**, 726, 1968.
132. *Ю. Е. Ерохин, О. А. Синегуб.* Молек. биология, **4**, 401, 1970.
133. *Ю. Е. Ерохин, О. А. Синегуб.* Молек. биология, **4**, 541, 1970.
134. *Ю. Е. Ерохин, А. А. Москаленко.* Докл. АН СССР, **212**, 497, 1973.
135. *Л. Г. Ерохина, А. А. Красновский.* Молек. биология, **5**, 399, 1971.
136. *А. А. Красновский, Л. Г. Ерохина.* Докл. АН СССР, **193**, 1415, 1970.
137. *Г. П. Брин, А. А. Красновский.* Биохимия, **16**, 453, 1951.
138. *H. Gaffron.* Amer. J. Botany, **27**, 282, 1940.
139. *H. Gaffron, J. Rubin.* J. Gener. Physiol., **26**, 219, 1942.
140. *В. П. Ощепков, А. А. Красновский.* Физиол. растений, **19**, 1090, 1972.
141. *В. П. Ощепков, К. А. Никитина, М. В. Гусев, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **213**, 739, 1973.
142. *Г. П. Брин, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **204**, 1253, 1972.
143. *А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая.* Докл. АН СССР, **82**, 761, 1952.
144. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **96**, 1025, 1954.
145. *Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский.* Биофизика, **8**, 191, 1963.
146. *N. V. Karapetyan.* In «Progress in Photosynthesis Res.», Tübingen, **2**, 778, 1969.
147. *Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **149**, 1428, 1963.
148. *L. N. M. Duysens, H. E. Sweers.* In «Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria», Tokyo, 353, 1963.
149. *Н. В. Карапетян, А. А. Красновский.* В сб. «Биохимия автотрофных микроорганизмов». Труды МОИП, **24**, 94, 1966.
150. *Н. В. Карапетян, В. В. Климов, Ф. Ланг, А. А. Красновский.* Физиол. растений, **18**, 507, 1971.
151. *Н. В. Карапетян, В. В. Климов, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **201**, 1244, 1971.
152. *N. V. Karapetyan.* In «Proc. of the 2-nd Intern. Congress of Photosynthesis Res.»,1, 180, 1972.
153. *В. В. Климов, Ф. Ланг, Н. В. Карапетян.* Физиол. растений, **19**, 151, 1972.
154. *Н. В. Карапетян, В. В. Климов.* Физиол. растений, **20**, 545, 1973.
155. *B. Kok, G. Hoch.* In «Light and Life», Hopkins University Press, 397, 1961.
156. *Н. В. Карапетян, В. В. Климов.* Физиол. растений, **18**, 223, 1971.
157. *Н. В. Карапетян, В. В. Климов, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **211**, 729, 1973.
158. *N. V. Karapetyan, V. V. Klimov, A. A. Krasnovsky.* Photosynthetica, **7**, 330, 1973.

159. *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **171**, 1201, 1966.
160. *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский.* Молек. биология, **6**, 773, 1972.
161. *Н. В. Карапетян, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **180**, 989, 1968.
162. *И. Н. Крахмалева, Н. В. Карапетян, А. А. Красновский.* Биофизика, **17**, 990, 1972.
163. *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский.* Молек. биология, **7**, 868, 1973.
164. *В. А. Шувалов, Ф. Ф. Литвин.* Молек. биология, **3**, 59, 1969.
165. *В. А. Шувалов,А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **207**, 746, 1972.
166. *А. А. Красновский* (мл.), *Ф. Ф. Литвин.* Биофизика, **17**, 764, 1972.
167. *В. А. Шувалов, А. А. Красновский.* Молек. биология, **5**, 698, 1971.
168. *J. McElroy, G. Feher, D. C. Mauzerall.* Biochim. Biophys. Acta, **267**, 363, 1972.
169. *А. И. Опарин.* Возникновение жизни на Земле. М., Изд-во АН СССР, 1957.
170. *C. Ponnamperuma.* In «Quarterly Reviews of Biophysics». Cambridge University Press, **4**, 77, 1971.
171. *А. А. Красновский, А. В. Умрихина.* Докл. АН СССР, **155**, 691, 1964.
171а. *А. А. Красновский, А. В. Умрихина.* Докл. АН СССР, **202**, 221, 1972.
172. *A. A. Krasnovsky, A. V. Umrikhina.* In «Molecular Evolution, prebiological and biological». Plenum Publ. N. Y., 1972.
173. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **147**, 656, 1962.
174. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* В сб. «Молекулярная фотоника». Л., «Наука», 161, 1970.
175. *Г. В. Фомин, Г. П. Брин, М. В. Генкин, А. К. Любимова, Л. А. Блюменфельд, А. А. Красновский.* Докл. АН СССР, **212**, 424, 1973.
176. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* Докл. АН СССР, **213**, 207, 1973.
177. *А. А. Красновский.* В сб. «Возникновение жизни на Земле». М., Изд-во АН СССР, 355, 1957.
178. *А. А. Красновский, Г. П. Брин.* В сб. «Проблемы эволюционной и технической биохимии». М., «Наука», 221, 1964.
179. *А. А. Красновский, Е. С. Михайлова.* Докл. АН СССР, **212**, 237, 1973.
180. *A. A. Krasnovsky.* In «Chemical Evolution and Origin of Life», ed. R. Buvet, C. Ponnamperuma, North — Holland, 279, 1971.
181. *А. А. Красновский.* В сб. «Эволюционная биохимия». М., «Знание», 32, 1973.

ПРОБЛЕМЫ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИИ ВИРУСОВ

В.И. Агол

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР и Московский государственный университет

В проблеме происхождения и эволюции вирусов можно выделить несколько подпроблем.

1. Исчерпывают ли известные в настоящее время вирусы теоретически возможные варианты способов передачи генетической информации /репликации и транскрипции геномов/?
2. Откуда произошли разные типы вирусов?
3. Возможно ли образование вирусов, имеющих некоторый способ передачи генетической информации, из вирусов с другим способом передачи генетической информации?
4. Каковы молекулярные механизмы изменчивости внутри группы вирусов, характеризующихся одинаковым способом передачи информации?
5. Каковы движущие силы эволюции вирусов?
6. Какова связь эволюции вирусов с эволюцией их хозяев?

По большинству из этих пунктов в настоящее время можно высказать только некоторые общие соображения. Лишь отдельные вопросы могут изучаться и изучаются экспериментально.

ХИМИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

А.А. Красновский

Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР

Жизнь на Земле полностью зависит от фотосинтеза растений, поставляющего органическое вещество и кислород всем организмам, существующим на нашей планете. Возникает вопрос, связано ли с фотосинтезом также и происхождение жизни на нашей планете? А.И. Опарин обосновал то положение, что фотосинтез является более поздним типом обмена веществ, который возник на основе метаболизма первичных гетеротрофов, использовавших "готовое органическое вещество" абиогенного происхождения. В докладе рассматриваются данные модельных систем экспериментов, указывающих на возможные пути химической эволюции фотосинтеза. Первичный энергетический обмен веществ пробионтов, вероятно, был основан на реакциях переноса электрона, кото-

рые управлялись катализаторами или пигментами-фотосенсибилизаторами. Действие пигментов-фоторецепторов было неизбежно в случае переноса электрона, ведущего к запасанию энергии в продуктах реакции. Первичные тетрапиррольные пигменты, образованные абиогенным путём (порфин, хлорин), также как их более сложные аналоги (хлорофиллы), способны фотосенсибилизировать реакции переноса электрона в системах, обладающих различной сложностью молекулярной организации.

Неорганические фотосенсибилизаторы (двуокись титана, окись цинка и т.д.) при возбуждении в близком ультрафиолете способны осуществлять те же реакции, что и порфины - перенос электрона от молекулы донора к акцептору (включая фотовосстановление виологенов), а также фотоокисление молекулы воды (выделение кислорода, сопряжённое с восстановлением соединений окисного железа и хинона). Однако неорганические фотосенсибилизаторы не использовались в биологической эволюции, которая пошла по пути включения неорганических ионов в тетрапиррольный цикл. Эффективные фотокатализаторы образовались при включении ионов магния. Встраивание пигментов в первичную мембрану привело к возможности сопряжения между пигментами и ферментативными системами мембран. Включение возбуждённых светом молекул пигмента в биокаталитическую цепь переноса электрона явилось необходимым условием в функционировании первичных фотосинтезирующих организмов.

А. А. Красновский, М. И. Быстрова

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

Институт биохимии АН СССР им. А. Н. Баха, Москва

Восстановление протохлорофилла (протохлорофиллида) до уровня хлорофилла *а* лежит в основе заключительного этапа хлорофиллобразования, который у большинства высших растений протекает при освещении и представляет собой сложное сочетание фотофизических, фотохимических и темновых биохимических процессов. В понимание природы этих процессов большой вклад внесли работы Т. Н. Годнева и А. А. Шлыка [1]. Результаты исследований конечных стадий биосинтеза хлорофилла описаны недавно в исчерпывающем обзоре Н. К. Акулович и В. И. Раскина [2].

В данной статье мы хотели дать краткий обзор работ нашей лаборатории по исследованию образования хлорофилла в бесклеточных системах.

Возможность фотовосстановления предшественника до уровня хлорофилла вне клетки была установлена в нашей лаборатории более 20 лет назад [3], когда удалось наблюдать в водном экстракте этиолированных листьев (коллоидном растворе) при освещении образование хлорофилла с максимумом поглощения около 670 *нм*. (Несколько позже Смит и сотр. [4] наблюдали фотовосстановление протохлорофиллового пигмента в глицериновом экстракте этиолированных листьев).

Обнаружение фотоактивности у бесклеточных гомогенатов этиолированных листьев позволило в дальнейшем [5—11] изолировать из таких систем протохлорофиллид-белковое соединение («протохлорофилл-голохром») и исследовать его свойства.

Первые прижизненные исследования спектров поглощения и люминесценции этиолированных и зеленеющих листьев [13, 14] позволили обнаружить существование отличающихся по свойствам форм протохлорофилловых пигментов и установить ряд последовательных спектральных стадий на заклю-

чительном этапе образования хлорофилла. В то же время стало известно [15—18] об участии бесфитольной формы протохлорофиллового пигмента в процессе фотовосстановления.

Многочисленные исследования последних лет значительно углубили и расширили представление о состоянии и превращении пигментов на заключительном этапе биосинтеза хлорофилла *а*.

Однако вопросы, касающиеся природы естественного состояния предшественника хлорофилла, специфики его связи с белком и характера фотовосстановления до уровня хлорофилла *а*, еще недостаточно исследованы. Мы надеялись подойти к их разрешению, исследуя гомогенаты этиолированных листьев, содержащие пигмент-белковые соединения, а также простые модельные системы, содержащие протохлорофилловый пигмент, отделенный от белкового носителя.

Состояние и превращение пигментов в гомогенатах изучались в диссертационной работе М. И. Быстровой более 10 лет назад [19, 20].

Гомогенаты получали из этиолированных листьев фасоли с использованием фосфатного буферного раствора (pH 4,5; 6,5; 8,5) с конечным центрифугированием при 1000 *g* 5 *мин.*

Электронномикроскопическое исследование таких систем [21] показало наличие в них пропластид и их фрагментов — компонентов проламеллярных тел.

Протохлорофилловые пигменты в гомогенатах представлены смесью протохлорофиллида (свыше 80%) и протохлорофилла (менее 20%), что согласуется с данными для интактных этиолированных листьев [16, 22]. Основной пигмент локализован в мембранах проламеллярного тела [8, 10, 12], являясь составной частью выделяемого из них протохлорофиллид-белкового комплекса.

Спектры флуоресценции неосвещенных гомогенатов (при ~—150°) обнаруживают отчетливый максимум при 655 *нм* и менее выраженный максимум в области 628—642 *нм*, который при pH 4,5, как правило, проявляется в виде двух четких максимумов — около 630 и 640 *нм* соответственно (рис. 1).

Подобные спектры имеют, как показано [10], препараты протохлорофиллид-белкового комплекса и мембраны проламеллярного тела. Интактным этиолированным листьям [14, 23] свойственны бóльшая относительная величина максимума 655 *нм* в низкотемпературном спектре и наличие только одного коротковолнового компонента — 630—632 *нм*, что связано с иными условиями миграции энергии возбуждения [10].

Центрифугирование гомогенатов при 3000 *g* приводит к некоторому уменьшению относительной интенсивности максимума 655 *нм* в спектре флуоресценции надосадочной жидко-

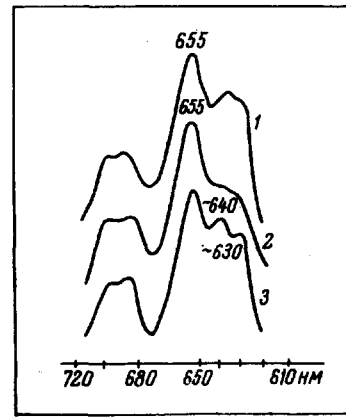


Рис. 1. Спектры флуоресценции гомогенатов этиолированных листьев фасоли при разных pH:
1—8,5; *2*—6,5; *3*—4,5

сти. Последующее центрифугирование при 20 000 *g* (в опытах с разной продолжительностью центрифугирования) позволило обнаружить бóльшую скорость и степень уменьшения максимума 655 *нм* в надосадочной фракции по сравнению с изменением коротковолновой флуоресценции. Эти результаты привели к предположению о том, что различающиеся по величине фрагменты пропластид обладают разным относительным содержанием формы 655 *нм*; наиболее обогащены этой формой целые пропластиды, осаждающиеся при 3000 *g*.

По нашим данным, в гомогенатах, освобожденных от целых пропластид и их крупных фрагментов, ход пигментных превращений существенно не изменяется. Поэтому в большинстве опытов мы исследовали гомогенаты без их предварительного скоростного центрифугирования, что обеспечивало сохранение естественных пигмент-белковых комплексов.

Освещение гомогенатов (при 20°) резко изменяет спектры. Максимум при 655 *нм* заметно уменьшается по интенсивности уже в первую секунду действия света и на протяжении одной минуты исчезает совсем. Флуоресценция в области 635 *нм* падает в меньшей степени. В то же время возникает интенсивный максимум при ~688 *нм*, который через несколько минут смещается до ~680 *нм* (рис. 2, *А*).

Аналогичный ход превращений впоследствии был обнаружен у изолированных мембран проламеллярного тела и препаратов протохлорофиллид-белкового комплекса [6—10]. Продолжительное освещение гомогенатов (в анаэробных условиях), по нашим данным, не вызывает каких-либо иных спектральных превращений (рис. 2, *Б*). Образование первичного максимума 688 *нм* можно было наблюдать и у замороженных образцов при температуре ~—100°, однако без последую-

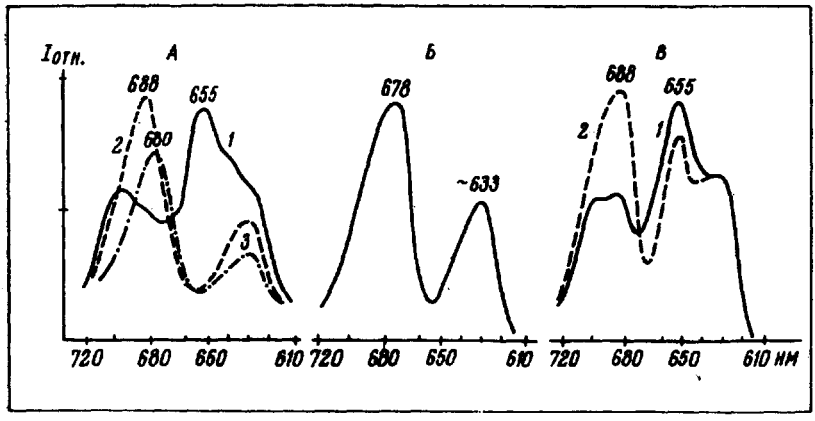


Рис. 2. Действие света на гомогенаты этиолированных листьев фасоли. Спектры флуоресценции (~—150°):

А—исходный (*1*); после освещения при 20° в течение 15 *сек* (*2*) и 5 *мин* (*3*); *Б*—после 2 *час* освещения в анаэробных условиях; *В*—исходный (1); после 10 *мин* освещения при температуре >—100° (*2*)

щего коротковолнового смещения (рис. 2, *В*). В этих опытах обращало внимание отсутствие пропорциональности между уменьшением максимума 655 *нм* и увеличением полосы 688 *нм*. Подобное явление недавно отмечено и у интактных листьев [24]. Объяснено оно на основании представления об эффективной миграции энергии возбуждения от протохлорофиллида к вновь образующемуся хлорофиллиду.

Проведенный нами [20, 22, 25] химический анализ пигментов, экстрагируемых из гомогенатов в ходе превращения, позволил установить, что максимум 655 *нм* принадлежит протохлорофиллиду, тогда как последовательно возникающие из него максимумы 688 и 680 *нм* — хлорофиллиду. Даже после продолжительного освещения гомогенатов в них не удается обнаружить сколько-нибудь заметного образования этерифицированного хлорофилла *а* так же, как и убыли протохлорофилла.

В бесклеточных гомогенатах только бесфитольный предшественник подвергается фотовосстановлению. Образующийся хлорофиллид не этерифицируется фитолом в ходе дальнейших превращений, что согласуется с данными Смита [26], не наблюдавшего активности хлорофиллазы у изолированного «протохлорофилл-голохрома».

При изучении действия факторов, нарушающих естественное состояние протохлорофиллида, получены следующие результаты.

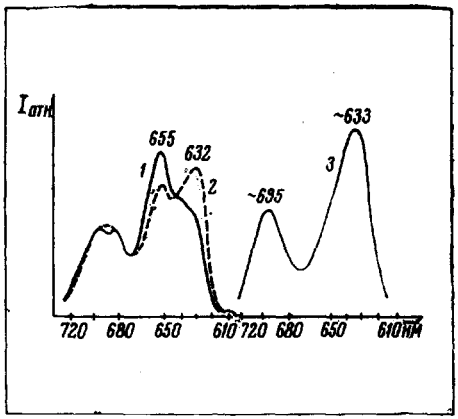


Рис. 3. Действие нагревания на гомогенаты этиолированных листьев фасоли. Спектры флуоресценции (—150°):

исходный (*1*); после нагревания до 40° (*2*) и 50° (*3*)

Нагревание до 40° (2 *мин*) вызывает резкое уменьшение максимума 655 *нм* и пропорциональное возрастание коротковолновой флуоресценции около 632 *нм*. Нагревание до 50° приводит к полному исчезновению максимума при 655 *нм* и дальнейшему увеличению интенсивности коротковолновой полосы (рис. 3). Эти результаты соответствуют данным по действию температуры на интактные этиолированные листья [27] и опытам Виргина [28], наблюдавшего у нагретых до 100° глицериновых гомогенатов максимум флуоресценции около 635 *нм*.

Добавление мочевины, детергентов, органических растворителей в возрастающих концентрациях вызывает сходные эффекты. В присутствии 5 М мочевины максимум 655 *нм* исчезает, что соответствует максимальному увеличению коротковолновой флуоресценции.

Аналогичное действие оказывают 0,5%-ный раствор детергента (аэрозоля и гардинола), пиридин в концентрации $>2{,}5\%$ и спирт в концентрации $>20\%$. Таким образом, максимум 655 *нм* исчезает под влиянием факторов, вызывающих денатурацию белка.

Исчезновение максимума 655 *нм* всегда сопровождается потерей способности к фотовосстановлению; вместе с тем любые воздействия, при которых хотя бы частично сохраняется этот максимум, не ингибируют и процесс образования хлорофиллида. Фотовосстановление протохлорофиллида в гомогенатах не останавливается в присутствии акцепторов электрона (водорода) в случае, если при этом сохраняется флуоресценция при 655 *нм*. Экзогенные доноры электрона также не влияют на превращение пигментов.

Эти результаты согласуются с данными по наблюдению образования хлорофилла (хлорофиллида) без вводимых извне восстановителей в очищенных препаратах «протохлорофилл-голохрома», а также с результатами [6, 8] по ингибированию процесса в присутствии веществ, денатурирующих белок. Совокупность полученного материала позволила предположить, что фотовосстановление «полуизолированной» двойной связи в молекуле протохлорофиллида осуществляется внутри пигмент-белкового комплекса со специфической нативной структурой; при этом роль донора водорода играют, по-видимому, электронодонорные группировки белка. Высокая квантовая эффективность фотовосстановления в таком комплексе [5, 26] обеспечивается, по-видимому, хорошей структурной «пригнанностью» его компонентов, особенно в местах химического взаимодействия. Это определяет и возможность протекания реакции при низкой температуре, в жесткой матрице, когда диффузионные процессы не могут иметь места.

Первым наблюдаемым продуктом фотовосстановления протохлорофиллида в гомогенатах является форма, флуоресцирующая при 688 *нм*. Она скорее всего .соответствует той промежуточной короткоживущей форме с поглощением 676—678 *нм*, которая, согласно исследованиям последнего времени [23, 29—33], обнаруживается в интактных этиолированных листьях при кратковременном освещении как результат непосредственного фотопревращения протохлорофиллида с максимумом поглощения при 655 *нм* и образования комплекса между предшественником и новообразованным хлорофиллидом [24]. Образование этой формы в листьях инициирует сложную цепь последующих процессов различной природы, приводящих в конечном итоге к созданию всей системы нативных форм и фотосинтетических функциональных структур клетки [32]. Электронномикроскопическое исследование листьев на начальных этапах зеленения [34—38] позволило выявить взаимосвязь между процессом образования хлорофилла (хлорофиллида) и стадиями структурной дифференциации пропластид в процессе развития ламеллярной системы. Изолированные пропластиды вне клетки не обнаруживают при освещении структурной перестройки, ведущей к построению ламелл [21]. Возможно, с этим связано отсутствие у гомогенатов того длинноволнового смещения максимума первично образованной формы, которое наблюдается у интактных листьев [3, 23, 29, 31—33] и, по данным [32, 33], представлено в виде последовательного образования из промежуточной формы форм с максимумами флуоресценции соответственно около 690 и 695 *нм*.

Продукт фотовосстановления протохлорофиллида в гомогенатах, по нашим данным, обнаруживает быстрое коротковолновое смещение максимума флуоресценции до 680—682 *нм*. Подобный сдвиг, отмеченный по спектрам поглощения у изолированных протохлорофиллид-белковых комплексов [8, 9], представляет собой темновую температурнозависимую реакцию [9]. Однако пока нет полной ясности в понимании того, насколько она идентична с коротковолновым смещением в интактных листьях [13, 14], которое наблюдается после фотохимического образования указанных длинноволновых форм [32, 33], протекает гораздо медленнее, чем в гомогенатах, и коррелирует с фитолизацией бо́льшей части пигмента [22, 25, 38]. Образующаяся коротковолновая форма хлорофилла *а* (с максимумом поглощения 670—673 *нм* и флуоресцирующая около 680 *нм* [3, 13, 14]) в структуре листа включается в цепь дальнейших превращений, приводящих к образованию хлорофилла, поглощающего при 676—678 *нм* [3], и ряда других нативных длинноволновых форм [32, 33]. В гомогенатах коротковолновая форма с максимумом флуоресценции 680—682 *нм*, принадлежащая хлорофиллиду, является конечным итогом спектральных превращений.

Таким образом, при образовании хлорофилла (хлорофиллида) вне клетки протекает лишь часть той цепи процессов, какая свойственна интактному листу в начале зеленения. Вместе с тем известно, что в бесклеточных системах [8, 26] и целых листьях [33, 39] ранние стадии образования хлорофилла (хлорофиллида) имеют близкую кинетику, характерную для двух последовательных реакций I порядка. Первоначальная стадия пигментных превращений, заключающаяся в фотохимическом гидрировании предшественника, является общей у бесклеточных систем и организмов. Возможность протекания этой стадии в обоих случаях обеспечивается наличием фотохимически активной лабильной формы протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 655 *нм* и соответствующим максимумом поглощения при 650 *нм* [13, 14]. Указанная форма разрушается под влиянием факторов, денатурирующих белок и оказывающих дезагрегирующее действие. Этот факт допускает предположение о том, что существование формы «655—650» является результатом создания особого нативного пигмент-белкового комплекса; его специфические конформация и локализация пигмента на белковом носителе способствуют проявлению межмолекулярного взаимодействия (агрегации) у предшественника хлорофилла и продукта его фотовосстановления — хлорофиллида.

Нас интересовала [40, 41] возможность самосборки в твердых пленках протохлорофилловых пигментов формы,

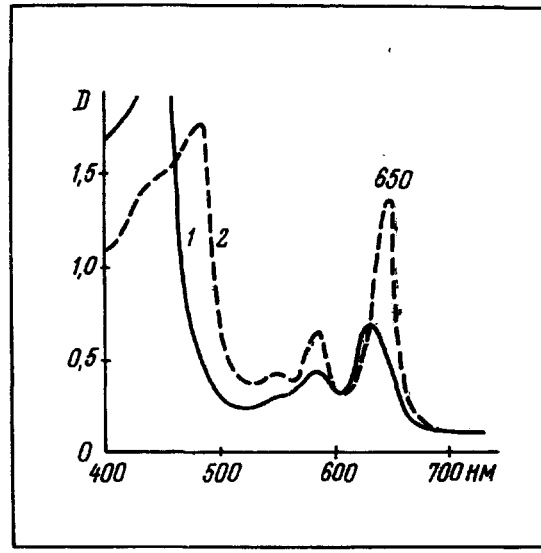


Рис. 4. Спектры поглощения пленки протохлорофилла:
1—исходный; *2*—после обработки парами метанола при 20° в течение 30 *мин*

сходной по спектральным свойствам с основной фотоактивной формой предшественника хлорофилла.

В 1953 г. в нашей лаборатории [42] наблюдали образование агрегированной формы с максимумом поглощения около 635 *нм* в твердых пленках 4-винилпротохлорофилла, выделенного из семян тыквы. В работе [43] было показано образование максимума 650 *нм* в спектре поглощения раствора протохлорофиллида в неполярных растворителях, наблюдаемое через несколько часов после растворения пигмента и обратимое в присутствии полярных примесей. Сходные результаты недавно получены в работе [44].

Постановка наших опытов описана в [41]. Было показано, что твердые пленки протохлорофилла, поглощающие около 635 *нм*, в присутствии паров метилового спирта подвергаются перестройке с образованием максимума около 650 *нм* (рис. 4), и весь спектр приобретает вид, сходный со спектром поглощения протохлорофиллового пигмента в естественном состоянии. Подобный результат получен и с пленками протохлорофиллида, выделяемого из этиолированных листьев.

Пленки пигментов, поглощающие при 650 *нм*, обладают при комнатной температуре заметной люминесценцией с отчетливым максимумом при 655 *нм*, доминирующим в спектре, и двумя другими — около 710 и 750 *нм* (рис. 5, спектр I).

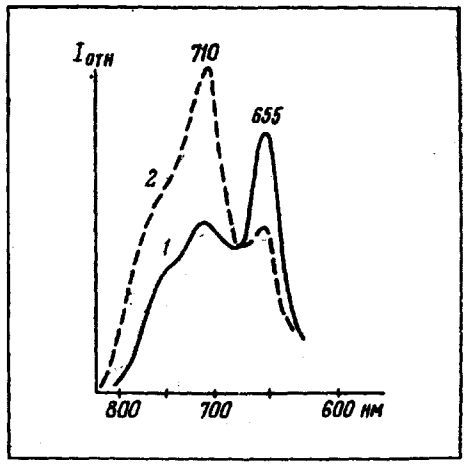


Рис. 5. Спектры флуоресценции пленки протохлорофилла с максимумом поглощения 650 *нм* при 20°:

1—при первоначальной регистрации в вакууме; *2*—после освещения возбуждающим светом в течение 3 *мин*

Спектр люминесценции в неизменном виде можно наблюдать только при первоначальной регистрации в вакууме, так как последующее действие возбуждающего света вызывает резкое уменьшение основного максимума и возрастание интенсивности длинноволновой люминесценции. Возможно, что этот эффект связан с фотоокислением формы «655—650» остаточным кислородом и уменьшением тушения длинноволновой люминесценции.

Спектры люминесценции пленок с основным максимумом поглощения при 650 *нм* во многом напоминают низкотемпературные спектры этиолированных листьев [10, 14, 23, 27]. Вместе с тем относительная величина максимума 655 *нм* в листьях выше, чем в пленках. Этот максимум в листьях практически не заметен при комнатной температуре, что обусловлено высокой квантовой эффективностью фотопревращения предшественника хлорофилла (хлорофиллида).

Пленки протохлорофилла, обработанные парами метилового спирта, обнаруживают появление в ИК спектре «агрегационного» максимума около 1675 $см^{-1}$, доминирующего в спектре, что свидетельствует о возможном участии связей кетоС=О...НО(CH_3)...Mg в образовании формы 650 *нм*. В работе [45] наблюдалась агрегация протохлорофилла и винилпротохлорофилла в четыреххлористом углероде, происходящая в образовании координационных связей кетогрупп молекул с атомом магния.

Полученные результаты так же, как и данные других авторов [27, 46—48], указывают на то, что в проявлении спектральных свойств нативного протохлорофиллид-белкового комплекса может играть роль межмолекулярное взаимодей-

ствие пигмента, которому способствует образование специфической связи с белковым компонентом. В свете этого материала вероятно предположение о том, что первичный продукт фотовосстановления протохлорофиллида («688—680»), образующийся в бесклеточных системах и целых листьях, представляет собой агрегированную форму хлорофиллида, связанного с белком, на что указано, например, в работах [23, 27, 29, 46]. Последующее возникновение в гомогенатах (но не в листьях) коротковолновой формы с максимумом флуоресценции 680—682 *нм* может быть связано с дезагрегацией молекул хлорофиллида [37, 46], происходящей в результате возможных конформационных изменений пигмент-белкового комплекса после акта фотовосстановления [49].

Как известно [10, 27, 38, 46, 50], в листьях, кроме основной формы протохлорофиллида «655—650», подвергается фотовосстановлению и более коротковолновая форма с максимумом флуоресценции около 640 *нм* и соответствующим поглощением около 635 *нм*. Эта форма —более простая в структурном отношении [51] содержит смесь неэтерифицированного и этерифицированного фитолом пигментов [22, 25, 38, 50]; при ее фотовосстановлении образуется менее агрегированный (возможно, мономерный) хлорофилл (хлорофиллид) с максимумом поглощения в области 670—675 *нм* и соответствующей флуоресценцией около 680 *нм* [38, 46, 50, 51].

Возник вопрос [52] о возможности фотовосстановления (по «полуизолированной» двойной связи 7—8) мономерного протохлорофилла, отделенного от белкового носителя, в растворе.

Ранее в ряде работ нашей лаборатории [53—55] при проведении фотовосстановления винилпротохлорофилла (выделенного из семян тыквы) в пиридине наблюдалось образование малого количества устойчивого хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения в области 670—675 *нм* и соответствующим максимумом флуоресценции в реакционной системе около 680 *нм* [54]. Недавно в лаборатории Г. П. Гуриновича [56, 57] было осуществлено в сходных условиях фотохимическое гидрирование «полуизолированных» двойных связей 7—8 у Zn-протофеофитина, протохлорофилла и ряда других металлопорфиринов с бо́льшим выходом хлорофиллоподобного (хлоринового) продукта; на примере Zn-феофитина, полученного фотохимическим путем и выделенного из реакционной системы, показано цис-расположение атомов водорода по гидрированной связи.

Нам удалось осуществить количественное фотовосстановление протохлорофилла по «полуизолированной» двойной связи в IV пиррольном кольце; провести идентификацию фо-

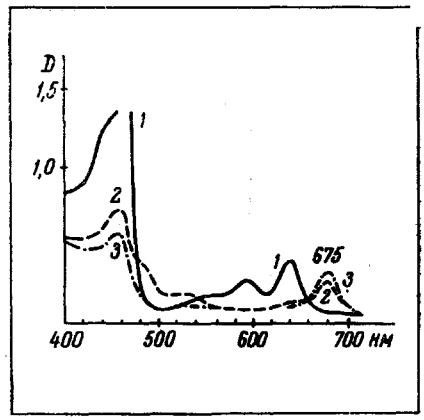


Рис. 6. Фотовосстановление протохлорофилла в пиридине, обработанном металлическим натрием, в присутствии аскорбиновой кислоты (10^{-2} М) при 20°, в вакууме. Спектры поглощения:

1—исходный; *2—3*—в ходе реакции, после освещения в течение 0,5—1 *мин*

тохимически полученного хлорофилла с помощью тонкослойной хроматографии на целлюлозе и измерения спектров флуоресценции; изучить механизм реакции гидрирования.

В наших опытах (методика их проведения описана в [52]) основным объектом исследования был протохлорофилл, выделяемый из семян тыквы [45]; в качестве растворителя использовали пиридин, обработанный металлическим натрием (в течение 30 *мин*, при 20°); фотовосстановление проводили при освещении раствора пигмента в вакууме в присутствии аскорбиновой кислоты (10^{-2} М).

В ходе реакции происходит быстрое (поэтому не всегда четко регистрируемое) последовательное образование максимумов поглощения около 480, 530 и 675 *нм*. Максимум 675 *нм* достигает наибóльшей величины после 0,5—2 *мин* освещения (при 20°), когда отмечается падение величин максимумов ~480 и ~530 *нм* (рис. 6). Пуск воздуха в раствор после кратковременного освещения приводит к ускорению образования максимума 675 *нм* по сравнению с реакцией в вакууме.

Максимум 675 *нм* принадлежит устойчивому хлорофиллоподобному продукту, его образование в указанных условиях достигает 20% и более от исходного протохлорофилла.

При разделении продуктов фотовосстановления на тонком слое целлюлозы фотохимически образованный хлорофилл обнаруживает величину *Rf*, близкую с величиной *Rf* обычного хлорофилла *а* в тех же условиях хроматографирования. Сопоставление спектров флуоресценции ацетоновых растворов обоих пигментов (рис. 7) показало, что у продукта фотовосстановления по сравнению с хлорофиллом *а* основной максимум флуоресценции сдвинут на 3—4 *нм* в длинноволновую сторону, будучи идентичным с феофитином *а*. Обнаруженные

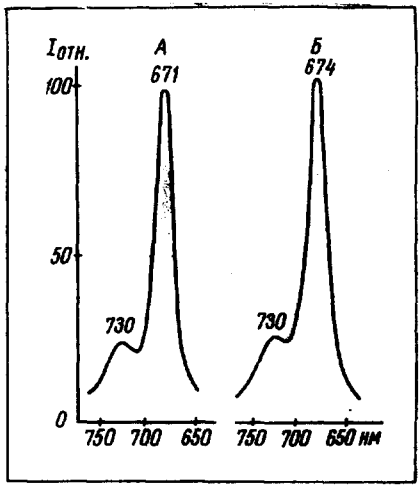


Рис. 7. Спектры флуоресценции растворов пигментов в ацетоне:

А—хлорофилл *а*; *Б*—фотохимически полученный хлорофиллоподобный продукт

спектральные отличия можно также объяснить иной конформацией образуемого пигмента, тогда как восстановление «полуизолированной» двойной связи в молекуле протохлорофилла не вызывает сомнения.

К подобной реакции способен также выделенный из этиолированных листьев протохлорофиллид, который образует устойчивый восстановленный продукт с максимумом поглощения при ~673 *нм*.

Восстановление «полуизолированных» двойных связей в молекулах протохлорофилловых пигментов в растворе протекает через ряд стадий; первым спектрально обнаруживаемым продуктом является «желтая» форма с максимумом поглощения около 480 *нм*. Эта форма в обратной реакции частично регенерирует в исходный пигмент (протохлорофилл и, вероятно, в протофеофитин), а частично подвергается дальнейшему восстановлению с образованием «красной» восстановленной формы хлорофилла (~530 *нм*), превращающейся в темновом акте реакции в хлорофилл с максимумом ~675 *нм*.

Мы предположили, что специфическое действие пиридина, обработанного металлическим натрием, в этой реакции связано с возможным присутствием в нем восстановленного Na-замещенного γ, γ'-дипиридила, который образуется наряду с другими изомерами при взаимодействии пиридина со щелочными металлами [58]. Действительно, при взаимодействии γ, γ'-дипиридила в эфирном растворе с металлическим натрием (в вакууме при 20° в течение 30 *мин*) образуется бесцветное кристаллическое вещество (по-видимому, восстановленный γ,γ'-дипиридил), которое при добавлении к обычному,

пиридину способствует образованию хлорофиллоподобного продукта в ходе фотовосстановления. Восстановленный γ,γ'-дипиридил имеет низкую величину окислительно-восстановительного потенциала по аналогии с виологенами, используемыми в изучении окислительно-восстановительных превращений пигментов. Это — неустойчивое соединение, быстро теряет активность в присутствии кислорода и воды за счет окисления. Не исключено, что в исследованной нами реакции восстановленный Na-замещенный дипиридил является донором электронов, тогда как аскорбиновая кислота при диссоциации поставляет протоны, и гидрирование «полуизолированной» двойной связи протекает путем последовательного присоединения электронов и протонов.

Хотя образование хлорофилла (хлорофиллида) в листьях имеет свою специфику благодаря связи предшественника хлорофилла с белком и участию белкового компонента в этом процессе, ряд особенностей объединяет фотовосстановление протохлорофилловых пигментов в организме с простой системой. Это прежде всего — ступенчатый характер фотовосстановления, состоящего из ряда элементарных стадий; возможное наличие в нем темновой стадии, следующей за собственно фотоактом и приводящей к гидрированию «полуизолированной» двойной связи молекулы.

На очереди детальное исследование особенностей структуры «протохлорофилл-голохрома», обеспечивающей высокую эффективность фотовосстановления протохлорофилла, связанного в молекуле белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Проблемы биосинтеза хлорофиллов (ред. А. А. Шлык). Минск, 1971.
2. Акулович Н. К., Раскин В. И. В сб.: Проблемы биосинтеза хлорофиллов. Минск, 1971, 5.
3. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. ДАН СССР, **85**, 1952, 177.
4. Smith J. H. C., Benitez A. Carn. Inst. Wash., Yearbook **52**, 1953, 151.
5. Smith J. H. C. In: Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems, ed. M. B. Allen. N. Y.—L., 1960, 257.
6. Smith J. H. C. In: Biological Structure and Function, v. 11, London—N. Y., 1961, 325.
7. Capon C., Bogorad L. Bot. Gaz., **123**, 1962, 285.
8. Boardman N. K. In: The Chlorophylls. N. Y.—L., 1966.
9. Schöpfer P., Siegelman H. W. Plant Physiol., **43**, 1968, 990.
10. Kahn A., Boardman N. K., Thorne S. W. J. Mol. Biol., **48**, 1970, 85.
11. Henningsen K. W., Kahn A. Plant Physiol., **47**, 1971, 685.
12. Kahn A. Plant Physiol., **43**, 1968, 1769.
13. Shibata K. J. Biochem. (Tokyo), **44**, 1957, 147.
14. Литвин Ф. Ф., Красновский А. А. ДАН СССР, **117**, 1957, 106.
15. Löeffler J. E. Carn. Inst. Wash., Yearbook **54**, 1955, 159.

16. Wolf J. B., Price Z. Arch. Biochem. Biophys., **72**, 1957, 293.
17. Годнев Т. Н., Шлык А. А., Ляхнович Я. П. Физиология растений, **4**, 1957, 393.
18. Virgin H. J. Physiol. Plantarum, **13**, 1960, 155.
19. Красновский А. А., Быстрова М. И. Биохимия, **25**, 1960, 168.
20. Быстрова М. И. Спектральные и фотохимические свойства разных форм протохлорофилловых пигментов. Автореф. канд. дисс. М., 1964.
21. Klein S., Polyakoff-Mayber A. J. Biophys. Biochem. Cytol., **11**, 1961, 433.
22. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А. Биохимия, **28**, 1963, 524.
23. Литвин Ф. Ф., Беляева О. Б. Биохимия, **33**, 1968, 928.
24. Sironval C., Kuyper Y. Photosynthetica, **6**, 1972, 254.
25. Красновский А. А., Быстрова М. И., Сорокина А. Д. ДАН СССР, **136**, 1961, 1227.
26. Смит Дж. В кн.: Структура и функции фотосинтетического аппарата. ИЛ, 1962, 300.
27. Dujardin E., Sironval C. Photosynthetica, **4**, 1970, 129.
28. Virgin H. J. Physiol. Plantarum, 8, 1955, 389.
29. Gassman M., Granick S., Mauzerall D. Biochem. Biophys. Res. Com., **32**, 1968, 295.
30. Sironval C., Brouers, Michel J. M., Kuyper Y. Photosynthetica, **2**, 1968, 268.
31. Bonner S. S. Plant Physiol., **44**, 1969, 739.
32. Литвин Ф. Ф., Беляева О. Б. Биохимия, **36**, 1971, 615.
33. Litvin F. F., Belyaeva O. B. Photosynthetica, **5**, 1971, 200.
34. Virgin H. J., Kahn A., Wettstein D. Photochem. Photobiol., **2**, 1963, 83.
35. Klein S., Bryan G., Bogorad L. J. Cell. Biol., **22**, 1964, 433.
36. Kahn A. Plant Physiol., **43**, 1968, 1781.
37. Henningsen K. W. J. Cell Sci., 7, 1970, 587.
38. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А. Молекулярная биология, **5**, 1971, 366.
39. Smith J. H. C., Benitez A. Plant Physiol., **29**, 1954, 135.
40. Красновский А. А., Быстрова М. И., Ланг Ф. ДАН СССР, **201**, 1971, 1485.
41. Быстрова М. И., Ланг Ф., Красновский А. А. Молекулярная биология, **6**, 1972, 77.
42. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К. ДАН СССР, **42**, 1953, 1201.
43. Seliskar C. J., Ke B. Biochim. Biophys. Acta, **153**, 1968, 685.
44. Brouers M. Photosynthetica, **6**, 1972, 415.
45. Houssier C., Sauer K. Biochim. Biophys. Acta, **172**, 1969, 476.
46. Butler W. L., Briggs W. . Biochim. Biophys. Acta, **112**, 1966, 45.
47. Fradkin L. I., Shlyk A. A., Kalinina L. M., Faludy-Daniel A. Photosynthetica, **3**, 1969, 326.
48. Фрадкин Л. И., Калинина Л. М., Шлык А. А. ДАН СССР, **194**, 1970, 201.
49. Bogorad L., Laber L., Gassman M. In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, K. Shibata, A. Takamija et al., eds., Tokyo (University of Tokyo Press and Univ. Park Press, State College), 1968, 299.
50. Годнев Т. Н., Акулович Н. К., Орловская К. И., Раскин В. И. ДАН СССР, **179**, 1968, 465.
51. Акулович Н. К., Годнев Т. Н., Орловская К. И. ДАН СССР, **191**, 1970, 1406.

Доклады Академии наук СССР
1974. Том 215, № 3

УДК 514.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОМ ПРЕВРАЩЕНИЙ ЦИТОХРОМА С: АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ХИНОНОВ

Ранее мы исследовали возможность реконструкции отдельных участков цепи фотосинтетического переноса электрона в водных растворах детергентов; так, мы описали модельную систему хлорофилл — цитохром с, в которой под действием красного света, поглощенного хлорофиллом, наблюдалось фотосенсибилизированное восстановление — окисление цитохрома; введение флавиновых коферментов активировало эту реакцию ([1]).

В данной работе обнаружено активирующее влияние ряда биохимических переносчиков электрона, многие из которых являются кофакторами циклического фотофосфорилирования; среди них наиболее интересна группа хинонов, которые, как оказалось, сами обладают фотосенсибилизирующим действием в синей области спектра, т. е. в области собственного поглощения ([2]).

Обычная схема опыта была следующей. В трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, вносили раствор 2,3 мг цитохрома с в 3,5 мл фосфатного буфера 0,03 *M* pH 7,4 (обычно мы использовали препараты цитохрома с фирмы «Biomed», Краков). В головку трубки вносили 1 мл 5% раствора тритона X-100, 0,5 мл водного или спиртового раствора «кофактора» и 0,3 мл спиртового раствора хлорофилла а ($2\cdot10^{-4}$ *M*). После откачивания воздуха раствор из головки сливали в трубку, выдерживали в темноте несколько минут, а затем освещали конденсированным светом лампы накаливания 300 вт через красный светофильтр КС-13 при 20° непосредственно в кюветном блоке спектрофотометра СФ-14. Наибольшая интенсивность красного света 10^5 эрг/(см^2·сек). После освещения в вакууме (10—15 мин.) в трубку пускали воздух, выдерживали в темноте и вновь освещали. Активность системы охарактеризована скоростью реакции за первые 3 мин. на линейном участке кривой, т. е. увеличением ($+\Delta D$) или уменьшением ($-\Delta D$) оптической плотности в максимуме поглощения восстановленного цитохрома при 550 ммк. Действие вводимых соединений оценивалось отношением K величины $\Delta D_{оп}$ (с кофактором) к $\Delta D_к$ в контрольном опыте, т. е. без кофактора. Если величина K близка к единице, то кофактор не оказывает действия.

Прежде всего было испытано влияние ряда гетероциклических соединений, способных к обратимому восстановлению. Так, феназин, акридин в концентрации 10^{-3} *M* незначительно активировали фотовосстановление и фотоокисление цитохрома (K=1,2—1,3), акрифлавин 10^{-3} *M* ингибировал фотовосстановление (K=0,5—0,6), индигокармин тоже ингибировал фотовосстановление (K=0,5) и явно активировал фотоокисление цитохрома (K=3,5). Наибольшей активностью обладал метилвиологен 10^{-4} *M*, который сильно активировал как фотовосстановление (K=5,4), так и фотоокисление цитохрома (K=4,2).

Более детально было изучено действие различных хинонов, в связи с их возможным участием в цепи фотосинтетического переноса электрона. Мы испытывали *n*-бензохинон, производные убихинона, нафтохиноны и антрахинон. Прежде всего выяснилось, что без хлорофилла хиноны активируют самовосстановление цитохрома в темноте и освещение в области собственного поглощения хинонов активирует эту реакцию; недавно это явление было описано нами ([2]).

В присутствии хлорофилла (pH 7,4) при освещении красным светом 10^{-3} *M* *n*-бензохинон не ускоряет фотовосстановления цитохрома (по сравнению с опытами без хинона), тогда как меньшие концентрации ускоряют реакцию. Наибольшая скорость реакции наблюдалась при концентрации хинона 10^{-5} и 10^{-6} *M* с величиной K более 3 (рис. 1). Чтобы выяснить возможность обратимости реакции, мы чередовали периоды освещения и темноты, после предварительного выдерживания реакционной смеси в темноте.

При сливании 10^{-3} *M* *n*-бензохинона к раствору цитохрома и дальнейшем выдерживании реакционной смеси в темноте в вакууме при pH 7,4 происходит некоторое восстановление цитохрома (ΔD до 0,05), красный свет активирует процесс, но при выключении света реакция идет обратно. При 10^{-4} *M* *n*-бензохиноне восстановление цитохрома в темноте происходит слабее (ΔD до 0,03), и освещение красным светом значительно ускоряет сенсибилизированное хлорофиллом восстановление цитохрома. Однако при выключении света реакция также идет обратно (рис. 2). Это явление обратимости следует объяснить темновым окислением фотовосстановленного цитохрома избытком хинона, находящимся в системе. Иные результаты были получены при введении 10^{-5} и 10^{-6} *M* *n*-бензохинона. В этом случае цитохром в темноте практически не восстанавливается (рис. 2). Освещение красным светом приводит к сенсибилизированному восстановлению цитохрома, но при выключении света реакция обратно не идет. Это объясняется малой скоростью окисления восстановленного цитохрома при малых концентрациях хинона. Описанные эффекты наблюдались и в присутствии кислорода воздуха.

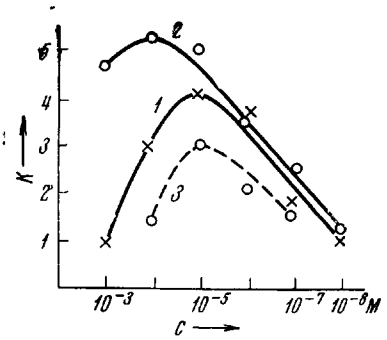


Рис. 1. Влияние *n*-бензохинона (*1*), менадиона (*2*) и витамина K (*3*) на восстановление цитохрома c, сенсибилизированное хлорофиллом

Было изучено влияние двух синтетических препаратов убихинона (любезно предоставленных нам Е. А. Обольниковой и проф. Г. И. Самохваловым) Q_0 (2,3-диметокси-5-метил-парабензохинона) и его аналога (2,3-диметоксипарабензохинона) в концентрации от 10^{-3} до 10^{-8} *M*. 10^{-3} *M* 2,3-диметоксипарабензохинон в вакууме в темноте приводил к восстановлению цитохрома за 5 мин. При 10^{-4} *M* хиноне цитохром восстанавливался в той же степени за 25 мин. Меньшие концентрации активировали фотовосстановление, сенсибилизированное хлорофиллом. Убихинон Q_0 не действует в темноте, но все испытанные нами концентрации вплоть до 10^{-8} *M* активировали фотовосстановление цитохрома, сенсибилизированное хлорофиллом на красном свете (рис. 3). Специфика действия этого соединения в темноте, возможно, связана с наличием метильной группы в его молекуле, влияющей на величину E_0'. После пуска воздуха в трубку Тунберга наблюдалось некоторое падение *D*. При дальнейшем освещении красным светом в опытах с 10^{-3} и 10^{-4} *M* убихиноном цитохром продолжал восстанавливаться, при этом величина *D* при 550 ммк не превышала пика фотовосстановленного цитохрома в вакууме. При 10^{-5} и 10^{-7} *M* убихиноне освещение 2—3 мин. на воздухе приводило к сенсибилизированному окислению фотовосстановленного цитохрома.

Из группы нафтохинонов мы испытывали влияние менадиона (витамина K_3) и синтетического препарата витамина K, любезно предоставленного нам проф. Р. М. Евстигнеевой. Опыты, проведенные в темноте, показали, что введение этих веществ в раствор приводило к исчезновению небольшого пика при 550 ммк, имевшегося в исходном препарате, т. е. эти вещества окисляли цитохром. Менадион чрезвычайно сильно активировал фотосенсибилизированное восстановление цитохрома в вакууме и окисле-

ние восстановленного цитохрома на воздухе (рис. 1). Максимальная скорость реакции наблюдалась при 10^{-4} *M*. Удивительно, что столь малые концентрации менадиона, как 10^{-8} *M*, оказывали активирующее действие на фотовосстановление цитохрома. Препарат витамина К активировал восстановление, сенсибилизированное хлорофиллом при концентрации до 10^{-5} *M* (рис. 1).

Действие антрахинона испытывалось от 10^{-4} до 10^{-7} *M*. Активирующее влияние этого соединения было гораздо ниже, чем у менадиона.

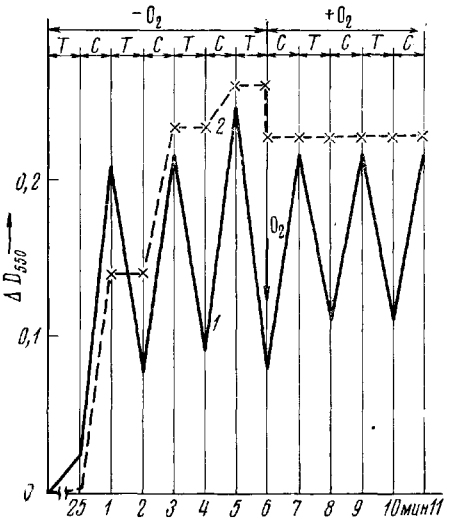


Рис. 2

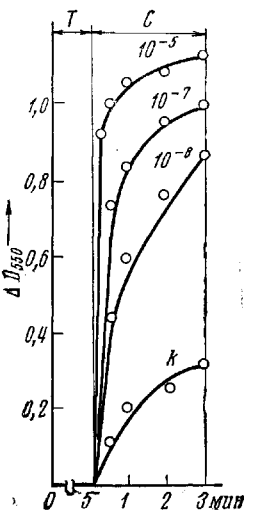


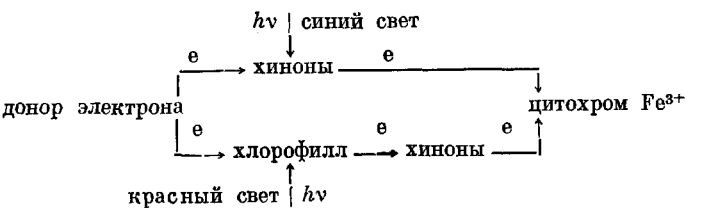
Рис. 3

Рис. 2. Окислительно-восстановительные превращения цитохрома с, сенсибилизированные хлорофиллом в присутствии *n*-бензохинона 10^{-4} *M* (*1*) и 10^{-6} *M* (*2*). Опыты в вакууме ($-O_2$) и на воздухе ($+O_2$), в темноте (*T*) и на красном свету (*C*)

Рис. 3. Влияние убихинона Q_0 на восстановление цитохрома с, сенсибилизированное хлорофиллом. *T* – темнота, *C* – красный свет, *к* – контроль, без убихинона

Ранее Вернон и Шоу ([3]) изучали фотовосстановление цитохрома с хлоропластами и хлорофиллом в детергентах в присутствии хинонов и гидрохинонов. Они показали, что в фотореакциях гидрохиноны служат донорами электрона для восстановления цитохрома, в то время как хиноны — акцепторами. В нашей работе показано, что хиноны активируют сенсибилизированное хлорофиллом восстановление цитохрома; по-видимому, эти соединения включаются в цепь переноса электрона между хлорофиллом и цитохромом в качестве промежуточного переносчика электрона, при этом исходным донором электрона являются электронодонорные группы в молекуле цитохрома.

Можно представить следующую последовательность переноса электрона в изученных системах:



Специфика действия отдельных хинонов может быть связана с величиной их окислительно-восстановительного потенциала и стерическими возможностями встраивания их в мицеллы детергента, солюбилизирующие цитохром и хлорофилл.

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

Поступило
13 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, К. К. Войновская,* Биофизика, т. 1, 120 (1956); *А. А. Красновский, Е. С. Михайлова,* ДАН, т. 185, 938 (1969); ДАН, т. 194, 953 (1970). [2] *А. А. Красновский, Е. С. Михайлова,* ДАН, т. 212, 237 (1973). [3] *L. P. Vernon, E. R. Show,* Biochemistry, v. 4, 132 (1965).

Доклады Академии наук СССР
1974. Том 219, № 3

УДК 577.3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. М. ПУШКИНА, Н. Н. ДРОЗДОВА

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b

Бактерии Rhodopseudomonas viridis могут использовать инфракрасное излучение с длиной волны более 1 мкм и с этим связан особый интерес к изучению пигментного аппарата этого вида бактерий. Клетки бактерий Rhodopseudomonas viridis, содержащие пигмент бактериохлорофилл b, отличаются тем, что в них присутствует длинноволновая форма этого пигмента с максимумом поглощения при 1020 нм; этой области соответствует максимум спектра действия фотосинтеза ([1]). Максимум поглощения бактериохлорофилла b в растворе лежит при λ=795 нм, и таким образом этот пигмент является наиболее длинноволновым среди бактериальных хлорофиллов.

На рис. 1 сопоставлены спектры поглощения и флуоресценции раствора бактериохлорофилла b в серном эфире и суспензии хроматофоров бактерий Rh. viridis, иллюстрирующие длинноволновый сдвиг в спектре хроматофоров. Особенностью этой бактериальной культуры является то, что реакционный центр содержит более коротковолновую форму пигмента с λ=985 нм (в водной суспензии хроматофоров) или с λ=960 нм (в сухих пленках хроматофоров) по сравнению с поглощением главной массы пигмента (λ=1020 нм), а также пигмент с полосой поглощения при λ=690 нм, являющийся окисленным бактериохлорофиллом b ([2, 3]).

В нашей лаборатории было обнаружено, что бактериохлорофилл a образует агрегированные длинноволновые формы в твердых пленках, поглощающие в ближней и.-к. области спектра (λ=800, 850—870, 890—910 нм), которые соответствуют поглощению пигмента in vivo ([4, 5]).

Целью данной работы было исследование способности бактериохлорофилла b к образованию длинноволновых агрегированных форм.

Для выделения бактериохлорофилла b, которое проводили по описанной ранее методике ([6]), использовали штамм Rh. viridis. Бактериофеофитин b получали обработкой эфирных растворов пигмента 5% раствором HCl с последующим промыванием водой и хроматографией на сахарозе. Из-за крайней фотолабильности пигментов все процедуры по их выделению проводили в темноте. Твердые пленки бактериохлорофилла b получали испарением в вакууме эфирных растворов пигмента в трубках Тунберга и на стеклянных пластинках. Образцы для измерения и.-к. спектров поглощения готовили на пластинках из NaCl. В работе использовали свежеперегнанный серный эфир, не содержащий перекисей; твердые пленки пигментов обрабатывали парами метанола, воды и формальдегида. Освещение растворов производили красным светом кинолампы (750 вт) через конденсор и светофильтр, пропускающий свет с длиной волны более 700 нм. Интенсивность света в большинстве опытов составляла 10^5 эрг/см^2·сек. И.-к. спектры измеряли на приборе UR-10, видимые спектры — на спектрофотометрах СФ-14 (модифицированном), SP 700 и Hitachi. Измерения спектров флуоресценции были любезно проведены А. А. Красновским мл. и Н. Н. Лебедевым на кафедре биофизики МГУ.

При испарении в вакууме растворов бактериохлорофилла b в серном эфире образуется твердая пленка пигмента, обладающая поглощением в

области 830—890 нм (рис. 2). В спектре поглощения присутствует также максимум при λ=690 нм, принадлежащий агрегированной форме хлорофиллоподобного продукта, присутствующего в незначительном количестве в исходном растворе. Существенно, что этот продукт окисления препятствует агрегации бактериохлорофилла b, так как образование наиболее длинноволновой полосы поглощения наблюдается только в образцах, приготовленных из свежих растворов пигмента.

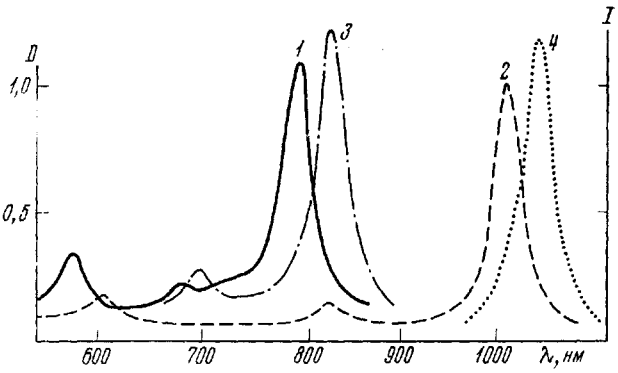


Рис. 1. Спектры поглощения (20°) раствора бактериохлорофилла b в серном эфире (*1*), суспензии хроматофоров Rh. viridis в фосфатном буфере pH 7,0 (*2*) и спектры флуоресценции (—196°), раствора бактериохлорофилла b в серном эфире (*3*), и суспензии хроматофоров в фосфатном буфере pH 7,0 (*4*)

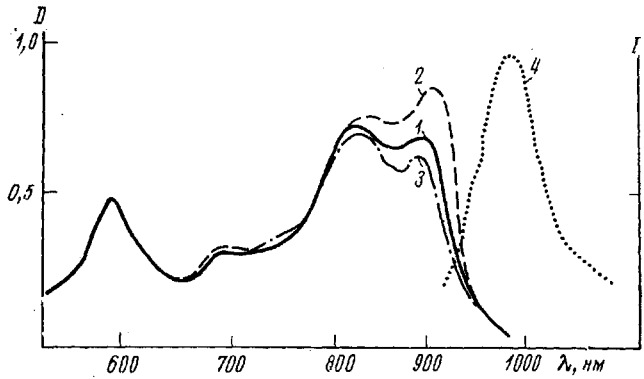


Рис. 2. Спектры поглощения (*1*, *2*, *3*) и флуоресценции (*4*) твердых пленок бактериохлорофилла b (—196°). *1* – исходная, *2* – после обработки парами водного раствора аммиака (25%), *3* – после обработки парами метанола, *4* – флуоресценция пленки 2

Известно влияние низкомолекулярных соединений на тип молекулярной организации агрегированных пигментных структур ([7], [8]). Пары воды, метанола и ацетальдегида (в присутствии серного эфира) вызывают длинноволновый сдвиг агрегированных форм бактериохлорофилла a от 860 нм до 910—920 нм. В наших опытах обработку твердых пленок бактериохлорофилла b парами различных веществ проводили без доступа воздуха в темноте. В отличие от бактериохлорофилла a, пары воды и водного раствора формальдегида (40%) не способствуют длинноволновой агрегации бактериохлорофилла b, и вызывают некоторое падение максимума поглощения λ=890 нм; обработка пленок парами метанола приводит к снижению интенсивности длинноволновой полосы поглощения.

Эффект длинноволнового смещения поглощения агрегированных структур бактериохлорофилла b удалось наблюдать только под действием паров водного раствора аммиака (25%) на твердые пленки пигмента, которые при этом обнаруживали появление в спектре поглощения формы с λ=910 нм (рис. 2). Понижение температуры до —196° приводит к значительному возрастанию интенсивности этого длинноволнового максимума, в меньшей степени сказываясь на интенсивности коротковолновых полос поглощения. Можно предполагать, что в полученных твердых пленках бактериохлорофилла b присутствуют и более длинноволновые формы пигмента, которые не удалось наблюдать при данной технике измерения. Действительно, измерения низкотемпературных спектров люминесценции показали, что твердые пленки с главным максимумом поглощения λ=910 нм обнаруживают длинноволновый максимум флуоресценции при

λ=970–975 нм, что связано, очевидно, с миграцией энергии возбуждения с более коротковолновых на длинноволновую форму пигмента, максимум поглощения которой не удается измерить в явной форме.

Чрезвычайная лабильность и склонность к фотоокислению мономерных форм бактериохлорофилла b описана нами ранее [6]. Агрегированные формы пигмента также обнаруживают способность необратимо окисляться на воздухе. При хранении твердых пленок без

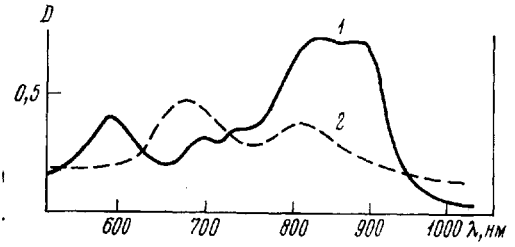


Рис. 3

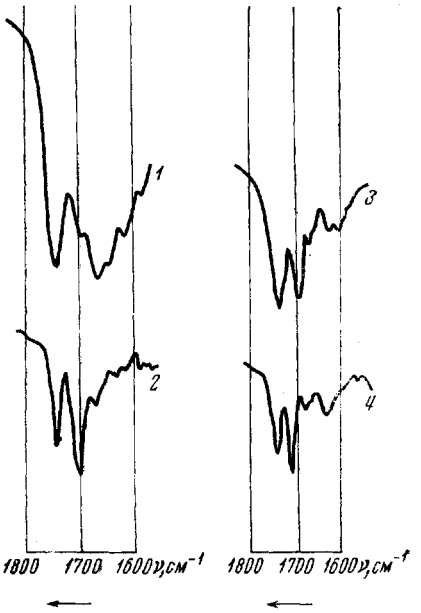


Рис. 4

Рис. 3. Фотохимическое окисление твердой пленки бактериохлорофилла b кислородом воздуха при 20°. *1* – исходная пленка, *2* – после освещения (45 мин.)

Рис. 4. Инфракрасные спектры поглощения: твердой пленки бактериохлорофилла b (*1*), раствора бактериохлорофилла b в серном эфире, 10^{-2} *M* (*2*), твердой пленки бактериофеофитина b (*3*), растворе бактериофеофитина b в серном эфире, ~10^{-2} *M* (*4*)

доступа кислорода в темноте длинноволновые формы с λ=830–890 нм сохраняются в спектре поглощения без изменения. Освещение твердых пленок в вакууме также не вызывало спектральных изменений. Фотоокисление агрегированных форм бактериохлорофилла b наблюдали лишь при длительном освещении образцов (до 45 мин.) на воздухе при 20° (рис. 3). При этом первые минуты освещения вызывали исчезновение длинноволновой формы с λ=890 нм, а последующее действие света приводило к падению поглощения в области λ=830 нм. Одновременно с уменьшением длинноволнового поглощения увеличивалась интенсивность полосы поглощения агрегированной формы хлорофиллоподобного продукта (λ=690 нм). Фотоокисление бактериохлорофилла b в органических растворителях на воздухе происходило за 25–30 сек. освещения с образованием этого же продукта необратимого окисления наряду с продуктами обратимого окисления. Таким образом, агрегированные формы бактериохлорофилла b в твердых пленках, как и других бактериальных хлорофиллов проявляют значительную устойчивость к фотоокислению на воздухе, в то время как скорость фотоокисления мономерных форм исследуемого пигмента значительно превышает скорость фотоокисления бактериохлорофилла a [6].

Бактериохлорофилл b в хроматофорах чрезвычайно устойчив к действию света. Так, освещение суспензии хроматофоров Rh. viridis в фосфатном буфере, pH 7,0, интенсивным «белым» конденсированным светом лампы накаливания (до 60 мин.) приводило лишь к незначительным спектральным изменениям. В то же время, обратимые окислительно-восстановительные светоиндуцированные изменения бактериохлорофилла b в составе хроматофоров описаны в литературе [3] и обусловлены превращениями пигмента реакционного центра.

При сравнении скоростей необратимого фотоокисления кислородом

воздуха бактериохлорофилла b в различных состояниях — в растворах, в пленках и в хроматофорах — получаются следующие величины. Изменение оптической плотности в 1 мин.: 2,25 для бактериохлорофилла b в спирте (λ=795 нм), $1{,}2\cdot10^{-2}$ для пленки бактериохлорофилла b (λ=910 нм), $5\cdot10^{-4}$ для хроматофоров в фосфатном буфере (λ=1020 нм).

С целью выяснения молекулярной организации агрегированных форм мы исследовали структуру и.-к. спектров поглощения твердых пленок бактериохлорофилла b и его безмагниевого производного в области ν=1800—1600 $см^{-1}$ в сравнении с и.-к. спектрами твердых пленок бактериохлорофилла a и его феофитина, которые изучались в нашей лаборатории ([5]). Твердая пленка бактериохлорофилла b с максимумами поглощения в области λ=830—890 нм обнаруживает четыре полосы в области колебаний двойных связей: $\nu\sim1745$; 1665, плечо при ν=1650 и ~1615 $см^{-1}$ (рис. 4), что близко к положению максимумов в твердой пленке бактериохлорофилла a ([5]). На основании интерпретации данных по и.-к. спектрам хлорофилла a ([9]) можно предположить, что максимум ν=1745 $см^{-1}$ проявляется за счет вибраций сложноэфирных группировок в составе пропионовокислого остатка и карбометоксильной группы у 7 и 10 атомов углерода, а доминирующий в спектре пленок бактериохлорофилла b максимум ν=1665 $см^{-1}$ характерен для агрегированных форм, являясь результатом координационного взаимодействия карбонильного кислорода кетогруппы у 9 атома углерода циклопентанонового кольца с центральным атомом Mg ([10]). Максимум ν=1665 $см^{-1}$ может принадлежать кетогруппам, связанным с Mg через посредство молекул воды, так как связанная вода всегда присутствует в препаратах пигментов. Полоса при ν=1615 $см^{-1}$ принадлежит колебаниям связей C=C и C=N молекулярного скелета. В и.-к. спектре раствора бактериохлорофилла b доминирует максимум ν=1700 $см^{-1}$, характерный для вибрации свободных кетогрупп у 9 атома углерода. Этот максимум в пленке пигмента практически незаметен, свидетельствуя о том, что в твердых пленках кетогруппы, принадлежащие 9 атому углерода, оказываются связанными. В то же время, «агрегационный» максимум ν=1665 $см^{-1}$ незначителен в растворах бактериохлорофилла b. Бактериофеофитин b образует пленку с длинноволновым максимумом поглощения около 830—840 нм. И.-к. спектры твердой пленки бактериофеофитина b обнаруживают основной максимум свободной кетогруппы циклопентанонового кольца ($\nu\sim1700$ $см^{-1}$), а общий вид спектра близок по структуре к спектру бактериофеофитина b в полярных растворителях (рис. 4). Совокупность данных по и.-к. спектроскопии бактериохлорофилла b позволяет предположить участие в межмолекулярном взаимодействии кетогрупп, связанных с центральным атомом магния за счет координационных связей.

Итак, бактериохлорофилл b в твердых пленках достигает максимума поглощения при λ=910 нм и максимума флуоресценции при λ=975 нм. Этот тип молекулярной упаковки отличается от состояния главной массы пигмента в клетках бактерий и более близок к спектральным свойствам активного центра.

Приносим глубокую благодарность Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской за предоставление исходной культуры Rhodopseudomonas viridis.

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

Поступило
19 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *P. Giesbrecht, G. Drews*, Arch. Mikrobiol., v. 54, 297 (1966). [2] *A. Holt, R. K. Clayton*, Photochem. Photobiol., v. 4, 829 (1965). [3] *J. Thornber, J. Olson*, Photochem. Photobiol., v. 14, 329 (1971). [4] *А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая*, ДАН, т. 85, 389 (1952). [5] *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева*, ДАН, т. 204, 1473 (1972). [6] *Е. М. Бокучава, И. Н. Дроздова, А. А. Красновский*, Биохимия, т. 39, 188 (1974). [7] *М. И. Быстрова, А. А. Красновский*, Молекулярная биология, т. 1, 362 (1967). [8] *А. А. Красновский, М. И. Быстрова*, ДАН, т. 174, 480 (1967). [9] *J. J. Katz, G. L. Closs et al.*, J. Am. Chem. Soc., v. 85, 3801 (1963). [10] *K. Ballschmiter, J. J. Katz*, J. Am. Chem. Soc., v. 91, 2661 (1969).

А. И. Опарин, А. А. Красновский, А. В. Умрихина

ПУТИ АБИОГЕННОГО ОБРАЗОВАНИЯ ПОРФИРИНОВ

Ордена Ленина Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Идея об образовании в начале процесса биосинтеза гема и хлорофилла пиррольных ядер, конденсирующихся затем в α-положениях с одноуглеродными молекулами типа муравьиной кислоты или формальдегида, впервые была высказана Т. Н. Годневым в 1926—1928 гг. [1]. Эта гипотеза, несмотря на отсутствие прямых экспериментальных данных, способствовала пониманию механизма образования порфиринов и в 40—50-х годах была подтверждена работами лаборатории Шемина и Граника в США и Ньюбергера и Римингтона в Англии. Было показано, что формирование молекул гема и хлорофилла включает конденсацию общего для всех биологически важных порфиринов пиррольного предшественника — порфобилиногена. С тех пор выяснены многие этапы биосинтеза порфиринов, природа промежуточных продуктов и ферментов, управляющих отдельными стадиями процесса.

Однако до сих пор не ясны пути возникновения порфиринов и включения их в процессы фотосинтеза и биологического окисления. Вопрос о возникновении порфиринов тесно связан с общей проблемой происхождения жизни на Земле. В 1924 г. одним из авторов было высказано предположение, что возникновению жизни на Земле предшествовала эпоха химической эволюции, когда из простых неорганических соединений первичной атмосферы и гидросферы шло абиогенное образование и дальнейшее усложнение органических веществ [1, 2].

Гипотеза о возникновении жизни получила веские экспериментальные подтверждения на основании данных экзобиологии, геологии, геохимии, путем осуществления химических и абиогенных синтезов биологически важных молекул и детального изучения структуры и функции систем ныне живущих организмов.

Экзобиология порфиринов [4]

Космические исследования последних лет показали широкое распространение разнообразных соединений во Вселенной. Так, в межзвездном пространстве обнаружены окись углерода [5], цианистый водород [6], аммиак [7]; среди органических молекул известны формальдегид [8, 9], цианоацетилен [10]. Порфирины в межзвездном пространстве могли бы возникать в результате реакций, включающих пиррол и формальдегид. Есть предположения, что диффузные полосы поглощения в звездных спектрах могут быть обусловлены присутствием порфиринов [11, 12]. Хорошо известна полоса при 443 *нм* [13] и несколько широких полос в красной области спектра [14].

Наиболее доступными для исследования космическими объектами являются метеориты. В углистых хондритах найдены разнообразные органические вещества, в том числе порфирины. Порфирины представлены в метеоритах в форме комплексов с металлами, они охарактеризованы как по поглощению, так и по флуоресценции. Обнаружены полосы поглощения в области от 390 до 420 *нм* (полоса Соре) и более слабые полосы при 490—620 *нм*; основная полоса флуоресценции — при 680 *нм* [15, 16]. Происхождение порфиринов в метеоритах до конца не выяснено. Не исключена возможность того, что они образуются за счет абиогенных химических синтезов при прохождении метеоритов через атмосферу Земли. В отношении тех соединений, которые присутствуют в метеоритах в следовых количествах, имеется опасность загрязнения ими при аналитической процедуре или они могут быть вторичного, земного происхождения.

Достоверных данных о присутствии порфиринов на планетах нет. Имеются предположения, что красные пятна на поверхности Юпитера могут быть обусловлены органическими азотистыми основаниями, возможно, и порфиринами [17]. В лунных почвах обнаружены флуоресцирующие порфириноподобные соединения с максимумом флуоресценции при 625 *нм* при возбуждении в области 390 *нм* [18]. Общая концентрация порфиринов была более низкой, чем в метеоритах. Хотя факт обнаружения порфиринов в образцах лунных почв чрезвычайно интересен, однако нет полной ясности в вопросе о природе их появления в этих образцах. Порфириноподобные соединения на лунной поверхности могут появиться в результате загрязнения лунных почв межпланетной пылью или образоваться из выхлопных газов ракеты [19], что наиболее вероятно.

Следует отметить, что более достоверное обнаружение порфиринов в космическом пространстве имело бы важное

значение для экзобиологии, так как порфирины могут служить тестом на распространение органической материи во Вселенной из-за возможности их прямого определения спектральными методами.

Порфирины в земной коре

Порфирины широко распространены в земных ископаемых породах. Они обнаружены не только в осадочных, но и изверженных породах, минералах эндогенного происхождения, в нефти, асфальтах и глубинных водах [20—23]. В нефти и сланцах порфирины находятся в форме комплексов с ванадием и никелем [24]. Порфирины нефти, вероятнее всего, биогенного происхождения, о чем говорит природа боковых заместителей в пиррольных кольцах [25]. Наиболее древние из обнаруженных порфиринов — это порфирины, найденные в свазилендских осадочных породах, возраст которых более трех миллиардов лет [26]. По данным авторов, эти порфирины не были привнесены извне, но происхождение их остается неясным. Они могут быть как абиогенного, так и биогенного происхождения.

Абиогенные синтезы порфиринов

Существенные данные, подтверждающие происхождение и пути эволюции органических соединений, в том числе и порфиринов, получены в последние годы на основании экспериментов по моделированию химических процессов, возможно, имеющих место на нашей планете в добиологическую эпоху. Начиная с работы Миллера [27], который обнаружил образование аминокислот и других органических соединений при действии электрических разрядов на смесь паров воды, водорода, метана, аммиака, ведутся интенсивные исследования возможности абиогенных синтезов разнообразных биологически важных соединений.

Авторы опирались на гипотетические положения, что первичная атмосфера Земли была восстановительной и состояла главным образом из простых газов, таких, как водород, углекислый газ, окись углерода, аммиак, азот, метан, паров воды и некоторых других соединений. Во многих исследованиях или именно эти вещества для синтезов биологически важных молекул были исходными, или простые органические соединения, которые могли легко образоваться из этих газов, например цианистый водород, ацетилен, формальдегид и др.

В настоящее время абиогенным путем синтезированы многие биологически важные молекулы: аминокислоты, пептиды, простейшие белки, пурины и пиримидины, нуклеозиды и нуклеотиды, полинуклеотиды, углеводы и жирные кислоты, АТФ и другие соединения [см., например, обзоры 28—30]. Полученные данные подтвердили возможность образования сложных органических молекул в добиогенный период развития Земли.

Наряду с другими органическими молекулами в этот период могли возникать абиогенным путем и порфирины. Вероятнее всего, синтез порфиринов шел из пиррольных предшественников — пиррола и его производных, другим возможным компонентом мог быть формальдегид или иные альдегиды.

Пиррол и формальдегид. Пирролы и пирролидины легко образуются из аммиака и ацетилена или других непредельных углеводородов как чисто каталитическим путем, так и фотохимически, под влиянием ультрафиолетовой радиации. Чичибабин показал, что пиррол синтезируется из аммиака и ацетилена в присутствии окислов алюминия, железа, хрома [31]. Ходжсон и Поннамперума [32] наблюдали образование пиррольных соединений при действии электрических разрядов на смесь аммиака и метана в присутствии паров воды. Авторы считают, что образование пиррола происходило путем конденсации формальдегида до сахаров, которые затем давали слизевую кислоту. Конденсация последней с аммиаком приводила к возникновению пиррольного цикла (предполагается, что формальдегид мог легко образоваться в этой системе [27, 33]). Синтез пиррола при сухой перегонке аммониевой соли слизевой кислоты рассматривал и Чичибабин [34]. Наконец, пиррол может быть получен из ацетилена и цианистого водорода [35].

Образование формальдегида в абиогенных условиях показано многократно. Теренин [36] указал на возможность синтеза формальдегида из смеси паров воды и углекислого газа при действии короткого ультрафиолета (шумановская радиация), а также из смеси окиси углерода и водорода или окиси углерода и метана. Образование формальдегида наблюдалось в атмосфере метана, аммиака и водорода [27, 33].

Химические синтезы порфиринов. Попытки синтезировать порфирины химическим путем предпринимались неоднократно. В 1926 г. Фишер синтезировал порфирин при бромировании криптопиррола [37], а в 1936 г. порфирин был получен из пиррол-α-альдегида в кипящей муравьиной кислоте [38]. В серии работ Ротемунда осуществлены синтезы порфина из пиррола и формальдегида в смеси пиридина и метилового спирта в запаянных ампулах при нагревании до 100° [39], тетрафенилпорфина из пиррола и бензальдегида [40] и его

металлокомплексов [41]. В этих работах отмечено образование нескольких продуктов, различающихся по спектрам поглощения и солянокислому числу. Ротемунд и соавт. [39—41] рассматривали эти продукты как изомерные формы, отличающиеся соседним и противоположным расположением NH-групп в центре молекулы порфирина. Аронов и Кальвин [42] провели аналогичный синтез тетрафенилпорфина из пиррола и бензальдегида, а также его цинкового комплекса. Общий выход порфирина увеличивался в присутствии ацетата цинка. Как и в работах Ротемунда, было отмечено образование нескольких продуктов, причем два из них преобладали. Однако было показано, что эти продукты представляют собой не изомерные формы, а различаются по степени восстановленности. Согласно аналитическим данным, основными продуктами в реакции между пирролом и альдегидами были порфин и хлорин [42, 43]. Образование хлорина подтверждено в работе других авторов [44, 45], которые синтезировали хлорин из 2-диметиламинометилпиррола. Крол [46] осуществил синтез порфиринов из 2-гидроксиметилпиррола. Состав продуктов, полученных в этом синтезе, был тщательно исследован [47]. В результате показано, что порфин, синтезированный по методу Ротемунда, является смесью нескольких порфиринов, причем основные из них — порфин и хлорин.

Приведенные работы по химическим синтезам порфиринов имеют наиболее прямое отношение к работам по абиогенным синтезам этих соединений. Однако следует отметить, что к настоящему времени химическим путем синтезированы почти все известные порфирины, в том числе в 1960 г. синтезирован хлорофилл [48].

Абиогенные синтезы порфиринов по сути дела те же химические синтезы с той лишь разницей, что они проводились в условиях, имитирующих те, которые могли существовать на Земле в эпоху химической эволюции. Исходными для этих синтезов, как правило, служили простые органические соединения, которые могли образоваться из газов первичной атмосферы. Для абиогенных синтезов порфиринов обычно использовали пиррол и альдегиды. Источником энергии служили электрические разряды, ультрафиолетовое и γ-облучение, а катализаторами — соединения, встречающиеся в земной коре. Известно, что пиррол практически нерастворим в воде. В связи с этим реакцию с ним приходится проводить в органических растворителях. Однако некоторые авторы синтезировали порфирины в присутствии значительных количеств воды [50] или в суспензии пиррола в воде [49].

Работа Шутки с соавт. [49] по абиогенному синтезу порфиринов дублировала синтез тетрафенилпорфина по методу Аронова и др. [42], но реакция шла не при нагревании, а при

действии γ-лучей. Ацетат цинка ускорял реакцию. В нашей работе [50] исходным был видоизмененный нами синтез порфина по Ротемунду [39]. Реакцию проводили в сильно разбавленных растворах пиррола в метиловом или этиловом спирте в присутствии формальдегида. Нами было показано ускоряющее действие на синтез порфиринов кислорода, воды и неорганических катализаторов: окислов металлов (цинка, кальция, магния, титана и др.), окиси кремния и кремневой кислоты и других соединений. Реакция легко осуществлялась при нагревании, а в некоторых вариантах опытов и без нагревания, при комнатной или более низкой температуре (3 °С) [51, 52]. Ходжсон и Бейкер [53] синтезировали порфин из пиррола и параформальдегида в пиридине или в водных суспензиях пиррола в присутствии катионов металлов — никеля, меди, ванадия, магния, железа, серебра, ртути. Без катионов вообще не наблюдалось образования порфиринов при нагревании растворов, тогда как в присутствии указанных катионов образовывались, по мнению авторов, значительные количества порфиринов, хотя эти «значительные» количества составляли от 0,003 до 0,0003%. По-видимому, такие низкие выходы порфиринов в опытах Ходжсона и Бейкера объяснялись тем, что авторы использовали параформальдегид, который, по нашим данным, не активен в реакции с пирролом. Значение этой работы заключается в том, что в ней показано ускоряющее действие катионов металлов на синтез порфиринов. Это подтверждает и наши данные [50—51]. Ходжсон и Бейкер [53] отметили также ускоряющее действие на синтез порфиринов образцов горных пород: глин, песчаников, карбонатов. В присутствии воды выход порфиринов не только не увеличивался, но даже уменьшался, что тоже, по-видимому, объясняется использованием параформальдегида вместо формальдегида.

Таким образом, в вышеприведенных работах по абиогенным синтезам порфиринов из пиррола и альдегидов показана принципиальная возможность подобных синтезов в условиях первичной гидросферы. Следует отметить, что хотя синтез порфириноподобных продуктов и наблюдается при действии ультрафиолетовой радиации и γ-облучении, но он не имеет никаких преимуществ по сравнению с температурной активацией. Более эффективным оказалось действие катализаторов — компонентов земной коры и кислорода.

В других работах по абиогенным синтезам порфиринов в качестве исходных продуктов использовали не пиррол и альдегиды, а другие соединения. Наибольший интерес представляет работа Ходжсона и Поннамперумы [32], которые обнаружили образование порфириноподобных продуктов при действии электрического разряда на смесь метана, аммиака и

паров воды. Окрашенные продукты реакции были выделены, очищены хроматографией, и с помощью метода гельфильтрации определены их молекулярные размеры. Полученные соединения обладали интенсивным поглощением в области 380—420 *нм* (полоса Соре), несколькими полосами поглощения при 500—650 *нм*, характерной красной флуоресценцией, были растворимы в соляной кислоте, образовывали комплексы с металлами. Все эти факты не оставляли сомнения в том, что полученными в атмосфере метана, аммиака и паров воды продуктами были порфирины. По мнению авторов, образование порфириновых соединений происходило из пиррола и формальдегида, которые также возникали в этой системе (см. выше). Действительно, при добавлении к системе пиррола выход порфириновых соединений увеличивался. По-видимому, вода не принимает непосредственного участия в синтезе порфиринов. Более того, согласно Ротемунду [39], конденсация пиррола и формальдегида сопровождается выделением одной молекулы воды и двух атомов водорода [1] на каждые две прореагировавшие молекулы пиррола и формальдегида. Продукты, имеющие поглощение в области полосы Соре, образовывались и в безводной среде, однако они были крайне неустойчивы.

Известно, что превращение двух молекул δ-аминолевулиновой кислоты в порфобилиноген в процессе биосинтеза порфиринов осуществляется при участии фермента дегидразы δ-аминолевулиновой кислоты. Шутка [54] предпринял попытку осуществить неферментативное превращение δ-аминолевулиновой кислоты в порфобилиноген. Как было показано, действие ультрафиолетового освещения на растворы δ-аминолевулиновой кислоты при температуре 40—50° приводило к образованию пиррольных соединений, присутствие которых определяли по реакции с *п*-диметиламинометилбензальдегидом.

Имеется много работ по неферментативному превращению порфобилиногена в уропорфириноген. Исследования Весталла [55], Куксона и Римингтона [56], Мозерола [57], Буллока и соавт. [59] показали, что неферментативная конденсация порфобилиногена происходила с образованием смеси уропорфириногенов серий I—IV, причем изомер серии III преобладал. Следует отметить, что именно этот изомер встречается в порфиринах биологического происхождения (продукты превращения уропорфириногена серии III входят в состав гемов и хлорофиллов). Изомеры серий II и IV в природных порфиринах не встречаются.

[1] В связи с этим понятно ускоряющее действие на синтез порфиринов кислорода, который мог взаимодействовать с выделяющимся в реакции водородом [50].

Состав продуктов. При взаимодействии пиррола и альдегидов обычно образуется несколько порфириноподобных продуктов. Достоверно определены порфин (или тетрафенилпорфин) и соответствующие хлорины — дигидропорфирины. Возможно образование наиболее восстановленного соединения — бактериохлорина, или тетрагидропорфирина. Образование бактериохлорина показано при темновом восстановлении тетрафенилпорфина гидразином в пиридине [60]. В другой работе [61] бактериохлорин синтезировали из 2-диметиламинометилпиррола по методу [43].

Образование нескольких порфиринов в системе пиррол — формальдегид отмечено и в нашей работе [51, 52]. Мы исследовали состав продуктов в зависимости от условий проведения реакции, используя для обнаружения порфиринов метод флуоресценции. Спектры флуоресценции записывали на всех этапах работы: в ходе синтеза, при выделении и очистке пигментов. В спектре флуоресценции обычно присутствовали максимумы при 690; 640 и 620 *нм*. Как известно, максимумы 690 и 620 *нм* принадлежат порфину, максимум 640 *нм* — хлорину [46, 51]. В большинстве опытов основным продуктом реакции был порфин. Образованию порфина способствовали окислительные условия среды — кислород, в присутствии которого, кроме того, увеличивались скорость реакции и общий выход продукта, и другие окислители, например хинон. Образованию хлорина благоприятствовали, напротив, восстановительные условия: отсутствие кислорода, добавки восстановителей (аскорбиновая кислота, гидрохинон). Особенно сильное действие на образование хлорина оказывала вода, в присутствии 40—50% которой основным продуктом реакции был хлорин. Катализаторы — компоненты земной коры мало влияли на состав продуктов. В их присутствии образовывались порфин и хлорин в разных соотношениях.

Нам удалось обнаружить образование и третьего возможного компонента — бактериохлорина. В спектрах люминесценции реакционных смесей иногда можно наблюдать «плечо» в области 740—770 *нм*. Концентрированные растворы порфиринов, выделенные из таких смесей, имели еще один максимум флуоресценции при 760 *нм*. Продукт с этим максимумом частично очищен с помощью растворов соляной кислоты и хроматографии на окиси алюминия. При стоянии на воздухе продукт легко окислялся до порфина и хлорина. Это позволило нам предположить, что соединение с максимумом флуоресценции при 760 *нм*, возможно, является бактериохлорином. Однако по сравнению с хлорином и особенно порфином бактериохлорин не всегда удается обнаружить среди продуктов реакции, и условия его образования пока не

выяснены. Это объясняется, по-видимому, не трудностью его образования, а легкостью его разрушения как в ходе синтеза, так и при выделении, особенно в окислительных условиях.

В эпоху химической эволюции, когда атмосфера носила восстановительный характер, возникновение восстановленных форм порфиринов было более вероятным. Образование восстановленных форм порфиринов могло происходить либо в процессе их синтеза из пиррольных предшественников, либо вторично в результате темнового или фотохимического восстановления различными донорами электронов. Это предположение подтверждается рассмотрением путей биосинтеза гема и хлорофилла, если исходить из того, что некоторые стадии биосинтеза в какой-то степени отражают отдельные этапы эволюции молекулы порфиринов. Так, первичный порфирин — уропорфириноген — восстановленное соединение. Он содержит десять избыточных атомов водорода по сравнению с их количеством в протопорфирине IX. Образование уропорфириногена может служить примером первичного возникновения восстановленного порфирина при синтезе из пиррольных предшественников. Ныне живущие фотосинтезирующие организмы используют в процессе фотосинтеза тетра- и дигидропорфирины, каковыми являются бактериохлорофилл и хлорофилл. Образование этих порфиринов происходит вторично в результате фотохимического (а иногда и темнового) присоединения водородов к более окисленному предшественнику. Исходя из этих предположений, можно прийти к выводу, что в процессе поисков абиогенно образованных порфиринов на других планетах или в глубинах земной коры следует учитывать возможность образования продуктов разной степени восстановленности: порфиринов, хлоринов и бактериохлоринов.

Таким образом, простейшие порфирины, по-видимому, легко образовывались в условиях первичной Земли из таких простых исходных продуктов, как метан, аммиак, формальдегид, но непосредственными предшественниками порфиринов были, вероятнее всего, пиррольные соединения. Это подтверждается данными и по биосинтезу порфиринов.

Одним из направлений химической эволюции порфиринов может быть усиление их каталитической функции. Порфирины в клетках современных организмов функционируют в виде комплексов с металлами: железом, магнием, медью, кобальтом. Как известно, введение металла в молекулу порфирина значительно (иногда на несколько порядков) повышает их каталитическую активность и, кроме того, специфичность катализируемой реакции. При этом следует допустить, что порфирины могли использоваться как катализаторы — переносчики электрона и в химических, добиологических процессах [62—64].

По-видимому, функция порфиринов как фотосенсибилизаторов сформировалась значительно позднее, уже в эпоху биологической эволюции, когда стал осуществляться переход от гетеротрофного обмена к автотрофному [3]. Этот переход можно проследить при изучении путей биосинтеза гема и хлорофилла. До стадии образования протопорфирина IX пути синтеза гема и хлорофилла являются общими. Включение атома железа в молекулу протопорфирина IX в конечном итоге ведет к формированию гема, который является основой гемоглобина и цитохромов. Образование хлорофилла не заканчивается включением атома магния, и в биосинтезе хлорофилла есть еще ряд стадий, причем последняя заканчивается реакцией фотохимического гидрирования протохлорофиллового предшественника. Все это может указывать на более позднее происхождение фотосинтетической функции порфиринов в соответствии с представлениями о том, что фотосинтез возник на основе развитого гетеротрофного обмена первичных организмов [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Годнев Т. Н. Изв. Иваново-Вознесенск. политех. ин-та, **2**, 123, 1928.
2. Опарин А. И. Происхождение жизни. М., 1924.
3. Опарин А. И. Возникновение жизни на Земле. М., 1957.
4. Hodgson G. W. In: Theory and experiment in exobiology, vol. 1, A. W. Schwarts (ed.). Groningen, 1971, 83—105.
5. Jefferts K. B., Penzias A. A., Wilson R. W. Chem. Eng. News, April 20, 1970, 14—15.
6. Buhl D., Snyder L. E. Chem. Eng. News, June 22, 1970, 57.
7. Cheung A. C., Rank D. M., Townes C. H., Thornton D. D., Welch W. J. Phys. Rev. Lett., **21**, 1968, 1701—1705.
8. Palmer P., Zuckerman B., Buhl D., Snyder L. E. Astrophys. J., **156**, L 147—L 150, 1969.
9. Snyder L. E. Phys. Rev. Lett., **22**, 1969, 679.
10. Turner B. E. et al. Chem. Eng. News, Aug. 17, 1970, 31.
11. Johnson F. M. In: Interstellar Grains. J. M. Greenberg, T. P. Roark (ed.). NASA SP-140, Calif., 1967, 269.
12. Johnson F. M., Hodgson G. W. In: 129th Meeting Amer. Astron. Soc., March 30—April 2. Honolulu, Hawaii, 1969.
13. Herbig G. H. In: The diffuse interstellar bands. III: The situation in 1966. I. A. M. Symp., № 31, 1967, 85—89.
14. Walker G. A. H., Hutchings J. B., Younger P. F. Astron. J., **74**, 1969, 1061—1068.
15. Hodgson G. W., Baker B. L. Nature, **202**, 1964, 125—131.
16. Hodgson G. W., Baker B. L. Geochim. cosmochim. acta, **33**, 1969, 943—958.
17. Woeller F., Ponnamperuma C. Icarus, **10**, 1969, 386—392.
18. Hodgson G. W. et al. Lunar pigments: Possible presence of porphyrins in an Apollo 12 sampe. Apollo 12 Lunar Science Conference. NASA, Houston Jan., 1971, 11—14.
19. Hodgson G. W. et al. Geochim. cosmochim. acta, Proc. Apollo 11 Zunar Science Conference, vol. 1, **34**, 1970, 1829—1844.

20. Флоровская В. Н. Люминесцентно-битуминологический метод в нефтяной геологии. М., 1957, 55.
21. Флоровская В. Н. Вестн. МГУ, сер. IV: Геология, 1964, № 2, 3—12.
22. Hodgson G. W., Baker B. L., Peake E. In: Fundamental Aspects of Petroleum Geochemistry, ed. B. Nagy and V. Colombo. Amsterdam, 1967. 177—259.
23. Hodgson G. W., Hitchon B., Taguchi K., Baker B. L., Peake E. Geochim. cosmochim. acta, **32**, 1968, 737—772.
24. Hodgson G. W., Baker B. L. Bull. Amer. Assoc. Petrol. Geol., **41**, 1957, 2413—2426.
25. Hodgson G. W., Flores J., Baker B. L. Geochim. cosmochim. acta, **33**, 1969, 532—535.
26. Kvenvolden K. A., Hodgson G. W. Geochim. cosmochim. acta, **33**, 1969, 1195—1202.
27. Miller S. L. J. Amer. Chem. Soc., **77**, 1955, 2351—2361.
28. Происхождение предбиологических систем. С. В. Фокс (ред.). М., 1966, 1—462.
29. Поннамперума С., Гейбел Н. В сб.: Возникновение органического вещества в солнечной системе. М., 1969, 116—162.
30. Molecular Evolution. Prebiological and Biological. D. L. Rohlfing, A. I. Oparin (eds). N. Y.—L., 1972.
31. Чичибабин А. Е. Журн. русск. физ. хим. общ., **47**, 1915, 703—713.
32. Hodgson G. W., Ponnamperuma C. Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A., **59**, 22, 1968.
33. Miller S. L., Urey H. C. Science, **130**, 1952, 245.
34. Чичибабин А. Е. Основные начала органической химии, т. 2. М., 1957, 529.
35. Meyer R. Ber. Chem. Ges., **46**, 1913, 3183.
36. Теренин А. Н. В сб.: Третий междунар. симп. «Возникновение жизни на Земле». М., 1959, 144.
37. Fischer H., Hallig A. Liebigs Ann., **448**, 1926, 193.
38. Fischer H., Gleim W. Liebigs Ann., **521**, 1936, 157.
39. Rothemund P. J. Amer. Chem. Soc., **58**, 1936, 625.
40. Rothemund P., Menotti A. R. J. Amer. Chem. Soc., **63**, 1941, 267.
41. Rothemund P., Menotti A. R. J. Amer. Chem. Soc., **70**, 1948, 1808—1812.
42. Aronoff S., Calvin M. J. Organic. Chem., **8**, 1943, 205.
43. Ball R. H., Dorough G. D., Calvin M. J. Amer. Chem. Soc., **68**, 1946, 2778—2881.
44. Eisner U., Linstead R. P. J. Chem. Soc., 1955, 3742.
45. Eisner U., Linstead R. P. J. Chem. Soc., 1955, 3749.
46. Krol S. J. Organic. Chem., **24**, 1959, 2065.
47. Rimington C., Mason S. F., Kennard O. Spectrochim. acta, **12**, 1958, 65—77.
48. Woodward R. B. J. Amer. Chem. Soc., **82**, 1960, 3800.
49. Szutka A., Hazel J. F., McNabb W. M. Radiat. Res., **10**, 1959, 597—603.
50. Красновский А. А., Умрихина А. В. ДАН СССР, **155**, 1964, 691.
51. Красновский А. А., Умрихина А. В. ДАН СССР, **202**, 1972, 221.
52. Krasnovsky A. A., Umrikhina A. V. In: Molecular Evolution. Prebiological and Biological. D. L. Rohlfing, A. I. Oparin (eds). N. Y.—L., 1972, 141—150.
53. Hodgson G. W., Baker B. L. Nature, **216**, № 5110, 1967, 29.
54. Szutka A. Nature, **212**, № 5060, 1966, 79.
55. Westall R. G. Nature, **170**, 1952, 614.
56. Cookson G. H., Rimington C. Biochem. J., **57**, 1954, 476.
57. Mauzerall D. J. Amer. Chem. Soc., **82**, 1960, 2601.

58. Mauzerall D. J. Amer. Chem. Soc., **82**, 1960, 2605.
59. Bullock E., Johnson A. W., Markham E., Shaw K. B. Nature, № 4713, 1960, 607—609.
60. Сидоров А. Н. Биофизика, **10**, 1965, 226.
61. Егорова Г. Д., Соловьев К. Н., Шульга А. М. Журн. общ. химии, **37**, 1967, 357.
62. Krasnovsky A. A. In: The Origin of Life on the Earth. Pergamon Press, 1959, 606.
63. Krasnovsky A. A. In: Prebiotic and Biochemical Evolution, Ed. A. Kimball and J. Oro. North Holland Publ., 1971, 209.
64. Krasnovsky A. A. In: Molecular Evolution, v. 1, Ed. R. Buvet and C. Ponnamperuma. North Holland, 1971, 279.

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

ТОМ X 1974 ВЫП. 5

УДК 543.544+576.809.8

ИЗМЕРЕНИЕ ГАЗООБМЕНА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В. П. ОЩЕПКОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Описана газохроматографическая методика измерения газообмена фотосинтезирующих организмов непосредственно под лучом света, а также при других физико-химических воздействиях. Стеклянная ячейка с объектом подключена перед колонкой через 4-ходовой двухпозиционный кран. Объект — 1 *мл* суспензии (водоросли, бактерии, бесклеточные препараты), с оптической плотностью 0,5 в максимуме поглощения хлорофилла. Время экспозиции 1 мин. и более. Чувствительность по водороду 0,01 *мкл*.

Важный аспект применения газовой хроматографии — исследование растворенных газов в биологических структурах, а также газообмен, сопровождающий клеточный метаболизм или отдельные ферментативные реакции. Так, Рамсей [1], сочетая метод вакуумной экстракции и газовой хроматографии, успешно определил парциальное давление кислорода в 1 *мл* плазмы человека. Свиннертон и сотр. [2] предложили метод газохроматографического анализа растворенных газов в водных растворах. Вилсон [3] разработал несколько вариантов использования газовой хроматографии для анализа инертных и химически активных газов в биологических жидкостях; Туркельтауб и сотр. [4] описали применение метода для исследования газов крови и респираторных газов. На основе вымывания растворенных в жидкостях газов газом-носителем (либо, используя сравнительно бытро устанавливающееся фазовое равновесие в системе анализируемая жидкость — газ-носитель) некоторые фирмы выпускают модификации газовых хроматографов для анализа растворенных в жидкостях газов. Стандартные приборы ориентированы на определение статических концентраций растворенных газов и не позволяют проводить кинетический анализ интересующих исследователя параметров при непосредственном воздействии тех или иных физических и химических факторов на объект в процессе опыта. Между тем такая возможность особенно привлекательна при изучении газообмена, сопровождающего метаболизм фотосинтезирующих организмов [5, 6].

Зеленые растения фиксируют углекислоту и выделяют кислород при освещении; установлено, что некоторые зеленые водоросли на свету в анаэробных условиях выделяют молекулярный водород [7]. Связь этих явлений с механизмом конверсии квантов света, способ и эффективность участия в них пигментов фототрофного организма — предмет исследования многих лабораторий.

В настоящей статье описана газохроматографическая методика измерения газообмена фотосинтезирующих организмов непосредственно под лучом света, а также при других воздействиях. При этом нас интересовало преимущественно измерение выделяющегося водорода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика

На базе газового хроматографа «Хром-3» (ЧССР) собрана установка и разработана методика, близкая к описанной ранее Свиннертоном и сотр. [2]. Принципиальная схема установки приведена на рис. 1. В аналитическую линию газового хроматографа до колонки *5* через 4-ходовой двухпозиционный кран *3* подключена стек-

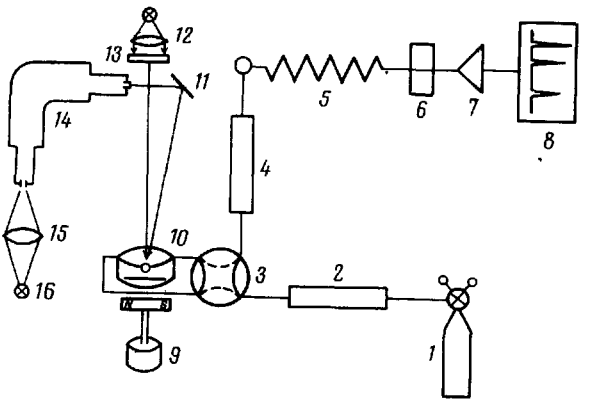


Рис. 1. Принципиальная схема установки на основе газового хроматографа «Хром-3» (ЧССР).

1 — баллон газа-носителя (аргон) с редуктором, *2* — поглотитель следов кислорода (Ni—Cr-катализатор), *3* — 4-ходовой кран, *4* — поглотитель паров воды (ангидрон) и углекислоты (аскарит), *5* — хроматографическая колонка (молекулярные сита 5А), *6* — детектор (катарометр), *7* — усилитель постоянного тока, *8* — самописец, *9* — магнитная мешалка, *10* — стеклянная ячейка с объектом, *11* — поворотное зеркало, *12* — осветитель ОИ-19, *13* — сменные светофильтры, *14* — монохроматор, *15* — конденсор, *16* — лампа накаливания

лянная ячейка (рис. 2) с объектом *10*. До крана установлена стеклянная трубка *2* (см. рис. 1) (800×30 *мм*) с Ni—Cr-катализатором для удаления следов кислорода из газа-носителя. После крана установлена стеклянная трубка *4* (200×6 *мм*) с поглотителями нерегистрируемых компонентов газовой пробы. Пары воды удалялись перхлоратом магния — $Mg(ClO_4)_2$ (ангидрон, зернение 10—24 *меш*). Углекислота поглощалась NaOH на асбесте (аскарит, зернение 10—24 *меш*). Трубка заполнялась на 120 *мм* ангидроном, остальная часть (80 *мм*) — аскаритом. Далее следовала обычная схема газового хроматографа: дозатор, колонка, детектор *6*, усилитель постоянного тока *7*, самописец *8*.

На рис. 1 представлены также два источника действующего света: осветитель (ОИ-19) *12* и монохроматор с лампой накаливания *16—14*. Ячейку с объектом в процессе опыта подогревали теплым воздухом из фена. Объект и химические реагенты вводили в ячейку шприцем через самоуплотняющуюся резиновую прокладку.

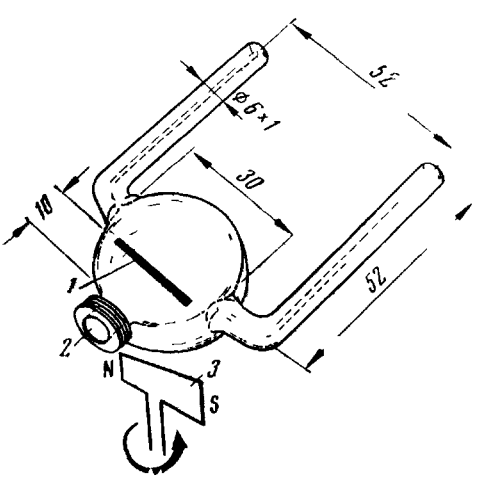


Рис. 2. Стеклянная ячейка с объектом. Внутренний объем 4,9 *см*³, *1* — остеклованный железный стержень (1,5×20 *мм*), *2* — входное отверстие закрываемое самоуплотняющейся резиновой прокладкой, *3* — постоянный магнит на оси электродвигателя (77 *об/мин*)

Процедура измерения сводится к следующему: объект вносят в кювету, затем, меняя положение 4-ходового крана, ячейку продувают газом-носителем 3 раза по 15 сек. через 3 мин. для создания в кювете анаэробных условий. Затем кран возвращают в исходное положение, указанное сплошной линией. Далее включают систему регистрации. Перо самописца пишет нулевую линию, так как проба из ячейки не поступает в линию газа-носителя. В это время на объект в ячейке воздействует тот или иной физический или химический фактор (свет, температура, химический реагент и т. д.), происходит накопление газообразных продуктов в ячейке, после чего кран *3* поворачивается в положение, указанное пунктиром, что приводит к вымыванию газообразной пробы из ячейки в линию хроматографического анализа. Время продувки 5 сек.

На рис. 3 представлена хроматограмма искусственной смеси H_2, O_2 и N_2, введенной в кювету. Условия анализа: колонка из нержавеющей стали (67×0,6 *см*) с насад-

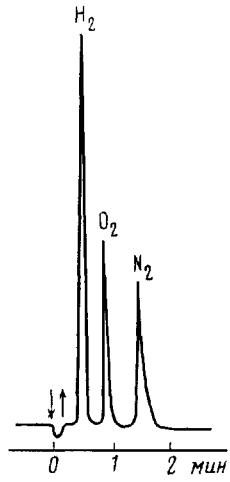


Рис. 3

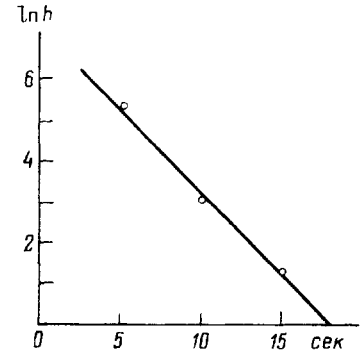


Рис. 4

Рис. 3. Хроматограмма искусственной смеси H_2, O_2 и N_2, введенной в ячейку

Стрелками обозначено переключение потока газа-носителя на ячейку и отключение ячейки от линии

Рис. 4. Зависимость логарифма высоты пика водорода от времени продувки ячейки газом-носителем

кой (молекулярные сита 5А, 60—80 *меш*). Газ-носитель аргон (U=85 *мл/мин*). Температура анализа 22±2°, детектор — катарометр, тока моста 120 *ма*. Шкала самописца — 1 *мв*, время пробега шкалы — 1 сек. На выходе после детектора ставили игольчатое сопротивление газовому потоку, так что давление на входе колонки составляло 0,45 *ати*.

Лавлок предложил методику [8] экспоненциального разбавления пробы для калибровки детекторов. Поскольку вымывание газовой пробы из ячейки в нашем случае также происходит по экспоненциальному закону, а площади пиков или их высоты пропорциональны концентрации компонента, возможно приложение этого метода. Концентрация компонента в заданный момент времени определяются уравнением

$$C = C_0 \exp\left\{-\frac{Ut}{V}\right\}$$

где C_0 — исходная концентрация компонента в ячейке; U — объемная скорость газа-носителя, *мл/сек*; V — внутренний объем петли (ячейка+подводка — 1 *мл* объекта); t — время, сек. Если ввести в ячейку, в которой находится 1 *мл* объекта (суспензия водорослей, убитых нагреванием при 80° 10 мин.), 20 *мкл* чистого H_2, то, продувая ячейку последовательно через 1 мин. по 5 сек., получим на шкале самописца 10 *мв* три убывающих по высоте пика водорода. Построив график зависимости ln h от t (рис. 4), получим прямую линию. Величины U и V можно непосредственно измерить. Подставляя их значение в уравнение при h=1 *мм*, находим время необходимой продувки. Практически его легко найти из графика рис. 4. Далее находим $C_{мин} \approx 2 \cdot 10^{-5}$. Величина $C_{мин}$ получена в относительных единицах от объема петли. При записи на шкале 1 *мв* это соответствует чувствительности 0,01 *мкл/мм*.

Результаты и их обсуждение

На рис. 5 представлены хроматограммы выделения O_2 и H_2 суспензией хлореллы при действии света и нагревания. Ранее [9] нами показано, что выделение O_2 и H_2 при освещении хлореллы в анаэробных условиях происходит альтернативно: при малых интенсивностях света регистрируется только пик H_2, при увеличении интентивности света — только пик O_2. Как видно из рис. 5, повышение температуры опыта в

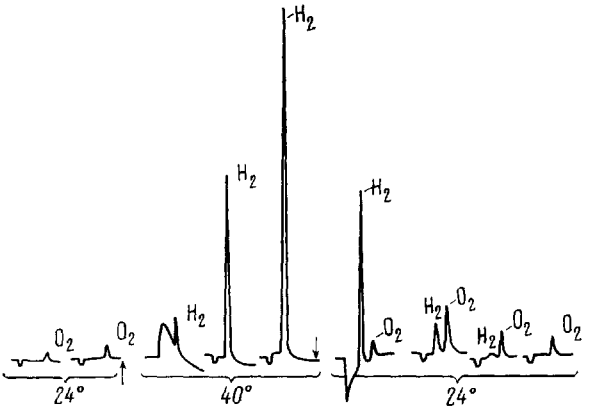


Рис. 5. Влияние нагревания водорослей в процессе опыта на выделение кислорода и водорода.

Объект *Chlorella pyrenoidosa*, 1 *мл* $D_{680}=0{,}5$. Интенсивность белого света $2{,}5\cdot10^4$ *эрг/см²·сек*. Стрелками обозначено включение и выключение нагревания ячейки теплым воздухом из фена

физиологических пределах 24—40° при освещении объекта светом достаточно большой интенсивности приводит к переходу от регистрируемого выделения O_2 к регистрируемому выделению H_2. Охлаждение объекта до исходной температуры приводит к обратному переходу $H_2 \longrightarrow O_2$. Легко заметить, что выделение O_2 после нагревания при 24° в несколько раз больше выделения O_2 при той же температуре в начале опыта. Можно было предположить, что в процессе опыта увеличилась концентрация растворенной углекислоты, поэтому при охлаждении объекта от 40 до 24° фотосинтез хлореллы увеличился, а следовательно, возросло и выделение кислорода. Действительно, в специальных опытах с применением этой методики на колонке (120×0,6 *см*) с насадкой полисорб-1 нами показано, что фотообразование H_2 у хлореллы сопровождается выделением CO_2 (в этом случае поглотитель CO_2— аскарит не ставится).

Таким образом, рис. 5 иллюстрирует применение описанной методики при одновременном воздействии на фотосинтезирующий объект в процессе опыта света, нагревания и изменения концентрации CO_2. Снимая по точкам зависимость скорости фотообразования H_2 хлореллой от длины волны света, мы получили спектр действия этого явления [10].

Интересы нашей тематики сосредоточены на исследовании газообмена H_2, O_2 и CO_2 у фотосинтезирующих организмов. Очевидно, что применение данной методики и близких к ней модификаций не ограничивается определением указанных газов на фотосинтезирующих объектах. При необходимости предложенная методика может быть сравнительно легко автоматизирована, а ее технические характеристики существенно улучшены.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР

Поступила
24.XII.1973

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ramsey L. H.* 1959. Science, *129*, 900.
2. *Swinnnerton J. W., Linnenbon V. J., Cheek C. H.* 1962. Analyt. Chem., *34*, 483.
3. *Wilson R. H.* 1964. J. Gas Chomatogr., *2*, N 11, 365.

4. *Туркельтауб Н. М., Лященко В. И., Колобякина А. И., Шварцман В. П.* 1970. В сб. Газовая хроматография, вып. 64, ВНИИГНИ, 152.
5. *Кутюрин В. М., Матвеева И. В., Назаров Н. М., Семенюк К. Г.* 1964. Докл. АН СССР, *157*, 1474.
6. *Самадзе Г. А., Курсанов А. Л.* 1966. Физиол. раст., *13*, вып. 2, 201.
7. *Gaffron H., Rubin J.* 1942. J. Gener. Physiol., *26*, 219.
8. *Lovelock J. E.* Analyt. Chem., *33*, 162, 1961.
9. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* 1972. Физиол. раст., *19*, вып. 5, 1090.
10. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* 1974. Физиол. раст., *21*, вып. 3, 462.

GAS CHROMATOGRAPHIC MEASUREMENT OF GAS METABOLISM OF PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS

V. P. OSHCHEPKOV, A. A. KRASNOVSKY

Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences

The paper describes the gas chromatographic method for measuring gas exchange of photosynthetic organisms exposed to illumination and other physico-chemical effects. A glass cell containing an object is placed in front of the column and connected by a four-way double-position valve. The object is 1 *ml* of suspension (algae, bacteria, cell-free preparations) with an optic density of 0.5 in the maximum of chlorophyll absorption. The exposure time is 1 min and more. The hydrogen sensitivity is 0.01/μl.

Том 21, вып. 3 1974 г.

УДК 581.132.1

ФОТООБРАЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА ХЛОРЕЛЛОЙ: СПЕКТР ДЕЙСТВИЯ

В. П. ОЩЕПКОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследован спектр действия фотообразования молекулярного водорода Chlorella pyrenoidosa в атмосфере аргона посредством газо-хроматографической методики. Полученный спектр действия фотообразования H_2 соответствует спектру поглощения хлорофилла *a* и *b* в клетках хлореллы. Квантовый выход процесса уменьшается в области поглощения каротиноидов, но сохраняется в дальней красной области до 743 *нм*. При одновременном освещении объекта двумя разными монохроматическими лучами в диапазоне 409—743 *нм* не наблюдается эффект усиления фотообразования H_2. Минимальный квантовый расход, рассчитанный при 680 *нм*, составил 5 квантов на молекулу выделившегося H_2.

Работы нашей лаборатории, посвященные исследованию состояния фотосинтетических пигментов в организмах и их моделированию, тесно связаны с вопросом о функциональной роли различных форм хлорофилла в клетке, способе и эффективности участия этих форм в первичных процессах конверсии энергии квантов света. Одним из путей изучения этих вопросов является исследование спектров действия различных фотопроцессов, сенсибилизируемых пигментами фототрофного организма [1—6].

Среди этих процессов большой интерес представляет явление выделения молекулярного водорода при освещении водорослей [7] с точки зрения спектральной и квантовой эффективности. По данным Хили [8], полученным на Chlamydomonas moewusii, спектр действия фотообразования молекулярного водорода, снятый в красной области (600—720 *нм*), хорошо коррелирует со спектром поглощения фотосистемы I, а его максимум сдвинут относительно максимума спектра действия фотосинтеза приблизительно на 20 *нм* в длинноволновую область. В этих опытах спектр был снят в присутствии ингибитора фотосинтетического выделения кислорода — диурона (3- (3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) и разобщителя фотофосфорилирования — (карбонил цианид-м-хлорфенилгидразина).

Ранее в нашей работе [9], проведенной на Chlorella pyrenoidosa сообщалось, что функции выделения кислорода и водорода при освещении в анаэробных условиях находятся в конкурентных взаимоотношениях. Было показано, что ингибиторы фотосинтетического выделения кислорода и разобщители фотофосфорилирования ингибируют обе функции, хотя действительное динамическое равновесие может быть сдвинуто в пользу регистрируемого выделения водорода.

В задачи настоящей работы входили снятие спектра действия фотообразования молекулярного водорода хлореллы в возможно более мягких физиологических условиях, а также оценка квантового выхода процесса.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали бактериально чистую несинхронную культуру зеленой водоросли Chlorella pyrenoidosa *Prings* 82Т. Культуру выращивали в плоскопараллельной камере на среде Тамия при $t=31$—$32°$ в течение 2 суток при непрерывной продувке воздухом, содержащим 2,5% CO_2. Состав среды в *г/л*: KNO_3—4, KH_2PO_4 — 0,5; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$—0,75; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—1,25; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$—0,06; ЭДТА — 0,037; раствор микроэлементов — 1 *мл*. Конечная величина pH 6,8. Освещенность люминесцентными лампами ЛД-40 составляла 8000 *лк*. Клетки осаждали центрифугированием, промывали 0,05 *М* фосфатным буфером pH 6,8, после чего суспендировали в том же буфере, доводя оптическую плотность объекта при 680 *нм* до 0,5. В опыт брали 1 *мл* суспензии. Для регистрации выделения газов, сопровождающих метаболизм водоросли, использовали газохроматографический метод. Принципиальная схема установки приведена ранее [9]; детали методики будут описаны в другом месте. Условия анализа: колонка из нержавеющей стали 67×0,6 *см* с насадкой, молекулярные сита 5А (60—80 *меш.*) Газ-носитель — аргон $v=85$ *мл/мин*. Температура анализа комнатная (22±2°). Детектор — катарометр, ток моста 120 *ма*. Шкала самописца 1 *мв*, время пробега шкалы 1 сек. На выходе после детектора ставилось игольчатое сопротивление газовому потоку так, что давление на выходе колонки составляло 0,45 *ати*. Чувствительность методики по H_2 при данном режиме работы составила 0,01 *мкл*. Источники действующего света: осветитель ОИ-19 (20 *вт*, 8 *в*) и призменный монохроматор УМ-2 с лампой накаливания ПЖ-24 (220 *вт*, 24 *в*). Тепловое излучение отсекалось светофильтрами СЗС-25 и СЗС-26 (полоса пропускания 400—750 *нм*). Интенсивность света изменялась нейтральными светофильтрами. Для получения монохроматического света от источника ОИ-19 использовали интерференционные светофильтры с полушириной пропускания 10 *нм*. Для устранения кратных порядков пропускания последовательно ставили соответствующие граничные светофильтры.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку «обычное» фотосинтетическое выделение кислорода не является необходимым условием для фотообразования водорода и ингибирует этот процесс [9, 10], необходимо избирательно инактивировать функцию выделения O_2 с тем, чтобы изолировать функцию фотообразования H_2 у водорослей в анаэробных условиях. Добавление диурона в концентрации 10^{-5} *М*, а также прогревание суспензии водорослей при 55° в течение 5 мин. в процессе опыта в ячейке инактивировало фотосинтетическое выделение O_2 практически полностью и необратимо. Фотообразование H_2 при этих воздействиях регистрировалось в значительно меньших количествах по сравнению с оптимальным выделением H_2 теми же клетками, не подвергавшимися воздействию указанных факторов, но находившихся в условиях сдвига динамического равновесия $O_2 \rightleftharpoons H_2$ в пользу образования H_2 [9]. Это указывало на большую трудность снятия спектра действия выделения молекулярного водорода при освещении водорослей в условиях избирательного ингибирования функции выделения O_2 диуроном или нагреванием.

Таким образом, наиболее эффективным подходом решения поставленной задачи, по-видимому, является снятие спектра действия фотообразования H_2 в условиях резкого смещения динамического равновесия функций в направлении $O_2 \rightarrow H_2$. Ранее было показано [9], что такой переход может быть вызван снижением интенсивности света, добавлением глюкозы, диурона (10^{-6} *М*), динитрофенола (10^{-4} *М*), нагреванием до 40°, действием света с λ длиннее 700 *нм*.

Решающее условие активного выделения водорода — наличие достаточного количества железа в культуральной среде. В прежних опытах [9] хлорелла выращивалась на среде Тамия при содержании $FeSO_4 \cdot 7H_2O$—0,003 *г/л*. Клетки, выращенные при дефиците железа в среде, выделяли H_2 слабо, а точка перехода функций $O_2 \rightleftharpoons H_2$ была смещена в сторону значительно меньших интенсивностей света. Напротив, при увеличенном содержании железа в ростовой среде точка перехода $O_2 \rightleftharpoons H_2$ была смещена в сторону большей интенсивности света и оптимальный выход H_2 соответственно увеличивался. В дальнейшем культура выращивалась при содержании в среде $FeSO_4 \cdot 7H_2O$—0,06 *г/л*.

Гаффрон и Рубин [7] показали на Scenedesmus, что отсутствие CO_2 в газовой фазе над объектом — необходимое условие фотообразования H_2; увеличение содержания CO_2 (в результате ферментации или искусственного добавления) приводило к выделению O_2 при освещении. Калтвассер и Гаффрон [11] в дальнейшем установили выделение CO_2 при фотообразовании H_2 у Scenedesmus.

В наших экспериментах на Chlorella были подтверждены эти результаты. В специальных опытах на колонке 120×0,6 *см* с насадкой полисорб-1 (60—80 *меш*) было показано, что и темновое, и световое образование H_2 сопровождается выделением CO_2, однако при интенсивностях

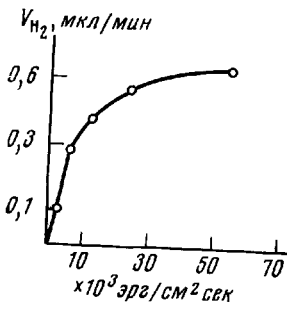


Рис. 1

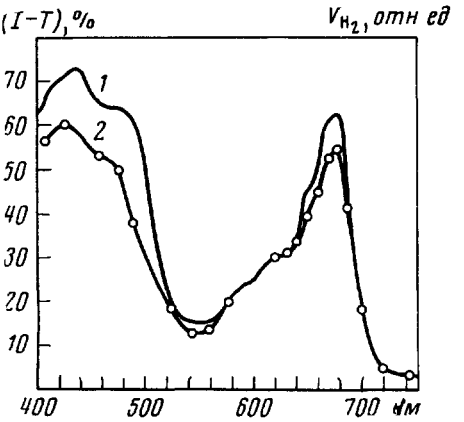


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость скорости выделения H_2 хлореллой от интенсивности белого света

Рис. 2. Спектр поглощения (*1*) и спектр действия (*2*) фотообразования молекулярного водорода культурой Chlorella pyrenoidosa, полученный при освещении объекта через интерференционные светофильтры

Интенсивность действующего света в экспериментальных точках от 409 до 743 *нм*: 1100, 1250, 1060, 900, 1900, 2040, 1060, 2900, 1850, 1400, 1570, 1900, 2200, 1600, 1850, 1400, 2240, 2440, 2240, 2440 *эрг/см² сек*

света, близких к переходу $H_2 \rightarrow O_2$, выделение H_2 наблюдается без регистрируемого выделения CO_2. Это указывает, по-видимому, на фотосинтетическую ассимиляцию углекислоты, количественно соизмеримую с процессами ее образования в клетке.

Учитывая вышеизложенное, спектр действия фотообразования водорода хлореллой снимался при следующих условиях: низкая интенсивность действующего монохроматического света, время экспозиции 1 мин. продувка газом-носителем 5 сек., температура ячейки с объектом 30°, концентрация экзогенной глюкозы 10^{-2} *М*. Каждая точка снималась при 5-кратном экспонировании при данной длине волны. Расчет производился по высотам 4-го и 5-го пиков. Проверку линейности показаний, а также оценку чувствительности методики производили по модифицированному методу экспоненциального разбавления, предложенному Лавлоком [12]. Между освещением в экспериментальных точках был темновой 5-минутный интервал с той же 5-секундной продувкой через 1 мин. Темновой фон выделения H_2 вычитался из светового сигнала. Важным предварительным этапом работы явилось снятие световой кривой фотообразования H_2 и выявление линейного участка. На рис. 1 представлена зависимость скорости выделения H_2 хлореллой от интенсивности белого света в указанных выше условиях. Линейный участок кривой простирается до $7{,}5 \cdot 10^3$ *эрг/см² сек*, максимальный выход водорода на нелинейном участке соответствует $55 \cdot 10^3$ *эрг/см² сек*. При дальнейшем увеличении интенсивности света выход H_2 падает (на рис. 1 не

показано). Световые кривые при монохроматическом освещении объекта не снимались, однако при длинах волн 429, 632 и 679 *нм* увеличение либо уменьшение интенсивности падающего света в 2 раза с помощью нейтральных светофильтров приводило к 2-кратному увеличению либо уменьшению фотообразования H_2 соответственно.

На рис. 2 представлен спектр поглощения Chlorella pyrenoidosa, записанный на спектрофотометре СФ-14 с интегрирующей сферой, и спектр действия фотообразования молекулярного водорода культурой при освещении через интерференционные светофильтры. Спектр действия был получен по точкам как среднее арифметическое двух спектров, один из которых снимался из коротковолновой области в длинноволно-

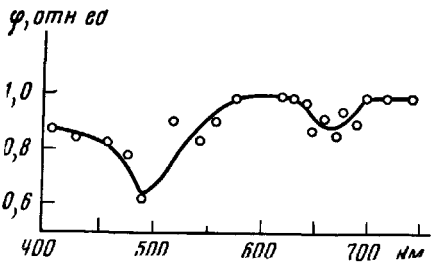


Рис. 3

Рис. 3. Спектр относительного квантового выхода фотообразования H_2 культурой Chlorella pyrenoidosa

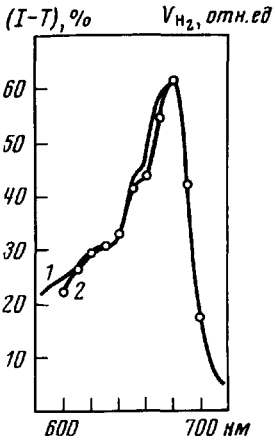


Рис. 4

Рис. 4. Спектр поглощения (*1*) и спектр действия (*2*) фотообразования молекулярного водорода культурой Chlorella pyrenoidosa, полученный при освещении объекта светом от монохроматора

Интенсивность действующего света в экспериментальных точках от 600 до 700 *нм*: 1320, 1190, 1120, 1050, 920, 990, 990, 920, 790, 660, 600 *эрг/см² сек*. Спектр действия нормализован при 630 *нм*

вую, другой — в противоположном направлении на одном и том же объекте в одном опыте. Отклонение от среднего (ΔV_{H_2}) не превышало 3 отн.%. Спектр не менялся в зависимости от пути измерения, а также если экспериментальные точки снимались вразброс. Спектр действия нормализован при 632 *нм*. Хотя тонкая структура спектра действия фотообразования H_2 еще нуждается в исследовании, основные результаты достаточно наглядны.

Прежде всего ясно, что процесс фотообразования молекулярного водорода хлореллой сенсибилизируется хлорофиллом. Основные максимумы спектра действия в красной (680 *нм*) и синей (430 *нм*) области совпадают с максимумами спектра поглощения. Вклад каротиноидов (490 *нм*) существенно меньше. Привлекает внимание проявление эффективности в процессе фотообразования водорода длинноволновыми формами хлорофилла (длинее 685 *нм*), тогда как эти формы малоэффективны в процессе фотосинтетического выделения кислорода [13].

Относительный квантовый выход φ фотообразования H_2 (рис. 3), полученный графическим делением (спектр действия/спектр поглощения),— величина, близкая к постоянной в спектральном интервале 409—743 *нм*. Уменьшение φ в области поглощения каротиноидов свидетельствует, вероятно, о сравнительно низкой эффективности миграции энергии поглощенной каротиноидами на хлорофилл. В дальней красной области квантовый выход сохраняется на оптимально высоком уровне, нет так называемого «красного падения», характерного для фотосинтеза [13]. Для выяснения причины небольшого уменьшения φ в области 645—690 *нм*, а также с целью выявления деталей структуры в красной обла-

сти (600—700 *нм*) спектр действия фотообразования H_2 был снят при освещении объекта светом от монохроматора с постоянной полушириной вырезаемого спектрального интервала (13 *нм*) за счет изменения геометрической ширины щелей. Полученный спектр (рис. 4) значительно лучше совпадает в указанной области со спектром поглощения, что указывает на практически одинаковую эффективность участия хлорофиллов *a* и *b* в процессе фотообразования H_2. Некоторое расхождение полученных спектров действия, по-видимому, связано с различной интенсивностью действующего монохроматического света.

Квантовый расход $\gamma = \frac{1}{\varphi}$ был определен в опытах с суспензией водоросли, имеющей оптическую плотность при 680 *нм*, равную 2, т. е. расчет производили исходя из 100% поглощения при 680 *нм*. Минимальный γ составил 5 квантов на молекулу выделившегося H_2.

Самостоятельный интерес представляет изучение влияния взаимодействия двух лучей разных длин волн [14]. При освещении объекта одновременно двумя разными монохроматическими лучами в диапазоне 409—743 *нм*, меняя их интенсивность от 0,4 до 10 тыс. *эрг/см*^{2} *сек*, можно получить либо аддитивность выхода H_2, либо величину меньше суммы сигналов раздельного освещения. Эффект усиления (Эмерсона), показанный по кислороду на Chlorella pyrenoidosa, не наблюдается по фотообразованию молекулярного водорода.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошее совпадение спектра действия фотообразования молекулярного водорода хлореллой со спектром поглощения ее хлорофиллов in vivo указывает, что все формы хлорофилла, присутствующие в клетке, эффективны в этом процессе. Другими словами, хлоропласты водоросли не содержат функционально неактивных или «лишних» форм хлорофилла. Это особенно важно подчеркнуть в отношении длинноволновых форм, так как ранее [13] их назначение, изучавшееся по фотосинтетическому выделению кислорода, оставалось неясным.

С другой стороны, совпадение указанных спектров не дает основания связывать процесс фотообразования H_2 у водорослей с активностью фотосистемы I или II, а отсутствие эффектов усиления не подтверждает гипотезы последовательного взаимодействия фотосистем [15]. Полученные результаты допускают возможность функционирования циклического фотофосфолирования в механизме фотообразования H_2 в согласии с предположением [9] о сходстве механизмов фотообразования молекулярного водорода у зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий.

Фотообразование H_2 идет со сравнительно высоким абсолютным квантовым выходом (0,2), однако реальная величина φ может быть значительно больше найденной по следующим причинам: хотя опыты проводились на покоящихся культурах, уровень остаточного «полезного» биосинтеза, осуществляемого с потреблением восстановителя, неизвестен; в условиях резкого смещения динамического равновесия в направлении $O_2 \rightarrow H_2$ уровень фотосинтеза, идущего с выделением кислорода, мал, но нет оснований думать, что он равен нулю; уровень фоторедукции [16] также не определен, хотя можно полагать, что при низких парциальных давлениях H_2 им можно пренебречь, наконец, возможность кислородно-водородной [17] реакции в анаэробных условиях не исключена. Очевидно, что все эти процессы уменьшают скорость фотообразования H_2 водорослями, однако в настоящее время их трудно количественно оценить. Вероятно, существенное влияние на величину φ оказывает режим, среда и условия культивирования водоросли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. В сб. Функциональная биохимия клеточных структур, 15. «Наука», 1970.
2. Литвин Ф. Ф., Хэ И-тань, Ефимцев Е. И. Физиол. растений, **12**, 365, 1965.
3. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А. В кн. Биология автотрофных микроорганизмов, 108. Изд-во МГУ, 1966.
4. Шувалов В. А., Кондратьева Е. Н., Литвин Ф. Ф. Докл. АН СССР, **178**, 711, 1968.
5. Литвин Ф. Ф., Звалинский В. И. Биофизика, **13**, 241, 1968.
6. Fork D. C., Amesz J. Annual Rev. Plant Physiol., **20**, 305, 1969.
7. Gaffron H., Rubin J. J. Gen. Physiol., **26**, 219, 1942.
8. Healey F. P. Plant Physiol., **45**, 153, 1970.
9. Ощепков В. П., Красновский А. А. Физиол. растений, **19**, 1090, 1972.
10. Kaltwasser H., Stuart T. S., Gaffron H. Planta, **89**, 309, 1969.
11. Kaltwasser H., Gaffron H. Plant Physiol., Suppl, **39**, III, 1964.
12. Lovelock J .E. Analyt. Chem., **33**, 162, 1961.
13. Emerson R., Lewis C. M. Amer. J. Bot., **30**, 165, 1943.
14. Emerson R., Chalmers R., Cederstrand C. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **43**, 133, 1957.
15. Hill R., Bendall F. Nature, **186**, 42, 1960.
16. Gaffron H. Amer. J. Bot., **27**, 273, 1940.
17. Gaffron H. J. Gen. Physiol., **26**, 241, 1942.

Поступила в редакцию
24.X.1973

PHOTOPRODUCTION OF MOLECULAR HYDROGEN BY CHLORELLA: ACTION SPECTRUM

V. P. OSHCHEPKOV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The action spectrum of photoproduction of molecular hydrogen by Chlorella pyrenoidosa was studied in the atmosphere of argon by gas chromatography. This spectrum was found to correspond to the absorption spectrum of chlorophylls *a* and *b* in the chlorella cells. The quantum yield of the process decreased in the region of absorption of carotenoids but remained the same in the far red region up to 743 nm. The rate of H_2 photoproduction was not increased upon simultaneous illumination of the object with two different monochromatic rays within the range of 409—743 nm. The minimal quantum requirement calculated at 680 nm was 5 quanta per a molecule of evolved H_2.

БИОФИЗИКА

Том XIX, вып. 2 1974

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА, ХЛОРОФИЛЛА И ИХ БЕЗМАГНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СУЛЬФИДОМ НАТРИЯ И СЕРОВОДОРОДОМ

Е. В. ПАКШИНА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Бактериохлорофилл, хлорофилл *а* и их безмагниевые производные при фотовосстановлении сернистым натрием и сероводородом образуют как устойчивые восстановленные формы, так и более лабильные, быстро образующие исходный пигмент после пуска кислорода воздуха. В работе приводятся схемы, суммирующие образование этих продуктов с указанными донорами электрона. Сернистый натрий способен восстанавливать пигменты в темноте с образованием продуктов, отличных по спектру от фотопродуктов. Приводятся рассуждения относительно природы промежуточных продуктов фотовосстановления.

Сероводород и сернистый натрий являются исходными донорами электрона при бактериальном фотосинтезе. В связи с этим представляет интерес использование этих веществ в качестве донора электрона при реакции обратимого фотовосстановления пигментов фотосинтезирующих организмов [1, 2]. В данной работе мы предприняли систематическое исследование обратимого восстановления хлорофилла *а*, феофитина *а*, бактериохлорофилла и бактериофеофитина указанными выше донорами электрона.

Методика

Пигменты получали принятым в нашей лаборатории методом. Реакцию фотовосстановления проводили в трубках Тунберга в пиридиновых (с 2% воды) растворах пигментов при температуре +20° и при охлаждении (—40, —60°). Освещение растворов осуществляли светом лампы накаливания 750 *вт* с конденсором через светофильтр КС-13, освещенность $\sim 10^5$ *эрг/см²сек*. Продолжительность освещения 3 *мин*. Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре СФ-14. Сероводород вводили в реакционную смесь в вакууме, подогревая предварительно замороженный отвод трубки Тунберга с 50 *мг* сернистого натрия и 1 *мл* 5%-ной серной кислоты. Сернистый натрий для использования в качестве донора электрона в водно-пиридиновых растворах пигментов брали в количестве, превышающем его растворимость в системе (3—30 *мг* на опыт при объеме опытной смеси 4,5 *мл*).

Результаты

На рис. 1 схематически представлена сравнительная картина изменения спектров поглощения при восстановлении пигментов сероводородом и сернистым натрием в темноте и при освещении. В присутствии сероводорода мы наблюдали фотовосстановление исследуемых пигментов и не наблюдали темнового восстановления пигментов. Сернистый натрий восстанавливал пигменты в темноте с регенерацией исходного спектра после пуска кислорода воздуха. Представленные далее на схеме продукты

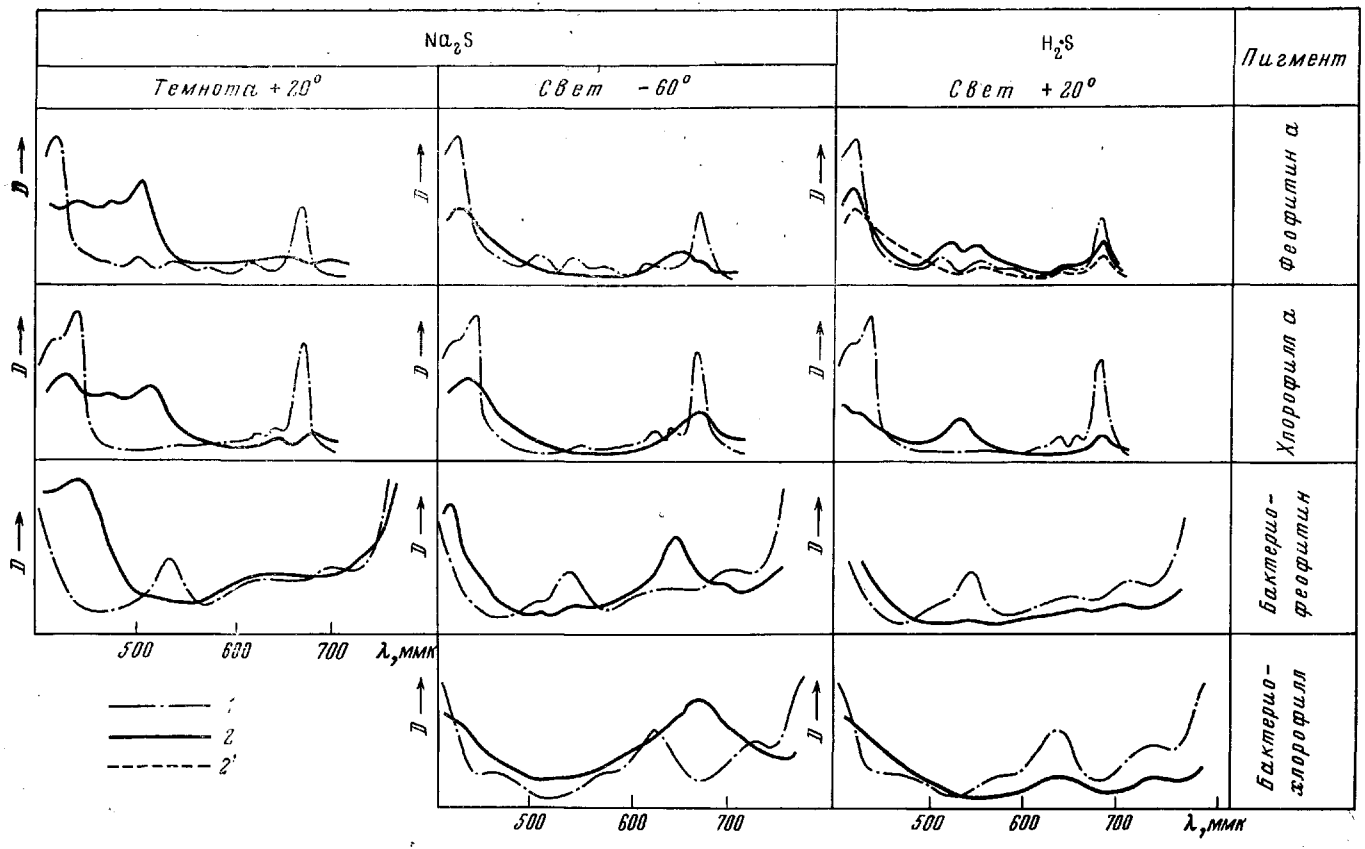


Рис. 1. Восстановление пигментов в пиридине (2% H_2O) сернистым натрием и сероводородом

1 — спектры поглощения исходных пигментов; *2* — восстановленных форм; *2'* — спектр восстановленной формы феофитина *a* при —40° С

фотовосстановления, наблюдаемые нами при охлаждении системы, отличались спектрально от продуктов темнового восстановления.

Феофитин а наиболее легко восстанавливался сернистым натрием в темноте, образуя при этом красный продукт с максимумами поглощения при 440, 480, 510 и 700 *ммк*. После пуска кислорода воздуха происходила мгновенная регенерация исходного пигмента. При увеличении концентрации сернистого натрия до 30 *мг*, вводимых в 0,3 *мл* водного раствора, этот продукт образовывался и в присутствии кислорода воздуха, сохраняясь длительное время. При резком встряхивании пробирки обратная реакция ускорялась и регенерировал исходный пигмент. При —60° такого темнового продукта восстановления мы не наблюдали ни при откачивании, ни при последующем освещении. На свету образовывался продукт восстановления, похожий на описанную ранее «первичную» восстановленную форму феофитина [3]. С сероводородом феофитин образовывал при освещении две спектрально различающиеся восстановленные формы, схематически представленные на рис. 1: при —40°— форму, похожую на «первичную» восстановленную форму и обозначенную 2′, и при +20° — «вторичную» форму *2*, регенерирующие после пуска воздуха в исходный пигмент. Форма *2* при подогревании до +20° образует форму *2*, являясь, таким образом, промежуточным продуктом на пути образования «вторичной» восстановленной формы феофитина *а*.

Хлорофилл а, подобно феофитину восстанавливался сернистым натрием в темноте, с той лишь разницей, что в случае хлорофилла требовалась большая концентрация восстановителя. В вакууме продукт был стабилен. Мы наблюдали образование этого продукта восстановления и в присутствии кислорода воздуха. При добавлении водного раствора указанного донора электрона в пробирку с пиридиновым раствором хлорофилла *а* можно заметить резкое изменение окраски: появление ярко-красного цвета с последующей быстрой регенерацией исходного пигмента. При проведении реакции восстановления хлорофилла *а* сернистым натрием при —60° «темнового» продукта не образуется, а образуется продукт, похожий на «первичную» восстановленную форму феофитина *а*. С сероводородом хлорофилл *а* при освещении образовывал красную восстановленную форму, схожую по спектру с восстановленной формой, получаемой в присутствии аскорбиновой кислоты. Охлаждение системы до —60° замедляло скорость образования этого продукта.

Бактериохлорофилл в темноте сернистым натрием не восстанавливался, а на свету образовывал описанный нами ранее [2] зеленый продукт. В связи с малой изученностью реакции обратимого восстановления бактериохлорофилла мы исследовали более подробно условия образования зеленого продукта. Он образовывался в пиридине и ацетоне. В спирте и диоксане бактериохлорофилл сернистым натрием не восстанавливался. 30% спирта в пиридине ингибировали реакцию. Нам удалось снять дифференциальные спектры (свет — темнота) при фотовосстановлении бактериохлорофилла и бактериофеофитина в пиридине сернистым натрием на установке [4]. В случае бактериохлорофилла освещение в каждой точке производилось в течение 5 *сек*. Полная обратимость реакции достигалась в темноте за 2 *мин*. В случае бактериофеофитина освещение в каждой точке —3 *сек*, обратимость в темноте достигалась за 6 *мин*. Измерения велись при +20°. Данные, представленные на рис. 2, показывают, что «под лучом» образуются те же «зеленые» восстановленные продукты, обладающие максимумами поглощения при 660 *ммк* в случае бактериохлорофилла и при 640 *ммк* в случае бактериофеофитина.

Измерение спектров флуоресценции при восстановлении бактериохлорофилла и бактериофеофитина на установке [5] обнаружило резкое падение интенсивности флуоресценции главного максимума с регенерацией его после пуска кислорода воздуха. «Зеленая» восстановленная форма не обладала флуоресценцией.

При использовании в качестве донора электрона сероводорода и бактериохлорофилл, и бактериофеофитин образовывали бесцветные фотопродукты (рис. 1), аналогичные тем, которые получаются при использовании в качестве доноров электрона аскорбиновой кислоты и фенилгидразина. Эти восстановленные продукты, являющиеся, очевидно, лейкоформами, были значительно более устойчивыми, чем «зеленые» восстановленные формы, после пуска кислорода воздуха обратная реакция шла медленно, и регенерация исходного пигмента была неполной. Проводя

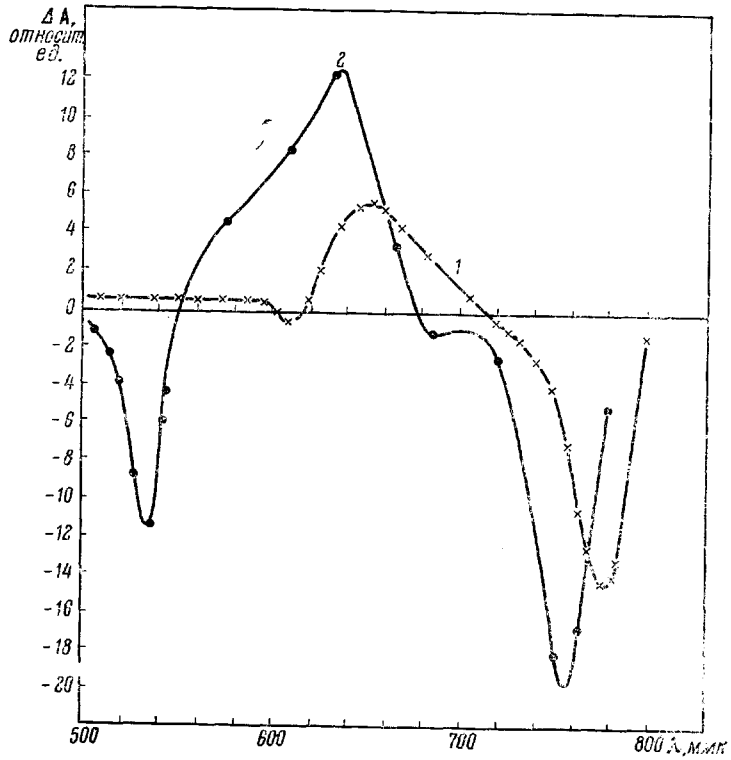


Рис. 2. Фотовосстановление бактериохлорофилла и бактериофеофитина в пиридине (2% H_2O) с 10 *мг* сернистого натрия

Дифференциальные спектры поглощения (свет — темнота): *1* — бактериохлорофилла; *2* — бактериофеофитина

фотовосстановление при разных температурах (+20°, 0°, —40°), нам не удалось наблюдать образование «зеленой» восстановленной формы как промежуточного продукта на пути к образованию конечного бесцветного продукта, равно как и других промежуточных продуктов.

Бактериофеофитин в отличие от бактериохлорофилла частично образует «зеленый» продукт восстановления в темноте при длительном стоянии эвакуированного пиридинового раствора пигмента в присутствии сернистого натрия. Свет заметно ускоряет эту реакцию. Кроме того, в случае прибавления сернистого натрия в виде водного раствора (20—30 *мг* в опыт) в темноте образовывался еще другой продукт с максимумом поглощения при 450 *ммк* (рис. 1). Появление этого желтого продукта иногда наблюдалось и при обратимом фотовосстановлении бактериофеофитина сернистым натрием, когда концентрация донора была меньшей (10 *мг* на опыт). Этот продукт образовывался при откачивании и исчезал при стоянии в темноте, после чего мы проводили фотореакцию с образованием зеленого продукта.

Обсуждение результатов

Изучение реакции фотовосстановления бактериохлорофилла, хлорофилла и их безмагниевых производных (см. схемы 1 и 2) показало, что все указанные пигменты образуют как устойчивые восстановленные формы, так и более лабильные, быстро образующие исходный пигмент после пуска кислорода воздуха. Кроме того, оказалось, что сернистый натрий способен восстанавливать пигменты в темноте с образованием продуктов восстановления, более устойчивых в случае безмагниевых производных. Эти продукты по спектру отличались от фотопродуктов.

Схема 1*. Восстановление бактериохлорофилла и бактериофеофитина Na_2S и H_2S

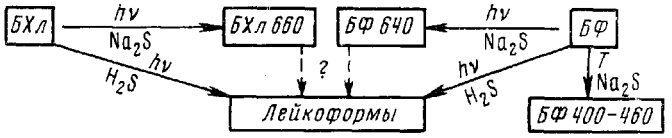
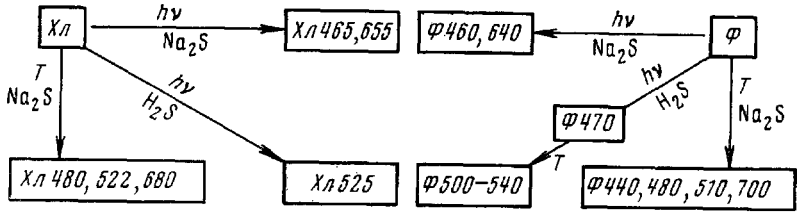


Схема 2. Восстановление хлорофилла *а* и феофитина *а* Na_2S и H_2S



При использовании в качестве донора электрона сероводорода, как видно на схемах, мы наблюдали образование устойчивых восстановленных форм — лейкоформы в случае бактериальных пигментов и «красных» восстановленных форм в случае хлорофилла *а* (Хл525) и его безмагниевого аналога (Ф500—540). Последняя была тождественна восстановленной форме феофитина *а*, наблюдавшейся ранее при восстановлении пигментов сероводородом. Эта форма, по данным ИК-спектров исходного и восстановленного пигментов, имеет [6] изофлориновую структуру с четырьмя иминными группами в центре молекулы. Как видно из схемы 2, образованию вторичной восстановленной формы феофитина *а* (Ф500—540) предшествовало образование более лабильной формы (Ф470), что можно было наблюдать в случае проведения реакции при —40°.

Использование в качестве донора электрона сернистого натрия и проведение реакции при охлаждении позволило обнаружить образование лабильных восстановленных форм, обозначенных на схемах для хлорофилла *а* — (Хл465, 655), феофитина *а* — (Ф460, 640), бактериохлорофилла — (БХл660) и бактериофеофитина — (БФ640). Считается, что при фотовосстановлении пигментов образованию протонизированной «вторичной» восстановленной формы предшествует присоединение электрона к циклической системе сопряженных связей молекулы пигмента с образованием ион-радикала ($\cdot X^-$). Мы высказали ранее [2] предположение относительно того, что лабильные «зеленые» восстановленные формы бактериальных пигментов могут быть продуктами такого рода. Используя в данной работе при проведении реакции фотовосстановления бактериальных пигментов дифференциальную спектроскопию (свет — темнота), мы не обнаружили образования продуктов, отличных от форм

* *Обозначения*: *БХл* — бактериохлорофилл, *БФ* — бактериофеофитин, *Хл* — хлорофилл, *Ф* — феофитин, *Т* — темнота.

БХл660 и БФ640. Можно предположить, что в изучаемой нами системе фотовосстановление бактериохлорофилла идет путем одноэлектронного переноса между лигментом и сернистым натрием с образованием ион-радикала ($\cdot$БХл$^-$). Такой механизм был показан для восстановления бактериохлорофилла гидрохиноном в спирте [7].

Спектральная характеристика восстановленных продуктов, представленных на схемах 1 и 2, недостаточна для суждения об их природе, и на очереди стоит химическая идентификация различающихся по спектрам фотопродуктов.

* * *

В измерениях дифференциальных спектров поглощения и спектров флуоресценции бактериальных пигментов участвовала Е. Бабаджанян.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Войновская К. К., Докл. АН СССР, **81**, 879, 1951.
2. Красновский А. А., Пакшина Е. В., Докл. АН СССР, **135**, 1258, 1960.
3. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Докл. АН СССР, **96**, 1201, 1954.
4. Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Биофизика, **8**, 191, 1963.
5. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А., Биофизика, **6**, 392, 1961.
6. Сидоров А. Н., Теренин А. Н., Докл. АН СССР, **145**, 1092, 1962.
7. Умрихина А. В., Бубличенко Н., Красновский А. А., Биофизика, **18**, № 3, 565, 1973.

Поступила в редакцию
25.IV.1973

STUDY OF PHOTOREDUCTION OF BACTERIOCHLOROPHYLL, CHLOROPHYLL AND THEIR MAGNIUM-FREE DERIVATIVES WITH SODIUM SULPHIDE AND HYDROGEN SULPHIDE

E. V. PAKSHINA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Bacteriochlorophyll, chlorophyll a and their magnium-free derivatives when photoreduced with sodium sulphide and hydrogen sulphide form both stable reduced forms and more labile ones, which form the initial pigment soon after the admission of air oxygen. Schemes are given which sum up the formation of these products with the given electron donors. Sodium sulphide is capable of reducing the pigments in the darkness with the formation of products whose spectrum differs from that of photoproducts. The nature of intermediate products of photoreduction is discussed.

---

(10)

Reprinted from:
THE ORIGIN OF LIFE
AND EVOLUTIONARY BIOCHEMISTRY
Edited by K. Dose, S. W. Fox,
G. A. Deborin, and T. E. Pavlovskaya
(Plenum Press, 1974)

CHEMICAL EVOLUTION OF PHOTOSYNTHESIS: MODELS AND HYPOTHESES

A. A. Krasnovsky

A. N. Bakh Institute of Biochemistry

Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The life on our planet depends on photosynthesis of plants providing organic matter and oxygen to all the organisms living on the Earth. Now the question arises: does the origin of life on the Earth depend on photosynthesis too?

A. I. Oparin presented convincing arguments that photosynthesis was developed after the primary heterotrophs originated, their metabolism having been based on the use of organic matter of abiogenic origin (1).

The study of the pathways of biological evolution is based on the data of comparative biology of contemporary organisms and on paleontological information on the development of ancient species. Blue-green algae are usually regarded as the most ancient photosynthetic organisms.

A plausible hypothesis is that the blue-green alga and photosynthetic bacteria had a common precursor, a primitive autotrophic organism, which has not been found yet on the Earth or in the ancient rocks.

To trace the pathways of prebiotic evolution, experimental data derived from different sources of information are used (2,3).

Chemical analysis of ancient rocks and meteorites can provide data on the nature of primary carbonaceous matter. With success in space exploration, the samples from the planets will be available for chemical analysis. The spectroscopy of stars and interstellar space provides us with valuable information on the nature and transformations of organic and inorganic substances in the Universe.

Impressive data were obtained by simulating in the laboratory the reactions in models of the primary reducing atmosphere under the influence of ultraviolet, visible, and corpuscular radiation, radioactivity and electric discharges [see reviews (4,5)].

The model experiments thus sustained the hypothesis of the accumulation of highly active organic and inorganic substances in a primary ocean.

Diverse organic substances of abiogenic origin in the primary soup could chemically interact one with another in aqueous solution, being adsorbed by minerals or in structures of protobionts. These reactions could be accelerated in general by catalysis or photochemical activation. I wish to present here some model experiments which may be relevant to constructing a hypothetic picture of photochemical evolution.

CATALYSIS OR PHOTOCHEMISTRY?

In the case of an abundance of chemically active substances in the primary soup, the redox reactions would probably have determined the pattern of primary energetic metabolism.

As catalysts of these reactions, various inorganic components of the Earth's crust may have been involved, the catalytic action having been enhanced by complexing with organic ligands of abiogenic origin such as simple organic bases.

Along with components having catalytic properties, there were on the primary Earth inorganic and organic substances, such as abiogenic tetrapyrrole compounds, possessing photosensitizing activity.

At the first International Symposium on the Origin of Life (6) we stated the assumption that the photochemical activation of catalysts similar to contemporary coenzymes might be an intermediary metabolic step in light energy utilisation. The photochemical activity of flavin coenzymes was known at that time. Later we studied the photochemical activation of reduced pyridine nucleotides and analogs excited by near ultraviolet radiation (365 nm) (cf. 7). Photochemical activation enhanced NAD·H oxidation by electron acceptor molecules including viologens which have a more negative redox potential than pyridine nucleotides (8). In the latter case it was possible to store some light energy in the reaction products:

$$\text{NAD·H + Viologen} \longrightarrow \text{NAD + reduced Viologen}$$

We recently revealed catalytic action of quinones in cytochrome

c autoreduction. Blue light absorbed by quinones greatly enhanced this reaction (9).

The superposition of catalytic and photosensitizing activity is pronounced in this case.

$$\text{electron donor} \xrightarrow{e} \underset{\downarrow\ h\nu}{\overset{\text{blue light}}{\text{quinones}}} \xrightarrow{e} \text{cytochrome } Fe^{+++}$$

The photochemical activity of cytochromes and other Fe-porphyrins proper is negligible as compared to the strong activity of magnesium complexes, the latter being able to effect photosensitization (to the red part of the spectrum) for the redox transformations of cytochromes.

The examples of a possible transition from a heterotrophic to an autotrophic mode of metabolism may be found in an extensive literature on the action of light on the metabolism of contemporary heterotrophs, for instance fungi (10).

These chlorophyll-deficient organisms usually contain photochemically active pigments--flavins and porphyrins--as intermediates in heme biosynthesis. In our laboratory were revealed Zn-porphyrins in various types of organisms using phosphorescence action spectra measurements in the cells (11). Finally, photochemically active reduced NAD and NADP are universal cell components.

We proposed (6) that in the course of evolution the photosensitizing and biocatalytic functions became specialized. A good example is to compare the properties of iron and magnesium porphyrins, the latter being effective photosensitizers inactive in the dark and extremely active when excited. On the contrary, the biocatalysts--iron porphyrin complexes--being extremely active in the dark, are practically inactive in light.

The significance of photosensitized substrate activation became more important in the course of exhaustion of active substances in the primary ocean.

It is generally considered that on the primary Earth there was no ozone layer in the upper parts of the atmosphere to absorb the shortwave ultraviolet radiation of the Sun. But the water layer absorbs shortwave ultraviolet too. So, in the case of reactions occurring in the ocean the primary photochemical reactions required sensitization to the longer wavelengths of the solar spectrum. In general, the primary photoreceptors-photosensitizers could have been either of inorganic or organic nature.

INORGANIC PHOTOSENSITIZERS

In the literature on chemical evolution, the use of inorganic photoreceptors has not yet been considered. But some inorganic substances that are components of the Earth's crust possess photosensitizing activity. They could play the role of primary photosensitizers. It is surprising that the oxides of titanium, zinc and tungsten possess high photosensitizing activity in redox reactions comparable with the activity of porphyrins and chlorophylls. These compounds are able to sensitize reactions with light energy storage in terminal stable products (12,13).

It was shown in our laboratory that titanium, zinc, and tungsten oxides under the action of ultraviolet radiation (365 nm) are able, in water media, to photosensitize oxygen evolution coupled with exogenous electron acceptor reduction (ferric ions, ferricyanide ions, p-benzoquinone were used).

The reaction follows the stoichiometry:

$$2\ Fe^{+++} + H_2O \longrightarrow 2\ Fe^{++} + 2\ H^+ + 1/2\ O_2$$ *

The origin of oxygen from the water molecules was recently confirmed experimentally with heavy water labelled by oxygen: $H_2{}^{18}O$ (14). The quantum yield of the reactions studied (Table I) ran up to 1%.

Table I

Photosensitization of Redox Reactions by TiO_2, ZnO and WO_3 (365 nm)

Electron donor	Electron acceptor	Reaction products
H_2O	Fe^{+++}, $Fe(CN)_6^{+++}$	Oxygen, Fe^{++}, $Fe(CN)_6^{++}$
H_2O	p-Benzoquinone	Oxygen, hydroquinone
H_2O	Viologens	Reduced viologens,
Glycine	Redox-dyes	Dyes
Hydrazine		Oxidized electron
Thiourea, etc.		donor

*I doubt that oxygen evolved on the primitive Earth according to this equation; these experiments demonstrate only that inorganic photosensitizers may do the same work as porphyrins.

These experiments reproduce the Hill reaction or the photosystem II of photosynthesis. When oxygen is used as a final electron acceptor it is possible to reproduce the chloroplast Mehler reaction accompanied by hydrogen peroxide formation. Finally, inorganic photocatalysts are able to photosensitize viologens' reduction running up to the redox potential of the hydrogen electrode (15). So the action of photosystem I can also be simulated by using inorganic photocatalysts. The mechanism of photocatalytic reactions may be the following.

As a result of light quantum absorption by the crystalline lattice of the photocatalyst-semiconductor the electron transition from valence band to conduction band proceeds.

At the phase boundary, photocatalytic particles/aqueous solution molecules-electron donors and acceptors are absorbed on the electron-accepting and electron-donating active centers of the photocatalytic surface. The primary redox reaction is realized by interaction of electron donor with a hole and acceptor with electron.

The dismutation of primary radicals on the catalytic surface takes place, in the case of oxygen evolution--recombination of OH radicals leading to oxygen evolution (see scheme).

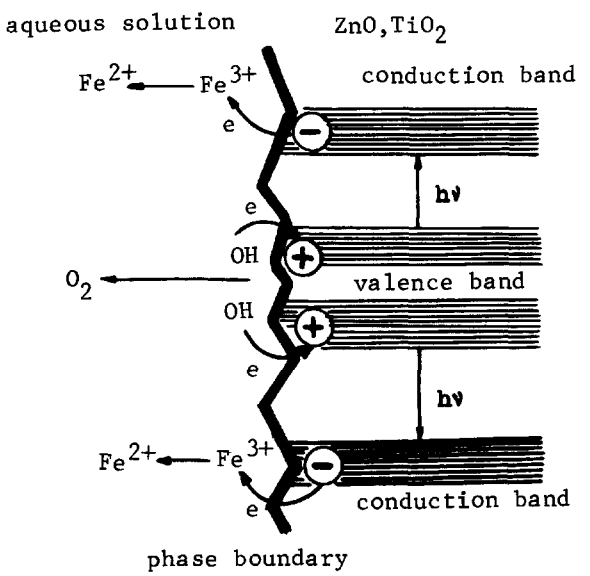


Figure 1. Visualized scheme of photocatalytic oxygen evolution on the photocatalyst surface.

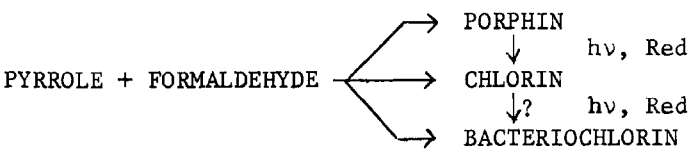
These observations point to a feasible mode of involvement of inorganic photosensitizers into the structure of portobionts. Nevertheless, none of the existing organisms includes inorganic sensitizers in the patterns of their metabolism; those were probably "blind alleys" in the growth of the evolutionary tree.

In the course of evolution, most effective catalysts and photosensitizers had been developed by bonding inorganic ions to organic ligands, the porphyrin cycle being most widespread.

ABIOGENIC SYNTHESIS OF PORPHYRINS

Rothemund in 1936 (16) described the synthesis of porphin from pyrrole and formaldehyde. This reaction is thermodynamically spontaneous, proceeding slowly at room temperature in the dark in the presence of some catalysts. The presence of oxidants (oxygen, quinones) enhances the synthesis of porphin since the condensation of pyrrole and formaldehyde proceeds with abstraction of hydrogen.

In the solution of pyrrole and formaldehyde not only porphin but also more reduced compounds are formed: chlorin and bacteriochlorin (17). The synthesis and analysis of the most reduced substances requires anaerobiosis as these pigments are spontaneously oxidized in the presence of the oxygen of air. Chlorin may be formed from porphin not only by condensation of pyrrole and formaldehyde but via photoreduction of porphin too. The following scheme summarizes the processes listed above:



Our studies have shown that interaction between pyrrole and formaldehyde is catalyzed by some components of the Earth's crust, silica, titanium dioxide, and zinc oxide and some organic substances among them tryptophan, which is most active (17).

When analyzing ancient rocks and samples from planets it is necessary to search alongside with porphin, the more reduced pigments--chlorins and bacteriochlorins.

All these compounds are photochemically active; they possess photosensitizing activity and are capable of undergoing reversible photooxidation and photoreduction. However, in organisms free porphyrins are found mostly as intermediates of biosynthesis; among photosynthetic organisms magnesium complexes of porphyrins dominate and among catalysts, iron complexes dominate. The

possibility of choosing the appropriate central metal atom in the porphyrin cycle in the process of evolution is illustrated by the following suggestion. The most widespread elements in the Earth's crust are Si (27.6%), Al (8.5%), Fe (5%), Ca (3.5%), Na (2.6%), K (2.5%), Mg (2%), Ti (0.6%).

The compounds of silicon and titanium are practically insoluble in water; this insulubility probably prevented the incorporation of these metals into porphyrin complexes. Complexes of Na, K and Ca with porphyrins are hydrolyzed in aqueous media. Only complexes of magnesium and iron are sufficiently stable to win in the competition. These complexes, having auxiliary coordination vacancies perpendicular to the plane of the porphyrin ring, are also capable of bounding reacting molecules. In the course of evolution, they made it possible to bind specific proteins.

The vanadyl and nickel porphyrins have been found in petroleum; they are probably formed as a result of chlorophyll degradation and central magnesium atom substitution.

The principal difference of magnesium porphyrin complexes from the ferric ones is that the first are active only after excitation by light quanta being converted into singlet or triplet excited states.

The studies in our laboratory have shown that excited porphyrins and their magnesium and zinc complexes are capable of reversible photochemical reduction or oxidation, that is, of accepting or donating an electron to the partner molecule (see scheme and review of ref. 18).

In the case of most longwave photosynthetic pigments, bacteriochlorophyll of Rhodopseudomonas viridis, the ability to reversible photooxidation is highly pronounced (19).

Reversible photoreduction: $P^* + Red \rightarrow \cdot P^- + \cdot Red^+$

Reversible photooxidation: $P^* + Ox \rightarrow \cdot P^+ + \cdot Ox^-$

In the triple system composed of molecules: electron donor (Red), electron acceptors (Ox) and pigment-excited molecules (P*) the photosensitization of the electron transport from Red molecules to Ox molecules proceeds at the expense of light energy absorbed by pigment molecules.

$$Red \xrightarrow{e} \text{excited pigment} \xrightarrow{e} Ox$$

Porphyrins can be incorporated into proteinoid structures as demonstrated in the experiments of Dose (20).

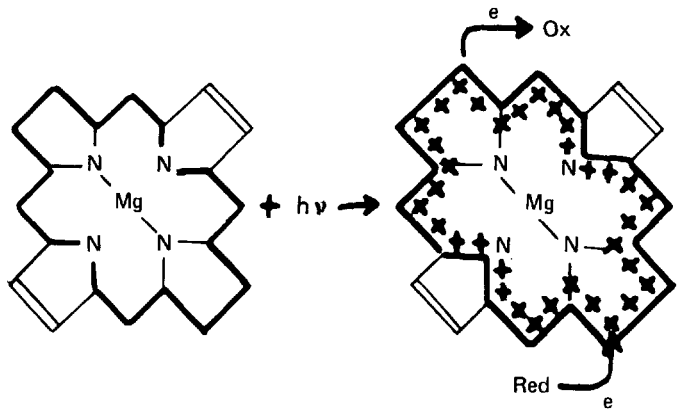


Figure 2. Excited (singlet or triplet) porphyrin molecule reversible interaction with electron donors (Red) and acceptors (Ox). To visualize: electron which is excited leaves an electron vacancy (+) behind.

In the case of more complicated protobionts having lipoproteinaceous membranes, the ability of porphyrins to incorporate the lipophilic tail into pigment molecules in this membrane is required. In the case of chlorophyll this tail is phytol, in the case of bacterioviridin, farnesol.

It should be noted that the lipophilic tail does not influence the photochemical properties of the pigment that are determined mainly by the porphyrin ring of the molecule.

EVOLUTION OF PIGMENTS AND EXCITATION ENERGY MIGRATION

The ancestors of photosynthetic organisms probably possessed small quantities of pigments directly participating in photochemical electron transfer as the effective pigment biosynthetic system was not yet developed. As far as the catalysts-enzymes are concerned they are active in very low concentrations; on the contrary, the quantity of pigment-photosensitizer must be very high to absorb effectively the Sun's radiation so as to win in the competition for survival.

In contemporary organisms, the energy of light quanta absorbed by aggregated pigments migrate to a minor part of the pigment functioning in the so-called "active center."

The development of metabolism in the course of biological evolution gradually led to the appearance of effective biosynthesis of chlorophylls, phycobilins and carotenoids.

When protobionts were formed, different types of pigment could enter into their structure. Various primary prophotobionts possessed different sets of pigments--carotenoids, linear or cyclic tetrapyrroles and various combinations of these pigments.

But only aggregated magnesium-porphyrins possessed the most longwave absorption band prerequisite to playing a role as a final trap of energy migration. Phycobilins have absorption bands in the shorter wavelengths of the spectrum, their high photochemical stability is favorable to their participation as an energy donor in the energy migration chain.

The organisms that survived acquired a combination of all types of pigment (chlorophylls, phycobilins and carotenoids), effectively absorbing most of the energy of the solar spectrum channelling the excitation energy to the longest wave trap--active centers. Such an organism is the blue-green alga.

It is remarkable that in the case of inorganic photosensitizers (TiO_2, ZnO) there exists a mechanism of energy migration from the bulk crystal lattice to the active center where the primary photoprocess is realized.

COUPLING OF PHOTOCHEMICAL AND CATALYTIC REACTIONS

Thus it is possible to suppose that a primary photocatalytic block of chemical and biological evolution comprised the ternary system: electron donor-pigment-electron acceptor. This system works efficiently not only in models but also in biologically organized structures (21).

The photochemical and catalytic electron transport chains were improved by diverse coupling of the primary photocatalytic blocks into the primary protobiont membranes. In the processes of biological evolution diverse combinations of photocatalytic blocks were realized. It is possible to trace several types of primitive photocatalytic electron transfer; we begin with noncyclic electron transfer. The excited pigment molecule reduces the activation energy and the overall reaction is thermodynamically possible ($-\Delta F$); here the photosensitizer acts as a photocatalyst.

$$Red + Ox + (P) \rightarrow Red_{ox} + Ox_{red} + (P)$$

Another type of reaction which is more important for the use of an inactive hydrogen donor, that is the water molecule, is the overall process accompanied by increase of free energy of the system ($+ \Delta F$). This case can be reproduced in a model system--in solutions of chlorophyll; here pyridine nucleotides and other electron acceptors are photoreduced at the expense of ascorbic acid as

an electron donor. This case was studied in our laboratory (22, etc.).

$$\text{Ascorbate} + \text{NAD} + (\text{CHL}) \xrightarrow{\text{red light}} \text{Ascorbate}_{ox} + \text{NAD}\cdot\text{H} + (\text{CHL})$$

The modelling of Hill's reaction photosensitized by inorganic semiconductors also proceeds with a gain of free energy (see above).

It is possible to presume a primitive cyclic electron transfer coupled with phosphorylation. In the cyclic processes, Mg or Fe porphyrin may participate; chlorophyll and porphyrins photosensitize effectively oxido-reductive transformations of cytochromes. But the coupling of such cyclic electron transfer with ATP formation has not yet been achieved in any model systems.

On the other hand, the formation of high energy phosphate esters in model reactions was described by Ponnamperuma, Wang, et al. In the experiments of Lohrmann and Orgel (23) the urea and inorganic phosphate mixture was an efficient phosphorylating agent.

It was found by Arnon (24) and Kamen (25) that ancient photosynthetic organisms (photosynthetic bacteria) possess both types of electron transfer, noncyclic and cyclic coupled with photophosphorylation. So, we may conclude that the primitive "bricks" of electron transfer may be used in biological evolution.

If the metabolism of contemporary photosynthetic organisms possesses rudiments of primary metabolic pathways, we must take into account their ability to heterotrophic existence and to use molecular hydrogen as an electron donor.

The use of water as an ultimate electron donor in more perfect photosynthetic organisms required coupling of two photoreactions for electron transport from water to pyridine nucleotides via ferredoxins (24), in other words, the coupling of two photocatalytic "bricks" which are denoted, according to contemporary ideas, as photosystems I and II.

The chemical and biological evolution from simple photocatalytic reactions to the perfectly organized systems of photosynthetic electron transfer required probably more than two billion years. The model experiments represent a plausible explanation of the various stages of chemical evolution; however, only future experimental data derived from geology and exobiology will probably reveal the real nature of the process.

SUMMARY

The primary metabolism of protobionts was probably based on the electron transfer reactions regulated by catalysts or photosensitizing pigments. The action of photoreceptive pigments was inevitable in the case of electron transfer leading to light energy storage in the reaction products. The primitive tetrapyrrolic pigments formed abiogenically (porphin, chlorin) as well as their more complicated biogenic analogs (chlorophylls) are capable of photosensitizing electron transfer in systems, having various degrees of molecular complexity. The inorganic photosensitizers (titanium dioxide, zinc oxide, etc.), being excited in the near ultraviolet, are able to perform the same reactions as porphyrins--electron transfer from donor to acceptor molecule (including photoreduction of viologens) or water molecule photooxidation (oxygen liberation), coupled with reduction of ferric compounds and quinones. The inorganic photosensitizers are not used in biological evolution; actually the inorganic ions entered into tetrapyrrolic cycle, forming effective photocatalysts. Inclusion of pigments into primary membranes led to elaborated coupling between pigments and enzymatic systems. The involvement of the excited pigments into the biocatalytic electron transfer chain was prerequisite to effective function of photosynthetic organisms.

REFERENCES

1. Oparin, A. I., "Origin of Life on Earth," Izd. AN SSSR, Moscow, 1957.

2. Gaffron, H., in: "Horizons in Biochemistry" (Kasha, M., and Pullmann, B., eds.), p. 59, Academic Press, New York, 1962.

3. Calvin, M., "Chemical Evolution," Clarendon Press, Oxford, 1969.

4. Pasynsky, A. G., and Pavlovskaya, T. E., Uspekhii khimii 33, 1198 (1964).

5. Ponnamperuma, C., Quart. Rev. Biophys. 4, 77 (1971).

6. Krasnovsky, A. A., in: "Origin of Life on Earth" (Oparin, A. I., et al., eds.), p. 606, Pergamon Press, New York, 1959.

7. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., review in "Problems of Evolution and Technical Biochemistry" (Kretovich, V. L., ed.), p. 221, Izd. Nauka, Moscow, 1964.

8. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., Dokl. AN SSSR 163, 761 (1965).

9. Krasnovsky, A. A., and Mikhailova, E. S., Dokl. AN SSSR 212, 237 (1973).

10. Kritzky, M. S., in this volume.

11. Shuvalov, V. A., and Krasnovsky, A. A., Molekularnaja biologia 5, 698 (1971).

12. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., Dokl. AN SSSR 147, 654 (1962).

13. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., review in "Molecular photonics," p. 161, Izd. Nauka, 1970.

14. Fomin, G. V., Brin, G. P., Genkin, M. V., Lubimova, A. K., Blumenfeld, L. A., and Krasnovsky, A. A., Dokl. AN SSSR 212, 424 (1973).

15. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., Dokl. AN SSSR 213, 207 (1973).

16. Rothemund, P., J. Am. Chem. Soc. 58, 625 (1936).

17. Krasnovsky, A. A., and Umrikhina, A. V., in: "Molecular Evolution: Prebiological and Biological" (Rohlfing, D. L., and Oparin, A. I., eds.), p. 141, Plenum Press, New York, 1972.

18. Krasnovsky, A. A., Biophys. J. 12, 749 (1972).

19. Krasnovsky, A. A., Bokuchava, E. M., and Drozdova, N. N., Dokl. AN SSSR 211, 981 (1973).

20. Dose, K., and Zaki, L., in: "Chemical Evolution" (Buvet, R., and Ponnamperuma, C., eds.), Vol. 1, p. 263, North-Holland, Amsterdam, 1971.

21. Krasnovsky, A. A., in: "Chemical Evolution" (Buvet, R., and Ponnamperuma, C., ed.), Vol. 1, p. 279, North-Holland, Amsterdam, 1971.

22. Krasnovsky, A. A., and Brin, G. P., Dokl. AN SSSR 67, 325 (1949).

23. Lohrman, R., and Orgel, L. E., Science 171, 494 (1971).

24. Arnon, D. I., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2883 (1971).

25. Kamen, M. D., "Primary Processes in Photosynthesis," Academic Press, New York, 1963.

PATHWAYS OF CHEMICAL EVOLUTION OF PHOTOSYNTHESIS

A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Science of the U.S.S.R., Moscow, U.S.S.R.

Abstract. The primary metabolism of protobionts was probably based on the electron transfer reactions regulated by catalysts or photosensitizing pigments. The action of photoreceptive pigments was inevitable in the case of electron transfer leading to light energy storage in the reaction products. The primitive tetrapyrrolic pigments formed abiogenically (porphin, chlorin) as well as their more complicated biogenic analogs (chlorophylls) are capable to photosensitize electron transfer in systems, having various degree of molecular complexity. The inorganic photosensitizers (titanim dioxide, zinc oxide, etc.). being excited in near UV are able to perform the same reactions as porphyrins – electron transfer from donor to acceptor molecule (including photoreduction of viologens) or water molecule photooxidation (oxygen liberation), coupled with reduction of ferric compounds and quinones. The inorganic photosensitizers are not used in biological evolution; actually the inorganic ions entered into tetrapyrrolic cycle, forming effective photocatalysts. Inclusion of pigments into primary membranes led to elaborated coupling between pigments and enzymatic systems. The involvement of the excited pigments into the biocatalytic electron transfer chain served as prerequisite of effective function of photosynthetic organisms.

The life on our planet depends on photosynthesis of plants providing organic matter and oxygen to all the organisms living on the Earth. Now the question arises: does the Origin of Life on the Earth depend on photosynthesis too?

The study of the pathways of biological evolution is based on the data of comparative biology of contemporary organisms and on paleontology, providing information on the development of ancient species. The most ancient photosynthetic organisms blue-green algae and photosynthetic bacteria are usually considered; more simple photoautotrophes are not found on the Earth.

A. I. Oparin presented convincing arguments that photosynthesis was developed after the primary heterotrophes were originated, their metabolism being based on the use of organic matter of abiogenic origin (Oparin, 1957).

To trace the pathways of prebiotic evolution experimental data derived from different sources of information are used (Gaffron, 1962; Calvin, 1969).

Chemical analysis of ancient rocks and meteorites would provide data on the nature of primary carbonaceous matter; due to the success of space exploration the samples from the Planets will be available for chemical analysis; the spectroscopy of stars and interstellar space provides us with valuable information on the nature and transformations of organic and inorganic substances in the Universe.

Impressive data were obtained by modeling in laboratory the reactions in primary reducing atmosphere under the influence of UV, visible, and corpuscular radiation of the Sun, radioactivity and electric discharges (Ponnamperuma, 1971).

The model experiments sustained the hypothesis on the accumulation of highly active organic and inorganic substances in primary ocean.

Origins of Life **5** (1974) 397–404. *All Rights Reserved*
Copyright © 1974 by D. Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland

Diverse organic substances of abiogenic origin in primary soup could chemically interact one with another in aqueous solution, in adsorbed state or in structures of protobionts. These reactions could be accelerated in general by catalysis or photochemical activation. I wish to present here some model experiments which may be useful to construct a hypothetic picture of the photochemical evolution.

1. The Photochemical Activation of Coenzymes

In the case of abundance of chemically active substances in the primary soup there was probably no need in the photochemical mode of substrate activation. The primary energetic metabolism was controlled by catalytic systems probably similar to contemporary coenzymes.

At the first International Symposium on the Origin of Life held in Moscow in 1957 we assumed that the photochemical activation of some coenzymes might be an intermediary metabolic step in light energy utilization (Krasnovsky, 1959). The photochemical activity of flavine coenzymes was known at that time. Later we studied the photochemical activation of reduced pyridinenucleotides and analogs excited by near UV radiation (365 nm) (Krasnovsky and Brin, 1964). Photochemical activation enhanced NADH oxidation by electron acceptor molecules including viologens which have more negative redox potential as pyridinenucleotides. In the latter case it was possible to store some light energy in the reaction products.

$$\text{NADH}^* + \text{Viologen} \longrightarrow \text{NAD} + \text{reduced Viologen}$$

Recently we revealed photochemical activity of some biocatalytically active quinones in cytochrome *c* reduction.

In the course of evolution the photosensitizing and biocatalytic function become specialized. A good example is to compare the properties of iron and magnesium porphyrines, the latter being an effective photosensitizer inactive in the dark and extremely active when excited. On the contrary the biocatalysts – iron porphyrine complexes – being extremely active in the dark are practically nonactivated by light.

The significance of photosensitized substrate activation becomes more important in the course of exhaustion of active substances in the primary ocean.

It is generally considered that on the primary Earth there was no ozone layer in the upper parts of atmosphere absorbing now the shortwave UV radiation of the Sun. But the water layer absorbs shortwave UV too. So, in the case of reactions occurring in the ocean the primary photochemical reactions required sensitization to the more longwave part of the solar spectrum. In general, the primary photoreceptors-photosensitizers could be either of inorganic or organic nature.

2. Inorganic Photosensitizers

In the literature on chemical evolution the use of inorganic photoreceptors was not yet considered. But some inorganic substance which are components of the Earth's

crust possesses photosensitizing activity. They could play a role of primary photosensitizers. It is surprizing that the oxides of titanium, zinc and tungsten possesses high photosensitizing activity in redox reactions comparable with the activity of porphyrines and chlorophylls. These compounds are capable to sensitize reactions with light energy storage in terminal stable products (Krasnovsky and Brin, 1970).

It was shown in our laboratory that titanium, zinc and tungsten oxides under action of UV radiation (365 nm) are capable in water media to photosensitize oxygen evolution coupled with exogeneous electron acceptors reduction (ferric ions, ferricyanide

TABLE I

Photosensitization of redoxreactions by TiO_2, ZnO and WO_3 (UV 365 nm)

Electron donor	Electron acceptor	Reaction products
H_2O	Fe^{+++}, $Fe(CN)_6^{+++}$	Oxygen, Fe^{++}, $Fe(CN)_6^{++}$
H_2O	p-benzoquinone	Oxygen, hydroquinone
H_2O	Viologens	Reduced viologens, dyes
Glycin	Redox-dyes	Oxidized electron donor
Hydrazin		
Thiourea, etc.		

ions, p-benzoquinone were used; see Table I. The quantum yield of the reactions studied run up to 1%. These experiments demonstrate working models of Hill's reaction or the so called Photosystem II of photosynthesis.

We have also created models of the Photosystem I using viologens as final electron acceptors in experiments accomplished *in vacuo*.

These observations point to the feasible mode of involvement of inorganic photosensitizers into the structure of protobionts. Nevertheless, since none of the existing organisms includes inorganic sensitizers in the patterns of their metabolism, they being probably 'blind alleys' of the evolutionary tree.

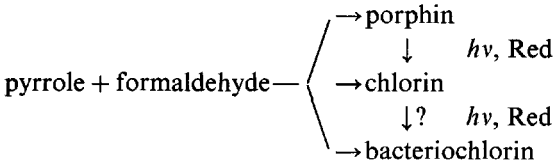
In the course of evolution the most effective catalysts and photosensitizers had been developed by bonding inorganic ions to organic ligands, the porphyrin ring being most widespread.

3. Abiogenic Synthesis of Porphyrins

Rothemund (1936) described the synthesis of porphin from pyrrole and formaldehyde. This reaction is thermodynamically spontaneous, proceeding slowly at room temperature in the dark in the presence of some catalysts. The presence of oxidants (oxygen, quinones) enhances the synthesis of porphin since the condensation of pyrrol and formaldehyde proceeds with hydrogen abstraction.

In the solution of pyrrole and formaldehyde not only porphin but also more reduced compounds are formed: chlorin and bacteriochlorin (Krasnovsky and Umrikhina, 1972). The synthesis and analysis of the most reduced substances requires

anaerobiosis as these pigments are spontaneously oxidized in the presence of air oxygen. Chlorin may be formed from porphin not only by condensation of pyrrole and formaldehyde but via photoreduction of porphin too. The following scheme resumes the processes listed above:



Our studies show that interaction between pyrrole and formaldehyde is catalysed by some Earth crust components: silica, titanium dioxide and zinc oxide and some organic substances among them tryptophane which is most active.

When analyzing ancient rocks and samples from planets it is necessary to search simultaneously with porphin, the more reduced pigment – chlorins and bacteriochlorins.

All these compounds are photochemically active; they possess photosensitizing activity and are capable of undergoing reversible photooxidation and photoreduction.

However, in organisms free porphyrines are found mostly as intermediates of biosynthesis; among photosynthetic organisms magnesium complexes of porphyrines dominate and among catalysts–iron complexes.

The possibility of choosing the appropriate central metal atom in the porphyrine ring in the process of evolution is illustrated in Table II.

The compounds of silicon and titanium are practically insoluble in water this is what probably prevented the incorporation of these metals into porphyrine complexes. Na, K and Ca complexes of porphyrines are hydrolysed in water media. There are only complexes of magnesium and iron which are sufficiently stable to win the competition. These complexes have auxiliary coordination vacancies perpendicular to the plain of the porphyrine ring thus are capable of bounding reacting molecules. In the course of evolution, they became the property which made it possible to bound specific proteins.

TABLE II

Possible incorporation of the Earth's crust metals into a porphyrine ring

Element	% % in Earth crust	Activity of porphyrine complex	
		Photochemistry	Catalysis
Si	27.6	insoluble in water media	
Al	8.5		
Fe	5.0	–	+
Ca	3.5		
Na	2.6	hydrolysed in water	
K	2.5		
Mg	2.0	+	–
Ti	0.6	insoluble in water media	

The principle difference of magnesium porphyrine complexes to the ferric complexes is that the first are active only after excitation by light quanta and are converted into singlet or triplet excited states.

Studies in our laboratory showed that excited porphyrines and their magnesium and zinc complexes are capable of reversible photochemical reduction or oxidation, that is, to accept or donate an electron to a partner molecule (Krasnovsky, 1972), see Table III.

$$\text{Reversible photoreduction: } P^* + \text{Red} \rightleftarrows \cdot P^- + \cdot \text{Red}^+$$
$$\text{Reversible photooxidation: } P^* + \text{Ox} \rightleftarrows \cdot P^+ + \cdot \text{Ox}^-$$

TABLE III

Electron donors (Red) and acceptors (Ox) in photoredox reactions of porphyrines

Electron donors	Electron acceptors
Dienols	Oxygen
SH-compounds	Ferric compounds
Ferrous compounds	Quinones
NADH, NADPH	Nitrocompounds
Hydroquinones	Dyes
Hydrazines	NAD
	Flavins, etc.

In the triple system composed of electron donor (Red), electron acceptors (Ox) and pigment-excited molecules (P*) the photosensitization of the electron transport from Red molecules to Ox molecules proceeds at the expense of light energy absorbed by pigment molecules.

$$\text{Red} \xrightarrow{e} \text{excited pigment} \xrightarrow{e} \text{Ox}$$

In the case of more complicated protobionts having lipoproteinic membranes, the ability of porphyrines to incorporate into this membrane required introduction of the lipophilic tail into pigment molecules. In the case of chlorophyll this tail belongs to phytol and in the case of bacterioviridin to farnesol.

It should be noted that the lipophylic tail does not influence the photochemical properties of the pigment determinated mainly by the porphyrine ring of the molecule.

4. Evolution of Excitation Energy Migration

The ancestors of photosynthetic organisms probably possessed small quantities of pigments which directly participated in the photochemical electron transfer since the effective pigment biosynthetic system had not yet developed. As far as the catalysts-enzymes are concerned they are active in very low concentrations; on the contrary, the quantity of pigment-photosensitizer must be very high to absorb effectively the Sun radiation so as to win the competition for survival.

In contemporary organisms the energy of light quanta absorbed by aggregated pigments migrate to a minor part of the pigment to function in the so called 'active center'.

The ancient photosynthetic organisms – blue-green algae already possess a fully developed energy migration system from phycobilins and a bulk of chlorophyll to the chlorophyll *a* in active center.

The development of metabolism in the course of biological evolution gradually led to the appearance of effective biosynthesis of chlorophylls, phycobilins, and carotenoids.

As the capacity of pigment biosynthesis increased in the course of evolution, the function of excitation energy migration inevitably developed. This energy migrated from the bulk of the pigment to the minor part of the pigment that existed previously.

It is remarkable that in the case of inorganic photosensitizers (TiO_2, ZnO) there exists a mechanism of energy migration from the crystal lattice to the active center where the primary photoprocess takes place.

5. Types of Photochemistry and Catalysis Coupling

Thus it is possible to suppose that primary photocatalytic block of chemical and biological evolution comprised the ternary system: electron donor-pigment-electron acceptor. This system works efficiently not only in models but in biologically organized structures, too (Krasnovsky, 1971a, b).

The photochemical and catalytic electron transport chains were improved by diverse coupling of the primary photocatalytic blocks incorporated into the primary protobiont membranes. In the processes of biological evolution diverse combinations of photocatalytic blocks were realized.

It is possible to trace several types of primitive photocatalytic electron transfer: we begin with noncyclic electron transfer. The excited pigment molecule decreases the activation energy and the overall reaction is thermodynamically possible ($-\Delta F$) here the photosensitizer acts as an photocatalyst.

$$\mathrm{Red} + \mathrm{Ox} + (\mathrm{P})^* \rightarrow \mathrm{Red_{ox}} + \mathrm{Ox_{red}} + (\mathrm{P})$$

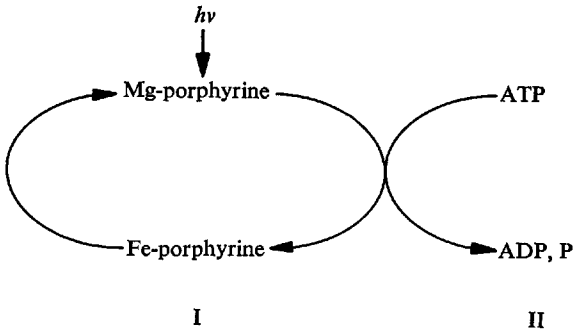
Another type of reaction which is more important for the use of an inactive hydrogen donor, that is the water molecule, is the overall process which is accompanied by the increase of free energy of the system ($+\Delta F$). This case is possible to reproduce in a model system – solutions of chlorophyll; here pyridinenucleotides and other electron acceptors are photoreduced at the expense of ascorbic acid as an electron donor. This case was studied in our laboratory:

$$\mathrm{Ascorbate} + \mathrm{NAD} + (\mathrm{CHL}) \xrightarrow{\text{red light}} \mathrm{Ascorbate_{ox}} + \mathrm{NADH} + (\mathrm{CHL})$$

A modelling of the Hill reaction photosensitized by inorganic semiconductors also proceeds with a gain of free energy (see above).

It is possible to presume a primitive cyclic electron transfer coupled with phos-

phorylation. In the cyclic processes Mg and Fe porphyrine may participate; the first cycle is reproduced in a model system: chlorophyll and porphyrins effectively photosensitize oxido-reductive transformations of cytochromes. But the coupling of such cyclic electron transfer with ATP-formation was not yet achieved in any model systems.



On the other hand the formation of high energy phosphate esters in model reactions was described by Ponnamperuma, Wang, etc. In the experiments of Lohrmann and Orgel the urea and inorganic phosphate mixture was an efficient phosphorylating agent.

It was found by Arnon and Kamen that ancient photosynthetic organisms (photosynthetic bacteria) possess both types of electron transfer: noncyclic and cyclic coupled with photophosphorylation. So we may conclude that the primitive 'bricks' of electron transfer may be used in biological evolution.

The use of water as an ultimate electron donor in more perfect photosynthetic organisms required the coupling of two photoreactions for electron transport from water to pyridinenucleotides via ferredoxins. In other words the coupling of two photocatalytic 'bricks' which is denoted, according to contemporary ideas, as photosystems I and II.

$$\underset{\text{II}}{\overset{h\nu}{\downarrow}} \qquad \underset{\text{I}}{\overset{h\nu}{\downarrow}}$$

$$H_2O \xrightarrow{e} (CHL) \xrightarrow{e} \text{Cytochromes} \xrightarrow{e} (CHL) \xrightarrow{e} Fd \xrightarrow{e} NADP$$

The chemical and biological evolution from simple photocatalytic reactions to the perfectly organized systems of photosynthetic electron transfer required probably more than two 2 b.y. The model experiments represent plausible explanation of the various stages of chemical evolution; however only the future experimental data derived from geology and exobiology would reveal the real nature of the process.

References

Calvin, M.: 1969, *Chemical Evolution*, Clarendon Press, Oxford.
Gaffron, H.: 1962, in M. Kasha and B. Pullman (eds.), *Horizons in Biochemistry*, Acad. Press, p. 59.

Krasnovsky, A. A.: 1959, *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, p. 606.
Krasnovsky, A. A.: 1971a, in R. Buvet and C. Ponnamperuma (eds.), *Molecular Evolution, I*, North Holland Publ., p. 279.
Krasnovsky, A. A.: 1971b, in A. Kimball and J. Oró (eds.), *Prebiotic and Biochemical Evolution*, North Holland Publ., p. 209.
Krasnovsky, A. A.: 1972, *Biophysical J.* **12**, 749.
Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P.: 1969, *Problems of Evolutionary and Technical Biochemistry* (in Russian), p. 221.
Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P., 1970, *Molecular Photonics* (in Russian), p. 161.
Krasnovsky, A. A. and Umrikhina, A. V.: 1972, in D. L. Rohlfing and A. I. Oparin (eds.), *Molecular Evolution, Prebiological and Biological*, Plenum Press, p. 141.
Oparin, A. I.: 1957, *Origin of Life on the Earth* (in Russian), U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow.
Ponnamperuma, C.: 1971, *Quart. Rev. Biophys.* **4**, 77.
Rothemund, P.: 1936, *J. Amer. Chem. Soc.* **58**, 625.

УДК 577.12

ИЗУЧЕНИЕ ФЕОФИТИНИЗАЦИИ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА

М. И. БЫСТРОВА, Е. В. ПАКШИНА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Изучена кинетика феофитинизации разных типов агрегированных форм хлорофилла *a* в твердых пленках и водно-метаноловых коллоидных растворах. Форма с максимумом поглощения при 730—735 *нм* имеет более высокую скорость феофитинизации по сравнению с формой ~680 *нм*. Форма 690 *нм*, получающаяся при обработке пленок парами диоксана, наиболее устойчива к действию кислоты. Длинноволновая форма под действием паров соляной кислоты подвергается дезагрегации, которая предшествует процессу замещения магния. Различие в скорости феофитинизации агрегированных форм разных типов связано с особенностями их молекулярной организации.

В предыдущей работе [1] мы провели сравнительное изучение деструктивного фотохимического окисления и фотосенсибилизирующей активности разных типов агрегированных форм хлорофилла *a* и бактериовиридина, обнаружив бóльшую скорость фотоокисления высокоагрегированных форм (725—730 *нм*) по сравнению с менее агрегированными формами (675—680 *нм*) и практически одинаковую фотосенсибилизирующую активность форм обоих типов.

Вопрос о том, как связана способность к феофитинизации с типами межмолекулярного взаимодействия, требовал разрешения. В литературе собран довольно большой материал по изучению феофитинизации хлорофилла и его аналогов в растворах [2—5].

При изучении кинетики замещения Mg на ионы H^+ в мономолекулярных слоях хлорофилла *a* [6] установлено, что скорость реакции пигмента в этом состоянии превышает скорость реакции в водном ацетоне. Это привело к предположению о специфической ориентации молекул в монослое, направленных отрицательными дипольными концами в сторону водной фазы.

В нашей лаборатории [7] была обнаружена бóльшая устойчивость к феофитинизации у хлорофилла *a in vivo*, а также в адсорбированном состоянии по сравнению с мономерными формами пигмента. При этом было установлено, что хлорофиллы *a* и *b* в листьях и гомогенатах так же, как в растворах, имеют различную реакционноспособность. Рассчитаны константы скоростей феофитинизации этих пигментов и величины энергии активации в водных коллоидных растворах [8]; обнаружена довольно значительная устойчивость к действию кислоты у хлорофилла *a* в составе искусственного комплекса с белковым компонентом молока [9].

При изучении феофитинизации бактериохлорофилла в составе естественного пигмент-белкового комплекса, выделенного из зеленых фотосинтезирующих бактерий [10, 11], были получены результаты, свидетельствующие о наличии по меньшей мере двух стадий в этом процессе, связанных с изменением состояния компонентов комплекса при действии кислоты. Обнаружено различие скоростей феофитинизации двух форм бактериохлорофилла (с поглощением 800 и 880 *нм* соответственно) у

пурпурных бактерий и получено указание на дезагрегацию, предшествующую процессу собственно феофитинизации [12].

Таким образом, систематического сравнительного изучения феофитинизации разных типов агрегированных форм хлорофилла *а* ранее не проводилось; имеющиеся сведения относительно связи способности к феофитинизации с состоянием пигментных молекул недостаточны.

В данной работе была поставлена задача сравнительного изучения способности к феофитинизации агрегированных форм хлорофилла *а*, различающихся степенью и характером межмолекулярного взаимодействия, получаемых в твердых пленках и водно-метаноловых растворах пигмента. Феофитинизацию агрегированных форм следовало сопоставить с феофитинизацией пигмента в растворе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Твердые пленки получали испарением в вакууме серного эфира из раствора хлорофилла *а* ($2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*) [13]. На получение каждой пленки использовали 0,5 *мл* раствора. Коллоидные растворы получали разбавлением раствора хлорофилла *а* ($2 \cdot 10^{-5}$ *М*) в метиловом спирте слабым раствором КОН [11]. В опытах использовали хроматографически чистый препарат хлорофилла *а*, выделенный из сухих листьев крапивы по методу, принятому в нашей лаборатории.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Феофитинизация хлорофилла *а* в твердых пленках. Объектами исследования были твердые пленки следующих трех типов (рис. 1, спектры *1—3*).

Пленки с основным максимумом поглощения 675—680 *нм* получали путем испарения и последующей эвакуации эфира на форвакуумном насосе в течение 30 *мин* при 20° (спектр *1*).

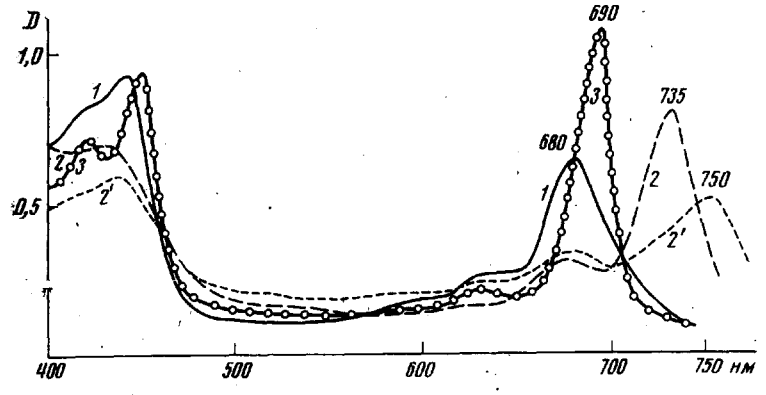


Рис. 1. Типы твердых пленок хлорофилла *а*. Спектры поглощения
Объяснения в тексте

Пленки с основным максимумом поглощения в области 730—735 *нм* получали обработкой исходных пленок парами метанола в течение 45—60 *мин* при 20° (спектр *2*). По нашим наблюдениям, одним из необходимых условий получения формы 730—735 *нм* является предварительное, как можно более полное, удаление воды из препарата пигмента. Это достигалось высушиванием препарата в эксикаторе над пятиокисью фосфора в вакууме в течение нескольких дней. Во многих случаях нужный эффект от обработки метанолом удавалось получить только после нагревания исходных пленок во время эвакуации до 70—80° в течение 15—30 *мин*. Выдерживание в парах метанола пигмента, высушенного недостаточно тщательно, как правило, приводило к образованию формы с предельно длинноволновым поглощением (~750 *нм*) при падении оп-

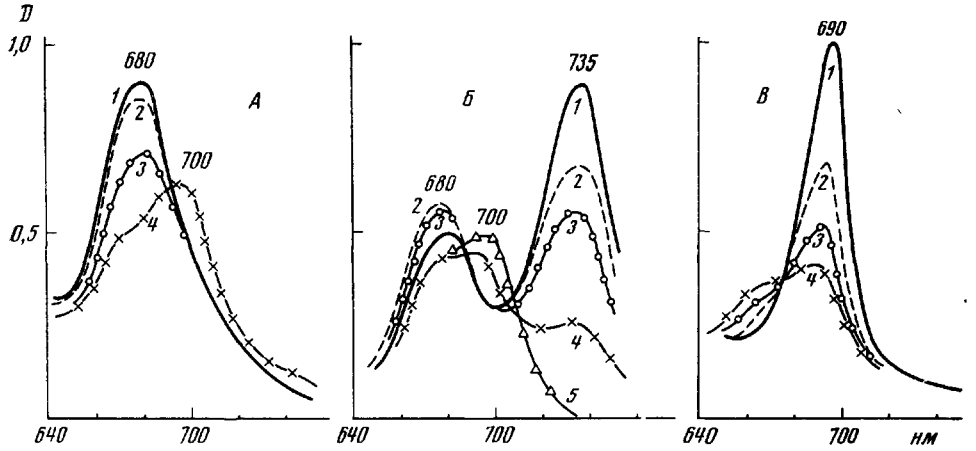


Рис. 2. Действие паров HCl (6,5 н) при 20° на пленки хлорофилла *а*. Спектры поглощения

А: 1 — исходный; 2—4 — после действия паров в течение 10—40 *мин*. *Б:* 1 — исходный; 2—5 — после действия паров в течение 20—30 *мин*. *В:* 1 — исходный, 2—4 — после действия паров в течение 20—60 *мин*

тической плотности по всему спектру (спектр 2′). Появление этой формы, по-видимому, связано с созданием и укрупнением трехмерной кристаллической структуры пигмента. Зависимость ее образования от содержания воды в исходном пигменте, а также других условий получения и обработки пленок точно не установлена. О феофитинизации формы 750 *нм* речь пойдет в другой работе.

Пленки с «диоксановой» структурой [13, 14], имеющие главный максимум поглощения 690 *нм* (спектр *3*), получали обработкой пленок 675—680 *нм* парами диоксана в течение 15—30 *мин* при 20°.

Все образцы пленок перед опытом эвакуировали 30—45 *мин* для удаления растворителя.

Для наблюдения за спектральными изменениями, происходящими при феофитинизации, пленки обрабатывали парами соляной кислоты. С этой целью в боковой отвод трубки Тунберга с пленкой наливали ~0,2 *мл* 6,5 н. HCl. Упругость пара, создаваемая данной концентрацией хлористого водорода, способствует течению реакции, которое удобно для измерения во времени. Целостность «макроструктуры» пленки при этом не нарушается. По мере выдерживания в парах HCl (при 20°) регистрировали спектры поглощения.

Феофитинизация формы 680 *нм* в парах кислоты проявляется в уменьшении основного максимума поглощения и возрастании поглощения при 700 *нм*, принадлежащего феофитину *а*. Возникая из формы 680 *нм*, феофитин в пленке наряду с формой 700 *нм* образует и коротковолновую, мономерную форму с поглощением около 670 *нм* (рис. 2, *А*).

При феофитинизации высокоагрегированной формы хлорофилла *а* (~735 *нм*) в пленках в конечном итоге также отмечается образование двух указанных форм феофитина. На начальных этапах обработки парами кислоты можно было наблюдать превращение формы «735» в коротковолновую форму хлорофилла (рис. 2, *Б*), происходящее, по-видимому, в результате дезагрегации под действием кислоты.

При выдерживании пленок в парах более разбавленной кислоты (2 н.), т. е. в условиях, когда значительно понижена упругость паров хлористого водорода, мы смогли наблюдать явление дезагрегации длинноволновой формы «в чистом виде» при полном отсутствии процесса феофитинизации (рис. 3). Нужно заметить, что этот эффект не наблюдался при обработке пленок парами воды в течение нескольких часов при ком-

натной температуре. Можно предположить, что в условиях, благоприятных для образования феофитина, дезагрегация предшествует феофитинизации формы 735 *нм* на всех стадиях течения реакции. Однако, возможно, что феофитинизация пленок в водной среде (см. ниже) протекает непосредственно, без предварительного образования коротковолновых форм хлорофилла.

Феофитинизация «диоксановых» пленок в парах кислоты проявляется в уменьшении максимума около 690 *нм* без увеличения поглощения в области 700 *нм*. Образование феофитина происходит в виде формы с поглощением около 690 и 665 *нм* соответственно.

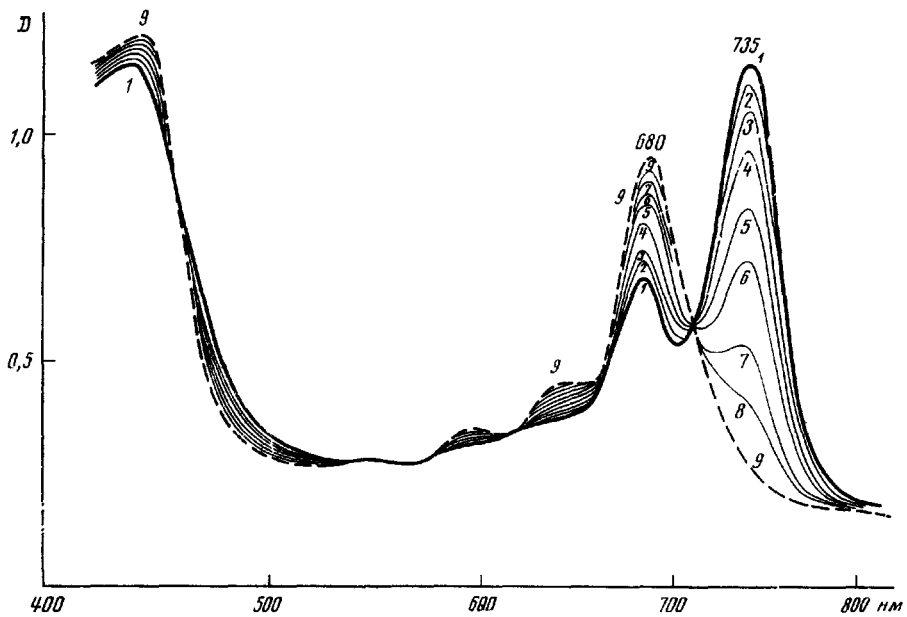


Рис. 3. Действие паров HCl (2 н.) на форму 735 *нм*. Спектры поглощения
1 — исходный; *2—9* — по мере обработки парами в течение 10 *мин* — 3 часов при 20°

Следует заметить, что спектральная картина феофитинизации пленок в парах кислоты и механизм процесса в этих условиях могут не совпадать с соответствующими показателями реакции, протекающей при погружении пленок в водную среду. Не исключено, что феофитинизация пленок в парах кислоты благодаря контакту с газообразной фазой имеет свою специфику, обусловленную сочетанием ряда факторов, среди которых могут иметь значение такие, как природа поверхности, ее атакуемость кислотой. Нам представлялось, что на кинетике феофитинизации в этих условиях могут не отразиться закономерности, обусловленные особенностями молекулярной структуры форм. Поэтому для количественной оценки устойчивости связи Mg в разных агрегированных формах феофитинизацию пленок указанных типов проводили в водном растворе HCl (10^{-3} н.).

В этих опытах использовали пленки, у которых исходная оптическая плотность при 680 *нм* составляла 0,25 и полуширина $\sim$20 *нм*. Это на наш взгляд, было достаточно надежным критерием близкого совпадения плотности исследуемых образцов.

Постановка опытов была следующей. Серию пленок исследуемого образца помещали в водный раствор HCl (pH 3) и экспонировали при температуре 21° в условиях термостатирования в течение 15, 30, 60 и 90 *мин*. В каждой измеряемой точке часть образцов (обычно три) элюировали 4 *мл* смеси ацетона с 0,7 н. водным раствором аммиака

(*v*/*v*=9 : 1), что обеспечивало полную нейтрализацию и прекращение реакции феофитинизации вместе с растворением пигмента. В тех случаях, когда пленка за время опыта «отклеивалась» от стенок сосуда, частицы пленки перед элюированием количественно собирали на стеклянном фильтре (№ 2) при фильтровании суспензии. Количество феофитина, образующегося в пленках в каждый момент реакции, рассчитывали по падению синего максимума поглощения хлорофилла *а* (432 *нм*) у соответствующих элюатов и выражали в % от общего количества пигмента, превратившегося в феофитин, как описано в работе [5]. Для каждого типа пленок было проведено несколько серий опытов, и точки приведенных кинетических кривых являются среднеарифметическими из ряда (обычно более 10) повторностей.

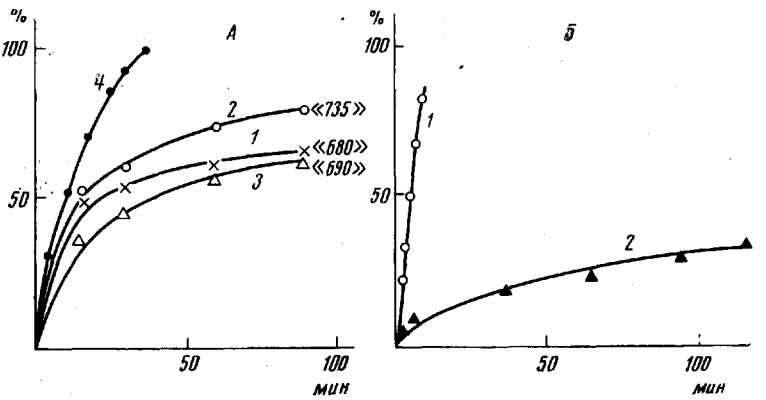


Рис. 4. Кинетика феофитинизации хлорофилла *а*

А: *1—3* — твердые пленки с формами 680, 735 и 690 *нм* соответственно; *4* — раствор в ацетоне с 20% воды (pH 3); *Б*: *1* —раствор в метаноле, pH 3,4; *2* — раствор в диоксане, pH 2,2

Сравнение кинетики феофитинизации указанных типов пленок (рис. 4, *А*) свидетельствует о наиболее высокой скорости реакции у формы 735 *нм*. Глубина реакции в случае длинноволновой формы также оказывается наибольшей. «Диоксановые» пленки наиболее устойчивы к действию кислоты и обнаруживают заметно меньшую начальную скорость реакции по сравнению с другими пленками. Разница в скорости феофитинизации «метаноловых» и «диоксановых» пленок особенно заметна; время полупревращения пигмента в пленках этих типов составляет $\sim$13 и $\sim$40 *мин* соответственно.

Скорость реакции в пленках была сопоставлена со скоростью феофитинизации хлорофилла *а* в водно-ацетоном растворе (20% H_2O) в присутствии такой же концентрации водородных ионов (pH 3). Это позволило установить, что феофитинизация пигмента в растворе протекает быстрее по сравнению с пленками всех исследованных образцов, хотя при этом начальная скорость реакции в растворе практически не отличается от начальной скорости реакции наиболее быстро феофитинизирующейся формы ($\sim$735 *нм*).

Для ответа на вопрос о том, с какими особенностями структуры связано различие реакционной способности «метаноловых» и «диоксановых» пленок мы провели сравнительное исследование реакции феофитинизации хлорофилла *а* в метаноле и диоксане (в присутствии 10% H_2O и $2 \cdot 10^{-4}$ *М* HCl), так как соответствующие сведения в литературе отсутствовали.

Было обнаружено, что скорость феофитинизации хлорофилла в водно-метаноловом растворе (pH 3,4) несоизмеримо выше, чем скорость реакции в водно-диоксановом растворе (pH 2,2) (рис. 4, *Б*). Скорость

феофитинизации в водном ацетоне в близких условиях [5, 7] занимает промежуточное положение.

Полученные результаты приводят к предположению о том, что взаимодействие метанола с молекулами хлорофилла в растворе значительно лабилизирует связь Mg в четырехпиррольном цикле. Вместе с тем возможно допустить, что присоединение метанола, не сказываясь на связи Mg, создает избыточный отрицательный заряд и притяжение протонов к центральным частям молекул пигмента, способствующее феофитинизации. Не исключено, что присоединение диоксана увеличивает устойчивость связи Mg в молекулах хлорофилла. Однако более вероятным представляется предположение о том, что диоксан, присоединяясь к пигменту по атомам магния, защищает от действия кислоты в силу стерических причин, блокируя доступ протонов к центру молекул.

Обнаруженное различие в скорости феофитинизации «метаноловых» и «диоксановых» пленок с учетом указанных выше результатов с растворами является доводом в пользу представления о непосредственном участии молекул растворителя в молекулярном устройстве соответствующих агрегированных структур, что до сих пор не было установлено прямыми методами.

«Метаноловые» пленки, содержащие высокоагрегированную форму, обнаружили бóльшую способность к феофитинизации, чем пленки с доминирующей формой 680 *нм*. Возник вопрос о количественном сравнении скорости феофитинизации обоих типов форм в одной и той же системе. Водно-метаноловые растворы хлорофилла *а* являлись подходящим объектом в этом отношении.

Феофитинизация хлорофилла *а* в водно-метаноловых растворах. В таких системах через несколько часов «созревания» при комнатной температуре можно было наблюдать образование двух четко разграниченных в спектре форм с максимумами поглощения 675—680 и ~730 *нм* соответственно (рис. 5, *А*, спектр *1*) [1], аналогичных формам, получаемым в твердых пленках.

Постановка опытов сводилась к следующему. К 4,5 *мл* коллоидного раствора приливали 0,1 *мл* водного раствора аскорбиновой кислоты с концентрацией $1{,}25 \cdot 10^{-2}$ *М*, создавая тем самым условия кислотности (pH 3,3), благоприятные для феофитинизации обеих форм и удобные для ее наблюдения. Использование аскорбиновой кислоты было вызвано тем, что она, как правило, не вызывала коагуляции коллоидного раствора, тогда как добавление других кислот (соляной и щавелевой) часто способствовало этому процессу, что затрудняло сравнение феофитинизации основных форм. В ходе реакции (при 20°) последовательно регистрировали спектры поглощения на приборе СФ-10, что позволяло следить за течением процесса.

Кинетику реакции рассчитывали по падению оптической плотности в каждом из основных максимумов поглощения, выраженному в % от исходной величины, а также по уменьшению общего количества хлорофилла, которое оценивали по возрастанию оптической плотности при 520 *нм* в ходе феофитинизации. Надежность расчетов была проверена составлением искусственных смесей водно-метаноловых растворов хлорофилла *а* и феофитина с разным соотношением компонентов.

В кислой среде обе формы хлорофилла подвергаются феофитинизации, которая проявляется в уменьшении максимумов 675 и 730 *нм* в спектре поглощения и увеличении максимума около 700 *нм*, принадлежащего основной форме феофитина *а* в данной системе. Спектральная картина феофитинизации более четкая по сравнению с пленками. Скорость изменения длинноволновой формы превышает скорость изменения коротковолновой формы. Скорость уменьшения общего количества хлорофилла в ходе феофитинизации несколько отстает от падения длинноволнового максимума (рис. 5, *Б*). Это дает основание для вывода о бóльшей

скорости феофитинизации формы 730 *нм* по сравнению с феофитинизацией формы 680 *нм*. Наличие изобестических точек в средней части спектра свидетельствует об индивидуально протекающем процессе феофитинизации. Разница в скоростях феофитинизации обеих форм сохраняется при любых «кислых» значениях pH. Эти результаты подтверждают результаты опытов с пленками.

Таким образом, нам удалось показать, что высокоагрегированные длиноволновые формы хлорофилла *а*, получаемые в твердых пленках и коллоидных растворах, обнаруживают бóльшую склонность к феофитинизации, чем менее агрегированные коротковолновые формы, имеющие вероятно, структуру димеров. Молекулярно-дисперсные, «мономерные», формы пигментов имеют бóльшую скорость феофитинизации, чем агрегированные формы любого типа.

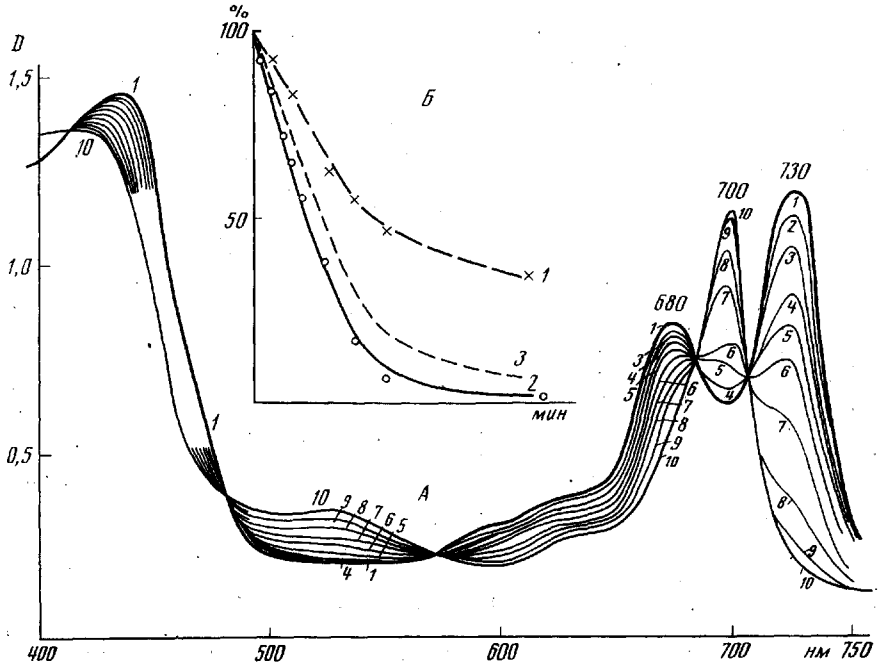


Рис. 5. Феофитинизация хлорофилла *а* в водно-метаноловом коллоидном растворе, pH 3,3

А: 1—10 — спектры поглощения в ходе реакции; *Б:* кинетика изменения оптической плотности при 675 (*1*), 730 (*2*) и 530 *нм* (*3*)

Вопрос о механизме замещения магния на водород в длинноволновых формах разных систем пока еще нельзя считать окончательно выясненным. Результаты наших опытов по феофитинизации высокоагрегированной формы в парах кислоты дают указание на возможность дезагрегации как начальной стадии процесса феофитинизации.

Отмеченное различие в феофитинизации форм с разной степенью агрегации может быть связано с включением в структуру длинноволновых агрегатов молекул метилового спирта, присоединение которых, возможно, лабилизирует связь центрального атома магния с четырехпиррольным циклом. Вместе с тем нельзя отрицать и того, что иные особенности молекулярной структуры и ориентации молекул в длинноволновых формах ответственны за их более высокую способность к потере магния. Так, в предыдущих работах [15, 16] по изучению спектральных эффектов агрегации хлорофилла и его аналогов в твердых пленках мы предположили, что молекулы метанола способствуют созданию высокоагрегиро-

ванных форм благодаря одновременному образованию координационной связи с атомом магния и водородной связи с кетогруппой циклопентанового кольца молекул пигмента. Установленная нами ранее [1] бо́льшая способность к фотоокислению длинноволновых форм по сравнению с коротковолновыми может быть связана с теми же структурными особенностями.

Обнаруженное в данной работе различие скорости замещения магния у разных агрегированных форм хлорофилла в искусственных системах, которое, вероятно, связано со способом молекулярной организации, дает возможность надеяться, что изучение феофитинизации пигментов в составе фотосинтезирующих организмов также может быть одним из подходов к выяснению их состояния и реакционной способности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Быстрова М. И., Красновский А. А.* Мол. биол., *5*, 291, 1971
2. *Mackiney G., Joslin M. A.*, J. Amer. Chem. Soc., *63*, 2530, 1941
3. *Lamort C.*, Rev. ferment et inds. aliment, *11*, 34, 1956
4. *Красновский А. А., Пакшина Е. В.*, Докл. АН СССР, *148*, 935, 1963
5. *Пакшина Е. В., Красновский А. А.*, Биохимия, *29*, 1132, 1964
6. *Rosoff M., Aron. C.*, J. Phys. Chem., *69*, 21, 1965
7. *Пакшина Е. В.*, Изучение феофитинизации хлорофилла и его аналогов в связи со структурой и фотохимическими свойствами молекул пигмента, дис., М., 1965
8. *Schneider H. A. W.*, Photosynthetica, *1* (3—4), 259, 1967
9. *Гиллер Ю. Е., Юхананова Л. Н.*, Биохимия, *35*, 873, 1970
10. *Ghosh A. K., Olson J. M.*, Biochim. et biophys. acta, *162*, 135, 1968
11. *Ghosh A. K., Broker T. R., Olson J. M.*, Biochim. et biophys. acta, *162*, 402, 1968
12. *Fujimori E.*, Biochim. et biophys. acta, *180*, 360, 1969
13. *Красновский А. А., Быстрова М. И.*, Докл. АН СССР, *174*, 480, 1967
14. *Красновский А. А., Брин Г. П.*, Докл. АН СССР, *95*, 611, 1954
15. *Быстрова М. И., Красновский А. А.*, Мол. биол., *1*, 362, 1967
16. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н.*, Докл. АН СССР, *204*, 1473, 1972

Поступила в редакцию
21.VIII. 1973

STUDY OF PHEOPHYTINIZATION OF AGGREGATED FORMS OF CHLOROPHYLL

M. I. BYSTROVA, E. V. PAKSHINA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The kinetics of pheophytinization of various aggregated forms of chlorophyll *a* in solid films and methanol-water colloidal solutions has been studied. The pigment form having absorbtion maximum at 730—735 *nm* exhibits the higher velocity of pheophytinization as compared to the form «680». The form «690», formed under the action of dioxan vapour, is stable most of all to the action of the acid. The longwave form desaggregates in the presence of hydrochloric acid vapour. This desaggregation preceedes the pheophytinization. The difference in the rate of pheophytinization of various aggregated forms is connected with the peculiarities of their molecular arrangement.

Том 22, вып. 1 1975 г.

УДК 581.174.1.035.4

СВЕТОВЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПИГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ANACYSTIS NIDULANS

Л. М. ВОРОБЬЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. А. КАЮПОВА

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

Путем измерения спектров флуоресценции при — 196° исследовали изменения пигментного комплекса сине-зеленой водоросли Anacystis nidulans, росшей при низкой интенсивности света ($6 \cdot 10^3$ *эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$*). Однодневные клетки обладали максимумом флуоресценции хлорофилла при 720 *нм*, флуоресценция при 685 и 695 *нм* была низкой; максимум фикоциана располагался около 655 *нм*. После длительного роста главный максимум был расположен при 685 *нм*, флуоресценция при 720 *нм* была низкой. В результате освещения однодневных клеток Anacystis при 30° на воздухе белым светом высокой интенсивности ($3 \cdot 10^6$ *эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$*) максимумы 695 и 720 *нм* уменьшались, флуоресценция при 685 *нм* увеличивалась. Длительное освещение приводило вследствие фотодеструкции пигмента к понижению и постепенному сдвигу максимума флуоресценции хлорофилла с 685 до 675 *нм*. Наблюдаемое при этом увеличение флуоресценции фикоциана обусловливалось, по-видимому, разобщением переноса энергии к хлорофиллу. У длительно растущих клеток, обладающих максимумом флуоресценции при 685 *нм*, возрастание этого максимума после освещения отсутствовало. Свет вызывал лишь быстрое понижение флуоресценции при 685 *нм*, а после длительного воздействия — увеличение флуоресценции фикоциана.

Без кислорода для наблюдения спектральных изменений требовались длительные (более 30 мин.) интервалы освещения; при этом не удалось обнаружить быстрого падения флуоресценции при 695 *нм* и смещения максимума флуоресценции 685 *нм* в коротковолновую сторону. Результаты освещения клеток на воздухе при 15° и последующего выдерживания в темноте при 30° указывают на две ступени процесса: фотохимическую реакцию с кислородом и обратную темновую реакцию, приводящую к увеличению количества коротковолновой формы.

Исследование изменений пигментно-белкового комплекса растений под влиянием света необходимо для понимания фотохимических превращений хлорофилла в процессе фотосинтеза. Высокая фотохимическая лабильность хлорофилла проявляется наиболее отчетливо в зеленеющих этиолированных проростках и у мутантных форм ряда растений [1—4]. Освещение в присутствии воздуха приводит к быстрой фотодеструкции хлорофилла, в отсутствие воздуха освещение листьев фоточувствительного мутанта кукурузы ведет к дезагрегации длинноволновых форм хлорофилла [3, 4].

Для изучения свойств разных форм хлорофилла в пигментном комплексе фотосинтезирующих организмов мы использовали в данной работе сине-зеленую водоросль. Исследовали изменения спектральных свойств водоросли в зависимости от продолжительности роста культуры, под действием света высокой интенсивности и при нарушении целостности клеток.

МЕТОДИКА

Anacystis nidulans растили на среде Кратц — Майерса [5] в люминостате под лампами белого света при 38° ($3 \cdot 10^4$ *эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$*) и при 30° ($6 \cdot 10^3$ *эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$*). Клетки осаждали центрифугированием при 5 000 *об/мин* и суспендировали в фосфатном буфере pH 7,0 или культуральной среде, в которой росли клетки. У полученных таким образом образцов различий в спектральных свойствах не обнаружено.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-5, дающем большое разрешение в красной области спектра (помещали кюветы 1×1 *см* вплотную к фотоэлементу для уменьшения рассеяния), и на регистрирующем спектрофотометре СФ-14 (помещали те же кюветы в держателе над сферой). Результаты, полученные при работе на СФ-5 и СФ-14, были сходными. Применение опаловых стекол, снижающих эффект светорассеяния, при работе на СФ-5 не вносило существенных изменений в положение и соотношение максимумов поглощения.

Спектры флуоресценции записывали на установке, позволяющей проводить измерения в области 600—900 *нм* [6]. Источником возбуждающего света служили ртутно-кварцевые лампы сверхвысокого давления ДРШ-250 и СВД-120А. В качестве светофильтров для возбуждающего света использовали комбинацию стандартных светофильтров ЗС-3, УФС-2 и СЗС-14, пропускающих линию ртути 365 *нм* (около 10^5 *эрг·см*$^{-2}$·*сек*$^{-1}$). При измерении спектров флуоресценции рабочий сосуд помещали в стеклянный сосуд Дьюара с жидким азотом. В опытах при пониженной температуре клетки перед измерением спектров флуоресценции и перед освещением выдерживали при заданной температуре 5 мин.

Клетки освещали светом высокой интенсивности ($3 \cdot 10^6$ *эрг·см*$^{-2}$·*сек*$^{-1}$) при термостатировании. Для исключения влияния на спектр флуоресценции возможного нагревания образца было проведено контрольное освещение клеток в сосуде, обернутом черной бумагой, показавшее отсутствие каких-либо спектральных изменений по сравнению с образцом, стоявшим в темноте.

Для контрольных измерений служили суспензии клеток водоросли, сохранившиеся во время опыта в темноте при соответствующей температуре или в люминостате в обычных условиях выращивания. При проведении опыта в отсутствие воздуха контрольные образцы после выдерживания в темноте или в люминостате эвакуировали. Удаление воздуха из суспензии клеток 15-минутной эвакуацией форвакуумным масляным насосом не вызывало изменений соотношения интенсивности максимумов в спектре флуоресценции при —196°. Вследствие того, что после удаления воздуха нельзя получить образцы, обладающие полностью идентичными спектрами флуоресценции, для удобства сравнения мы уравнивали при записи спектров величину максимума 720 *нм* у освещенного и контрольного образцов.

Фотохимическое выделение кислорода измеряли амперометрическим методом [7] на установке, собранной в нашей лаборатории Г. П. Брин, при освещении водоросли белым светом ($5 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$·*сек*$^{-1}$). В наших опытах клетки однодневной культуры выделяли около $0{,}7 \cdot 10^{-5}$ *мл* кислорода в 1 *сек*. Диурон (3-[3,4-дихлорфенил]-1,1-диметилмочевина) в концентрации $1{,}25 \cdot 10^{-3}$ и $1{,}25 \cdot 10^{-5}$ *М* подавлял выделение кислорода (в ряде опытов почти на 100%). После 6—7-минутного освещения действие диурона уменьшалось и происходило постепенное возрастание скорости выделения кислорода.

Озвучивали клетки при 20 циклах на установке MSE (500 *вт*). Во время озвучивания сосуд с водорослями охлаждали проточной системой с температурой —5° (смесь этанола и твердой углекислоты).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектры поглощения и флуоресценции. Показано [8, 9], что в клетках Anacystis присутствуют две формы хлорофилла *a* с максимумами поглощения 672 и 682 *нм*. В наших опытах в спектре поглощения однодневной культуры присутствовали помимо максимума 625—630 *нм*, принадлежащего фикоциану, максимумы хлорофилла около 440 и 680—682 *нм*. По мере роста культуры водоросли наблюдался постепенный сдвиг главного красного максимума поглощения хлорофилла в коротковолновую сторону до 672 *нм* (рис. 1). В ряде опытов после двух-трех дней роста водоросли можно было одновременно видеть два отчетливых максимума хлорофилла около 672 и 680 *нм*.

У однодневной культуры Anacystis при —196° обнаруживался высокий максимум флуоресценции хлорофилла *a* при 718—720 *нм*. Коротковолновые формы хлорофилла были представлены низкими максимумами 685—686 и 696 *нм*. Низкий пологий максимум около 655 *нм* принадлежал фикоцианину (рис. 1). По мере роста водоросли обнаружены постепенные изменения в спектрах флуоресценции, коррелирующие с изменениями в спектрах поглощения. Наблюдалось перераспределение относительной высоты максимумов флуоресценции хлорофилла, выражающееся в понижении по мере роста водоросли длинноволнового максимума 720 *нм* и в возрастании коротковолнового при 685 *нм*. После 10—15 дней роста длинноволновый максимум в спектре флуоресценции полностью отсутствовал, коротковолновый же возрастал во много раз. Следует

отметить также, что по мере роста культуры водоросли становилось более высоким плечо в области 740—750 *нм* и после пяти-семи дней роста проявлялось как максимум. Известно, что в этой области поглощает пигмент, отличный от хлорофилла, обнаруженный в клетках Anacystis и ряда других водорослей [10].

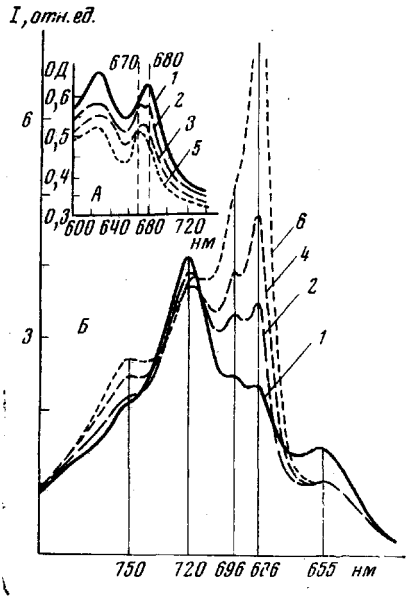


Рис. 1. Изменение спектров поглощения (*А*) и низкотемпературной флуоресценции (*Б*) по мере роста культуры Anacystis nidulans

1—1 день, *2*—2, *3*—4, *4*—5, *5*—7, *6*—9 дней роста

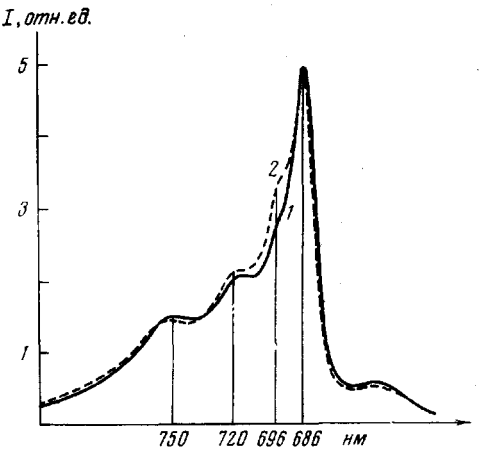


Рис. 2. Спектр флуоресценции (—196°) клеток 19-дневной культуры Anacystis nidulans, росших при 30° и интенсивность света $3 \cdot 10^4$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$ (*1*) и $6 \cdot 10^2$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$ (*2*)

«Старая» культура водоросли была жизнеспособной и при посеве в новую среду давала на следующий день культуру, по спектральным свойствам совпадающую с однодневной.

Процесс перераспределения высоты максимумов происходил при выращивании водоросли на белом свету разной интенсивности при постоянной температуре. Различия в низкотемпературных спектрах флуоресценции клеток, росших при интенсивности $3 \cdot 10^4$ и $6 \cdot 10^2$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$, заключались в большей высоте максимума 696 *нм* у культуры, выросшей при низкой интенсивности света (рис. 2).

Известно, что по мере роста культуры клеток Anacystis происходит подщелачивание культуральной среды [11]. В наших условиях роста величина pH изменялась от 7,0 до 10,5. Сравнение свойств клеток Anacystis после 1—14 дней роста, суспендированных в культуральной среде, на которой водоросль росла, и в фосфатном буфере pH 7,0 показало, что удаление культуральной среды и замена ее буферным раствором с постоянным значением pH не изменяет спектральных свойств пигментов.

Ранее [12] было показано, что щелочная среда способствует дезагрегации хлорофилла в хлоропластах. Можно было предполагать, что наблюдаемые спектральные изменения по мере роста Anacystis вызываются длительным воздействием щелочной среды. Мы попытались приостановить спектральные изменения по мере роста клеток ежедневным двухразовым подкислением среды до 7,0 с помощью 10%-ной HCl. Обнаружено, что подкисление тормозит возрастание коротковолнового компонента. Однако подщелачивание среды однодневной культуры до pH 9,5 или 10 приводило к быстрому понижению коротковолнового мак-

симума флуоресценции. Опыты привели нас к заключению, что скорость увеличения щелочности среды и наблюдаемых спектральных изменений зависит от интенсивности роста культуры водоросли.

Изменение спектральных свойств после освещения. Для изучения влияния света высокой интенсивности ($3 \cdot 10^6$ *эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$*) клетки растили при 30° и низкой интенсивности света

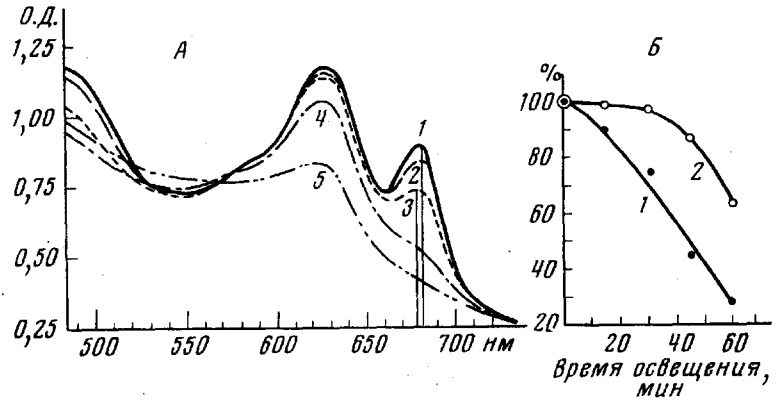


Рис. 3. Влияние освещения в присутствии воздуха на спектр поглощения клеток однодневной культуры Anacystic nidulans

А: *1* — спектр исходных клеток, *2*—15 мин., *3*—30, *4*—45, *5*—60 мин. освещения; *Б*: понижение поглощения в максимумах хлорофилла (*1*) и фикоциана (*2*) по мере освещения

($6 \cdot 10^3$ *эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$*). Опыты проводили с суспензиями клеток на культуральной среде, в которой они росли, чтобы избежать возможных описанных выше спектральных изменений, обусловленных длительным (до 1,5 час.) освещением клеток в новой культуральной среде.

После освещения клеток однодневной культуры в присутствии воздуха при 30° наблюдалось постепенное понижение максимумов хлорофилла в красной и синей областях спектра. Поглощение фикоциана в первые 15 мин. освещения не уменьшалось или уменьшалось незначительно. Более длительное действие света, приводившее к глубокой фотодеструкции хлорофилла, обусловливало также быстрое понижение максимума поглощения фикоциана (рис. 3).

Уменьшение красного максимума поглощения хлорофилла после длительного освещения в присутствии воздуха (более 30 мин.) сопровождалось небольшим смещением максимума в коротковолновую сторону.

Длительное освещение Anacystis (до 90 мин.) без воздуха не вызывало фотодеструкции пигментов и не приводило к каким-либо изменениям в спектрах поглощения.

После освещения суспензии однодневных клеток при 30° белым светом в присутствии кислорода воздуха максимумы флуоресценции (—196°) 696 и 720 *нм* понижались, флуоресценция же при 685 *нм* возрастала. Изменения становились заметными после 4—5-минутного действия света и увеличивались по мере освещения. Они были необратимыми в темноте.

Наибольшей фотолабильностью в присутствии воздуха обладал максимум флуоресценции 696 *нм*, полностью исчезавший в первые минуты освещения (рис. 4). По мере возрастания коротковолнового максимума наблюдалось его постепенное смещение от 685—686 до 675—677 *нм*. После освещения более 30 мин. наряду со смещением происходило понижение этого максимума.

Флуоресценция фикоциана около 655 *нм* до 15 мин. освещения существенно не менялась. По мере дальнейшего освещения, приводившего к

полному исчезновению максимума 696 *нм* и значительному понижению флуоресценции длинноволновой формы хлорофилла 720 *нм*, наблюдалось постепенное возрастание флуоресценции фикобилина, сопровождающееся постепенным смещением его максимума в длинноволновую сторону до ~660 *нм* (см. рис. 4).

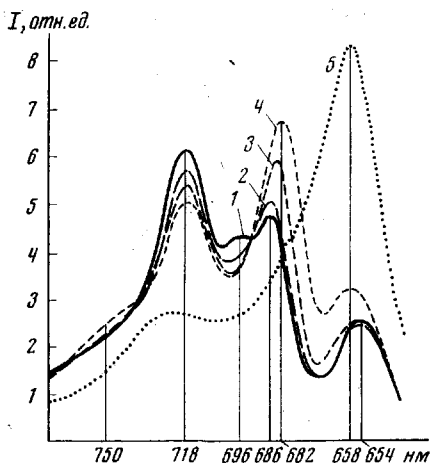


Рис. 4. Изменения низкотемпературных спектров флуоресценции при освещении клеток однодневной культуры Anacystis nidulans в присутствии воздуха

1 — исходные клетки, *2*—4 мин., *3*—15, *4*—30, *5*—60 мин. освещения

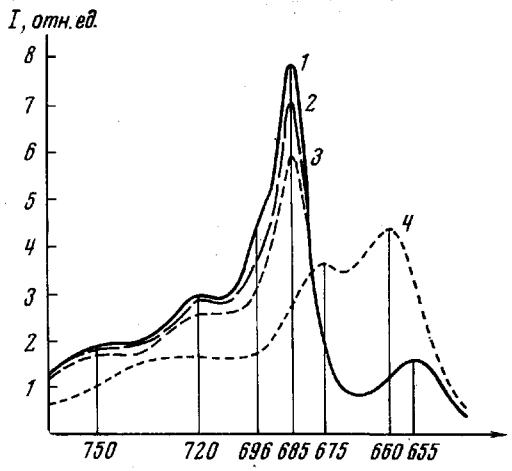


Рис. 5. Изменение спектров флуоресценции (—196°) при освещении клеток 19-дневной культуры Anacystis nidulans в присутствии воздуха

1 — исходные клетки, *2*—3 мин., *3*—5, *4*—60 мин. освещения

Сравнение действия света высокой интенсивности на спектральные свойства клеток разного возраста показало, что у водоросли после 19 дней роста (максимум флуоресценции при 685 *нм*) освещение вызывает лишь быстрое понижение главного максимума флуоресценции уже после первых минут действия света, длительное освещение приводило к возрастанию интенсивности флуоресценции фикоциана (рис. 5).

Освещение однодневных клеток в течение 15 мин. при 12—15° в присутствии воздуха приводило к понижению максимумов 696 и 720 *нм*. Интенсивность флуоресценции при 685 *нм* в разных опытах понижалась в результате освещения, оставалась без изменений или даже увеличивалась выше исходной величины. После 15 мин. действия света максимум 685 *нм* смещался на 2—3 *нм* в коротковолновую сторону. Существенных изменений в области флуоресценции фикоциана не происходило, в ряде опытов освещение вызывало смещение максимума флуоресценции 655 *нм* на 3—5 *нм* в длинноволновую сторону спектра.

Выдерживание клеток, освещенных при пониженной температуре, в темноте при 30° и последующее измерение спектров флуоресценции в жидком азоте показало, что в этом случае происходило возрастание коротковолнового максимума флуоресценции хлорофилла. Положение этого максимума, как и сразу после освещения, было более коротким, чем у исходных клеток.

Интенсивность флуоресценции при 720 *нм* также возрастала в результате выдерживания клеток при 30°, после освещения при 15°, но не достигала исходного уровня. Обратимых изменений в темноте при 696 *нм* обнаружить не удалось (рис. 6). Контрольный образец, стоявший в течение опыта при соответствующих температурах, по спектру флуоресценции не отличался от исходного.

Таким образом, общим результатом освещения однодневных клеток при пониженной температуре и последующего нагревания является уменьшение максимумов 696 и 720 *нм* и возрастание коротковолнового.

Освещение клеток при 30° после удаления воздуха также приводило к возрастанию высоты максимума коротковолновой формы хлорофилла 685 *нм*. Однако для обнаружения заметных спектральных изменений

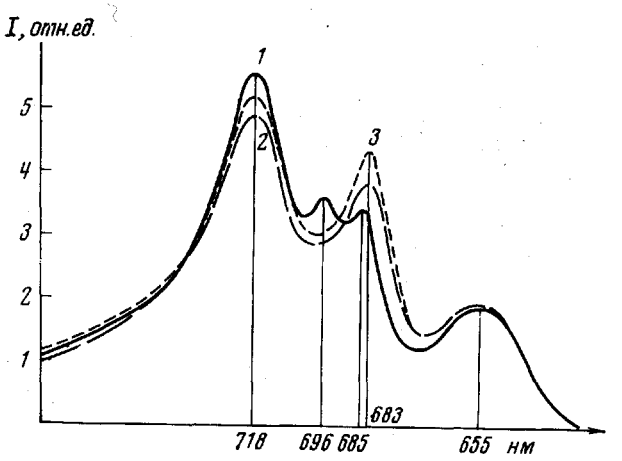


Рис. 6. Изменения спектров флуоресценции (—196°) при освещении клеток однодневной культуры Anacystis nidulans при 12° в присутствии воздуха

1 — исходные клетки, *2*—15 мин. освещения, *3*—15 мин. освещения и 30 мин. темноты при 30°

в этом случае требовались длительные интервалы освещения, не менее 30 мин. [13]. После длительных (30—90 мин.) интервалов освещения без воздуха интенсивность флуоресценции в максимуме коротковолновой формы хлорофилла 685 *нм* была выше, чем у культуры, стоявшей это время в люминостате. Высота этого максимума у культуры из люминостата в свою очередь была выше, чем у образца, стоявшего во время опыта в темноте (рис. 7).

Различия спектральной картины при освещении клеток в присутствии и в отсутствие воздуха заключались в том, что в последнем случае не происходило падения флуоресценции при 696 *нм* и возрастающий максимум хлорофилла не испытывал коротковолнового смещения, располагаясь, как и у исходного образца, при 685 *нм*. В результате освещения клеток Anacystis без воздуха наблюдалось относительное возрастание флуоресценции в длинноволновой области спектра без ясно выраженного максимума.

Величина роста коротковолнового максимума в результате освещения водоросли без воздуха увеличивалась при увеличении продолжительности освещения. Обратимости после стояния освещенного образца в темноте в течение 30—60 мин. не наблюдалось. Освещение в «вакууме» при 12—15° с последующим выдерживанием при 30° не приводило к отчетливому возрастанию коротковолнового максимума.

Диурон в вышеуказанных концентрациях не подавлял возрастание коротковолнового максимума флуоресценции в результате освещения клеток в отсутствие и в присутствии воздуха.

Изменения спектров флуоресценции (—196°) при нарушении целостности клеток. У Anacystis разные формы пигментов обладают различной прочностью связи в пигментно-белковом комплексе. Наибольшей лабильностью обладает фикоциан — при простом растирании клеток водоросли он выходит из структуры [14, 15].

Проведенное нами замораживание — оттаивание клеток Anacystis, обладающих высоким длинноволновым максимумом флуоресценции 720 *нм*, как и в случае листьев [16], приводило к дезагрегации пигментного комплекса водоросли — к понижению интенсивности флуоресцен-

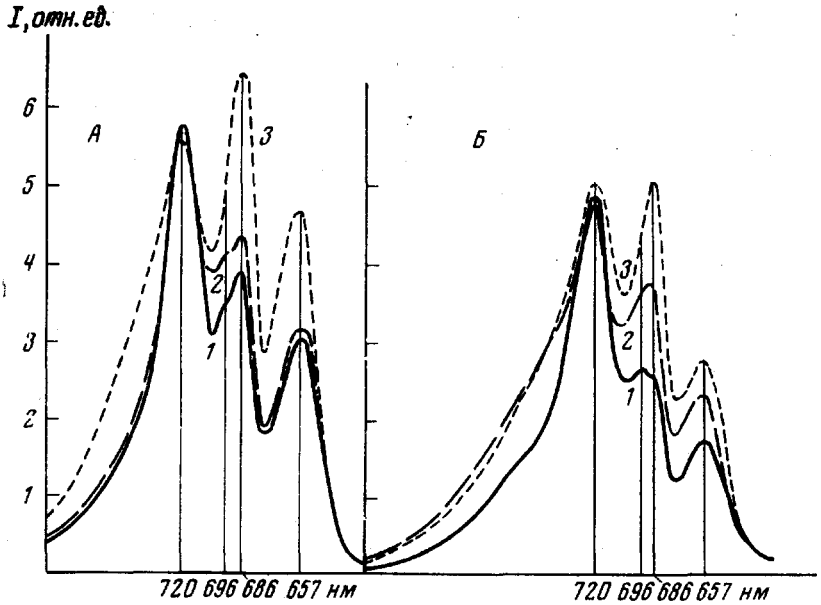


Рис. 7. Влияние освещения в отсутствие воздуха на спектр флуоресценции (—196°) клеток однодневной культуры Anacystis nidulans

А: 1—90 мин. темноты, *2*—90 мин. в люминостате, *3*—90 мин. освещения, *Б: 1*—90 мин. темноты, *2*—60 мин. освещения, *3*—90 мин. освещения

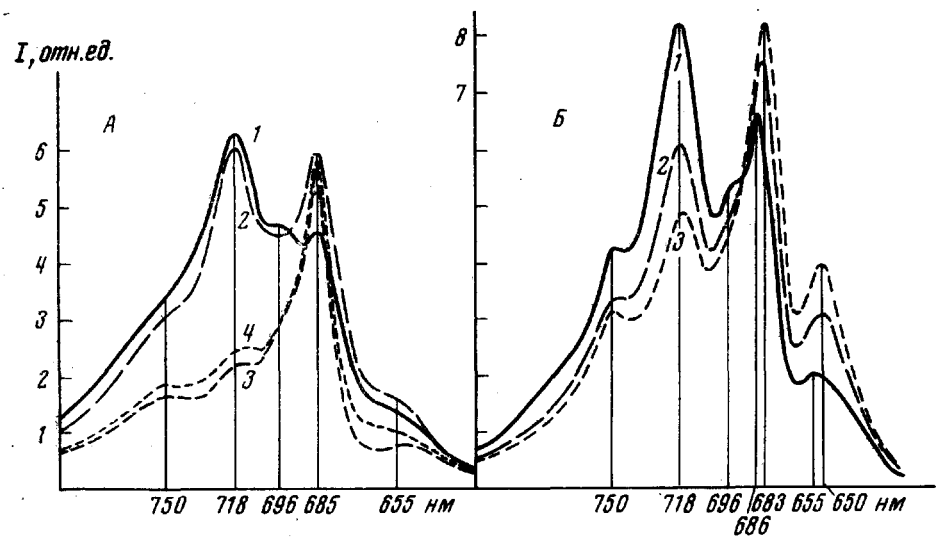


Рис. 8. Изменения низкотемпературных спектров флуоресценции при нарушении целостности клеток Anacystis nidulans

А — замораживание — оттаивание: *1* — исходные клетки однодневной культуры, *2* — оттаявшие после замораживания при —196°, *3* — исходные клетки десятидневной культуры, *4* — оттаявшие после замораживания при —196°; *Б* — озвучивание: *1* — исходные клетки двухдневной культуры, *2*—30 сек., *3*—90 сек. озвучивания.

ции агрегированной формы хлорофилла 720 *нм* и к возрастанию максимумов коротковолновой формы хлорофилла и фикоциана (рис. 8). Подобные спектральные изменения отсутствовали при замораживании клеток водоросли после длительного роста, обладающих главным максимумом в спектре флуоресценции (—196°) при 685 *нм*.

Частичную дезагрегацию пигментного комплекса мы наблюдали также при обработке клеток в течение 24 часа 50%-ным глицерином.

В этом случае помимо возрастания величины коротковолнового максимума хлорофилла и значительного увеличения флуоресценция фикоциана происходило смещение максимума хлорофилла до 683—684 *нм* и фикоциана до 650 *нм*.

Разрушение клеток водоросли с помощью ультразвука способствовало дезагрегации пигментов — возрастанию максимумов флуоресценции фикоциана и коротковолновой формы хлорофилла. Максимум хлорофилла по мере озвучивания сдвигался в коротковолновую сторону вплоть до 680 *нм* (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В литературе есть указания на то, что низкотемпературный спектр флуоресценции трехдневной культуры Anacystis отличается от спектра водоросли после семи дней роста относительно большей высотой коротковолнового максимума [17, 18]. Различия вида спектра флуоресценции объяснялись изменениями процесса переноса энергии от фикоциана к коротковолновым формам хлорофилла 686 и 696 *нм* [18]. Результаты данной работы показали, что перераспределение высоты максимумов флуоресценции по мере роста водоросли, выражающееся в понижении флуоресценции при 720 *нм* и возрастании коротковолнового максимума 685 *нм*, коррелирует с коротковолновым смещением красного максимума поглощения. Из этого следует, что наблюдаемые при росте культуры спектральные сдвиги нельзя объяснить лишь изменениями в процессе переноса энергии. Можно думать, что помимо возможного нарушения переноса энергии между фикоцианом и хлорофиллом, разными формами хлорофилла в процессе роста водоросли происходят изменения состояния хлорофилла в пигментном комплексе и переход большей его части в коротковолновую форму с максимумом поглощения около 672 *нм* и низкотемпературной флуоресценцией при 685 *нм*.

Отсутствие возрастания флуоресценции коротковолновой формы хлорофилла при замораживании — оттаивании клеток после длительного роста легко объяснимо, если полагать, что в этом случае хлорофилл представлен коротковолновой формой и поэтому не дезагрегирует после замораживания.

Большинство данных о количественных соотношениях хлорофилла и фикобилинов, спектральных свойствах пигментов, полученных при выращивании красных и сине-зеленых водорослей на свету разных интенсивностей и спектрального состава и при кратковременном освещении светом высокой интенсивности, объясняется авторами с точки зрения изменений под действием света эффективности переноса энергии от фикоциана к хлорофильным формам [19, 20].

Броди и Броди [19] предположили, что сильный свет при воздействии на клетки водоросли, выросшие при более низкой интенсивности, может вызывать нарушения эффективности переноса энергии вследствие межмолекулярных превращений типа диффузионных изменений степени агрегации молекул в пигментном комплексе, т. е. изменения взаиморасположения молекул без заметных проявлений в спектре поглощения.

Моханти и Говинджи [21] пришли к заключению, что «секундные» изменения выхода флуоресценции хлорофилла у Anacystis при освещении клеток после темноты определяются окислительно-восстановительными изменениями в фотосинтетической цепи, тогда как медленные «минутные» — структурными изменениями тилакоидной мембраны при фотосинтезе.

При действии света высокой интенсивности на зеленые листья мутантных растений кукурузы, выращенных на слабом свету, обнаружена отчетливая дезагрегация длинноволновых форм хлорофилла, сопровождающаяся относительным увеличением количества коротковолновой формы пигмента в низкотемпературном спектре флуоресценции [3, 4].

В данной работе удалось наблюдать возрастание интенсивности флуоресценции коротковолновой формы хлорофилла с одновременным понижением величины максимума агрегированного пигмента при освещении клеток Anacystis nidulans. Существует представление о том, что флуоресценция коротковолновых форм хлорофилла у этих водорослей определяется в основном энергией, поглощенной фикобилином [18]. Нарушение переноса энергии в таком случае должно было бы привести одновременно к понижению интенсивности флуоресценции хлорофилла и увеличению собственной флуоресценции фикоциана. Однако в наших опытах возрастание флуоресценции фикоциана начинало проявляться и быстро увеличиваться после относительно больших интервалов освещения (более 15 мин.), когда освещение приводило к выцветанию заметных количеств хлорофилла.

Отсутствие явления перераспределения интенсивности полос флуоресценции при действии света на клетки Anacystis, обладающие после длительного роста дезагрегированным хлорофиллом (главный максимум флуоресценции при 685 *нм*), свидетельствует о том, что спектральные изменения при освещении однодневных клеток объясняются дезагрегацией, а не изменениями на свету процесса миграции энергии.

Наиболее быстро и отчетливо дезагрегация хлорофилла в клетках Anacystis наблюдается при освещении в присутствии воздуха и можно думать, что она является следствием фотохимической реакции пигмента с кислородом. Сравнение спектральных изменений в результате освещения клеток при 15 и 30° свидетельствует о сложном механизме световой дезагрегации хлорофилла в водорослях. Увеличение коротковолнового максимума флуоресценции хлорофилла при 30° после освещения, проведенного при пониженной температуре, тормозящей обратные реакции промежуточных продуктов, отчетливо показало двухступенчатый характер процесса — фотохимическая реакция пигмента с кислородом, ведущая к уменьшению интенсивности флуоресценции, и обратная темновая реакция, приводящая к увеличению флуоресценции главным образом в области максимума коротковолновой формы хлорофилла.

Нами [22—24] обнаружено и изучено обратимое фотоокисление хлорофилла кислородом в модельных системах, сопровождающееся дезагрегацией длинноволновых форм. Результаты данной работы указывают на то, что фотоокисление длинноволновых форм хлорофилла кислородом в клетках Anacystis идет, возможно, по механизму, изученному нами в простых системах — через промежуточную стадию дезагрегации. Фотохимическая реакция с кислородом, приводящая к уменьшению максимумов флуоресценции, идет с большой скоростью при понижении температуры, возрастание флуоресценции коротковолновой формы происходит путем обратной темновой реакции, зависимой от температуры. Как и в модельных системах, коротковолновая форма хлорофилла с максимумом флуоресценции 685 *нм* при освещении клеток Anacystis светом высокой интенсивности быстро фотоокисляется при комнатной температуре (рис. 5). Однако у клеток, обладающих высоким максимумом при 720 *нм*, фотоокисление коротковолновой формы пигмента экранируется непрерывно идущей дезагрегацией длинноволновой формы, приводящей к возрастанию флуоресценции в области 685 *нм*, понижение происходит лишь после фотопревращения пигмента, флуоресцирующего при 720 *нм*.

Коротковолновое смещение (до 12 *нм*) возрастающего максимума хлорофилла 685 *нм* свидетельствует об изменении состояния пигмента, дезагрегированного светом в присутствии воздуха при 15—30°. Такое значительное смещение максимума до его положения в растворах пигментов в органических растворителях может являться результатом изменения или даже нарушения под действием света высокой интенсивности в присутствии кислорода связи пигмента с белковым носителем.

Обнаружение дезагрегации хлорофилла при освещении в «вакууме» (в данной работе клеток Anacystis или зеленых листьев мутанта кукурузы ранее [3, 4]) не опровергает вышеизложенного, так как в случае живых организмов трудно добиться полного отсутствия кислорода в клетках. Кроме того, для проявления эффекта в «вакууме» требуется длительное время освещения, в течение которого можно предполагать выделение кислорода за счет фотосинтеза. Выделившийся в небольших количествах кислород может участвовать в обратимой стадии фотоокисления пигмента, в результате которой наблюдается дезагрегация, но его количества недостаточно для фотодеструкции образующейся коротковолновой формы пигмента и глубоких изменений структуры пигментного комплекса, наблюдаемых при освещении на воздухе.

Частичное деструктивное разрушение хлорофилла в результате освещения клеток Anacystis не противоречит представлению о дезагрегации хлорофильных форм, так как и в модельных системах в опытах с хлорофиллом наблюдалась сходная картина спектральных превращений при фотоокислении кислородом [22]. По спектру поглощения световую дезагрегацию удалось наблюдать лишь с феофитином, у которого продукт темновой реакции после обратимой стадии фотоокисления пигмента устойчив к дальнейшему фотоокислению кислородом [24].

В модельных системах в результате обратимого фотоокисления хлорофилла образуется пигмент, по спектральным свойствам идентичный исходному, но отличающийся от него скоростью движения на хроматограмме. Тонкослойная хроматография на целлюлозе пигментов Anacystis после освещения в течение 15 мин. в присутствии воздуха не показала наличия «измененного» хлорофилла. Возможно, что мы не нашли подходящих условий для его обнаружения. Однако можно полагать, что в живых клетках фотоокисление пигмента кислородом не доходит до конечной стадии образования измененного продукта.

Ранее уже отмечалось, что для проявления действия света на спектральные свойства водорослей необходимо значительное превышение интенсивности света в опыте по сравнению с условиями выращивания [14]. В наших опытах интенсивность света в опыте на три порядка выше, чем в люминостате. Вероятно, имеет значение скачок от «привычной» для водорослей интенсивности, так как используемая нами «высокая» интенсивность лежит в области физиологических величин [20]. Намного бо́льшая интенсивность света в наших опытах по сравнению с условиями роста определила в опытах с листьями кукурузы [3, 4] и с клетками Anacystis большую амплитуду спектральных изменений.

В физиологических опытах по выращиванию водорослей на свету разных интенсивностей и спектрального состава обнаружено регулирующее действие света на концентрации и соотношения хлорофилла и фикоциана [9, 14, 25] и можно думать, что фотоокисление пигментов кислородом играет важную роль в жизни растения. В данной работе показано относительное понижение при выращивании на свету большей интенсивности максимума низкотемпературной флуоресценции 695 *нм*, особенно фотолабильного и при кратковременном освещении.

Итак, описанные в данной работе спектральные изменения при освещении клеток Anacystis nidulans могут объясняться изменениями состояния пигментного комплекса водоросли, связанными с обратимым фотоокислением хлорофилла кислородом.

Приносим глубокую благодарность сотрудникам кафедры гидробиологии МГУ В. Д. Федорову и Л. Д. Гапочке за предоставление исходной культуры Anacystis nidulans и ценные советы по ее выращиванию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М. Докл. АН СССР, **91**, 343, 1953.
2. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Биофизика, **13**, 453, 1968.
3. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А. Докл. АН СССР, **183**, 711, 1968.

4. Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А. Биофизика, **14**, 245, 1969.
5. Kratz W. A,. Myers J. Amer. J. Bot., **42**, 282, 1955.
6. Ерохин Ю. Е., Красновский А. А. Биофизика, **4**, 392, 1961.
7. Гришина Г. С., Белл Л. Н., Букина Г. С. Физиол. растений, **13**, 737, 1966.
8. Goedheer J. C. Biochim. et biophys. acta, **88**, 304, 1964.
9. Halldal P. Physiol. plantarum, **11**, 401, 1958.
10. Fischer K. Dissertation, Universität zu Tübingen. Berlin, 1968.
11. Таха М. С. Микробиология, **32**, 583, 1963.
12. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Биохимия, **31**, 573, 1966.
13. Воробьева Л. М. Тез. Междунар. биофиз. конгр. М., 1972.
14. Brody M., Emerson R. Amer. J. Bot., **46**, 433, 1959.
15. Goedheer J. C. Biochim. et biophys. acta, **102**, 73, 1965.
16. Butler W. L., Briggs W. R. Biochim. et biophys. acta, **112**, 45, 1966.
17. Bergeron J. A., in: Photosynthetic mechanisms of green plants. Nat. Acad. Sci.— Nat. Res. Council, № 1145, p. 527. Washington, 1963.
18. Goedheer J. C. Biochim. et biophys. acta, **153**, 903, 1968.
19. Brody S. S., Brody M. Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 161, 1959.
20. Ghosh A. K., Govindjee. Biophys. J., **6**, 611, 1966.
21. Mohanty P. K., Govindjee. Tez. Междунар. биофиз. конгр. М., 1972.
22. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Докл. АН СССР, **205**, 233, 1972.
23. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Докл. АН СССР, **195**, 731, 1970.
24. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Докл. АН СССР, **189**, 420, 1969.
25. Jones L. W., Myers J. Plant Physiol., **39**, 938, 1964.

Поступила в редакцию
26.XII.1973

LIGHT-INDUCED CHANGES OF PIGMENT COMPLEX OF ANACYSTIS NIDULANS

L. M. VOROBIEVA, A. A. KRASNOVSKY, G. A. KAYUPOVA

A. N. Bach Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Changes in the pigment complex were studied by recording the fluorescence spectra at —196° C with the blue-green alga Anacystis nidulans grown at a low light intensity, 6×10^3 erg·cm^{-2} sec^{-1}. One-day-old cells had the maximum of chlorophyll fluorescence at 720 nm, the fluorescence at 685 and 695 nm was low; the maximum of phycocyan was at 655 nm. After prolonged growth the main maximum was located at 685 nm and the fluorescence at 720 nm was low.

The maxima at 695 and 720 nm decreased and the flurescence at 685 nm increased when one-day-old cells of Anacystis were subjected at 30° C to white light of a high intensity (3×10^6 erg·cm^{-2}sec^{-1}). Prolonged illumination resulted in photodestruction of the pigment and in a decrease and shift of the maximum of chlorophyll fluorescence from 685 to 675 nm. An increase in phycocyan fluorescence was caused presumably by decoupling of energy transfer to chlorophyll. There was no increase in the maximum of fluorescence at 685 nm after illumination in the cells after prolonged growth. Light induced only a rapid decrease in fluorescence at 685 nm and an increase in phycocyan fluorescence after the prolonged action.

Longer intervals of illumination (over 30 min) were required for recording spectral changes without oxygen; no rapid decrease in fluorescence at 695 nm or shift of the maximum of fluorescence at 685 nm to shorter wavelerigthes was found in this case. Illumination of the cells in the air at 15° C and following incubation in the darkness at 30° C revealed two stages of the process: (a) photochemical reaction with oxygen and (b) reversed «dark» reaction resulting in an increase of the content of the short wavelength form.

The mechanism of photooxidation of chlorophyll by oxygen in the cells of Anacystis nidulans was found to be similar to that in model systems containing the monomer and aggregated forms of the pigment. Light deaggregation of chlorophyll in Anacystis is presumed to be due to reversible photooxidation of the pigment by oxygen.

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 225, № 5

УДК 541.14+547.979.4

БИОФИЗИКА

Н. Н. ДРОЗДОВА, А. В. УМРИХИНА, Е. М. ПУШКИНА,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАТИМОЕ ФОТООКИСЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ a и b В ВОДНОМ РАСТВОРЕ ДЕТЕРГЕНТА

Обратимое фотоокисление порфиринов исследовалось главным образом в органических растворителях ([1–4]). Изучение этой реакции в водных растворах детергентов представляет интерес для моделирования свойств пигментов в естественных белково-липидных структурах ([5]). Ранее было показано, что бактериальные пигменты способны к обратимому фотовзаимодействию с хинонами как в мономерной, так и в агрегированной форме ([6]). При этом наблюдается появление полос при 430 и 450 нм, соответствующих продуктам одноэлектронного фотоокисления бактериохлорофиллов ([7, 8]), а также изменение окислительно-восстановительного потенциала системы на свету как в органических растворителях ([3, 8]), так и в водных растворах детергентов ([9]). Образование свободных радикалов при этой реакции показано в наших ([10, 11]) и других работах ([12–14]).

В настоящей работе исследовано обратимое фотоокисление бактериохлорофиллов в водных растворах тритона X-100 и участие продуктов обратимого фотоокисения в фотосенсибилизированном переносе электрона.

Использовали бактериохлорофиллы a и b, выделенные из Rhodospirillum rubrum и Rhodopseudomonas viridis соответственно. Опыты проводили в вакуумных трубках Тунберга, куда вводили спиртовый раствор пигмента, водный раствор детергента определенного pH и акцептор электрона. О ходе реакции судили по изменению оптической плотности при 590 нм (второй максимум поглощения пигмента) и при 430 и 450 нм, соответствующих максимумам промежуточных продуктов окисления бактериохлорофиллов a, b. Изменение оптической плотности регистрировали на самопишущем потенциометре КСП-4, присоединенном к спектрофотометру СФ-14. Освещение киноламповой 300 вт со светофильтром КС-19, пропускающим свет длиной волны более 700 нм и поглощаемый только пигментом. Концентрация пигмента 10^{-5} *M*, акцептора электрона 10^{-3}—10^{-4} *M*.

При освещении системы в вакууме происходит увеличение поглощения при 430 или 450 нм и уменьшение при 590 нм (рис. 1). Изменение оптической плотности на свету происходит быстро ($\tau_{1/2} \approx 1{,}5$ сек), а затем наступает насыщение. Обратная реакция в темноте включает быструю и медленную фазы, соотношение которых зависит от pH и температуры. Наличие быстрой компоненты обусловлено, вероятно, рекомбинацией окисленного пигмента с восстановленным акцептором электрона.

При изучении влияния pH на обратимое фотоокисление бактериохлорофилла в растворе тритона X-100 были использованы $^1/_{15}$ *M* фосфатные буферные смеси. Исследована область pH от 5 до 8 (табл. 1). При уменьшении pH наблюдается, как и в спиртовых растворах ([15]), увеличение глубины окисления. Это, вероятно, связано с замедлением обратной реакции за счет присоединения протонов (H^+) к восстановленному акцептору электрона ($\cdot Q^-$) с образованием ($\cdot QH$). Небольшие спектральные изменения при более высоких значениях pH (6,4; 7,4) могут быть объяснены тем, что в средах, благоприятных для депротонизации $\cdot QH$, происходит увеличение концентрации ($\cdot Q^-$), что способствует более быстрой регенерации исходных продуктов. Понижение температуры до 0° при этих значениях pH практи-

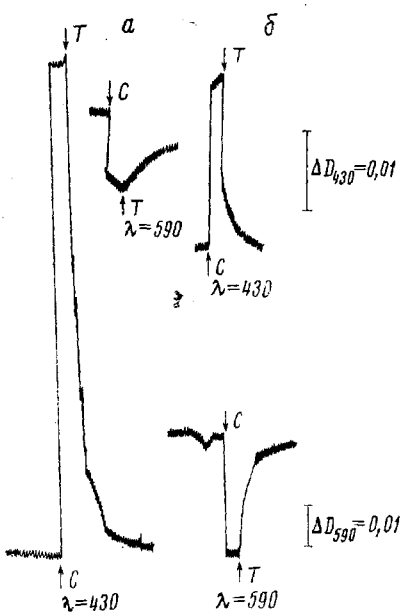


Рис 1

Рис. 1. Изменение оптической плотности (D) при 430 и 590 нм при обратимом фотоокисление бактериохлорофилла а *n*-бензохиноном ($а$) и убихиноном ($б$) в 0,4% водном растворе тритона Х-100. pH 4,9; 20°; C – свет 30 сек, T – темнота 2 мин.

Рис. 2. $а$ – спектры э.п.р., наблюдаемые при освещении красным светом бактериохлорофилла а и *n*-бензохинона в водном растворе тритона Х-100 в присутствии 10% этанола при pH 5,2 и 6,8 (1) и раствора *n*-бензохинона при pH 5,2 (2) и 6,8 (3) при освещении белым светом. $б$ – зависимость интенсивности синглетного сигнала э.п.р. (I) на свету (C) и в темноте (T) от температуры

Рис. 3. Влияние температуры на фотосенсибилизированное бактериохлорофиллом а ($а$) и b ($б$) окисление убихиноном восстановленного ДХФИ

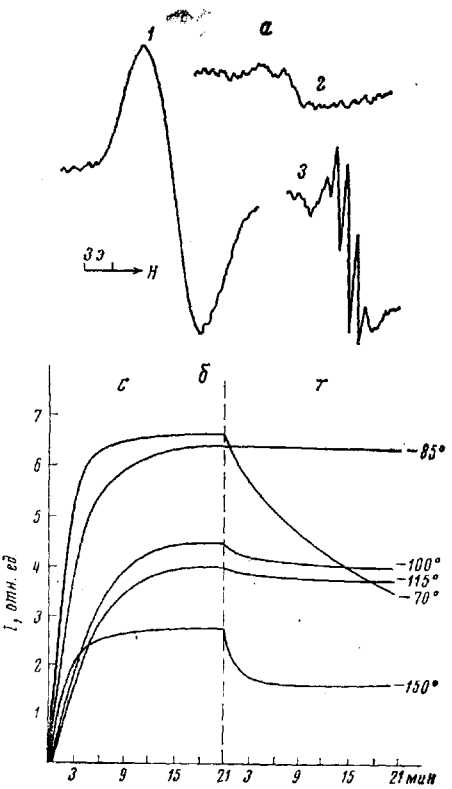


Рис. 2

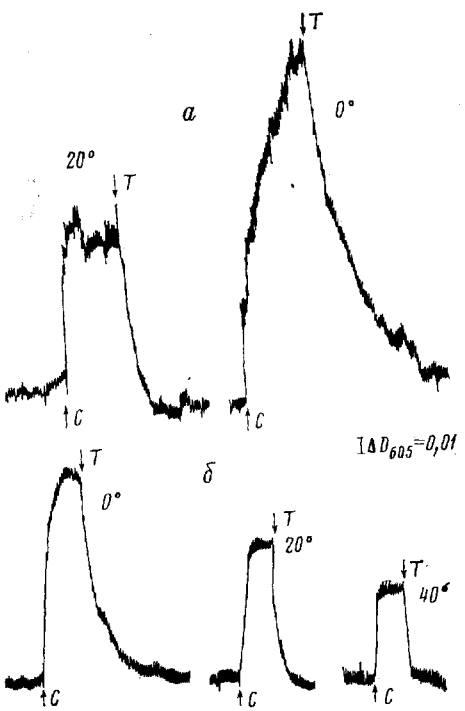


Рис. 3

чески не влияет на ход темновой реакции. Аналогичные результаты получены в опытах с бактериохлорофиллом b.

Проведение реакции в водном растворе тритона X-100, в спирте и в смеси спирта с глицерином (1:3) показало, что скорости прямой и обратной реакций зависят от состава среды (табл. 2). В водном растворе детер-

Таблица 1

Зависимость фотоокисления бактериохлорофилла a *n*-бензохиноном в водном растворе тритона X-100 от pH. Время освещения 30 сек. ($D \pm 0{,}001$)

$\Delta D \cdot 1000$	pH					
	4,9	5,6	6,4	6,8	7,4	8,01
$+\Delta D_{430}$	62	50	50	25	10	5
$-\Delta D_{590}$	30	25	20	15	6	–

Примечание. Знак плюс — увеличение D, минус — уменьшение D.

Таблица 2

Фотохимическое взаимодействие бактериохлорофилла a с *n*-бензохиноном в разных средах при 20° и 0°; pH 5,2. Обратимое изменение оптической плотности $(D)_l$ при $\lambda = 770$ нм, ($D \pm 0{,}001$)

Среда	ΔD *·1000 при световой реакции		ΔD *·1000 при обратной реакции в темноте	
	20°	0°	20°	0°
Спирт + глицерин	−312	−340	+25	–
Спирт	−225	−300	+75	+40
Тритон X-100	−145	−450	+135	+50
	−480 *	–	+300 **	–

* Знак минус — падение D при освещении 2 сек, плюс — увеличение D за 10 сек. темноты.

** Изменение D за 10 сек. света и 30 сек. темноты.

гента при 20° величина ΔD за 2 сек. освещения значительно меньше, чем в спирте и в смеси спирта с глицерином. Из сравнения величин ΔD при обратной реакции в темноте видно, что в водном растворе тритона X-100 этот продукт обладает меньшей стабильностью и равновесие в этой системе наступает быстрее. Понижение температуры до 0° в опытах с водным раствором детергента вызывает увеличение изменения D при освещении. Измерение оптической плотности при дальнейшем понижении температуры в этой системе невозможно из-за образования непрозрачного льда.

Образование свободных радикалов при этой реакции показано с помощью метода э.п.р. Измерения были проведены в температурном диапазоне $-150° \div -50°$ при pH 5,2 и 6,8. Наиболее отчетливые результаты получены при pH 5,2. Освещение красным светом растворов бактериохлорофилла a и *n*-бензохинона в водном растворе детергента в присутствии 10% этанола приводило к возникновению синглетного сигнала шириной 12—14 э. и $g = 2{,}0025$ (рис. 2*а*). Скорость нарастания синглетного сигнала и общий выход продукта зависели от температуры, увеличиваясь с ее повышением (рис. 2*б*). Индуцируемый светом синглетный сигнал длительное время сохраняется в темноте после выключения света. После размораживания образца сигнал полностью исчезает.

Действие белого света на растворы *n*-бензохинона в водном тритоне X-100 различно при кислом и нейтральном pH. Так, при pH 5,2 в присут-

ствии небольших добавок этанола на свету сигнал э.п.р. семихинона не наблюдался, тогда как при pH 6,8 на свету индуцировался пятилинейчатый сигнал семихинона (рис. 2*а*). Свойства синглетного сигнала: ширина и форма линии, длительность жизни сходны с наблюдавшимися нами ранее для сигнала э.п.р. в растворах бактериохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле ([10], [11]), что свидетельствует об образовании в водном растворе тритона X-100 катион-радикальной формы бактериохлорофилла. Бо́льшая длительность жизни радикального продукта по сравнению с длительностью жизни фотохимического продукта «430» объясняется проведением э.п.р. измерений и спектрофотометрических опытов в разных температурных условиях. Однако сравнение данных, полученных в аналогичных опытах со спиртовыми растворами, показывает совпадение кинетик возникновения и расходования этих продуктов как при фотохимических, так и э.п.р. измерениях.

В тройной системе, состоящей из акцептора электрона (убихиноны UQ_0 и UQ_2), пигмента (бактериохлорофиллы a и b) и донора электрона (дихлорфенолиндофенол (ДХФИ), восстановленный аскорбиновой кислотой), показано увеличение поглощения при 605 нм при освещении растворов светом длиной волны больше 700 нм. Это свидетельствует о сенсибилизированном пигментом фотоокислении красителя убихиноном. При выключении света реакция идет обратно за счет взаимодействия восстановленного акцептора электрона с окисленным красителем. Реакция в тройной системе, так же как и реакция переноса электрона между возбужденными молекулами пигмента и хинона, зависит от pH и температуры.

Итак, бактериохлорофиллы a и b способны к прямому фотохимическому взаимодействию с акцепторами электрона в водных растворах детергента. Промежуточный продукт, образующийся при этой реакции, имеет природу катион-радикала. Исследование тройной системы показало способность бактериохлорофиллов a и b участвовать в фотосенсибилизированном переносе электрона.

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

Поступило
24 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова,* ДАН, т. 150, 1379 (1963); т. 153, 721 (1963). [2] *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 30, 605 (1965). [3] *В. Б. Евстигнеев,* Биофизика, т. 15, 239 (1970). [4] *G. Tollin, G. Green,* Biochim. biophys acta, v. 60, 524 (1962); *R. A. White, G. Tollin,* Photochem. Photobiol., v. 14, 143 (1971). [5] *М. Г. Шапошникова, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 36, 704 (1971). [6] *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* ДАН, т. 195, 1222 (1970). [7] *А. А. Красновский, Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова,* ДАН, т. 211, 981 (1973). [8] *Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 39, 188 (1974). [9] *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* ДАН, т. 207, 988 (1972). [10] *А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко, А. А. Красновский,* Биофизика, т. 18, 565 (1973); ДАН, т. 221, 974 (1975). [11] *А. А. Красновский, Е. М. Пушкина и др.,* ДАН, т. 221, 1457 (1975). [12] *I. R. Harbour, G. Tollin,* Photochem. Photobiol., v. 19, 69, 163 (1974). [13] *А. П. Костиков, Н. А. Садовникова и др.,* Биофизика, т. 19, 244 (1974). [14] *В. А. Ким, В. М. Возняк, В. Б. Евстигнеев,* Биофизика, т. 19, 992 (1974); т. 20, 208 (1975). [15] *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова,* ДАН, т. 165, 1435 (1965).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 9 1975 Вып. 2

УДК 541.144.7

ДЕЙСТВИЕ ДЕТЕРГЕНТА ТРИТОНА Х-100 НА ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВЫХОДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ *

В. В. КЛИМОВ, Н. В. КАРАПЕТЯН и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва, и Институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пущино, Московская область

Показано, что фотоиндуцированные ΔФ изолированных хлоропластов уменьшаются при концентрации детергента до 0,03%, возрастают при увеличении от 0,03 до 0,05 и необратимо подавляются при концентрациях выше 0,08—0,1%. Характерная для хлоропластов зависимость ΔФ от концентрации тритона наблюдается у фрагментов хлоропластов, обогащенных ФС-2, но не у фрагментов, обогащенных ФС-1. Световые ΔФ хлоропластов, обработанных тритоном, активировались при добавлении гидроксиламина и насыщались при меньших интенсивностях света, чем ΔФ исходных хлоропластов. Тритон в концентрации 0,01%, как и диурон, вызывал активацию световых ΔФ хлоропластов с инактивированной донорной частью ФС-2. Предполагается, что сложная зависимость ΔФ хлоропластов от концентрации тритона обусловлена наложением ряда эффектов: разобщением фотофосфорилирования, инактивацией электроно-траспортной цепи в области донорного и акцепторного участков ФС-2 и ее активного центра, а также изменением действующей концентрации тритона в области ККМ.

Широкое применение детергентов для получения водных растворов хлорофилла [1, 2] и для фрагментирования хлоропластов [3—5] определяет интерес к детальному изучению действия этих веществ на фотосинтетический аппарат изолированных хлоропластов и хроматофоров [6—12]. Было показано, что наиболее часто применяемый для этих целей неионогенный детергент тритон уже в концентрации 0,007%, нарушая целостность мембран, полностью подавляет способность хлоропластов к фотофосфорилированию, световым изменениям объема и световому поглощению ионов H^+ [6, 7]. При этом разобщение фотофосфорилирования сопровождается активацией реакции Хилла, однако при дальнейшем увеличении концентрации детергента (до 0,02% и выше) наблюдается полное подавление этой реакции [6, 8, 9]. При более высоких концентрациях тритона хлоропласты выполняют фотохимические реакции, характерные для солюбилизированного хлорофилла [10]. Наряду с подавлением реакции Хилла обработка хлоропластов тритоном вызывает коротковолновый сдвиг красного максимума поглощения хлорофилла [9, 11] и увеличение интенсивности Ф [11].

Представляло интерес выяснить, подавление каких участков фотосинтетической цепи переноса электрона ответственно за инактивацию хлоропластов тритоном. Один из подходов к решению этой задачи — ис-

* Сокращения: Ф — флуоресценция; ΔФ — изменения выхода флуоресценции; ФС-1, ФС-2 — соответственно фотосистемы 1 и 2; тритон — тритон Х-100; ДХФИФ — 2,6-дихлорфенолиндофенол; ККМ — критическая концентрация мицеллообразования.

следование влияния детергента на фотоиндуцированные ΔФ изолированных хлоропластов.

Как отмечалось ранее [5, 13—15], за световые ΔФ хлоропластов ответственна главным образом ФС-2. Увеличение Ф хлорофилла ФС-2 при освещении связано, по-видимому, с накоплением первичного акцептора электронов этой фотосистемы (Q) в восстановленной форме [13]. Поэтому при создании условий, препятствующих восстановлению Q (при добавлении окислителей Хилла, при инактивации донорной части ФС-2, а также при активации ФС-1) происходит подавление световых ΔФ [5, 13—15]. Следовательно, при исследовании ΔФ можно получить информацию о функционировании активных центров ФС-2 и ближайших к ним участков цепи переноса электрона, а также о взаимодействии фотосистем.

Использование в этой работе метода измерения световых ΔФ позволило нам получить данные, свидетельствующие о том, что в зависимости от концентрации тритона происходит подавление различных участков фотосинтетической цепи переноса электрона преимущественно в области ФС-2.

МЕТОДИКА

Хлоропласты гороха, а также «дигитониновые» фрагменты хлоропластов, выделенные по методике работ [5, 15], хранили при температуре жидкого азота в 10%-ном глицерине, что позволило провести всю работу с однородным материалом. Указанные в статье конечные концентрации тритона получали добавлением в суспензию хлоропластов 5%-ного водного раствора тритона фирмы «Schuchard». Обработанную суспензию инкубировали в темноте в течение часа, после чего проводили все спектральные измерения. Обработку тритоном и все последующие измерения проводили при 4° в среде, содержащей 0,015 *М трис*-HCl-буфер (pH 7,8), 0,035 *М* NaCl и 0,002 *М* $MgCl_2$, при содержании хлорофилла в суспензии 0,01 *мг/мл*.

Измерение темновой Ф и световых ΔФ проводили на установке, описанной ранее [16]. Слабый свет (480 *нм*, 5 *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$) возбуждал Ф объекта, выход которой изменялся под действием дополнительного освещения светом 600—700 *нм* ($1{,}5 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$), насыщающим для ΔФ; регистрировали Ф с $\lambda > 660$ *нм*. На этой же установке измеряли скорость фотовосстановления добавленного к хлоропластам ДХФИФ [5, 15]. Спектры поглощения и флуоресценции измеряли как описано ранее [5, 15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Световые ΔФ суспензии хлоропластов значительно уменьшаются при концентрациях тритона 0—0,03%, возрастают при концентрациях 0,03—0,05% и практически полностью подавляются при увеличении концентрации детергента до 0,1% и выше (рис. 1). Зависимость темновой Ф от концентрации тритона имеет антибатный по отношению к зависимости ΔФ характер (рис. 1, *а*, кривая *3*). Такая же зависимость Ф и ΔФ от концентрации тритона была получена для Ф с $\lambda > 710$ *нм* при возбуждении светом 650 *нм*, а также в опытах, проводимых при 20°.

Аналогичная зависимость от концентрации тритона наблюдается также для эффектов, связанных с изменением состояния хлорофилла в хлоропластах (см. рис. 2): для изменения положения максимума Ф при 685 *нм* — $Ф_{685}$ — (кривая *1*), а также для изменения отношения $Ф_{685}/Ф_{735}$ в спектрах Ф (кривая *2*). Скорость реакции Хилла имеет еще более сложную зависимость от концентрации тритона: активация в области 0—0,005% (связанная, по-видимому, с разобщением фотофосфорилиро-

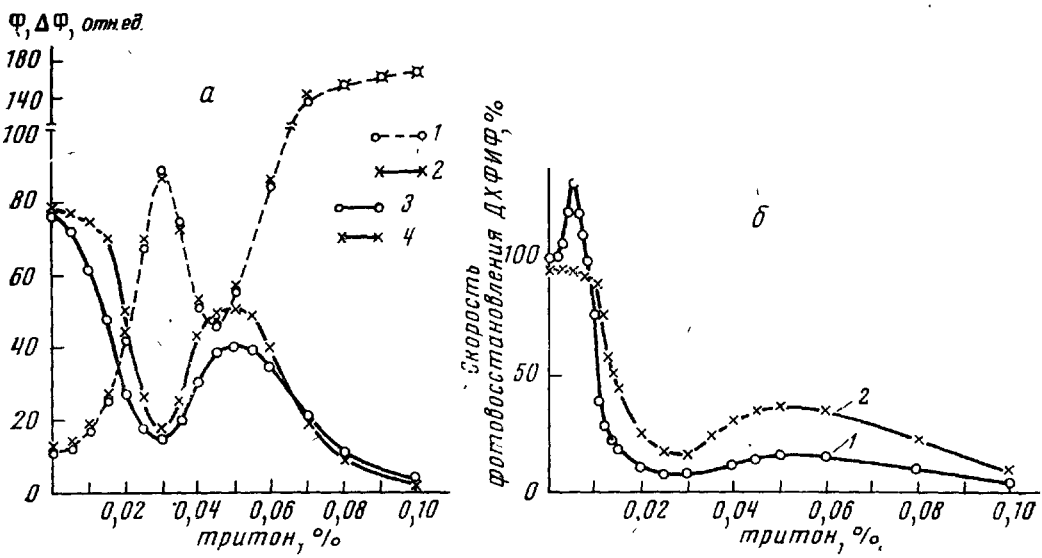


Рис. 1. Зависимость от концентрации тритона: *а* — темновой Ф (пунктирные кривые) и световых ΔФ (сплошные кривые); *б* — скорости фотовосстановления ДХФИФ у хлоропластов. Кривые *1*, *3* (рис. *а*) и *1* (рис. *б*) — до добавления, а кривые *2*, *4* (рис. *а*) и *2* (рис. *б*) — после добавления $5 \cdot 10^{-3}$ *М* гидроксиламина

вания [6]), спад в области 0,005—0,03%, небольшое увеличение в области 0,03—0,05% и подавление при дальнейшем увеличении концентрации тритона (рис. 1, *б*).

Инактивация донорного и акцепторного участков ФС-2. Как видно на рис. 1, световые ΔФ и фотовосстановление ДХФИФ у хлоропластов, обработанных тритоном в концентрации выше 0,01%, значительно активируются при добавлении гидроксиламина, способного, согласно дан-

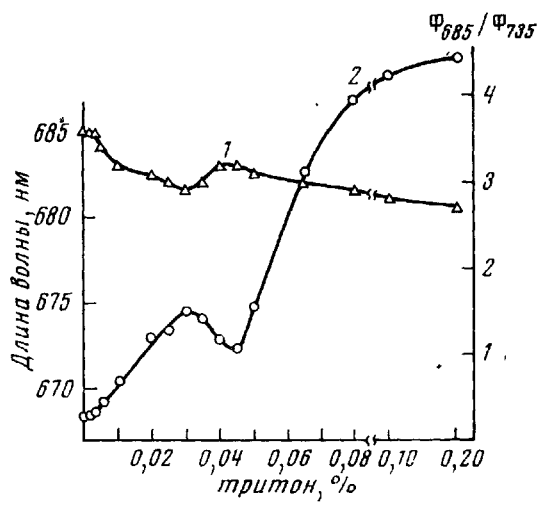


Рис. 2. Зависимость от концентрации тритона положения коротковолнового максимума в спектрах флуоресценции при 4° (*1*) и отношения величин коротковолнового максимума к длинноволновому в спектрах флуоресценции хлоропластов при —196° (*2*)

ным работы [17], служить донором электрона для ФС-2. При добавлении диурона ($5 \cdot 10^{-6}$ *М*) способность к фотовосстановлению ДХФИФ утрачивалась у исходных и обработанных тритоном хлоропластов как в отсутствие, так и в присутствии гидроксиламина. При всех концентрациях тритона добавление гидроксиламина активировало ΔФ до такого уров-

ия, что сумма Ф и ΔФ равнялась $Ф_{макс}$, т. е. уровню, до которого Ф усиливалась в темноте при добавлении сильного восстановителя дитионита (0,5 *мг/мл*).

Следовательно, одной из причин подавления ΔФ хлоропластов уже при малых (0,005—0,01%) концентрациях тритона может быть поражение донорной части ФС-2. На это указывает также отсутствие подавления ΔФ при концентрации тритона до 0,01% для хлоропластов, у которых донорная часть ФС-2 была предварительно инактивирована по методике из работы [18], обработкой 0,6 *М трис*-HCl-буфером (рис. 3). Световые

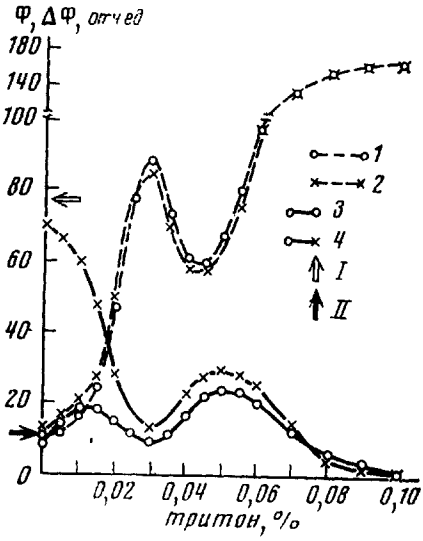


Рис. 3. Зависимость от концентрации тритона темновой Ф (пунктирные кривые) и световых ΔФ (сплошные кривые) хлоропластов, предварительно обработанных 0,6 *М трис*-HCl-буфером, pH 7,8 (1 *час* при 4° в темноте) при измерении в отсутствие (*1*, *3*) и в присутствии (*2*, *4*) $5 \cdot 10^{-3}$ *М* гидроксиламина. Стрелками *I* и *II* обозначены соответственно уровни ΔФ и Ф исходных хлоропластов

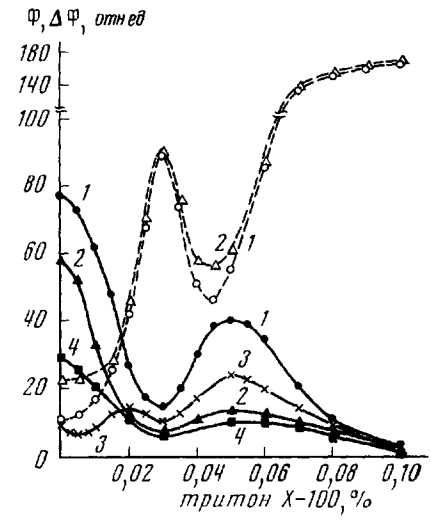


Рис. 4. Зависимость от концентрации тритона темновой Ф (пунктирные кривые) и световых ΔФ (сплошные кривые) хлоропластов при освещении светом насыщающей интенсивности (*1*, *2*) и интенсивностью 1,5% от насыщающей (*3*, *4*) при измерении в отсутствие (*1*, *3*) и в присутствии (*2*, *4*) $5 \cdot 10^{-6}$ *М* диурона

ΔФ у таких хлоропластов значительно подавлены, а при обработке трионом в концентрации 0—0,01% наблюдается увеличение ΔФ. При добавлении гидроксиламина световые ΔФ таких хлоропластов активируются, а их зависимость от концентрации тритона становится подобной аковой исходных хлоропластов.

Следует отметить, что причиной уменьшения ΔФ при концентрации ритона ~0,005%, особенно хорошо заметного при низких интенсивностях света (рис. 4, кривая *3*), может быть также увеличение скорости переноса электронов при данных концентрациях детергента (рис. , *б*), препятствующее световому накоплению *Q* в восстановленной орме.

При добавлении к хлоропластам 0,01—0,03% тритона наблюдаются ффекты, которые характерны для действия диурона и, следовательно, огут свидетельствовать о блокировании оттока электронов от ФС-2.) При концентрации тритона 0,01—0,03% (как и в присутствии $\cdot 10^{-6}$ *М* диурона) ΔФ хлоропластов насыщаются при меньших интенсивностях света и поэтому ΔФ, вызываемые светом низкой интенсивности, значительно активируются (рис. 4, кривая *3*; рис. 5, кривые *1*—*3*,

5); кроме того, темновая Ф растет, а световые ΔФ, вызываемые светом насыщающей интенсивности, за счет этого уменьшаются (рис. 4, кривые *1*; рис. 5, кривые *1—3*). *2*) Световые ΔФ хлоропластов, обработанных 0,6 *М трис*-буфером, значительно активируются при добавлении 0,01—0,02%-ного тритона (рис. 3), что характерно также для действия диурона [15]. *3*) Метилвиологен (искусственный акцептор электрона для ФС-1 [19]) подобно феррицианиду подавлял световые ΔФ хлоропластов. Однако после добавления к хлоропластам тритона в концентрации выше

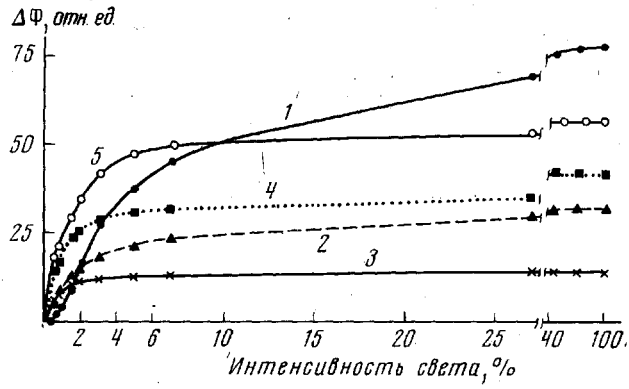


Рис. 5. Зависимость ΔФ от интенсивности действующего света у исходных хлоропластов (*1*), после обработки тритоном в концентрации (%): 0,02—*2*; 0,03—*3*; 0,05—*4* и после добавления $5 \cdot 10^{-6}$ *М* диурона — *5*. Максимальная интенсивность света (600—700 *нм*) соответствует $1{,}5 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$

0,02% (как и при добавлении диурона) метилвиологен не влиял на величину Ф и ΔФ, что свидетельствует о блокировании переноса электронов между фотосистемами. Этот вывод подтверждается данными о том, что отрицательные ΔФ, регистрируемые при возбуждении ФС-1, исчезают при добавлении к хлоропластам 0,02%-ного тритона [15]. *4*) Световые ΔФ хлоропластов, обработанных 0,02—0,03%-ным тритоном, активировались при добавлении $2 \cdot 10^{-5}$ *М* феррицианида и уменьшались при последующем добавлении диурона. В то же время при добавлении феррицианида к исходным хлоропластам (или обработанным тритоном в концентрации ниже 0,02%) световые ΔФ подавлялись, а при последующем добавлении диурона возрастали.

Таким образом, при концентрации тритона 0,02—0,03%, по-видимому, помимо донорной подавляется и акцепторная часть ФС-2.

Реактивация акцепторного участка ФС-2. При увеличении концентрации тритона от 0,03 до 0,05% происходит увеличение (вместо ожидаемого дальнейшего уменьшения) световых ΔФ и скорости фотовосстановления ДХФИФ (рис. 1). За этот эффект ответственна ФС-2, а не ФС-1, поскольку при добавлении диурона световые ΔФ хлоропластов, обработанных 0,05%-ным тритоном, подавляются даже в большей степени, чем ΔФ исходных хлоропластов (рис. 4, кривые *2*, *4*), а фотовосстановление ДХФИФ подавлялось полностью. Кроме того, эффект реактивации наблюдался на дигитониновых фрагментах хлоропластов, обогащенных ФС-2, тогда как у фрагментов, обогащенных ФС-1, при увеличении концентрации тритона наблюдалось монотонное увеличение Ф и уменьшение ΔФ.

Реактивация ΔФ и фотовосстановления ДХФИФ при увеличении концентрации тритона от 0,03 до 0,05%, по-видимому, обусловлена разблокированием акцепторной части ФС-2. На это указывают данные о

том, что при переходе от 0,03 к 0,05% тритона происходит значительное уменьшение темновой Ф (рис. 1, *а*; рис. 3, 4 — пунктирные кривые), а для насыщения ΔФ требуются более высокие интенсивности света (рис. 5, кривые *3*, *4*). Причиной такого разблокирования акцепторной части ФС-2 могло бы быть освобождение эндогенных окислителей или увеличение их доступа к ФС-2.

С другой стороны, эффект реактивации можно рассматривать как следствие того, что переход от 0,03 к 0,05% тритона сопровождается уменьшением действующей концентрации детергента. Действительно, уменьшение эффекта инактивации в этой области концентраций тритона проявляется не только в реактивации ΔФ и реакции Хилла, но и в уменьшении коротковолновых спектральных сдвигов (рис 2). Реактивация имела место только в том случае, если изменение концентрации тритона от 0,03 до 0,05% происходило до окончания реакции с тритоном в концентрации 0,03% (рис. 6). Чем меньше был промежуток времени между добавлением 0,03 и 0,02% тритона, тем ниже был эффект инактивации, т. е больше реактивация (рис 6). В то же время переход кон-

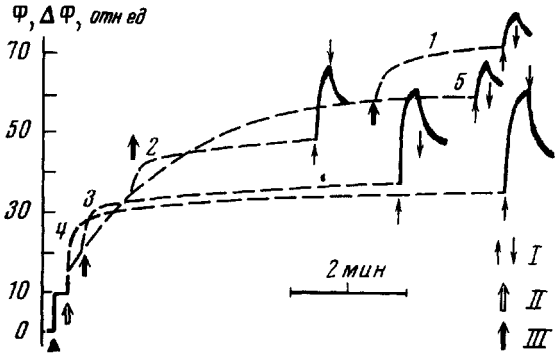


Рис 6 Влияние на Ф (пунктирные кривые) и ΔФ (сплошные кривые) хлоропластов 0,02% тритона, добавляемого через различные промежутки времени после добавления 0,03% тритона *1* — через 5,5 *мин* (после насыщающего действия 0,03% тритона), *2* — через 70 *сек*, *3* — через 20 *сек* и *4* — в момент добавления (т е в среду добавлено 0,05%), *5* — добавлено только 0,03% тритона Обозначения ▲ — включение света, возбуждающего Ф, *I* — включение и выключение действующего света, *II* и *III* — добавление соответственно 0,03 и 0,02% тритона

центрации тритона от 0,05 к 0,03% (разбавлением) вызывал усиление ингибирования независимо от того, в какой момент осуществлялся этот переход

Причиной уменьшения действующей концентрации тритона при переходе от 0,03 к 0,05%, по-видимому, может быть неспецифическое связывание детергента хлоропластами, не вызывающее инактивации цепи переноса электрона и спектральных сдвигов. При образовании мицелл, сопровождающемся солюбилизацией нерастворимого в воде материала хлоропластов, такое неспецифическое связывание тритона будет увеличиваться, что и может привести к резкому понижению действующей концентрации детергента. О связи эффекта реактивации с мицеллообразованием могут свидетельствовать следующие факты. *1*) ККМ для тритона при растворении в воде составляет 0,02% [20]. Вследствие взаимодействия тритона с хлоропластами ККМ может сдвинуться в область концентраций более высоких, чем 0,02%, где как раз и наблюдается эффект реактивации. *2*) С увеличением содержания хлорофилла в суспензии хлоропластов от 0,01 до 0,05 *мг/мл* эффект реактивации сдвигался в область концентраций тритона 0,04—0,08%. Это может быть обусловлено тем, что мицеллообразование задерживалось из-за увеличения неспецифического связывания детергента хлоропластами. *3*) С увеличением концентрации NaCl в среде от 0,035 до 0,6 *М* эффект реактивации сдвигался в область концентраций тритона 0,02—0,04%. Как следует из теории мицеллообразования [21], такой сдвиг может быть следствием влияния ионной силы на ККМ. Следует также отметить, что эффект,

сходный с обнаруженным нами эффектом реактивации у хлоропластов, наблюдался при изучении влияния тритона на движение протоплазмы клеток нителлы [22].

Не совсем ясно с точки зрения связи эффекта реактивации с мицеллообразованием, почему этот эффект отсутствует у легких фрагментов хлоропластов, обогащенных ФС-1. Возможно, это связано с тем, что легкие (по сравнению с тяжелыми) фрагменты хлоропластов характеризуются относительно меньшим содержанием липидов [4].

Разрушение активных центров ФС-2. Практически полное подавление реакции Хилла и ΔФ при увеличении концентрации тритона до 0,1% и выше (рис. 1) вызвано, по-видимому, разрушением самих активных центров ФС-2, связанным с солюбилизацией хлоропластов. Об этом свидетельствуют данные о том, что при концентрации тритона 0,08—0,1% происходит резкое усиление темновой Ф, а световые ΔФ не активируются ни при добавлении гидроксиламина или дитионита, ни при переходе к более низким концентрациям детергента (при разбавлении). Разрушение активных центров ФС-2 начинается, по-видимому, уже при 0,025—0,03% тритона, о чем свидетельствует значительное усиление Ф и необратимое подавление ΔФ в этой области концентраций детергента. Однако при увеличении концентрации тритона до 0,05% деструкция центров приостанавливается (в связи с эффектом реактивации) и проявляется лишь при дальнейшем увеличении концентрации детергента.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что сложная зависимость Ф и ΔФ хлоропластов от концентрации тритона может быть обусловлена наложением ряда эффектов: разобщения фотофосфорилирования, инактивации донорного и акцепторного участков ФС-2 и ее активных центров, изменения состояния хлорофилла, а также изменения действующей концентрации детергента в области ККМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брин Г. П., Красновский А. А., Биохимия, **22**, 776, 1957.
2. Шапошникова М. Г., Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, **36**, 704, 1971.
3. Anderson J. M., Boardman N. K., Biochim. et biophys. acta, **112**, 403, 1966.
4. Vernon L. P., Ke B., Mollenhauer H. H., Shaw E., Progress in Photosynthesis Res., Tübingen, **1**, 137, 1969.
5. Karapetyan N. V., Klimov V. V., Krasnovsky A. A., Photosynthetica, **7**, 330, 1973.
6. Neumann J., Jagendorf A., Biochim. et biophys. acta, **109**, 382, 1965.
7. Packer L., Marchant H., J. Biol. Chem., **239**, 2061, 1964.
8. Vernon L. P., Shaw E., Plant Physiol., **40**, 1269, 1965.
9. Красновский А. А., Брин Г. П., Докл. АН СССР, **179**, 726, 1968.
10. Vernon L. P., Zaugg W. S., Shaw E., Photosynthetic Mechanisms of Green Plants, Natl. Acad. Sci.— Natl. Res. Council. Publ. 1145, Washington, p. 508. 1963.
11. Sauer K., Park K. B., Biochim. et biophys acta, **79**, 476, 1964.
12. Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А., Мол. биол., **6**, 773, 1972.
13. Duysens L. N. M., Sweers H. E. Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, University of Tokyo Press, Tokyo, p. 353, 1963.
14. Карапетян Н. В., Климов В. В., Ланг Ф., Красновский А. А., Физиол. раст., **18**, 507, 1971.
15. Карапетян Н. В., Климов В. В., Физиол. раст., **20**, 545, 1973.
16. Карапетян Н. В., Климов В. В., Физиол. раст., **18**, 223, 1971.
17. Katoh S., Ikegami J., Takamiya A., Arch. Biochem. and Biophys., **141**, 207, 1970.
18. Yamashita T., Butler W. L., Plant Physiol., **43**, 1978, 1968.
19. Kok B., Rurainsky H. J., Owens O. V. H., Biochim. et biophys. acta, **109**, 347, 1965.
20. Massini P., Voorn G., Biochim. et biophys. acta, **153**, 589, 1968.
21. Шинода К., Накагава Т., Тамамуси Б., Исемура Т., Поверхностно-активные вещества, «Мир», М., 1966.
22. Haapala E., Physiol. plantarum, **23**, 187, 1970.

Поступила в редакцию
8.X.1973

THE EFFECT OF DETERGENT TRITON X-100 ON THE LIGHT INDUCED CHANGES IN THE FLUORESCENCE YIELD OF CHLOROPLASTS

V. V. KLIMOV, N. V. KARAPETYAN and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, and Institute of Photosynthesis, Academy of Sciences of the USSR, Poustchino, Moscow Region

It is shown that light induced changes of the fluorescence yield (ΔF) of isolated chloroplasts are affected by Triton X-100. ΔF value decreases with the increase of the detergent concentration from 0 to 0.03%, increases in the range of 0.03—0.05% and is irreversibly blocked at concentrations more than 0.08—0.1%. The same dependence of ΔF on the detergent concentration is obtained for «digitonin» fragments of chloroplasts enriched in the photosystem 2, but not for fragments enriched in the photosystem 1. Light induced ΔF of chloroplasts treated by detergent were activated by hydroxylamine and saturated at lower light intensities than ΔF of untreated chloroplasts. Addition of 0.01% Triton resulted in an activation of light induced ΔF of chloroplasts with damaged donor part of photosystem 2. It is suggested that the complex dependence of ΔF of chloroplasts on the Triton concentration is due to superposition of several effects: the uncoupling of photophosphorylation, inactivation of the electron transport chain in the donor and acceptor parts of photosystem 2, and changes of acting concentration of Triton X-100 within the range of critical micelle concentration.

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 221, № 5

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

В. В. КЛИМОВ, И. Н. КРАХМАЛЕВА, В. А. ШУВАЛОВ,
Н. В. КАРАПЕТЯН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ЗАВИСИМОСТЬ ВЫХОДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ И ХРОМАТОФОРОВ ОТ СОСТОЯНИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ

Фотоиндуцированное увеличение выхода флуоресценции хлорофилла фотосинтезирующих организмов связывают с временной потерей способности реакционных центров фотосистем использовать энергию возбуждения хлорофилла из-за накопления продуктов первичной фотореакции. В случае фотосистемы 2 растений увеличение выхода флуоресценции объясняется накоплением первичного акцептора электрона этой фотосистемы в восстановленном виде ([1], [2]). Световые изменения флуоресценции ($\Delta\Phi$) пурпурных бактерий связывают с накоплением окисленного бактериохлорофилла ($П870^+$) в реакционном центре ([3–6]). Обнаруженное нами увеличение выхода флуоресценции фотосистемы 1 вызвано, по-видимому, фотоокислением П700 ([2], [7]). В настоящей работе мы попытались выяснить, является ли фотоокисление хлорофилла в реакционном центре фотосистемы бактерий и фотосистемы 1 растений единственной причиной увеличения выхода флуоресценции, или же оно может быть вызвано, как у фотосистемы 2 растений, еще и накоплением первичного акцептора электрона этих фотосистем в восстановленном виде.

Исследования проводили на фрагментах хлоропластов, обогащенных фотосистемой 1, и на изолированных хроматофорах бактерий Rhodospirillum rubrum. Легкие фрагменты хлоропластов получали по методике ([8]) с некоторыми изменениями. Хлоропласты гороха, суспендированные в 0,05 *M* трис-буфере (pH 8,0) при концентрации хлорофилла 0,5 мг/мл, обрабатывали в течение 50 мин. 1% дигитонином, а затем в течение 10 мин. 1% дигитонином и 0,1% тритоном X-100. Надосадочную жидкость после 30 мин. центрифугирования суспензии при 80 000 *g* центрифугировали 3,5 часа при 175 000 *g*, полученный осадок суспендировали в 0,05 *M* трис-буфере (pH 8,0). У выделенных фрагментов отношение хлорофиллов a/b=4,95, а П700/хлорофилл *a*=1/150. Скорость фотоокисления восстановленного 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ-H_2) этими частицами, измеряемая как в ([2]), но в присутствии пластоцианина, составляла 320 мкмол. на 1 мг хлорофилла в час. Для подавления функциональных проявлений примеси фотосистемы 2 фрагменты прогревали при 45° в течение 5 мин. Хроматофоры бактерий R. rubrum, полученные по методике ([9]), обрабатывали 0,1% тритоном X-100, что вело к исчезновению фотоиндуцированного увеличения поглощения при 900 нм, связываемого с возникновением трансмембранного потенциала ([10]). Фотоиндуцированные ΔD и $\Delta\Phi$ измеряли на однолучевом дифференциальном спектрофотометре, аналогичном описанному ранее ([11]). У фрагментов хлоропластов флуоресценцию $\lambda>660$ нм возбуждали монохроматическим светом 480 нм (45 эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$), а у хроматофоров флуоресценцию $\lambda>850$ нм — светом 590 нм (120 эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$). В качестве действующего использовали свет 700—1000 нм, 10^5 эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$. При освещении фрагментов хлоропластов, обогащенных фотосистемой 1, в присутствии аскорбата натрия наблюдается обратимое увеличение выхода флуоресценции и уменьшение поглощения в красной области спектра (рис. 1, *1*). Добавление $2\cdot10^{-5}$ *M* диурона не влияло на величину и кинетику $\Delta\Phi$ и ΔD. Световые $\Delta\Phi$ и ΔD активировались при добавлении метилвиологена (экзогенного акцептора электронов для фотосистемы 1). Добавление ДХФИФ-H_2 (эффективного экзогенного донора электронов для фотосистемы 1) ускоряло темновую

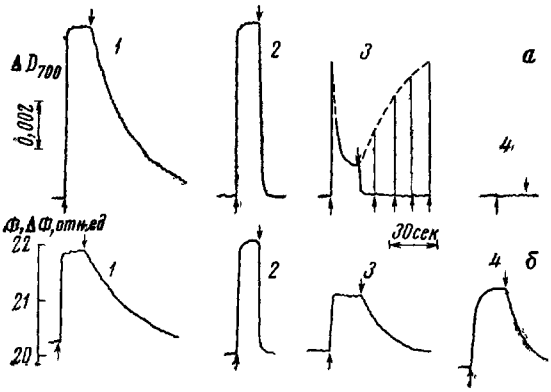


Рис. 1. Кинетика фотоиндуцированных ΔD_{700} (*а*) и ΔФ (*б*) фрагментов хлоропластов в присутствии: *1* – 10^{-3} *М* аскорбата натрия, *2* – 10^{-3} *М* аскорбата натрия и 10^{-5} *М* ДХФИФ, *3* – 1 мг/мл дитионита, *4* – 1 мг/мл дитионита и 10^{-5} *М* ФМС. Содержание хлорофилла в образце 13 мкг/мл

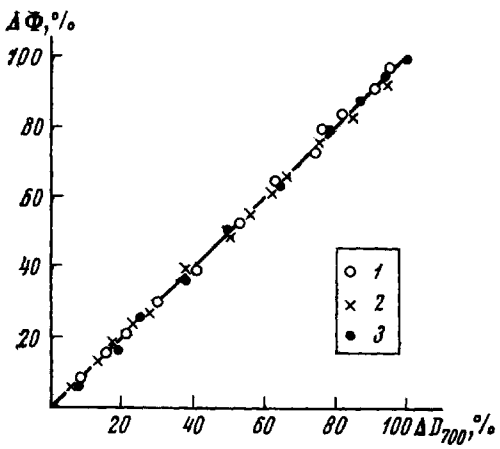


Рис. 2. Величина ΔФ как функция величины ΔD_{700} при освещении фрагментов хлоропластов светом разной интенсивности в присутствии: *1* – 10^{-3} *М* аскорбата натрия и 10^{-5} *М* ДХФИФ, свет $\lambda>700$ нм, *2* – 10^{-3} *М* аскорбата натрия, 10^{-5} *М* ДХФИФ и 10^{-4} *М* метилвиологена, свет $\lambda>700$ нм; *3* – 10^{-3} *М* аскорбата натрия и 10^{-5} *М* ДХФИФ, свет $\lambda>720$ нм. Содержание хлорофилла 10 мкг/мл

релаксацию ΔФ и ΔD (рис. 1, *2*). Спектр ΔD характеризовался максимумами при 700, 682 и 430 нм. Все это позволило наблюдаемые ΔD приписать фотоокислению П700, а ΔФ — увеличению выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 1 вследствие фотоокисления П700.

Величина ΔФ линейно зависит от величины ΔD_{700} при различной интенсивности действующего света (рис. 2). Прямая зависимость между этими параметрами наблюдается: 1) с метилвиологеном и без него: 2) при освещении светом $\lambda>700$ и $\lambda>720$ нм; 3) при возбуждении флуоресценции фрагментов светом 480, 650 и 680 нм и при регистрации флуоресценции как с $\lambda>660$, так и с $\lambda>720$ нм.

В присутствии дитионита ΔD_{700}, достигнув в первый момент освещения максимального значения, быстро уменьшаются на свету до стационарного уровня (рис. 1а, *3*). Световые ΔФ в этих условиях мало изменяются по величине, но в отличие от ΔD_{700} они значительно медленнее релаксируют в темноте (рис. 1*б*, *3*), что особенно отчетливо проявляется при увеличении концентрации дитионита. Кроме того, кинетика темнового спада ΔФ в присутствии дитионита соответствует кинетике темновой регенерации световых ΔD_{700} после их подавления при длительном освещении (рис. 1, *3*). Это позволило нам предположить, что световое увеличение выхода флуоресценции фотосистемы 1 в присутствии дитионита вызвано фотовосстановлением первичного акцептора электронов этой фотосистемы.

Медленно релаксирующие в темноте ΔФ (рис. 1*б*, *4*) наблюдаются и в случае добавления к фрагментам дитионита и феназинметасульфата (ФМС) (эффективного медиатора переноса электронов к $П700^+$) ([13]), когда световые ΔD_{700} не обнаруживаются совсем (рис. 1, *4*). Действие дитионита на ΔD и ΔФ полностью устранялось после окисления его феррицианидом или в ходе аэрации.

На связь ΔФ хроматофоров пурпурных бактерий с фотоокислением П870 указывалось ранее ([3–6]). В пользу этого свидетельствует тот факт, что релаксация как ΔФ, так и ΔD_{885} после выключения света ускоряется

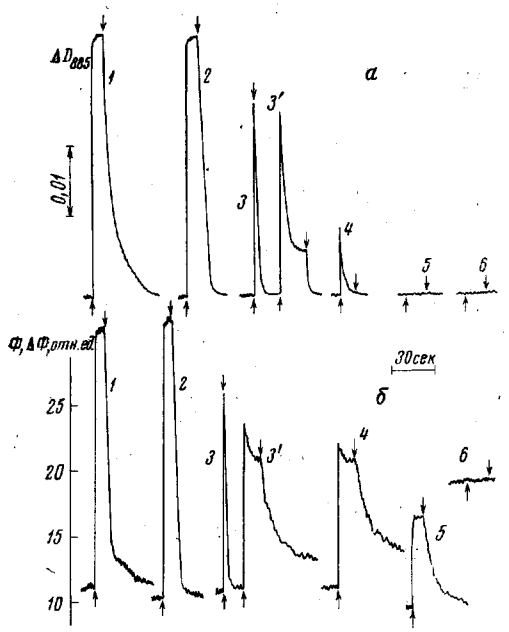


Рис. 3

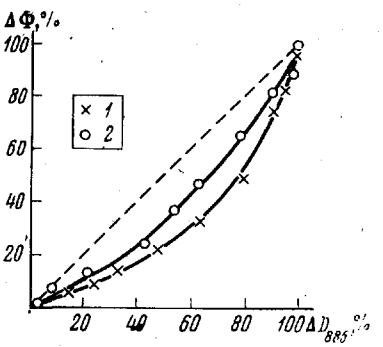


Рис. 4

Рис. 3. Кинетика фотоиндуцированных ΔD_{885} (*а*) и ΔФ (*б*) хроматофоров R. rubrum без добавок (*1*) и в присутствии: *2* – $5 \cdot 10^{-5}$ *М* аскорбата натрия; *3* – $5 \cdot 10^{-5}$ *М* аскорбата натрия и 10^{-5} *М* ДХФИФ; *3'* – то же при более длительном освещении; *4* – $5 \cdot 10^{-5}$ *М* аскорбата натрия и 10^{-5} *М* ДХФИФ в анаэробных условиях (после эвакуации воздуха); *5* – $5 \cdot 10^{-5}$ аскорбата натрия и 10^{-5} *М* ФМС в анаэробных условиях; *6* – 1 мг/мл дитионита в анаэробных условиях. Содержание бактериохлорофилла 9 мкг/мл

Рис. 4. Величина ΔФ как функция величины ΔD_{885} при освещении светом 700–1000 нм различной интенсивности хроматофоров R. rubrum: *1* – обработанных 0,1% тритоном X-100, *2* – без обработки тритоном. Содержание бактериохлорофилла 10 мкг/мл

при добавлении доноров электрона (аскорбата натрия или ДХФИФ-H_2) (рис. 3, *1–3*). Кроме того, нам удалось показать, что окисление П870 феррицианидом в темноте сопровождается увеличением выхода темновой флуоресценции до уровня, равного сумме постоянной и переменной компонент флуоресценции. В отличие от ΔФ фотосистемы 1, световые ΔФ хроматофоров R. rubrum характеризуются нелинейной зависимостью от доли $П870^+$ (рис. 4). Эти данные согласуются с предположением о том, что миграция энергии в фотосинтетических единицах у пурпурных бактерий осуществляется по мультицентральному типу ([3, 5, 6]), тогда как у фотосистемы 1 — по уницентральному типу ([2, 7]). В то же время, в работе ([12]) на основании анализа кинетики фотоокисления П700 было сделано предположение о мультицентральности фотосинтетических единиц фотосистемы 1.

Если ускорение темновой релаксации ΔD_{885} при добавлении ДХФИФ-H_2 не зависит от продолжительности освещения, то релаксация ΔФ ускоряется только в случае кратковременной экспозиции хроматофоров на свету (рис. 3, *3*). После длительного освещения, сопровождающегося спадом ΔD и ΔФ от максимального к более низкому стационарному уровню, темновой спад ΔФ, в отличие от ΔD_{885}, значительно замедлялся (рис. 3*б*, *3*). Следовательно, в этом случае световые ΔФ связаны уже не с накоплением $П870^+$. Медленно релаксирующие в темноте световые ΔФ сохранялись и при добавлении ФМС-H_2 или ДХФИФ-H_2 в анаэробных условиях, когда световые ΔD_{885} полностью исчезали во время освещения или не наблюдались совсем (рис. 3, *4*, *5*). В присутствии дитионита не наблюдались ни ΔD_{885}, ни ΔФ, а темновая флуоресценция возрастала до уровня

меньшего, чем сумма постоянной и переменной компонент флуоресценции (рис. 3, *6*).

Освещение хроматофоров R. rubrum и «легких» фрагментов хлоропластов в присутствии эффективных доноров электрона (в условиях как на рис. 1, *3*, *4*; рис. 3, *3—5*) ведет к накоплению на свету акцепторов электрона этих фотосистем в востановленном виде ([13], [14]). В этом случае скорость фотоокисления П870 и П700 становится меньше, чем скорость темнового восстановления $П870^+$ и $П700^+$, что проявляется в подавлении световых ΔD_{885} и ΔD_{700} (рис. 1*а* и 3*а*), а также фотоокисления цитохрома с у бактерий ([15]). Естественно предположить, что с обратимым фотовосстановлением акцептора электронов связаны и ΔФ, медленно релаксирующие в темноте (рис. 1*б*, *3*, *4*; 3*б*, *3—5*). Действительно, эти ΔФ не могут быть приписаны фотоокислению П870 и П700, поскольку они сохраняются в условиях, когда ΔD_{885} и ΔD_{700} не наблюдаются совсем. Кроме того, в отличие от ΔD, время темновой релаксации ΔФ возрастает при понижении окислительно-восстановительного потенциала среды.

Обозначив хлорофилл в реакционных центрах как П, а первичный акцептор электрона как А, реакции, происходящие в реакционных центрах, можно изобразить следующим образом

$$ПА \xrightarrow{h\nu} П^+А^- \begin{cases} \xrightarrow{+А'} П+А \\ \xrightarrow{+Д'} ПА^- \end{cases}$$

При наличии эффективных экзогенных или эндогенных вторичных акцепторов электрона (А′) происходит накопление окисленного П ($П^+А$), и флуоресцируют молекулы хлорофилла, ближайшие к П, так как энергия с них не может быть передана на $П^+$. При введении же эффективного донора электрона (Д′), когда усиливается приток электронов на $П^+$ и восстанавливаются вторичные акцепторы электрона, стабилизируется состояние ПА. В этих условиях, когда А восстановлен ($ПА^-$), энергия возбуждения молекул П не может быть использована в фотохимической реакции и растрачивается ими в виде флуоресценции. Способность П пурпурных бактерий (П890) к флуоресценции в присутствии дитионита была показана ранее ([5]).

Понижение общего уровня флуоресценции хроматофоров R. rubrum при добавлении дитионита или в условиях проявления медленно релаксирующих ΔФ может свидетельствовать о более низком выходе флуоресценции П870 по сравнению с молекулами бактериохлорофилла-светосборщика.

Таким образом, фотоиндуцированное увеличение выхода флуоросценции фотосистемы 1 растений и фотосистемы пурпурных бактерий может быть связано не только с фотоокислением хлорофилла в реакционном центре, но и с фотовосстановлением первичного акцептора электронов, как в случае фотосистемы 2 растений.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
20 XII 1974

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *L. N. M. Duysens, H. E. Sreers,* In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo, 1963, p. 353. [2] *N. V. Karapetyan, V. V. Klimov, A. A. Krasnovsky,* Photosynthetica, v. 7, 330 (1973). [3] *W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens,* Nature, v. 197, 355 (1963). [4] *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский,* ДАН, т. 71, 1201 (1966). [5] *R. K. Clayton,* Photochem. Photobiol., v. 5, 679 (1966). [6] *А. Ю. Борисов,* ДАН, т. 173, 208 (1967). [7] *Н. В. Карапетян, В. В. Климов, А. А. Красновский,* ДАН, т. 211, 729 (1973). [8] *J. M. Anderson, N. K. Boardman,* Biochim. et biophys. acta, v. 112, 403 (1966). [9] *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский,* Молек. биол., т. 6, 773 (1972). [10] *Е. Л. Барский, В. Д. Самуилов,* Биохимия, т. 37, 1005 (1972). [11] *Н. В. Карапетян, Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский,* Биофизика, т. 8, 191 (1963). [12] *А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина,* Молек. биол., т. 7, 212 (1973). [13] *B. Ke,* Biochim. et biophys. acta, v. 301, 1 (1974). [14] *R. Govindjee, W. R. Smith, Govindjee,* Photochem. Photobiol., v. 20, 191 (1974). [15] *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский,* Молек. биол., т. 7, 868 (1973).

ХИМИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА: МОДЕЛИ И ГИПОТЕЗЫ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

Ордена Ленина Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва, СССР

Жизнь на Земле полностью зависит от фотосинтеза растений, поставляющего органическое вещество и кислород всем организмам, существующим на нашей планете. Возникает вопрос, связано ли происхождение жизни на нашей планете с фотосинтезом?

А. И. Опарин убедительно обосновал то положение, что фотосинтез является более поздним типом обмена веществ, возникшим на основе метаболизма первичных гетеротрофных организмов, использующих готовое органическое вещество абиогенного происхождения [1]. Рассмотрим имеющиеся по этому вопросу данные.

Исследование путей биологической эволюции опирается на результаты изучения сравнительной биологии ныне существующих организмов и палеонтологии, позволяющие судить о развитии древних организмов. Поэтому пути биологической эволюции ныне представляются с большой степенью достоверности. Наиболее древними фотосинтезирующими организмами считают синезеленые водоросли, обнаруженные в докембрийских отложениях с возрастом до 3 млрд. лет. Наиболее вероятно, что первичные автотрофы — синезеленые водоросли и фотосинтезирующие бактерии возникли из примитивного фотоавтотрофного организма, пока не обнаруженного на Земле и в древних породах.

В ином состоянии находится изучение путей добиологической, или, как ее часто называют, химической, эволюции. В этом случае экспериментальный материал пока не столь достоверен и используется информация, полученная из самых разнообразных источников [2, 3]. Так, геология изучает древнейшие породы земной коры, химический анализ которых, вероятно, позволит получить данные о природе находящихся в них первичных органических веществ. Анализ вещества метеоритов, прилетающих к нам из небесного пространства, служит тем же целям. Благодаря выдающимся успехам космических исследований, для лабораторного анализа стали доступны пробы с поверхности небесных тел. Спектроскопические исследования межзвездного пространства и звезд позволили получить важные сведения о природе и превращениях органического и неорганического вещества во Вселенной.

Наконец, чрезвычайно интересные данные получены путем моделирования в лабораторных условиях обстановки, существовавшей на Земле в добиологический период, и реакций, происходящих под влиянием достигавших поверхности Земли излучений:

ультрафиолетового, видимого, инфракрасного и корпускулярного излучений Солнца, естественной радиоактивности и электрических разрядов.

Принципиально важным было установление в работах последних двадцати лет возможности образования в смеси газов, имитирующих первичную восстановительную атмосферу (CH_4, NH_3, H_2, H_2O, CO_2), громадного числа органических соединений и, что особенно поразительно, универсальных звеньев обмена веществ ныне существующих организмов: аминокислот, белковоподобных полимеров, сахароподобных веществ, моно- и полинуклеотидов, фосфорных эфиров, порфиринов и многих других веществ [4, 5].

Итак, в первичном океане было возможно накопление многочисленных высокоактивных органических и неорганических соединений. Разнообразные вещества первичного океана могли вступать друг с другом в химическое взаимодействие в растворе, в адсорбированном состоянии или в примитивных структурах пробионтов. Эти реакции могли вообще ускоряться путем катализа либо фотохимической активации.

КАТАЛИЗ ИЛИ ФОТОХИМИЯ?

В условиях изобилия химически активных соединений в первичном океане окислительно-восстановительные реакции между этими соединениями могли войти в круг реакций первичного энергетического метаболизма. В качестве катализаторов этих реакций могли использоваться многочисленные неорганические компоненты земной коры, не только соединения доминирующих элементов — кремния, алюминия, железа, но и соединения многочисленных рассеянных элементов. Каталитическое действие могло быть многократно усилено за счет возможного образования комплексных соединений неорганических ионов с абиогенными органическими лигандами, например с органическими основаниями или тетрапиррольными соединениями.

Наряду с катализаторами на первичной Земле находились соединения, обладающие фотосенсибилизирующей активностью,— некоторые неорганические компоненты земной коры (см. ниже) и абиогенно образованные органические вещества, например тетрапиррольные соединения.

На первом симпозиуме по происхождению жизни в Москве в 1957 г. мы предположили [6], что переходным путем к фотосенсибилизированной активации субстратов фотосинтетического типа мог быть путь фотохимической активации биокатализаторов, сходных с современными коферментами. Существенно, что эти молекулы участвуют в биокаталитическом переносе электрона и обладают фотохимической активностью. В те годы была известна фотохимическая активность флавиновых коферментов, которая связана с осуществлением ряда фотобиологических процессов.

Впоследствии в нашей лаборатории изучалась фотохимическая активация восстановленных пиридиннуклеотидов и их аналогов при возбуждении близким ультрафиолетовым излучением (365 нм) [7]. Активация светом ускоряет окисление НАД · Н многими молекулами — акцепторами электрона, в числе которых мы использовали виологены и ферредоксин, обладающие более отрицательной величиной редокс-потенциала, чем пиридиннуклеотиды [8]: в этом случае существовала возможность некоторого запасания энергии света в продуктах реакции:

$$\text{НАД}\cdot\text{Н} + \text{виологен} \xrightarrow{\text{свет (365 нм)}} \text{НАД}^+ + \text{восстановленный виологен}.$$

Недавно мы обнаружили каталитическое действие хинонов при самовосстановлении цитохрома *c*; синий свет, поглощаемый хинонами, чрезвычайно активирует эту реакцию, т. е. наблюдается отчетливое наложение фотосенсибилизации и катализа [9]:

$$\text{Донор электрона} \xrightarrow{e} \text{Хиноны} \xrightarrow[h\nu]{\text{синий свет}} \text{Цитохром } Fe^{3+}.$$

Этот пример хорошо характеризует действие света на биокаталитическую функцию. Собственная фотохимическая активность цитохромов, как и всех Fe-комплексов порфиринов, незначительна по сравнению с активностью магниевых комплексов. Последние способны к эффективной фотосенсибилизации (к красной области спектра) окислительно-восстановительных превращений цитохромов.

Наконец, иллюстрацию возможности перехода от гетеротрофного к автотрофному существованию мы находим в большом числе работ, посвященных изучению действия света на обмен веществ ныне существующих гетеротрофных организмов; таково, например, действие света на обмен веществ грибов [10].

Эти бесхлорофильные организмы обычно содержат фотохимически активные соединения — флавины и порфирины как промежуточные продукты биосинтеза гема. В нашей лаборатории было обнаружено распространение цинковых комплексов порфиринов путем измерения их фосфоресценции непосредственно в клетках [11]. Наконец, гетеротрофы содержат пиридиннуклеотиды и ряд фотохимически активных компонентов.

Мы уже высказывали ту мысль [6], что дальнейшая эволюция потребовала разделения функций биокатализатора и фотосенсибилизатора, малоактивного в невозбужденном состоянии и крайне активного при возбуждении светом. Так, например Fe-комплексы порфиринов — хорошие катализаторы, но неактивны фотохимически, тогда как магниевые и цинковые комплексы неактивны «в темноте», но чрезвычайно активны в возбужденном состоянии (см. ниже).

По мере исчерпания активных соединений в первичном океане все большее значение приобретал путь фотосенсибилизиро-

ванной активации субстратов. Следует полагать, что в период химической эволюции не существовало озонового экрана в верхних слоях атмосферы, ныне поглощающего коротковолновое (до 300 нм) ультрафиолетовое излучение Солнца. Наиболее вероятно, что озоновый экран нынешней атмосферы образовался из кислорода фотосинтетического происхождения. Однако толща воды также эффективно поглощает короткое ультрафиолетовое излучение. Поэтому в толще воды первичные химические реакции требовали сенсибилизации к более длинноволновой области спектра. Первичными фоторецепторами—фотосенсибилизаторами могли быть неорганические соединения или органические соединения, образованные абиогенным путем.

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ФОТОКАТАЛИЗАТОРЫ

До сих пор в литературе по химической эволюции не рассматривалась возможность использования неорганических фоторецепторов. Однако известно, что ряд неорганических соединений — компонентов земной коры — обладает фотосенсибилизирующим действием и поэтому они могли играть роль первичных фоторецепторов.

Мы обнаружили, что окислы титана, цинка и вольфрама обладают фотосенсибилизирующей активностью в окислительно-восстановительных реакциях, вполне сравнимой с активностью порфиринов и хлорофилла в растворах. Существенно, что эти соединения способны также сенсибилизировать реакции, идущие с «запасанием» энергии света [12, 13].

В нашей лаборатории было найдено, что окислы титана (TiO_2), цинка (ZnO) и вольфрама (WO_3) под действием ультрафиолетового излучения (365 нм) способны в водной среде к выделению кислорода, сопряженному с восстановлением экзогенных акцепторов электрона: ионов окисного железа, феррицианида и *n*-бензохинона с квантовым выходом, доходящим до 1%. Реакция следует стехиометрии:

$$2Fe^{3+} + H_2O \rightarrow 2Fe^{2+} + 2H^+ + {}^1/_2O_2^1.$$

Происхождение молекулярного кислорода из молекулы воды было недавно подтверждено в опытах с применением тяжелой воды H_2O^{18} [14].

Таким образом, в этих опытах удалось моделировать реакцию Хилла, или так называемую II фотосистему фотосинтеза. Следует указать, что при использовании кислорода в качестве акцептора

---

[1] Я сомневаюсь, что на первичной Земле кислород выделялся в результате этой реакции; эти опыты показывают только, что неорганические фотосенсибилизаторы в модельных системах могли выполнять те же функции, что и порфирины.

электрона удалось моделировать так называемую реакцию Мелера, сопровождающуюся образованием перекиси водорода.

Наконец, с помощью неорганических сенсибилизаторов удалось моделировать также I фотосистему фотосинтеза. В вакууме они вызывают эффективное фотовосстановление виологенов, т. е. доводят систему до потенциала водородного электрода [15]:

$$\text{Донор электрона} + \text{метилвиологен} \xrightarrow[TiO_2,\ ZnO]{h\nu} \text{восстановленный метилвиологен} +$$

$$+ \text{окисленный донор электрона.}$$

Ниже дана сводка о фотосенсибилизации окислительно-восстановительных реакций окислами титана, цинка и вольфрама (ультрафиолетовое освещение 365 нм)

Донор электрона	Акцептор электрона	Продукты реакции
H_2O	Fe^{3+}, $Fe(CN)_6^{3+}$	O_2, Fe^{2+}, $Fe(CN)_6^{2+}$
H_2O	*п*-Бензохинон	O_2, гидрохинон
Глицин, формальдегид, тиомочевина, гидразин и т. д.	Метилвиологен, красители	Восстановленные метилвиологен и красители, окисленный донор электрона

Механизм реакции заключается в следующем. При поглощении кванта света кристаллической решеткой фотокатализатора электрон из валентной зоны переходит в зону проводимости, оставляя за собой дырку. На поверхности частицы фотокатализатора адсорбируются доноры и акцепторы электрона. Первичный окислительно-восстановительный процесс реализуется при взаимодействии донора электрона с дыркой и акцептора — с электроном. На поверхности фотокатализатора происходит рекомбинация первичных фотопродуктов, в случае выделения кислорода — радикалов ОН (схема 1).

Эти опыты указывают на возможные варианты включения в пробионты неорганических фотосенсибилизаторов; однако ни у одного из ныне существующих типов организмов мы не встречаем включения неорганических сенсибилизаторов в систему обмена веществ. Видимо, они являются «тупиковой ветвью» эволюционного древа.

В процессе эволюции закрепились катализаторы и фотосенсибилизаторы, построенные путем сочетания неорганических ионов с органическими лигандами, среди которых наиболее распространен порфириновый цикл. Однако при возникновении жизни на других планетах мог использоваться неорганический фотокатализ.

АБИОГЕННЫЙ СИНТЕЗ ПОРФИРИНОВ

Среди большого количества продуктов, образуемых при действии коротковолнового ультрафиолета на смесь газов, имитирующих первичную атмосферу, обнаружен формальдегид, и следует

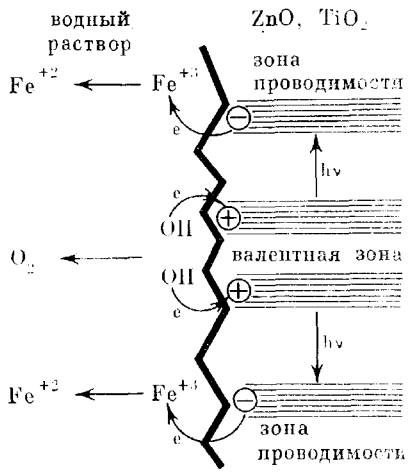


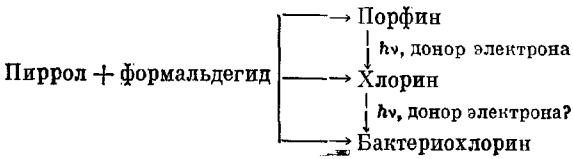
Схема 1. Фотокаталитическое выделение кислорода на поверхности окиси цинка или двуокиси титана

считать возможным образование простых пиррольных соединений.

Ротмунд в 1936 г. [16] осуществил синтез порфина из пиррола и формальдегида. Это термодинамически самопроизвольная реакция, которая, как было показано в нашей лаборатории, медленно идет при комнатной температуре (в темноте) и в присутствии ряда катализаторов. Наличие окислителей (кислорода, хинонов) способствует синтезу порфина, так как реакция конденсации пиррола и формальдегида идет с отнятием водорода.

В нашей лаборатории было обнаружено, что в растворе пиррола и формальдегида помимо порфина образуются также более восстановленные соединения — хлорин и бактериохлорин [17]. Синтез и анализ наиболее восстановленных порфиринов требуют анаэробных условий, так как эти пигменты самопроизвольно окисляются в присутствии кислорода воздуха.

Существенно, что хлорин образуется не только при конденсации пиррола и формальдегида, но и при прямом фотовосстановлении порфина за счет ряда доноров водорода. Описанные процессы можно проиллюстрировать следующим образом:



Наши исследования показали, что на взаимодействие пиррола и формальдегида оказывают каталитическое действие компоненты земной коры: окислы кремния, титана, цинка, а также ряд органических соединений, в том числе триптофан, который является наиболее активным [17].

Таким образом, при анализе древних пород и проб, взятых с поверхности небесных тел, нужно искать наряду с порфином более восстановленные соединения — хлориды и бактериохлориды. Все эти соединения фотохимически активны, обладают фотосенсибилизирующим действием, способны к обратимому фотоокислению и фотовосстановлению. Однако в организмах свободные порфири-

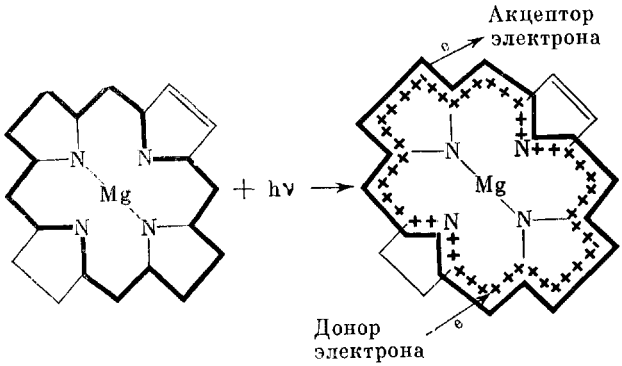


Схема 2. Взаимодействие возбужденной молекулы порфирина с донорами и акцепторами электрона

В системе сопряженных по кругу двойных связей порфирина в результате $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода и последующего $S \rightarrow T$-перехода электрон оставляет за собой электронную вакансию — дырку (+)

ны встречаются главным образом как промежуточные продукты биосинтеза; в фотосинтезирующих организмах доминируют магниевые комплексы порфиринов (хлорофилл), а среди катализаторов — Fe-комплексы (цитохромы).

Возможность выбора в процессе эволюции соответствующего центрального атома металла в порфириновом кольце определяется следующими соображениями. Наиболее широко распространенными элементами земной коры являются: кремний (27,6%), алюминий (8,5%), железо (5%), кальций (3,5%), натрий (2,6%), калий (2,5%), магний (2%), титан (0,6%).

Соединения кремния, алюминия и титана практически нерастворимы в водной среде биосферы, что затрудняет получение соответствующих порфириновых комплексов. Натриевые, калиевые и кальциевые комплексы порфиринов гидролизуются в водной среде; остаются более устойчивые в этих условиях Mg- и Fe-комплексы. В нефтях обнаружены ванадиловые и никелевые комплексы порфиринов, эти металлы, по-видимому, замещают магний в процессе деградации хлорофилловых пигментов.

Mg- и Fe-комплексы не только наиболее активны (они обладают дополнительными координационными возможностями перпендикулярно плоскости порфиринового кольца), но и способны к связыванию с реагирующими молекулами и с носителями (впоследствии — со специфическим белком).

Существенное отличие магниевых комплексов от Fe-комплексов состоит в том, что магниевые комплексы активны лишь в возбужденном состоянии (синглетном или триплетном). Наши исследования показали, что возбужденные порфирины и их магниевые комплексы (П*) способны к обратимому фотохимическому

восстановлению или окислению, т. е. восприятию электрона от молекулы-донора (Д) или отдаче электрона молекуле-акцептору (А) [18] (схема 2).

Обратимое фотовосстановление: $П^* + Д \rightleftarrows \cdot П^- + \cdot Д^+$

Обратимое фотоокисление: $П^* + А \rightleftarrows \cdot П^+ + \cdot А^-$.

Кстати, у пигмента наиболее «длинноволнового» организма Rhodopseudomonas viridis сильнее всего выражена способность к обратимому фотоокислению [19]. В тройной системе, где находятся молекулы-доноры, акцепторы электрона и возбужденные молекулы пигмента, наблюдается фотосенсибилизированный перенос электрона от Д к А за счет энергии кванта света, поглощенного молекулой пигмента.

$Д \xrightarrow{e}$ возбужденный пигмент $\xrightarrow{e} А$.

В нашей лаборатории было установлено, что в качестве доноров и акцепторов электрона в реакциях такого типа могли участвовать цитохромы, флавины и пиридиннуклеотиды.

Доноры и акцепторы при фотохимическом окислении-восстановлении порфиринов таковы:

Доноры электрона	Акцепторы электрона
Диэнолы	Кислород
SH-Соединения	Соединения окисного железа
Соединения закисного железа	Хиноны
Восстановленные пиридиннуклеотиды	Нитросоединения
Гидрохинон	Красители (виологен) и др.
Фенилгидразин	Пиридиннуклеотиды
	Флавины

Порфирины и их комплексы с металлами могли включаться в первичные белковоподобные полимерные структуры, что показано в опытах Дозе [20]. Более сложно построенные пробионты, вероятно, содержали липопротеиновые мембраны. Способность порфириновых пигментов встраиваться в мембрану потребовала включения в их молекулу липофильного «хвоста»— у хлорофилла это фитольная группа, у бактериовиридина — фарнезоловая.

Следует подчеркнуть, что липофильный «хвост» не влияет на фотохимические свойства пигментов, которые определяются главным образом порфириновым кольцом, обладающим сопряженной по кругу системой двойных связей.

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ВЫБОР ПИГМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ И МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Эволюционные предки фотосинтезирующих организмов обладали малыми количествами пигментов, поскольку еще не был развит биосинтез пигментов; согласно современной терминологии они обладали лишь пигментом «активного центра».

Однако, в отличие от катализатора-фермента, который активен в очень малой концентрации, количество пигмента-фоторецептора должно было быть большим, чтобы эффективно улавливать падающую солнечную радиацию и чтобы фотоавтотрофный организм мог успешно выдержать борьбу за существование.

Поэтому усовершенствование системы обмена веществ в процессе биологической эволюции постепенно привело к возникновению мощной системы биохимического синтеза пигментов — хлорофиллов, фикобилинов, каротиноидов.

В условиях возникновения первичных организмов, вероятно, существовали разнообразные метаболические варианты пигментной системы. По-видимому, существовали варианты первичных фотосинтетиков, обладающих различными пигментными наборами: каротиноидами, линейными и циклическими тетрапирролами и различными комбинациями этих пигментов.

Однако лишь магниевые комплексы порфиринов в агрегированных формах имели наиболее длинноволновое поглощение, что определило их роль в качестве конечной ловушки при миграции энергии возбуждения, поглощенной другими пигментами. Действительно, фикобилины обладают более коротковолновым поглощением, большой фотохимической стабильностью, благоприятствующей их использованию при миграции энергии возбуждения к хлорофиллу.

Каротиноидам свойственно еще более коротковолновое поглощение, хотя, по некоторым данным, их триплетные уровни расположены ниже, чем у хлорофилла, что определяет возможность миграции энергии возбуждения по триплетным уровням.

По мере накопления пигментов в клетках организмов вырабатывался механизм миграции энергии возбуждения от всей массы пигментов к уже существующему ранее пигменту в активном центре. Мы знаем теперь, что в современных организмах энергия света, поглощенная массой пигментов, накапливающихся в агрегированных формах, эффективно мигрирует к малому количеству пигмента, работающему в активном центре.

Борьбу за существование выиграл организм, в котором сочетание всех типов пигментных систем обеспечило эффективное использование энергии всего солнечного спектра с ее «стоком» к наиболее длинноволновым активным центрам; такими организмами были синезеленые водоросли.

СОПРЯЖЕНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ И КАТАЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

На основании вышеизложенного можно предположить, что первичный фотокаталитический блок химической и биологической эволюции представляет собой тройную систему: донор электрона — пигмент — акцептор электрона,— которая весьма эффек-

тивно работает в модельных системах и биологически организованных структурах [21].

Совершенствование цепи фотохимического и каталитического переноса электрона, вероятно, происходило путем различных типов сочетаний фотокаталитических блоков, монтируемых в первичных мембранах пробионтов [21]. В процессе биологической эволюции различные сочетания фотокаталитических блоков осуществлялись в ламеллярных структурах — хроматофорах фотосинтезирующих бактерий и в хлоропластах более совершенных фотосинтезирующих организмов, выделяющих кислород. Можно представить следующие возможные типы примитивного фотокаталитического переноса электрона: а) возбужденная молекула пигмента приводит лишь к снижению энергии активации, и суммарная конечная реакция термодинамически возможна:

$$Д + А + (П) \xrightarrow{-\Delta F} Д_{окисл} + А_{восст} + (П);$$

б) другой случай более важен для использования более инертных доноров водорода — в конечном счете воды, когда процесс сопровождается увеличением свободной энергии системы ($+\Delta F$). Этот случай также моделируется в растворах. Например, фотовосстановление НАД$^+$ и НАДФ$^+$, сенсибилизированное хлорофиллом, было обнаружено в нашей лаборатории еще в 1949 г. [22]:

$$\text{Аскорбат} + \text{НАД}^+ + (\text{Хл}) \xrightarrow{\text{красный свет}} \text{Дегидроаскорбат} + \text{НАД}\cdot\text{Н} + (\text{Хл}).$$

Наконец, можно представить себе примитивный циклический фотоперенос электрона, сопряженный с фотофосфорилированием. В этих циклических процессах могут участвовать порфирины, содержащие магний или железо; хлорофилл и порфирины активно фотосенсибилизируют окислительно-восстановительные превращения цитохромов. Однако сопряжение такого циклического переноса электронов с образованием АТФ до сих пор не было достигнуто в модельной системе. В то же время недавно описан целый ряд модельных систем, в которых образуются богатые энергией фосфорные эфиры. Так, например, в работе Лормана и Оргеля было показано, что смесь мочевины и неорганического фосфата является хорошим фосфорилирующим агентом [23].

В работах Арнона [24] и Камена [25] показано, что у наиболее древних фотосинтезирующих организмов — фотосинтезирующих бактерий — наблюдаются два типа фотосинтетического переноса электрона: нециклический перенос и циклический перенос, связанный с фотофосфорилированием. Таким образом, примитивные «блоки» переноса электрона могли использоваться в биологической эволюции.

Если считать, что обмен веществ современных фотсинтетиков включает в себя рудименты первичного обмена, то следует отметить не только их способность к гетеротрофному существованию, но и способность к использованию в качестве донора

электрона соединений более активных, чем молекула воды, вплоть до молекулярного водорода.

Использование воды в качестве донора электрона у совершенных современных аэробных фотосинтетиков потребовало сочетания двух фотореакций для переноса электрона от воды к пиридиннуклеотидам, иначе говоря, сопряжения двух фотокаталитических блоков.

Длинный путь химической и биологической эволюции от простых фотокаталитических реакций, идущих в неорганизованных системах, к хорошо организованным системам фотосинтетического переноса электрона потребовал 2—3 миллиарда лет эволюции.

Модельные эксперименты позволяют дать разумное объяснение различным стадиям химической эволюции и ее перехода в эволюцию биологическую; однако лишь грядущие экспериментальные данные геологии и космических исследований дадут возможность установить действительное течение этих процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предполагается, что первичный обмен веществ пробионтов был основан на реакциях переноса электрона, регулируемых катализаторами или фотосенсибилизирующими пигментами. В случае переноса электрона, ведущего к запасанию световой энергии в продуктах реакции, действие пигментов-сенсибилизаторов было неизбежным.

Образованные абиогенным путем простейшие тетрапиррольные пигменты (порфин, хлорин), как и их более сложные биогенные аналоги (хлорофиллы), способны фотосенсибилизировать перенос электрона в системах, обладающих различной сложностью молекулярной организации.

Неорганические фотосенсибилизаторы (двуокись титана, окись цинка и пр.) при возбуждении в близкой ультрафиолетовой области спектра могут участвовать в тех же реакциях, что и порфирины, т. е. в переносе электрона от молекулы-донора к молекуле-акцептору, включая фотовосстановление виологенов и фотоокисление молекул воды (выделение кислорода), сопровождающееся восстановлением соединений окисного железа или хинонов. Твердофазные неорганические фотосенсибилизаторы, по-видимому, не использовались в биологической эволюции; лишь неорганические ионы вошли в тетрапиррольный цикл с образованием активных катализаторов и фотосенсибилизаторов.

Встраивание пигментов-фоторецепторов в первичные мембраны привело к возникновению механизмов сопряжения фотореакций пигментов и энзиматических систем. Включение возбужденных пигментов в энзиматическую цепь переноса электрона было неизбежной предпосылкой эффективного функционирования фотосинтетических организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Опарин А. И.* Происхождение жизни. М., «Московский рабочий», 1924.
2. *Гафрон Г.* В кн.: Горизонты биохимии. Перев. с англ., под ред. и с предисл. Л. А. Тумермана. М., «Мир», 1964, стр. 49.
3. *Кальвин М.* Химическая эволюция. Перев. с англ., под ред. и с предисл. А. И. Опарина. М., «Мир», 1971.
4. *Пасынский А. Г., Павловская Т. Е.* Успехи химии, 33, 1198, 1964.
5. *Ponnamperuma C.* Quart. Revs Biophys., 4, 77, 1971.
6. *Красновский А. А.* В сб.: Возникновение жизни на Земле. Труды Международного симпозиума 19—24 августа 1957 г., Москва. Под ред. А. И. Опарина, А. Е. Браунштейна, А. Г. Пасынского и Т. Е. Павловской. М., Издво АН СССР, 1959, стр. 604.
7. *Красновский А. А., Брин Г. П.* В сб.: Проблемы эволюционной и технической биохимии. Под ред. В. Л. Кретовича, Т. Е. Павловской, Г. А. Деборина. М., «Наука», 1964, стр. 221.
8. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 163, 761, 1965.
9. *Красновский А. А., Михайлова Е. С.* Докл. АН СССР, 212, 237, 1973.
10. *М. С. Крицкий.* Наст. сборник, 1975, стр. 160.
11. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* Молек. биол., 5, 698, 1971.
12. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 147, 654, 1962.
13. *Красновский А. А., Брин Г. П.* В сб.: Молекулярная фотоника. М., «Наука», 1970, стр. 161.
14. *Фомин Г. В., Брин Г. П., Генкин М. В., Любимова А. К., Блюменфельд Л. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 212, 424, 1973.
15. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 213, 207, 1973.
16. *Rothemund P.* J. Amer. Chem. Soc., 58, 625, 1936.
17. *Krasnovsky A. A., Umrikhina A. V.* [*Красновский А. А., Умрихина А. В.*]. In: Molecular Evolution: Prebiological and Biological. Rohlfing D. L., Oparin A. I. (Eds). Plenum Press, 1972, p. 141.
18. *Krasnovsky A. A.* [*Красновский А. А.*]. Biophys. J., 12, 749, 1972.
19. *Красновский А. А., Бокучава Е. М., Дроздова Н. Н.* Докл. АН СССР, 211, 981, 1973.
20. *Dose K., Zaki L.* In: Molecular Evolution, v. 1. Buvet R., Ponnamperuma C. (Eds). Amsterdam, North-Holland, 1971, p. 263.
21. *Krasnovsky A. A.* [*Красновский А. А.*]. In: Molecular Evolution, v. 1. Buvet R., Ponnamperuma C. (Eds). Amsterdam, North-Holland, 1971, p. 279.
22. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 67, 325, 1949.
23. *Lohrman R., Orgel L. E.* Science, 171, 494, 1971.
24. *Arnon D. I.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2883, 1971.
25. *Kamen M. D.* Primary Processes in Photosynthesis. N. Y., Acad. Press, 1963.

ФОТОРЕЦЕПТОРЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ И ПУТИ СВЕТОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ
Ордена Ленина Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

ВВЕДЕНИЕ

Обмен веществ растения тесно связан с использованием энергии солнечного излучения. При фотосинтезе происходит преобразование энергии света в потенциальную химическую энергию продуктов фотосинтеза — органического вещества и молекулярного кислорода.

Наряду с фотосинтезом свет управляет многочисленными реакциями, регулирующими пути обмена веществ в растениях. К числу этих реакций относятся фотопериодизм, различные проявления фотоморфогенеза, фототаксис органов и структур, фототропизм, воздействие света на прорастание семян и многие другие фотобиологические явления.

Чрезвычайная подвижность системы обмена веществ в растениях и возможность разнообразных переключений метаболических путей давно известны. Особенно разителен, например, эффект переключения фотосинтетического выделения кислорода на выделение водорода у зеленых одноклеточных водорослей, обнаруженный в лаборатории Гаффрона более 30 лет тому назад и изучаемый сейчас в нашей лаборатории [1, 2].

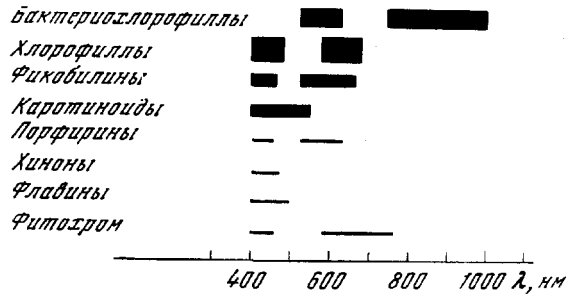
Следует считать, что главным метаболическим путем фотосинтеза является работа цепи фотосинтетического переноса электрона и «темнового» углеродного цикла. С этой точки зрения всякие световые реакции, которые накладываются на главный метаболический путь, могут служить целям регулирования. Сведения о природе этих реакций могут быть получены при изучении поведения интактных организмов, клеточных структур или модельных систем. В последнем случае имеются данные лишь о возможности тех или иных путей регулирования; такие опыты наиболее многочисленны и, как правило, их результаты ждут проверки на интактных организмах. Эта проблема уже обсуждалась нами ранее [3].

Для того чтобы свет мог действовать на обмен веществ растения, необходимо его поглощение пигментами — фоторецепторами растительной клетки. Таким образом, пигментная система

растения является антенной, связывающей световые условия внешней среды с обменом веществ в растении.

Коротковолновая граница солнечного излучения, достигающего поверхности земли, находится при 300 нм. Длинноволновая граница фотобиологического действия для некоторых видов фотосинтезирующих бактерий достигает 1000 нм.

Пигментами следует называть компоненты клетки, способные к избирательному поглощению части солнечного спектра в обла-



Р и с. 1. Основные пигменты растений и их главные полосы поглощения

сти 300—1000 нм. Таким образом, к числу пигментов относят разнообразные соединения, участвующие не только в фотобиологических, но и в энзиматических реакциях.

Следует отметить, что использование энергии света при энергетическом обмене (фотосинтез) требует большого количества пигментов, эффективно поглощающих значительную часть солнечного излучения в фотосинтетически активной области спектра. В отличие от энергетического обмена, реакции фоторегулирования могут осуществляться с помощью очень малого количества пигмента, поглощающего ничтожную часть падающего солнечного излучения. В этом случае энергия света используется лишь для переключения метаболических путей, которое может происходить с большим коэффициентом усиления.

Поэтому при фоторегулировании может использоваться очень малое количество пигмента, или фотохимически активного кофермента. При этом реакции фоторегулирования тесно переплетаются с реакциями фотосинтеза. На рис. 1 изображены основные типы пигментов растений и показаны границы их главных полос поглощения. Степень зачернения грубо указывает на относительное количество пигмента в клетке.

ПИГМЕНТЫ РАСТЕНИЙ

Наиболее распространены пигменты, в основе структуры которых лежит порфириновый цикл. Это — хлорофиллы *a* и *b* водорослей и высших растений, хлорофилл *c* диатомовых водорос-

лей (близкий по структуре к протохлорофиллу) и хлорофилл *d*, обнаруженный в ряде красных водорослей.

В клетке растения непрерывно идет биосинтез хлорофилла, поэтому в ней всегда содержатся пигменты, являющиеся промежуточными продуктами биосинтеза — порфирины и протохлорофиллы. Стационарная концентрация этих пигментов в клетке обычно на 2—4 порядка ниже, чем у хлорофилла. Путем измерения спектров фосфоресценции в растениях и фотосинтезирующих бактериях в нашей лаборатории удалось обнаружить малое количество цинкового комплекса порфирина [4].

Синезеленые и красные водоросли кроме хлорофилла содержат белковые соединения линейных тетрапирролов: фикобилины — синий фикоциан и красный фикоэритрин. К этим пигментам близок по структуре фитохром, обнаруженный в клетках высших растений. В хлоропластах и митохондриях растений содержатся разнообразные цитохромы, в основе структуры которых лежит комплекс порфирина с железом — гем. Цитохромы являются биокатализаторами, и их количество на 3—5 порядков меньше количества хлорофилла. Постоянными компонентами пигментной системы растения являются разнообразные каротиноиды желтого, бурого и красного цвета. К числу пигментов следует отнести флавины и разнообразные хиноны — коферменты биокаталитических систем; наконец, антоцианы и флавоны обычно растворены в клеточном соке и придают характерную окраску цветкам, плодам и листьям. Чрезвычайно разнообразны по своей химической природе пигменты бактерий.

При таком разнообразии пигментов в клетках растений установить их участие в тех или иных фотобиологических процессах довольно трудно. Наличие пигментной системы в клетке не может служить доказательством ее участия в фотобиологическом процессе. Наиболее распространенным методом решения этого вопроса является измерение спектров действия данного фотобиологического процесса и его сопоставление со спектрами поглощения пигментов в клетке.

СПЕКТРЫ ДЕЙСТВИЯ

Около ста лет тому назад классические опыты Тимирязева показали, что свет, поглощенный хлорофиллом, используется в процессе фотосинтеза. Впоследствии было установлено, что свет, поглощенный фикобилинами синезеленых и красных водорослей и некоторыми каротиноидами, также участвует в процессах фотосинтеза.

В растениях содержатся разные формы хлорофилла и других пигментов, возбуждаемые светом. Энергия возбуждения мигрирует в системе агрегированных форм пигментов к наиболее длинноволновым формам, участвующим в цепи фотосинтетического переноса электрона.

Фитохромная пигментная система была первоначально обнаружена при измерении спектра действия фотопериодической реакции растения и лишь впоследствии ее удалось выделить из клетки растения. Спектр действия фототропизма ограничен сине-фиолетовой областью спектра, где поглощают флавины и каротиноиды. Но далеко не всегда удается выяснить химическую природу пигментной системы, управляющей этим процессом.

В зеленых листьях, в условиях поглощения света избытком хлорофилла, весьма трудно выявить истинную структуру спектра действия тех процессов, в которых хлорофилл не участвует, но может экранировать их своим поглощением.

Во многих случаях для анализа природы фоторецепторов измерения спектра действия проводят с использованием двух монохроматических пучков света по типу измерения эффекта Эмерсона при фотосинтезе.

Следует подчеркнуть, что многие фотобиологические процессы в растениях обнаруживают особую активность в синей области спектра, в которой поглощают разные фоторецепторы, в том числе хлорофиллы и каротиноиды. Особое внимание привлекает вопрос о различии фотобиологического действия в «синей» и «красной» полосе поглощения хлорофилла и его аналогов [5, 6].

В тех случаях, когда клетки содержат избыток хлорофилла, достаточно трудно изучить структуру спектра действия, управляемого другими пигментами; поэтому более достоверные данные удается получить при использовании тканей или организмов, не содержащих хлорофилла, например этиолированных листьев или гетеротрофных организмов.

ОБРАЗОВАНИЕ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ

Фотобиологический процесс начинается с поглощения кванта света пигментной системой растения.

Общепринятая схема энергетических уровней молекулы хлорофилла показывает два главных синглетных уровня возбуждения $S+h\nu \rightarrow S^*$ и $S+h\nu_1 \rightarrow S_1^*$, соответствующих красному и синему максимумам поглощения.

Испускание флуоресценции происходит с наиболее низко расположенного «красного» уровня, длительность жизни которого составляет 10^{-8} сек., тогда как длительность жизни «синего» уровня не превышает 10^{-12} сек. Независимого испускания люминесценции, соответствующего «синему» уровню, не удалось установить.

Лишь в присутствии кислорода наблюдалось слабое сине-зеленое свечение хлорофилла, которое, однако, следует отнести к явлениям хемилюминесценции: в этом случае испускают свет продукты фотоокисления хлорофилла [7].

Следовательно, энергия «синего» уровня возбуждения деградирует до «красного» уровня, который имеет соответствующий

метастабильный триплетный уровень, лежащий в близкой инфракрасной области спектра. Не удалось также обнаружить триплетный уровень, соответствующий «синему» максимуму поглощения хлорофилла.

Таким образом, следует ожидать одинаковых фотохимических эффектов синего и красного света с тем отличием, что энергия синего уровня используется более расточительно, частично деградируя в тепло.

Долгоживущие триплетные молекулы обладают собственным поглощением в сине-зеленой области спектра. Этот $T \rightarrow T^*$ переход изучен в ряде лабораторий методом импульсной спектроскопии и определяет возможность накопления энергии двух квантов света в одной молекуле хлорофилла: казалось бы, что такой переход мог бы объяснить специфику действия сине-зеленой области спектра на фотосинтез. Мы должны, однако, отвергнуть это объяснение. Дело в том, что $T \rightarrow T^*$ поглощение удается наблюдать лишь при чрезвычайно большой интенсивности света при действии мощных световых импульсов. При интенсивности света, близкой к дневному освещению, населенность триплетных уровней близка к нулю, что практически исключает такой механизм. Столь же малой вероятностью обладает прямой переход в метастабильное состояние, соответствующий области спектра при 750—850 нм.

Все эти рассуждения относятся к мономерной молекуле в растворе, однако в хлоропластах обнаруживается набор агрегированных форм пигментов, в которых тип межмолекулярного взаимодействия влияет на положение энергетических уровней и вероятность элементарных переходов. Кроме того, тип испускания всегда связан с явлением миграции энергии от коротковолновых к длинноволновым формам.

В хлоропластах доминируют агрегированные формы с поглощением в области 670—730 нм, причем предполагается, что коротковолновые формы «работают» в фотохимической системе II, а длинноволновые — в системе I. Каждому набору форм соответствует собственное испускание, зависимое от условий миграции энергии между фотосистемами [8]. Можно принять, что схема уровней мономерной молекулы в общем приемлема и в этом случае, однако, флуоресценция испускается в более длинноволновой области, так как высвечивает наиболее длинноволновая форма [9]. К сожалению, вероятность перехода в триплетное состояние в системе агрегированных форм пока изучена мало. При интенсивности освещения 10^5 эрг/см^2·сек не удается увидеть сигнал ЭПР в твердых пленках пигментов [10], тогда как при этих условиях измерения сигнал ЭПР раствора хлорофилла весьма интенсивен.

Применение полупроводниковой модели к квазикристаллическим агрегированным формам позволяет объяснить действие света вне максимумов поглощения хлорофилла: в этом случае

разная глубина ловушек могла бы объяснить специфику действия света разного спектрального состава.

Итак, мы не имеем достоверных данных, указывающих на возможность качественных отличий в фотохимических (и фотобиологических) свойствах различных возбужденных уровней молекулы фоторецептора.

ВОЗМОЖНОСТЬ РАБОТЫ ХЛОРОФИЛЛА ПОМИМО ГЛАВНОГО ПУТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Нет сомнения в том, что свет, поглощаемый хлорофиллом, используется в процессе фотосинтеза. Возникает вопрос, может ли хлорофилл участвовать в регуляторных реакциях. Метод спектров действия трудно применить для решения данной задачи, так как главная масса хлорофилла, бесспорно, участвует в процессе фотосинтеза.

Возможность использования хлорофилла в разнообразных фотобиологических реакциях определяется тем, что хлорофилл в клетках растения находится в разных формах, различающихся не только по своим спектральным, но и фотохимическим свойствам. Так, в нашей лаборатории уже давно было замечено, что малая часть хлорофилла в клетке чрезвычайно фотолабильна и склонна к деструктивному фотоокислению; это явление наиболее характерно для свежеобразованного хлорофилла [11]. Эти факты хорошо соответствуют концепции о метаболической гетерогенности хлорофилла, которая развивается в работах А. А. Шлыка с сотр. [12].

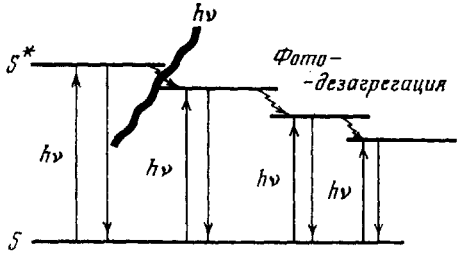


Рис. 2. Фотодезагрегация хлорофилла

В работах нашей лаборатории удалось установить, что интенсивное освещение вызывает фотодезагрегацию хлорофилла в клетках растений. Наиболее отчетливо этот эффект проявляется при освещении листьев мутантов кукурузы, дефицитных по хлорофиллу; освещение листьев в анаэробных условиях ведет к увеличению флуоресценции «мономерных» форм хлорофилла, последующий пуск воздуха приводит к быстрому выцветанию образованных «мономерных» форм [13]. Подобные эффекты обнаружены в менее отчетливой форме при освещении нормальных

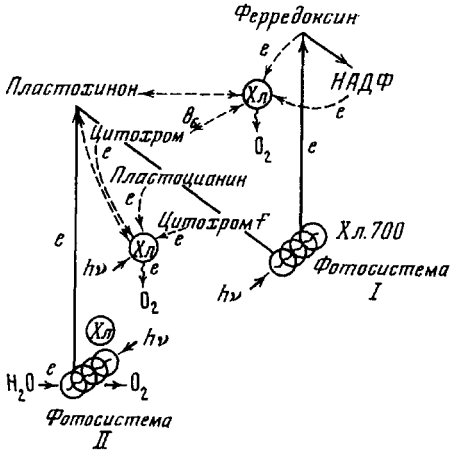
листьев кукурузы, а также суспензий зелёных и синезелёных водорослей [14].

Исследование этого явления в модельных системах, например при освещении агрегированных форм феофитина и хлорофилла (рис. 2), показало связь фотодезагрегации с процессом фотоокисления пигмента, что, по-видимому, предотвращает обратное «слипание» мономерных форм, образуемых при фотодезагрегации [15].

Следует подчеркнуть, что у мономерных форм хлорофилла в органических растворителях и в водных растворах детергентов большая фотохимическая активность. Так, они обладают способностью к обратимым окислительно-восстановительным превращениям и к фотосенсибилизации переноса электрона от молекулы донора к молекуле акцептора.

Многочисленные типы этих реакций были изучены в работах нашей лаборатории [15]. Наиболее характерным для мономерных пигментов является способность к фотосенсибилизированному окислению ряда доноров электрона с использованием кислорода в качестве конечного акцептора электрона. Квантовый выход этих реакций достигает 100%, т. е. они весьма эффективны.

Совокупность изложенных наблюдений приводит к предположению, что фотохимически активная форма хлорофилла может работать вне главной цепи фотосинтетического переноса электрона.



Действительно, в работе I и II фотосистем участвует совокупность агрегированных форм пигмента, в системе которых происходит миграция энергии возбуждения к активному центру, непосредственно участвующему в реакциях фотосинтетического переноса электрона.

Фотохимически активная форма хлорофилла, образованная в процессе биосинтеза, либо возникающая при фотодезагрегации, может выйти из организованной цепи переноса электрона. В этом случае возможно большое число разнообразных процессов, при которых происходит фотосенсибилизированный хлорофиллом перенос электрона помимо главных метаболических путей, показанный выше. При этом возможно замыкание накоротко отдельных ветвей переноса электрона и фотоокисление восстановленных форм коферментов или метаболитов с образованием супероксидных радикалов, которые могут выводиться из системы с помощью фермента супероксиддисмутазы, обнаруженной в зеленых листьях растений [16].

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ НЕХЛОРОФИЛЛОВЫХ ЗВЕНЬЕВ ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Возбужденный хлорофилл работает в цепи переноса электрона, где сопряжены фотохимические реакции пигментов с энзиматическими окислительными системами.

Возникает вопрос, могут ли непосредственно активироваться светом нехлорофилловые звенья цепи переноса электрона: цитохромы, хиноны, флавины, пиридиннуклеотиды, ферредоксины, а также пигменты, не входящие в цепь, например порфирины и антоцианы.

Прежде всего надо указать на то, что фотохимическое поведение порфиринов, их цинковых комплексов очень похоже на фотохимическое поведение хлорофилла, и поэтому они могут участвовать в разнообразных фотоокислениях в качестве пигмента-фотосенсибилизатора, подобно мономерному хлорофиллу, свойства которого описаны выше.

Комплексы порфиринов с железом, в том числе цитохромы, фотохимически малоактивны, и их эффективные превращения наблюдаются лишь при сопряжении с фотохимическими реакциями хлорофилла и порфиринов, что было показано в нашей лаборатории [17, 18].

Фотохимическая активность флавинов хорошо известна, так же как возможность их участия в реакциях фотоморфогенеза нехлорофилловых организмов (см., например, обзор [19]).

Недавно в нашей лаборатории была обнаружена (рис. 3) фотохимическая активность хинонов в реакциях фотосенсибилизированного окисления — восстановления цитохромов [20]. Водные растворы цитохрома *С* при стоянии подвергаются медленному самопроизвольному восстановлению за счет электронодонорных группировок молекулы белка. Хиноны катализируют этот процесс. Освещение чрезвычайно ускоряет эту реакцию, т. е. хиноны могут работать в качестве фотосенсибилизаторов, подобно

хлорофиллу, с тем отличием, что реакция возбуждается в синей области спектра.



В случае фотовозбуждения хлорофилла красным светом хинон играет роль промежуточного переносчика электрона [21].

Пиридиннуклеотиды (окисленные) имеют максимум поглощения при 280 нм, т. е. вне границ солнечного спектра, достигающего поверхности земли. Восстановленная форма пиридиннуклеотидов обладает поглощением при 340 нм, соответствуя, таким образом, нашему определению пигментов. Было показано, что при возбуждении близким ультрафиолетом восстановленные пиридиннуклеотиды способны к восстановлению ряда

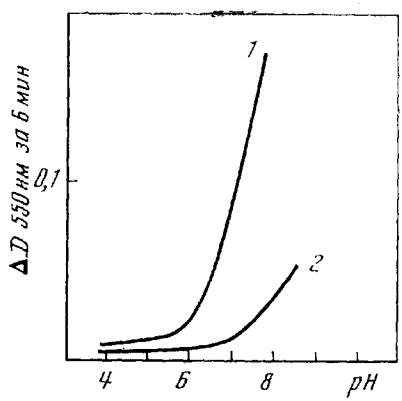


Рис. 3. Действие света на восстановление цитохрома *C* в присутствии р-бензохинона (10^{-4} М)

1 — свет; *2* — темнота

акцепторов электрона (Ox), в том числе виологенов, обладающих более отрицательным редокс-потенциалом по сравнению с НАД [22], что приводит к некоторому «запасанию» энергии света.

$$\text{НАД}\cdot\text{H}+Ox \xrightarrow{\text{365 нм}} \text{НАД}+Ox_{\text{ред.}}$$

Фотохимическая активность перечисленных коферментных систем может реализоваться в различных случаях фоторегулирования, возбуждаемого коротковолновой областью солнечного спектра. Поэтому в первую очередь необходимо изучение возможности этих процессов в интактных организмах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение возможных механизмов первичных фотореакций, начинающих цепь регуляторных процессов, приводит к следующим предположениям.

Возбужденные молекулы фоторецепторов растений обычно способны инициировать процессы переноса электрона, и поэтому возможным путем регулирования является включение фоторецепторов в различные участки главных и побочных метаболических путей переноса электрона. Протекая в мембранах, эти реакции тесно связываются с перемещением протона. Далее следует образование более долгоживущих соединений, приводящих к конечному физиологическому ответу.

Другим механизмом является изменение конформации молекулы фоторецептора, вмонтированной в мембрану. В этом случае *цис-транс*-изомерные превращения, индуцируемые светом, могут приводить к структурным перестройкам мембраны, вызывающим в конечном счете физиологический ответ [23]. Конечная физиологическая реакция растения может быть сходной, несмотря на различие в первичных фотопроцессах.

В заключение следует указать, что биохимические пути энергетического обмена изучены гораздо лучше, чем пути фоторегуляции. Это объясняется не только большим числом исследователей, работающих в области фотосинтеза, но и относительной легкостью изучения энергетического обмена по сравнению с фоторегулированием. Положение осложняется тем, что регуляторные реакции тесно переплетены с отдельными стадиями энергетического обмена. Исследование природы фоторегуляторных реакций растения позволит сознательно управлять метаболизмом растения, и поэтому рассмотренная проблема заслуживает углубленного изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gaffron H., Rubin J. J.* 1942. J. Gen. Physiol., **26**, 219.
2. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* 1972. Физиол. раст., **19**, 1090.
3. *Красновский А. А.* 1972. В сб.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М., «Наука», стр. 23.
4. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* 1971. Молек. биол., **5**, 698.
5. *Воскресенская Н. П.* 1965. Фотосинтез и спектральный состав света. М., «Наука».
6. *Белл Л. Н.* 1972. В сб.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М., «Наука», стр. 50.
7. *Красновский А. А. (мл.), Литвин Ф. Ф.* 1967. Молек. биол., **1**, 699.
8. *Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А.* 1967. Докл. АН СССР, **175**, 1175; Биофизика, **12**, 433, 1967.
9. *Быстрова М. И., Красновский А. А.* 1968. Молек. биол., **2**, 847.
10. *Рихирева Г. Т., Сибельдина Л. А., Грибова З. П., Маринов Б. С., Каюшин Л. П., Красновский А. А.* 1968. Докл. АН СССР, **181**, 1485.
11. *Красновский А. А., Кособуцкая Л. М.* 1953. Докл. АН СССР, **91**, 343.
12. *Шлык А. А.* 1972. В сб.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М., «Наука», стр. 34.

13. *Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А.* 1971. Молек. биол., **5**, 366.
14. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* 1970. Докл. АН СССР, **195**, 731.
15. *Красновский А. А.* 1970. В сб.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., «Наука», стр. 15.
16. *McCord J. M., Fridovich J.* 1969. J. Biol. Chem., **244**, 6049.
17. *Красновский А. А., Войновская К. К.* 1956. Биофизика, **1**, 120.
18. *Красновский А. А., Михайлова Е. С.* 1970. Докл. АН СССР, **194**, 953.
19. *Carlile M. J.*, 1970. In: Photobiology of microorganisms, P. Halldal (Ed.), Wiley — Interscience, p. 310.
20. *Красновский А. А., Михайлова Е. С.* 1973. Докл. АН СССР, **212**, 237.
21. *Красновский А. А., Михайлова Е. С.* 1974. Докл. АН СССР, **215**, 727.
22. *Красновский А. А., Брин Г. П.* 1964. В сб.: Проблемы эволюционной и технической биохимии. М., «Наука», стр. 221.
23. *Конев С. В., Волотовский И. Д.* 1971. Введение в молекулярную фотобиологию. Минск, «Наука и техника».

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 220, № 5

УДК 541.14

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Г. П. БРИН, В. В. НИКАНДРОВ

ВОЗБУЖДЕНИЕ СВЕТОМ ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ: ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА НА ФЕРРЕДОКСИН И МЕТИЛВИОЛОГЕН

Ранее было определено, что возбужденные ультрафиолетовым светом НАД-Н и его аналоги способны к фотовосстановлению ряда соединений, в том числе метилвиологена (1). Высказывались предположения о возможной роли таких реакций при химической эволюции фотосинтеза (2).

В настоящей работе изучено фотохимическое восстановление ферредоксина (Фд) и метилвиологена (в форме дикатиона $МВ^{2+}$) возбужденными НАД-Н и НАДФ-Н и фотосенсибилизация этих реакций к видимой области спектра гематопорфирином.

Мы использовали лиофилизированный ферредоксин, выделенный из сине-зеленой водоросли Spirulina maxima с известной величиной E_0' (3), НАД-Н и НАДФ-Н 80% чистоты («Reanal»), метилвиологен дихлорид кристаллический. Реакции проводились в водном растворе в вакуумных трубках Тунберга, освещение линиями ртути 365 нм, выделенными из спектра ртутно-кварцевой лампы СВД-120А комбинацией светофильтров УФС-1, СЗС-23, СЗС-24 ($4 \cdot 10^4$ эрг/см^2·сек). За восстановлением метилвиологена следили по увеличению оптической плотности раствора при 605 нм в максимуме поглощения катион-радикала ($МВ^{\cdot+}$), за восстановлением Фд — по изменению поглощения в максимумах 420 и 465 нм. Спектрофотометр СФ-14 был приспособлен для измерения образцов малой оптической плотности введением дополнительного диапазона измерения от 0 до 0,1 D.

Прямое фотовосстановление метилвиологена. Освещение водных растворов НАД-Н и НАДФ-Н ($4{,}8 \cdot 10^{-4}$ *M*) в присутствии $МВ^{2+}$ ($4 \cdot 10^{-6}$ *M*) приводит к появлению характерного спектра поглощения катион-радикала $МВ^{\cdot+}$. При продолжительности освещения 10 мин. после максимального накопления синей формы мы наблюдали падение D при 605 нм (рис. 1). Неокрашенный продукт не окисляется кислородом. На 1 моль образованного $МВ^{\cdot+}$ расходуется $^1/_2$ моля НАД-Н, а восстановление до бесцветной формы требует 1 моль НАД-Н, т. е. соответствует стехиометрии образования дигидроформы (МВ). Известно, что восстановление $МВ^{\cdot+}$ (4–6) приводит к образованию дигидродипиридила, который обладает поглощением при 400 нм, обратимо окисляется кислородом. Возможно, что дигидродипиридил является промежуточным продуктом на пути образования тетрагидропиридила (4). На это указывает частичная обратимость (около 10%) реакции (на нисходящей ветви кривой) в темноте после освещения.

E_0' первой ступени электрохимического восстановления $МВ^{2+}$ до $МВ^{\cdot+}$ составляет 0,45 в, а второй ступени 0,8 в (5). Вероятно, возбуждение светом НАД-Н или НАДФ-Н увеличивает их восстановительный потенциал по крайней мере до этой величины. Это согласуется с нашим измерением фотопотенциала системы (2).

С помощью железооксалатного актинометра (7) был измерен квантовый выход (γ) реакции. При образовании $МВ^{\cdot+}$ $\gamma = 0{,}2$ для НАД-Н и $\gamma = 0{,}1 \cdot 10^{-2}$

для НАДФ-Н. Для второй ступени восстановления величина γ на порядок меньше.

Фотовосстановление ферредоксина. При освещении водных растворов НАД-Н в присутствии Фд наблюдалось падение поглощения в области 420 и 465 нм (рис. 2*а*), что соответствует образованию восстановленного ферредоксина ($Фд^-$). За 20 мин. освещения восстанавливается до 80% исходного белка. При пуске воздуха происходит полное обратимое окисление $Фд^-$ до Фд. Последующее удаление кислорода и освещение приводит к повторению реакции. Такая процедура повторялась

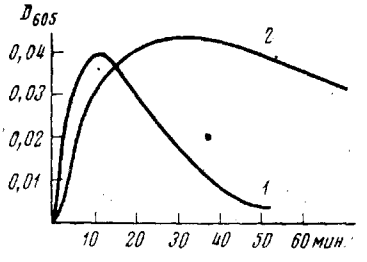


Рис. 1

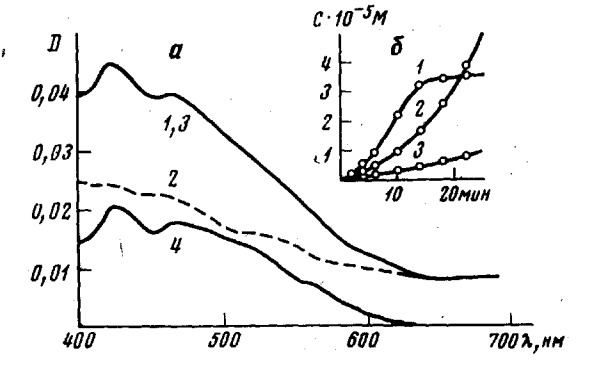


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика фотовосстановления метилвиологена ($4 \cdot 10^{-6}$ *М*) восстановленными пиридиннуклеотидами. *1* – НАД-Н ($4{,}8 \cdot 10^{-4}$ *М*), *2* – НАДФ-Н ($4{,}8 \cdot 10^{-4}$ *М*). Освещение 365 нм; $4 \cdot 10^4$ эрг/см²·сек, без воздуха

Рис. 2. *а* – фотовосстановление ферредоксина ($4{,}4 \cdot 10^{-6}$ *М*) с помощью НАД-Н ($2{,}4 \cdot 10^{-4}$ *М*). Спектры поглощения: *1* – до освещения, *2* – после освещения, *3* – после обратной реакции с кислородом воздуха, *4* – дифференциальный спектр (темнота – свет). Освещение 20 мин. светом 365 нм, $4 \cdot 10^4$ эрг/см²·сек, без воздуха. *б* – кинетика фотовосстановления ферредоксина НАД-Н и НАДФ-Н при разных концентрациях компонентов: *1* – НАД-Н $2{,}4 \cdot 10^{-4}$ *М*, Фд $4{,}4 \cdot 10^{-6}$ *М*; *2* – НАД-Н $2{,}4 \cdot 10^{-4}$ *М*, Фд $3{,}7 \cdot 10^{-5}$ *М*; *3* – НАДФ-Н $2{,}4 \cdot 10^{-4}$ *М*, Фд $4{,}4 \cdot 10^{-6}$ *М*

4 раза без снижения поглощения исходного Фд. Освещение реакционной смеси светом длиннее 400 нм, т. е. в области, которая не поглощает НАД-Н, не приводило к восстановлению Фд. Измерения в максимуме поглощения НАД-Н показали его окисление в ходе реакции, также как и в случае образования $МВ^{\cdot+}$.

Квантовый выход реакции при концентрации Фд $4{,}4 \cdot 10^{-6}$ *М* $\gamma = 0{,}2 \cdot 10^{-2}$ а при $3{,}7 \cdot 10^{-5}$ *М* Фд величина γ достигала $0{,}3 \cdot 10^{-2}$ (рис. 2*б*), т. е. реакция является весьма эффективной. Изменение pH от 7,3 до 9,3 не отразилось на скорости и глубине описанных реакций.

При использовании НАДФ-Н скорость реакции ниже (рис. 2*б*). $\gamma = 0{,}02 \cdot 10^{-2}$ при $4{,}4 \cdot 10^{-6}$ *М* Фд. Причины этого неясны. Возможны стерические трудности при взаимодействии Фд с НАДФ-Н по сравнению с НАД-Н. В контрольном опыте освещение Фд при pH 7,3 в вакууме (без НАД-Н) линиями ртути 365 нм не вызывало изменений в спектре поглощения. Существенно, что освещение линиями ртути 313 нм (светофильтр УФС-1) приводило к фотовосстановлению Фд с γ до 0,1. При последующем пуске воздуха до 90% образованного $Фд^-$ окислялось. По-видимому, этот эффект связан с самовосстановлением Фд за счет электронодонорных группировок молекулы белка, что подобно эффекту фотохимического самовосстановления цитохрома с, обнаруженному в нашей лаборатории ([8], [9]).

Освещение «полным» нефильтрованным спектром ртутной лампы приводило к необратимому падению максимума окисленного Фд, что, очевидно, связано с далеко идущей деструкцией белка.

Фотосенсибилизация. Мы наблюдали ранее восстановление $МВ^{2+}$ в присутствии различных доноров электрона ([1], [10]) фотосенсибилизированное хлорофиллом; НАД-Н также может быть донором электрона в этих реакциях ([11]). Фотосенсибилизированное копропорфирином восстановление Фд происходит при использовании в качестве донора электрона аскорбиновой кислоты и дитиоэритритола ([12]). Наблюдалось фотовосстановление Фд при использовании гематопорфирина как сенсибилизатора и глютатиона как донора электрона ([13]).

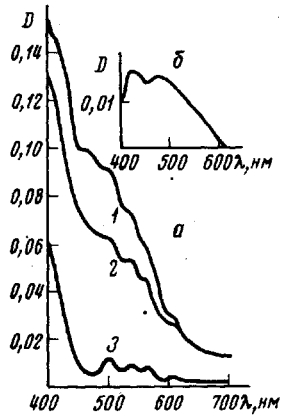


Рис. 3

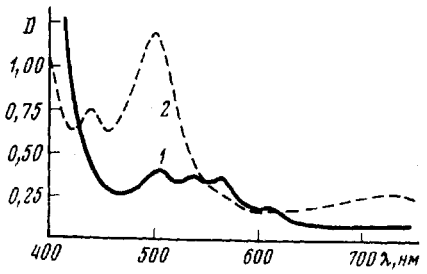


Рис. 4

Рис. 3. Фотосенсибилизированное гематопорфирином ($5 \cdot 10^{-7}$ *М*) восстановление ферредоксина ($1{,}05 \cdot 10^{-5}$ *М*) с помощью НАД-Н ($2{,}4 \cdot 10^{-4}$ *М*). *а* – спектры поглощения: *1* – до освещения, *2* – после освещения, *3* – спектр поглощения гематопорфирина ($5 \cdot 10^{-7}$ *М*). *б* – дифференциальный спектр (темнота – свет). Освещение светом 500–650 нм, $3 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек, без воздуха

Рис. 4. Фотовосстановление гематопорфирина ($8 \cdot 10^{-6}$ *М*) в присутствии НАД-Н ($2{,}4 \cdot 10^{-4}$ *М*). Спектры поглощения: *1* – до освещения, *2* – после 20 мин. освещения. Свет 500–650 нм, $3 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек, без воздуха

Мы применили водорастворимый гематопорфирин как фотосенсибилизатор окисления НАД-Н ферредоксином или метилвиологеном. В этом случае реакция возбуждалась видимым светом в области поглощения гематопорфирина при 500—650 нм (лампа накаливания 100 вт с конденсором, комбинацией светофильтров ЖС-17, СЗС-23, СЗС-24), $3 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек.

При фотосенсибилизированной реакции наблюдается восстановление $МВ^{2+}$ до $МВ^{\cdot+}$, однако в отличие от прямого восстановления фотовозбужденным НАД-Н не происходит дальнейшего восстановления $МВ^{\cdot+}$. Такое различие прямой и фотосенсибилизированной реакции, очевидно, связано с тем, что потенциал фотовосстановленного гематопорфирина не достигает 0,8 в.

При использовании Фд в качестве акцептора электрона происходит его полное фотовосстановление, после чего наступает фотовосстановление гематопорфирина, что видно по первоначальному уменьшению поглощения в области 465 и 420 нм (рис. 3) и последующему увеличению поглощения при 440, 500, 730 нм (образование дигидроформы 440, 730 нм и тетрагидроформы 500 нм восстановленного гематопорфирина ([14])). При впуске воздуха идет полное обратимое окисление $Фд^-$. После повторной откачки воздуха и освещения реакцию можно было повторить. При использовании НАДФ-Н как донора электрона при фотосенсибилизации гематопорфирином скорость восстановления Фд была в два раза меньше, чем с НАД-Н.

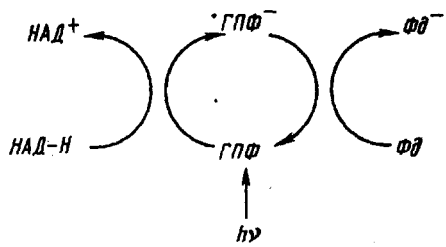
Гематопорфирин способен к фотовосстановлению различными донорами электрона ([15]). В наших опытах освещение водного раствора гематопорфирина с НАД-Н также приводило к образованию дигидро- и тетра-

гидроформ восстановленного гематопорфирина (рис. 4). В контрольных опытах, когда растворы гематопорфирина и Фд освещались без донора электрона, наблюдается медленное (скорость реакции в 50 раз меньше) падение максимумов поглощения Фд. При пуске воздуха происходило лишь частичное обращение реакции. Так, при падении поглощения Фд при 465 нм на 25% возвращалась лишь половина Фд, при падении на 60% — около одной трети. Это явление можно объяснить тем, что гематопорфирин фотосенсибилизирует восстановление Фд за счет электронодонорных групп самого белка и при этом происходит частичная деструкция Фд. Подобное явление наблюдается при фотосенсибилизированном восстановлении цитохрома ([16]).

Итак, результаты опытов могут быть выражены следующей схемой. Прямое фотовосстановление Фд возбужденным НАД-Н

$$\text{НАД-Н} + 2\text{Фд} \xrightarrow{h\nu} \text{НАД}^+ + 2\text{Фд}^- + \text{H}^+.$$

Фотосенсибилизированное гематопорфирином (ГПФ) восстановление Фд



В цепи фотосинтетического переноса электрона образованный $Фд^-$ восстанавливает $НАД^+$ и $НАДФ^+$ с помощью НАДФ-редуктазы; при световой активации НАД-Н и НАДФ-Н (или сенсибилизации) наблюдается обратная реакция, идущая «против» градиента термодинамического потенциала. Наиболее существенно, что в изученных реакциях при световой активации НАД-Н и НАДФ-Н восстановительный потенциал выше, чем у водородного электрода.

В заключение приносим благодарность доктору Д. Холлу, любезно предоставившему нам лиофилизованный ферредоксин из спирулины.

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

Поступило
21 XI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 163, 761 (1965). [2] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* Сб.: Проблемы эволюционной и технической биохимии, «Наука», 1964. [3] *D. O. Hall, K. K. Rao, R. Cammack,* Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 47, 798 (1972). [4] *L. Michaelis, E. S. Hill,* J. Gen. Physiol., v. 6, 864 (1933). [5] *R. M. Elofson, R. L. Edsberg,* Canad. J. Chem., v. 35, 646 (1957). [6] *J. G. Carey, J. F. Cairns, J. E. Colhester,* Chem. Commun., v. 21, 1280 (1969). [7] *C. A. Parker,* Proc. Roy. Soc., v. 220, 104 (1953). [8] *А. А. Красновский, К. К. Войновская,* Биофизика, т. 1, 120 (1956). [9] *А. А. Красновский, Е. С. Михайлова,* ДАН, т. 215, 727 (1974). [10] *Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский,* ДАН, т. 174, 221 (1967). [11] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 153, 212 (1963). [12] *R. Kassner, M. D. Kamen,* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 58, 2445 (1967). [13] *K. K. Eisenstein, L. H. Wang,* J. Biol. Chem., v. 244, 1720 (1969). [14] *D. Mauzerall,* J. Am. Chem. Soc., v. 84, 2438 (1962). [15] *А. А. Красновский, К. К. Войновская,* ДАН, т. 96, 1209 (1954). [16] *А. А. Красновский, Е. С. Михайлова,* ДАН, т. 194, 953 (1970).

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 223, № 1

УДК 541.14

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. Н. ЛУГАНСКАЯ

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА И ФЕРРЕДОКСИНА В ВОДНЫХ СРЕДАХ В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОРОДА

В водных растворах детергентов фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена тиомочевиной в присутствии кислорода происходит значительно активнее, чем в анаэробных условиях. Реакция протекает в две стадии: первая, фотохимическая, представляет собой фотосенсибилизированное пигментами окисление тиомочевины кислородом, в результате которого происходит образование более активного, чем исходная тиомочевина, восстановителя, который и взаимодействует с метилвиологеном в темновой стадии реакции ([1], [2]).

В данной работе фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена и ферредоксина изучалось в водных средах, без применения детергентов, с использованием в качестве фотосенсибилизатора гематопорфирина. Фотореакции исследовались параллельно в аэробных и анаэробных условиях.

В трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, помещали раствор пигмента (10^{-6}—10^{-5} *M*) в боратном буфере с донором электрона (0,1 *M* тиомочевины), в «головку» трубки — раствор акцептора электрона ($5 \cdot 10^{-4}$ *M* метилвиологена или $1{,}7 \cdot 10^{-5}$ *M* ферредоксина). Растворы сливались после вакуумирования трубки Тунберга масляным насосом. В опытах на воздухе все компоненты реакции находились в трубке без откачивания. Раствор освещали «белым» светом киноламповы 300 вт (10^5 эрг/см^2·сек) через конденсор и водяной фильтр.

Для предотвращения возможной диффузии кислорода из воздуха в реакционную среду при механическом перемещении трубки освещение неподвижной трубки осуществлялось непосредственно в кюветодержателе спектрофотометра. Во время освещения сфера спектрофотометра закрывалась заслонкой, а во время измерений шторка, пропускающая излучение осветителя, закрывалась и одновременно открывалась сфера спектрофотометра.

Восстановление метилвиологена. Фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена тиомочевиной в водной среде в вакууме протекает медленно и неглубоко; скорость реакции и ее глубина значительно увеличиваются в присутствии кислорода (рис. 1), так же как и в описанных ранее опытах ([1], [2]). Реакция в аэробных условиях наблюдается начиная от pH 8,5. С повышением pH раствора скорость реакции увеличивается (рис. 2).

Реакцию удается разделить на две стадии: световую и темновую. Вначале раствор гематопорфирина с тиомочевиной освещался 30 мин., затем реакционная смесь была вакуумирована и в темноте к ней был прилит раствор метилвиологена из «головки» трубки Тунберга. При этом наблюдалось восстановление метилвиологена. Этот опыт показывает, что световой стадией реакции является фотосенсибилизированное гематопорфирином окисление тиомочевины кислородом воздуха с образованием активных восстановителей, способных к темновому восстановлению метилвиологена.

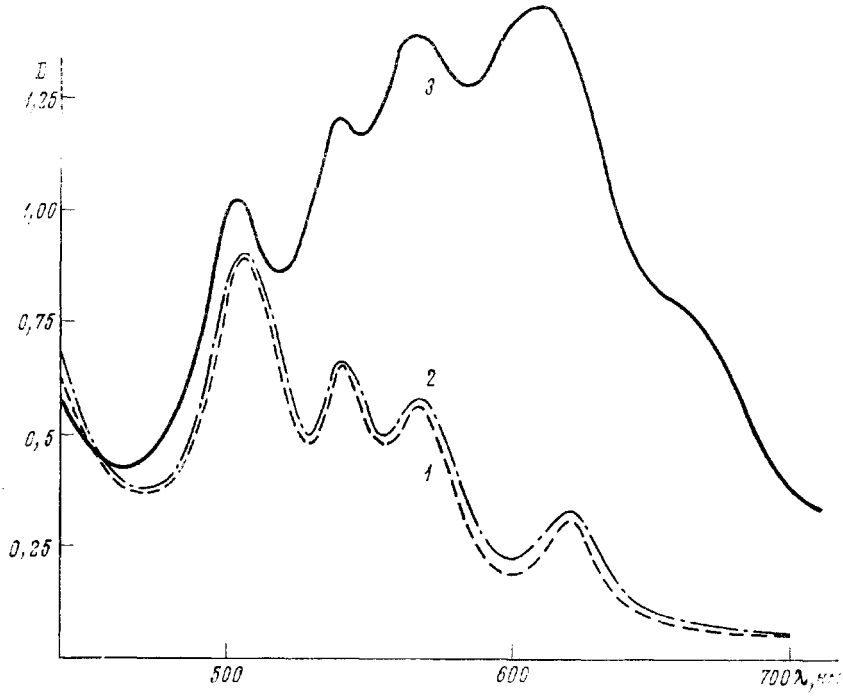


Рис. 1. Фотосенсибилизированное гематопорфирином восстановление метилвиологена тиомочевиной в аэробных и анаэробных условиях (5 мл водного раствора гематопорфирина pH 10, 10^{-4} *M* метилвиологен, 0,08 *M* тиомочевина). *1* – спектр раствора до освещения, *2* – через 25 мин. освещения в вакууме, *3* – через 25 мин. освещения на воздухе

Были проведены опыты по установлению времени жизни этих активных восстановителей. Раствор метилвиологена прибавлялся из «головки» трубки Тунберга к реакционной смеси через определенные промежутки времени после освещения. Оказалось, что степень восстановления метилвиологена через 24 часа снижалась примерно наполовину, а через двое суток восстановления метилвиологена вообще не наблюдалось. Таким образом, активные восстановители являются сравнительно устойчивыми и долгоживущими соединениями.

Наряду с этим возможно участие в реакции более короткоживущих продуктов сенсибилизированного окисления тиомочевины. В настоящее время в литературе дискутируется вопрос об участии в фотосенсибилизированном окислении тиомочевины синглетного кислорода ([3]). В этом случае можно было ожидать образования супероксидного анионрадикала кислорода, который также может быть ответственным за увеличение глубины и скорости восстановления метилвиологена тиомочевиной в присутствии кислорода.

Известно, что фермент супероксиддисмутаза (СОД) замедляет реакции, протекающие при участии супероксида ([4]). Опыты с СОД проводились различными способами. В опыт бралось от 30 до 100 мкг СОД. Параллельно исследовались реакции в присутствии и в отсутствие СОД при различных значениях pH. В одной части опытов СОД добавлялась к реакционной смеси, содержащей все компоненты реакции, и фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена тиомочевиной в водной среде проводилось в аэробных условиях. В реакциях с разделением стадий в одних опытах СОД помещалась в «головку» трубки Тунберга и добавлялась к остальной реакционной смеси после ее предварительного освещения на воздухе и последующего вакуумирования. В других опытах СОД находилась в трубке вместе с гематопорфирином и тиомочевиной, куда

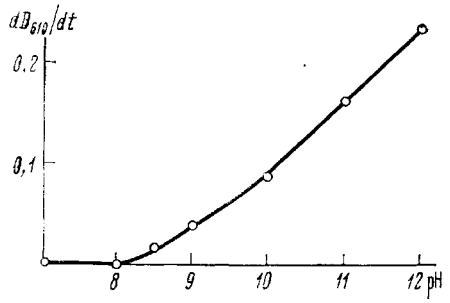


Рис. 2

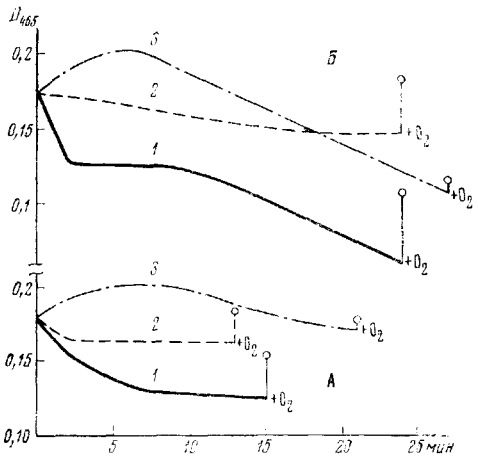


Рис. 3

Рис. 2. Скорость фотосенсибилизированного гематопорфирином восстановления метилвиологена тиомочевиной в водной среде в зависимости от pH раствора в аэробных условиях. 2 мин. освещения

Рис. 3. Кинетика фотосенсибилизированного гематопорфирином восстановления ферредоксина тиомочевиной в водных буферных растворах. *А* – pH 9, *Б* – pH 11. *1* – ферредоксин, гематопорфирин, тиомочевина + O_2; *2* – ферредоксин, гематопорфирин, тиомочевина – O_2; *3* – гематопорфирин, тиомочевина + O_2

после освещения в присутствии кислорода и дальнейшего вакуумирования добавлялся из «головки» трубки Тунберга в темноте метилвиологен. В этих опытах не удалось установить влияния СОД на скорость и конечную глубину восстановления метилвиологена. Опыты могут свидетельствовать о том, что супероксидный анион-радикал кислорода не участвует в восстановлении метилвиологена, хотя не исключена фотосенсибилизированная деструкция СОД в этих условиях.

Восстановление гематопорфирина. Ранее было показано, что в отсутствие акцепторов электрона при фотосенсибилизированной реакции в аэробных условиях восстановлению подвергается пигмент-сенсибилизатор (хлорофилл а), образуя красную восстановленную форму ([2]). В данной работе исследовалась возможность фотосенсибилизированного восстановления гематопорфирина тиомочевиной в основных средах в аэробных и анаэробных условиях.

Освещение раствора пигмента с тиомочевиной в вакууме при pH 9—11 приводит к небольшому увеличению оптической плотности в области 660—670 нм, тогда как остальной спектр поглощения пигмента остается без изменений. Встряхивание с воздухом после окончания реакции не вызывало обратимости в спектре поглощения пигмента.

В присутствии кислорода освещение гематопорфирина с тиомочевиной ведет к снижению оптической плотности по всему спектру пигмента, параллельно с чем наблюдается рост максимума при 650—660 нм. При 465 нм в первые минуты освещения наблюдается небольшое увеличение поглощения, которое снижается при дальнейшем освещении. Обратимые изменения поглощения в максимумах 465 и 655 нм, наблюдаемые при энергичном встряхивании реакционной смеси с воздухом после окончания освещения, указывают на восстановление гематопорфирина тиомочевиной в присутствии кислорода.

Фотовосстановление ферредоксина. Касснер и Камен, используя в качестве доноров электрона аскорбиновую кислоту и дитиоэритритол, наблюдали фотосенсибилизированное восстановление ферредоксина в трис-буферном растворе pH 7,85—7,9. В качестве фотосенсибилизатора использован копропорфирин ([5]).

В нашей работе использовался лиофилизованный ферредоксин из спируллины с молекулярным весом 12 000 и коэффициентами экстинкции в максимумах 420 и 465 нм соответственно $9{,}7 \cdot 10^4$ и $8{,}8 \cdot 10^4$ ([6]). Восстановление ферредоксина тиомочевиной изучалось нами как в аэробных, так и анаэробных условиях. Поскольку максимум поглощения ферредоксина при 420 нм экранируется поглощением гематопорфирина, наблюдение за ходом реакции проводилось по изменению поглощения в максимуме 465 нм.

В первые минуты освещения в вакууме растворов, содержащих ферредоксин, тиомочевину и гематопорфирин в водном буферном растворе при pH 9—11, наблюдалось падение поглощения при 465 нм. Пуск воздуха после окончания реакции приводил к обратимости в спектре поглощения, причем D при 465 нм превышало исходное значение, наблюдаемое до освещения. При реакции в аэробных условиях падение в максимуме поглощения ферредоксина при освещении достигало большей величины, нежели при реакции в вакууме. На рис. 3 показано изменение поглощения в максимуме 465 нм от времени освещения. Пунктирная кривая показывает фотосенсибилизированное восстановление тиомочевиной пигмента в аэробных условиях в отсутствие акцептора электрона. Поскольку в первые минуты освещения у самого гематопорфирина наблюдается подъем оптической плотности в области 465 нм, падение D в этом максимуме в присутствии ферредоксина может свидетельствовать о восстановлении последнего.

При реакции на воздухе достигается от 35 до 55% изменения поглощения ферредоксина при 465 нм, при реакции в вакууме — от 17 до 25%. Касснер и Камен получили 47% восстановления белка ([5]), тогда как с дитионитом наблюдалось 54—55% изменения поглощения в максимуме 465 нм (в процентах от общего поглощения) ([7, 8]).

Обратимое увеличение поглощения в максимуме 465 нм, наблюдаемое при пуске воздуха после окончания восстановления ферредоксина, в некоторых случаях превышает 55%. Этот результат является, по-видимому, следствием суммирования процессов окисления восстановленного ферредоксина и окисления восстановленного гематопорфирина.

Таким образом, глубина восстановления ферредоксина тиомочевиной в фотосенсибилизированной гематопорфирином реакции на воздухе выше, чем при аналогичной реакции в анаэробных условиях.

Полученные данные указывают на необходимость рассмотрения аналогичных реакций с участием кислорода в процессах переноса электрона при фотосинтезе. Возможно, кислород, выделяемый в результате различных реакций метаболизма, а также второй фотосистемой, может участвовать в процессах фоторегулирования путем фотосенсибилизированного окисления некоторых сульфгидрильных эндогенных доноров электрона. Образованные при этом активные соединения могли бы использоваться в качестве доноров электрона при переносе электрона к ферредоксину.

В заключение следует отметить, что лиофилизованный ферредоксин любезно предоставил нам Д. О. Холл, а супероксиддисмутазу — Р. М. Бекина, за что мы приносим им нашу искреннюю благодарность.

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

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
1 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, А. Н. Луганская*, ДАН, т. 183, № 6, 1441 (1968). [2] *А. Н. Луганская, А. А. Красновский*, Мол. биол., т. 4, № 6, 848 (1970). [3] *C. S. Foote*, Science, v. 162, 963 (1968). [4] *J. M. McCord, J. Fridovich*, J. Biol. Chem., v. 244, 604 (1969). [5] *R. J. Kassner, M. D. Kamen*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 58, 2445 (1967). [6] *D. O. Hall, K. K. Rao, R. Cammack*, Biochem. Biopys. Res. Commun., v. 47, 798 (1972). [7] *F. R. Whatley, K. Tagava, D. Arnon*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 26, 633 (1963). [8] *K. T. Fry, R. A. Lazzarini, A. San Pietro*, ibid., v. 50, 652 (1969).

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 225, № 3

УДК 581.132.1

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, В. В. НИКАНДРОВ, Г. П. БРИН, И. Н. ГОГОТОВ, В. П. ОЩЕПКОВ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА В РАСТВОРАХ ХЛОРОФИЛЛА, НАД-Н И ХЛОРОПЛАСТАХ

В нашей лаборатории найдены фотобиохимические системы, в которых наблюдалось прямое и фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена. К числу таких систем относятся: фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена хлорофиллом и его аналогами в органических растворителях ([1–4]), в водных растворах детергентов ([5, 6]), хлоропластами при нарушении их структуры растворителями ([4]), а также фотовосстановление метилвиологена ([1]) и ферредоксина ([7]) возбужденными светом молекулами НАД-Н и НАДФ-Н.

В изученных реакциях за счет энергии света, поглощенного фоторецептором, достигалось повышение окислительно-восстановительного потенциала (E_0') до величины потенциала водородного электрода. Поэтому в таких системах следовало ожидать выделения молекулярного водорода, при введении катализатора, способствующего реакции $2e+2H^+ \rightarrow H_2$.

В согласии с этим целью настоящей работы было изучение фотовыделения водорода некоторыми из описанных систем с введением в них препаратов фермента гидрогеназы.

Гидрогеназа была выделена из фототрофных пурпурных бактерий Thiocapsa rescopersicina, штамм BBS. Бактерии выращивались на среде Пфеннига ([8]), содержащей 0,2% ацетата, 0,1% тиосульфата и 0,1% хлористого аммония. Выращивание культуры и выделение гидрогеназы проведено по методу ([9]). Для опытов использовали препарат гидрогеназы с удельной активностью 9,0 мкл H_2 на 1 мл (из раствора восстановленного метилвиологена).

Измерение выделения водорода осуществлялось на газохроматографической установке, описанной ранее ([10]). Водный раствор исследуемой системы (1 мл) продували аргоном до полного удаления кислорода, после чего к нему добавляли 0,1 мл водного раствора гидрогеназы (0,62 мг в расчете на белок). Опыты проводили при комнатной температуре (20±2°). Кювету освещали видимым светом лампы накаливания или ультрафиолетовым светом в максимуме поглощения НАД-Н (линиями ртути 365 нм). Хлоропласты выделяли из листьев гороха по методу ([11]); эти опыты ставили в среде выделения: фосфатный буфер 0,05 *М* pH 6,5; сахароза 0,5 *М*: NaCl 0,035 *М*, $MgCl_2$ 0,002 *М*. Источники действующего света — осветители ОИ-24, ОИ-28, ртутная лампа ДРШ-250. Линию 365 нм выделяли светофильтрами УФС-1 и СЗС-23.

Фотосенсибилизированное выделение водорода в водных растворах детергентов. В растворе тритона X-100 (0,5%) хлорофилл a+b (оптическая плотность при 670 нм 2,5) при освещении видимым светом сенсибилизирует выделение водорода при использовании доноров электрона, обладающих разной величиной окислительно-восстановительного потенциала: НАД-Н (E_0' −0,32 в), цистеина (E_0' −0,22 в) и аскорбата (E_0' +0,05 в). Без освещения реакция не идет.

Как видно из табл. 1, НАД-Н является наиболее эффективным донором электрона в реакции выделения водорода. Добавление метилвиологена приводит к значительному увеличению выделения водорода в опытах с цистеином и НАД-Н. Аскорбат натрия оказался малоэффективным.

Таблица 1

Фотовыделение водорода, сенсибилизированное хлорофиллом в водных растворах тритона X-100 (0,5%) в присутствии гидрогеназы и разных доноров электрона ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*) с метилвиологеном ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*) при освещении белым светом (400–750 нм) $1 \cdot 10^6$ эрг/см²·сек и красным светом (600–750 нм) $7 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек

Системы	Водород, мкл/мин		Системы	Водород, мкл/мин	
	красный свет	белый свет		красный свет	белый свет
НАД-Н	0,070	0,100	Цистеин + $МВ^{2+}$	0,125	0,200
НАД-Н+$МВ^{2+}$	0,150	0,260	Аскорбат натрия	– *	0,001
Цистеин	0,006	0,010	Аскорбат натрия + $МВ^{2+}$	– *	0,001

* Не удалось зарегистрировать в пределах чувствительности метода.

Фотовыделение водорода в водных растворах НАД-Н. Освещение водных растворов восстановленных пиридиннуклеотидов и их синтетического аналога бензилникотинамида (БНА-Н) ультрафиолетовым светом (365 нм) в присутствии гидрогеназы приводило к выделению водорода. Добавление метилвиологена во всех случаях активировало реакцию.

Таблица 2

Выделение водорода при освещении водных растворов НАД-Н и НАДФ-Н и БНА-Н ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*) в присутствии гидрогеназы и метилвиологена ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*). Свет (365 нм) $2 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек

Системы	Водород, мкл/мин	Системы	Водород, мкл/мин
НАД-Н	0,12	НАДФ-Н + $МВ^{2+}$	0,62
НАД-Н + $МВ^{2+}$	0,40	БНА-Н	0,10
НАДФ-Н	0,07	БНА-Н + $МВ^{2+}$	0,27

Фотовыделение водорода хлоропластами. В опытах американских исследователей ([12]) описано выделение водорода в суспензии хлоропластов в присутствии гидрогеназы и кислородпотребляющей системы.

В наших опытах при освещении хлоропластов наблюдалось фотовыделение водорода в присутствии экзогенных доноров водорода НАД-Н или НАДФ-Н и гидрогеназы. Результаты этих опытов согласуются с наблюдениями ([13]) о световом выделении водорода бесклеточными препаратами зеленых водорослей Chlamydomonas eugametos и цианобактерий Anabaena variabilis при использовании в качестве донора водорода НАД-Н-генерирующей системы. Введение диурона (до 10^{-5} *M*) не подавляло выделение водорода, что указывает на неактивность II фотосистемы в этом процессе.

Итак, эффективность фотовыделения водорода оказалась близкой в водных растворах детергентов и в суспензиях хлоропластов. Предварительные измерения указывают на величину квантового выхода, достигающего 0,1%.

Описанные наблюдения дают возможность высказать предположение о механизме фотовыделения водорода клетками фотосинтезирующих организмов. Результаты опытов по фотосенсибилизированному хлорофиллом восстановлению метилвиологена с использованием НАД-Н как донора электрона ([1, 7]) дали возможность предположить наличие такой реакции при фотовыделении водорода водорослями ([14]).

Установленное в настоящей работе фотовыделение водорода в присутствии НАД-Н и НАДФ-Н в растворах хлорофилла и суспензиях хлоропластов подтверждает это предположение. Так, при катаболизме (цикл Кребса) углеводов и других продуктов фотосинтеза происходит образование НАД-Н или НАДФ-Н, которые, поступая в I фотосистему, могут быть

Таблица 3

Выделение водорода на красном (600–750 нм) и на белом (400–700 нм) свету хлоропластами, содержащими 0,05 мг/мл хлорофилла в присутствии НАД-Н (10^{-3} *M*) и метилвиологена (10^{-3} *M*). Интенсивность света дана в табл. 1

Системы	Водород, мкл/мин	
	красный свет	белый свет
Без НАД-Н	0,000	0,000
НАД-Н	0,007	0,015
НАД-Н + $МВ^{2+}$	0,072	0,152

донорами водорода при реакции выделения молекулярного водорода с помощью гидрогеназы, находящейся в клетках водорослей. Этот метаболический путь не исключает возможность переноса электрона за счет фотофосфорилирования.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва
Институт фотосинтеза Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

Поступило
16 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 163, 761 (1965). [2] *Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский,* ДАН, т. 174, 221 (1967). [3] *Г. П. Брин,* Сб.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, «Наука», 1965, стр. 302. [4] *Г. П. Брин, А. А. Красновский,* ДАН, т. 204, 1253 (1972). [5] *А. А. Красновский, А. Н. Луганская,* ДАН, т. 178, 1441 (1968). [6] *А. Н. Луганская, А. А. Красновский,* Молек. биол., т. 4, 848 (1970). [7] *А. А. Красновский, Г. П. Брин, В. В. Никандров,* ДАН, т. 220, 1214 (1975). [8] *N. Pfennig,* Zbl. Bacteriol. I, Abt. Orig., Suppl. v. 1, 179 (1965). [9] *И. Н. Гоготов, Н. А. Зорин, Л. В. Богоров,* Микробиология, т. 43, 5 (1974). [10] *В. П. Ощепков, А. А. Красновский,* Прикладная биохимия и микробиология, т. 10, 760 (1974). [11] *D. A. Walker,* In: Methodes in Enzymology, v. 23, 217 (1971). [12] *J. R. Benemann, J. A. Berenson et al.,* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 2317 (1973). [13] *F. B. Abels,* Plant Physiol., v. 39, 169 (1964). [14] *В. П. Ощепков, А. А. Красновский,* Физиол. раст., т. 19, 1090 (1972).

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 225, № 3

УДК 581.132.1

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, В. В. НИКАНДРОВ, Г. П. БРИН, И. Н. ГОГОТОВ, В. П. ОЩЕПКОВ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА В РАСТВОРАХ ХЛОРОФИЛЛА, НАД-Н И ХЛОРОПЛАСТАХ

В нашей лаборатории найдены фотобиохимические системы, в которых наблюдалось прямое и фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена. К числу таких систем относятся: фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена хлорофиллом и его аналогами в органических растворителях ([1–4]), в водных растворах детергентов ([5, 6]), хлоропластами при нарушении их структуры растворителями ([4]), а также фотовосстановление метилвиологена ([1]) и ферредоксина ([7]) возбужденными светом молекулами НАД-Н и НАДФ-Н.

В изученных реакциях за счет энергии света, поглощенного фоторецептором, достигалось повышение окислительно-восстановительного потенциала (E_0') до величины потенциала водородного электрода. Поэтому в таких системах следовало ожидать выделения молекулярного водорода, при введении катализатора, способствующего реакции $2e+2H^+ \rightarrow H_2$.

В согласии с этим целью настоящей работы было изучение фотовыделения водорода некоторыми из описанных систем с введением в них препаратов фермента гидрогеназы.

Гидрогеназа была выделена из фототрофных пурпурных бактерий Thiocapsa rescopersicina, штамм BBS. Бактерии выращивались на среде Пфеннига ([8]), содержащей 0,2% ацетата, 0,1% тиосульфата и 0,1% хлористого аммония. Выращивание культуры и выделение гидрогеназы проведено по методу ([9]). Для опытов использовали препарат гидрогеназы с удельной активностью 9,0 мкл H_2 на 1 мл (из раствора восстановленного метилвиологена).

Измерение выделения водорода осуществлялось на газохроматографической установке, описанной ранее ([10]). Водный раствор исследуемой системы (1 мл) продували аргоном до полного удаления кислорода, после чего к нему добавляли 0,1 мл водного раствора гидрогеназы (0,62 мг в расчете на белок). Опыты проводили при комнатной температуре (20±2°). Кювету освещали видимым светом лампы накаливания или ультрафиолетовым светом в максимуме поглощения НАД-Н (линиями ртути 365 нм). Хлоропласты выделяли из листьев гороха по методу ([11]); эти опыты ставили в среде выделения: фосфатный буфер 0,05 *М* pH 6,5; сахароза 0,5 *М*: NaCl 0,035 *М*, $MgCl_2$ 0,002 *М*. Источники действующего света — осветители ОИ-24, ОИ-28, ртутная лампа ДРШ-250. Линию 365 нм выделяли светофильтрами УФС-1 и СЗС-23.

Фотосенсибилизированное выделение водорода в водных растворах детергентов. В растворе тритона X-100 (0,5%) хлорофилл a+b (оптическая плотность при 670 нм 2,5) при освещении видимым светом сенсибилизирует выделение водорода при использовании доноров электрона, обладающих разной величиной окислительно-восстановительного потенциала: НАД-Н (E_0' −0,32 в), цистеина (E_0' −0,22 в) и аскорбата (E_0' +0,05 в). Без освещения реакция не идет.

Как видно из табл. 1, НАД-Н является наиболее эффективным донором электрона в реакции выделения водорода. Добавление метилвиологена приводит к значительному увеличению выделения водорода в опытах с цистеином и НАД-Н. Аскорбат натрия оказался малоэффективным.

Таблица 1

Фотовыделение водорода, сенсибилизированное хлорофиллом в водных растворах тритона Х-100 (0,5%) в присутствии гидрогеназы и разных доноров электрона ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*) с метилвиологеном ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*) при освещении белым светом (400–750 нм) $1 \cdot 10^6$ эрг/см²·сек и красным светом (600–750 нм) $7 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек

Системы	Водород, мкл/мин		Системы	Водород, мкл/мин	
	красный свет	белый свет		красный свет	белый свет
НАД-Н	0,070	0,100	Цистеин + MB^{2+}	0,125	0,200
НАД-Н+MB^{2+}	0,150	0,260	Аскорбат натрия	– *	0,001
Цистеин	0,006	0,010	Аскорбат натрия + MB^{2+}	– *	0,001

* Не удалось зарегистрировать в пределах чувствительности метода.

Фотовыделение водорода в водных растворах НАД-Н. Освещение водных растворов восстановленных пиридиннуклеотидов и их синтетического аналога бензилникотинамида (БНА-Н) ультрафиолетовым светом (365 нм) в присутствии гидрогеназы приводило к выделению водорода. Добавление метилвиологена во всех случаях активировало реакцию.

Таблица 2

Выделение водорода при освещении водных растворов НАД-Н и НАДФ-Н и БНА-Н ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*) в присутствии гидрогеназы и метилвиологена ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*). Свет (365 нм) $2 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек

Системы	Водород, мкл/мин	Системы	Водород, мкл/мин
НАД-Н	0,12	НАДФ-Н + MB^{2+}	0,62
НАД-Н + MB^{2+}	0,40	БНА-Н	0,10
НАДФ-Н	0,07	БНА-Н + MB^{2+}	0,27

Фотовыделение водорода хлоропластами. В опытах американских исследователей ([12]) описано выделение водорода в суспензии хлоропластов в присутствии гидрогеназы и кислородпотребляющей системы.

В наших опытах при освещении хлоропластов наблюдалось фотовыделение водорода в присутствии экзогенных доноров водорода НАД-Н или НАДФ-Н и гидрогеназы. Результаты этих опытов согласуются с наблюдениями ([13]) о световом выделении водорода бесклеточными препаратами зеленых водорослей Chlamydomonas eugametos и цианобактерий Anabaena variabilis при использовании в качестве донора водорода НАД-Н-генерирующей системы. Введение диурона (до 10^{-5} *M*) не подавляло выделение водорода, что указывает на неактивность II фотосистемы в этом процессе.

Итак, эффективность фотовыделения водорода оказалась близкой в водных растворах детергентов и в суспензиях хлоропластов. Предварительные измерения указывают на величину квантового выхода, достигающего 0,1%.

Описанные наблюдения дают возможность высказать предположение о механизме фотовыделения водорода клетками фотосинтезирующих организмов. Результаты опытов по фотосенсибилизированному хлорофиллом восстановлению метилвиологена с использованием НАД-Н как донора электрона ([1, 7]) дали возможность предположить наличие такой реакции при фотовыделении водорода водорослями ([14]).

Установленное в настоящей работе фотовыделение водорода в присутствии НАД-Н и НАДФ-Н в растворах хлорофилла и суспензиях хлоропластов подтверждает это предположение. Так, при катаболизме (цикл Кребса) углеводов и других продуктов фотосинтеза происходит образование НАД-Н или НАДФ-Н, которые, поступая в I фотосистему, могут быть

Таблица 3

Выделение водорода на красном (600–750 нм) и на белом (400–700 нм) свету хлоропластами, содержащими 0,05 мг/мл хлорофилла в присутствии НАД-Н (10^{-3} *M*) и метилвиологена (10^{-3} *M*). Интенсивность света дана в табл. 1

Системы	Водород, мкл/мин	
	красный свет	белый свет
Без НАД-Н	0,000	0,000
НАД-Н	0,007	0,015
НАД-Н + $МВ^{2+}$	0,072	0,152

донорами водорода при реакции выделения молекулярного водорода с помощью гидрогеназы, находящейся в клетках водорослей. Этот метаболический путь не исключает возможность переноса электрона за счет фотофосфорилирования.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва
Институт фотосинтеза Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

Поступило
16 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 163, 761 (1965). [2] *Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский,* ДАН, т. 174, 221 (1967). [3] *Г. П. Брин,* Сб.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, «Наука», 1965, стр. 302. [4] *Г. П. Брин, А. А. Красновский,* ДАН, т. 204, 1253 (1972). [5] *А. А. Красновский, А. Н. Луганская,* ДАН, т. 178, 1441 (1968). [6] *А. Н. Луганская, А. А. Красновский,* Молек. биол., т. 4, 848 (1970). [7] *А. А. Красновский, Г. П. Брин, В. В. Никандров,* ДАН, т. 220, 1214 (1975). [8] *N. Pfennig,* Zbl. Bacteriol. I, Abt. Orig., Suppl. v. 1, 179 (1965). [9] *И. Н. Гоготов, Н. А. Зорин, Л. В. Богоров,* Микробиология, т. 43, 5 (1974). [10] *В. П. Ощепков, А. А. Красновский,* Прикладная биохимия и микробиология, т. 10, 760 (1974). [11] *D. A. Walker,* In: Methodes in Enzymology, v. 23, 217 (1971). [12] *J. R. Benemann, J. A. Berenson et al.,* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 2317 (1973). [13] *F. B. Abels,* Plant Physiol., v. 39, 169 (1964). [14] *В. П. Ощепков, А. А. Красновский,* Физиол. раст., т. 19, 1090 (1972).

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 221, № 6

УДК 541.14+547.979.4

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. М. ПУШКИНА, Н. Н. ДРОЗДОВА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО, А. В. УМРИХИНА

ПЕРВИЧНЫЕ СТАДИИ ОБРАТИМОГО ФОТООКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b

Способность бактериохлорофилла к обратимому фотоокислению кислородом воздуха и хинонами была обнаружена и исследована в нашей лаборатории ([1–3]). Более глубокое необратимое окисление бактериохлорофилла приводит к образованию устойчивых фотопродуктов, обладающих характерными спектрами поглощения и люминесценции, аналогичных хлорофиллу и протохлорофиллу ([4]).

Мы описали обратимое и необратимое фотоокисление бактериохлорофилла b, выделенного из культуры Rhodopseudomonas viridis ([5]). Этот пигмент является наиболее «длинноволновым» фотосинтетически активным пигментом, что определяет интерес к исследованию его свойств.

При сравнительном изучении фотохимических свойств бактериохлорофиллов a и b обнаружены различия в реакционной способности и фотохимическом поведении этих бактериальных хлорофиллов. Однако имеются лишь единичные сведения о появлении фотоиндуцированного сигнала э.п.р. в клетках бактерий Rhodopseudomonas viridis, содержащих бактериохлорофилл b ([6]), тогда как образование свободных радикалов при фотореакциях этого пигмента в растворе не изучено.

В настоящей работе поставлена задача обнаружить радикальную окисленную форму бактериохлорофилла b и сравнить ее свойства со свойствами катион-радикала бактериохлорофилла a, обнаруженного и исследованного в наших предыдущих работах ([7, 8]).

Методика. Растворы бактериохлорофилла b (10^{-4} M) и хинона ($5\cdot10^{-4}$ M) в этаноле в вакуумированных стеклянных ампулах освещали красным светом (светофильтр КС-19) непосредственно в резонаторе э.п.р. спектрометра. Условия измерения сигналов э.п.р. описаны ранее ([8]). Бактериохлорофилл b выделяли из культуры бактерий Rhodopseudomonas viridis ([9]); *n*-бензохинон – дважды возогнанный; этанол – ректификат (96%).

Результаты. Ранее показано, что освещение в резонаторе э.п.р. спектрометра системы бактериохлорофилла a – *n*-бензохинон в этаноле в вакууме приводило к появлению в диапазоне температур $-150\div-10°$ сигнала э.п.р., представляющего синглетную линию с $g=2{,}0025$ и шириной $\Delta H=12$ э. Этот сигнал был обусловлен радикальной окисленной формой бактериохлорофилла a. Он отличался по своим характеристикам от сигнала семихинона, образование которого также показано в этой системе и который отчетливо можно было наблюдать при действии желтого или белого света на растворы *n*-бензохинона в этаноле (пентет $\Delta H=5$ э и $g=2{,}005$).

Установлено, что освещение растворов бактериохлорофилла b и *n*-бензохинона в этаноле в вакууме также приводило к возникновению синглетного сигнала э.п.р. со сходными характеристиками: сигнал представлял собою синглетную линию с $g=2{,}0025$ и $\Delta H=13$ э, наблюдался при температуре $-160–0°$. Очевидно, при фотоокислении бактериохлорофилла b, как и при окислении бактериохлорофилла a, образуется стабильная катион-радикальная форма пигмента. Однако несмотря на общее сходство окисленных форм обоих бактериальных пигментов, имеются и различия в свойствах их радикальных продуктов окисления.

На рис. 1 приведены спектры э.п.р., наблюдаемые при действии крас-

ного света на растворы бактериохлорофилла b и *n*-бензохинона в этаноле в сравнении с соответствующими данными для бактериохлорофилла a. Сопоставлен ход исчезновения синглетного сигнала э.п.р. при −120°. На рис. 1 видно, что оба бактериальных пигмента дают сходные сигналы э.п.р., однако длительность жизни этих сигналов существенно различает-

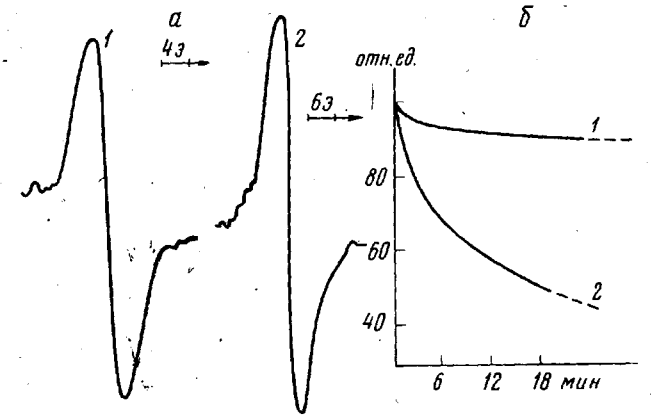


Рис. 1. Спектры синглетного сигнала э.п.р., наблюдаемого при освещении красным светом растворов бактериохлорофилла a и b (10^{-4} *M*) и *n*-бензохинона ($5\cdot10^{-4}$ *M*) в этаноле (*а*) и кривые исчезновения этого сигнала в темноте при −120° (*б*). *1* – бактериохлорофилл a, *2* – бактериохлорофилл b

ся. Если сигнал бактериохлорофилла a часами сохраняется в темноте при температуре ниже −70°, то окисленная форма бактериохлорофилла b при −70° исчезает в течение нескольких минут и даже при −120° исчезает довольно быстро в темноте после выключения света. Более быстрое исчезновение синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофилла b по сравнению с синглетом бактериохлорофилла a можно наблюдать во всем диапазоне температур. Только при температуре ниже −135°, т. е. в замороженной матрице, удается стабилизировать окисленную радикальную форму бактериохлорофилла b (рис. 2). Частичное уменьшение амплитуды синглетного сигнала после выключения света при −150° (рис. 2) можно объяснить дисмутацией семихинона, который также образуется в этой системе (см. [8]).

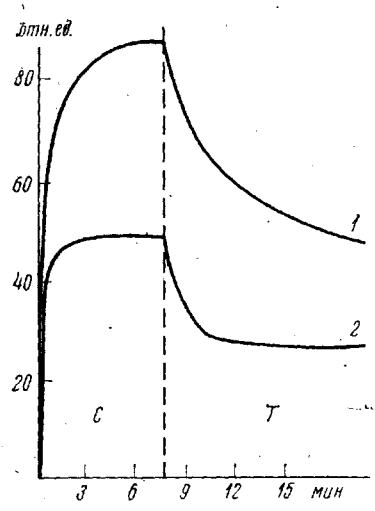


Рис. 2. Кривые нарастания на свету и исчезновения в темноте синглетного сигнала э.п.р. в растворах бактериохлорофилла b (10^{-4} *M*) и *n*-бензохинона ($5\cdot10^{-4}$ *M*) в этаноле. *1* – при −120°, *2* – при −150°. Здесь и на рис. 3 С – свет, Т – темнота

Полученные данные указывают на то, что оба бактериальных пигмента характеризуются разной реакционной способностью их окисленных радикальных форм, при этом радикальные свойства продуктов окисления соответствуют фотохимическим свойствам бактериохлорофиллов ([5]).

При концентрации *n*-бензохинона равной или меньшей концентрации пигмента (10^{-4} *M*) интенсивность синглетного сигнала э.п.р. была невелика. Увеличение концентрации окислителя приводило к увеличению скорости нарастания и интенсивности сигнала, однако при этом увеличивалась и скорость обратной реакции. Так,

при концентрации *n*-бензохинона $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M* синглетный сигнал удается наблюдать с бактериохлорофиллом b только на свету, тогда как после выключения света сигнал исчезал практически мгновенно. Из-за большей устойчивости синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофилла a его можно наблюдать в более широком интервале концентраций *n*-бензохинона. Однако при получении сравнимых результатов была выбрана оптимальная концентрация *n*-бензохинона, равная $5 \cdot 10^{-4}$ *M*, при которой в отчетливой форме наблюдали как световой, так и темновой (после действия света) сигналы э.п.р. бактериохлорофилла a и b.

Известно, что глицерин оказывает замедляющее действие на ход прямой и обратной фотохимической реакции, увеличивая вязкость среды (аналогично понижению температуры). Добавляя глицерин к раствору бактериохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле в количестве 20; 40; 50%, удалось повысить температурный предел наблюдения синглетного сигнала э.п.р. (до 20°), а также замедлить ход обратной реакции — исчезновения синглетного сигнала э.п.р. Полученные результаты также соответствуют фотохимическим свойствам бактериохлорофиллов ([3]).

Ранее установлено, что синий свет значительно ускоряет регенерацию до исходного состояния окисленной формы бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 нм, которая, по-видимому, ответственна за появление синглетного сигнала э.п.р. Мы проверили действие синего света на светоиндуцированный красным светом синглетный сигнал э.п.р. Оказалось, что в области температур $-150 \div -90°$ синглетный сигнал не только не исчезал на синем свету, но значительно увеличивался по интенсивности. Однако наблюдаемый после действия синего света синглетный сигнал э.п.р. сразу же исчезал после выключения света и по ширине и *g*-фактору соответствовал светоиндуцированному белым или желтым светом сигналу э.п.р. семихинона. Принадлежность сигнала э.п.р., возникающего при действии синего света семихинону доказывается опытами при температуре −90°. В этих условиях при действии синего света стабильный (светоиндуцированный красным светом) синглетный сигнал э.п.р. исчезал и появлялся отчетливый сигнал семихинона (пентет, $\Delta H = 5$ э). Такой же сигнал семихинона появляется при действии синего света на растворы одного *n*-бензохинона в отсутствие бактериохлорофилла. По-видимому, синий свет, оказывая прямое активирующее действие на *n*-бензохинон (в системе с бактериохлорофиллом), приводит к образованию избыточного количества радикалов семихинона, которые участвуют как в реакции рекомбинации, так и в реакции с окисленной формой бактериохлорофилла, приводя к ее исчезновению. Возможно и прямое активирующее действие синего света на форму 430, однако присутствие в системе *n*-бензохинона не позволяет разграничить действие синего света на *n*-бензохинон и окисленную форму бактериохлорофилла.

Полученные данные по свойствам стабильного синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофиллов a и b позволяют предположить, что наблюдаемый ранее продукт окисления бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 нм ([3, 5]) является свободным радикалом и ответствен за появление синглетного сигнала э.п.р.

Необратимое окисление бактериальных пигментов приводит к образованию устойчивых фотопродуктов, подобных хлорофиллу и протохлорофиллу.

Мы исследовали способность хлорофиллоподобного продукта к обратимому окислению хиноном на примере бактериохлорофилла b. С этой целью бактериохлорофилл b был окислен предварительно кислородом воздуха на свету с образованием хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения при 680 нм. Освещение растворов этого пигмента с *n*-бензохиноном в этаноле в вакууме (светофильтр КС-13) не приводило к возникновению устойчивого синглетного сигнала э.п.р., характерного для окисленных бактериохлорофиллов. Вместо этого на свету мы наблюдали сиг-

нал семихинона, который сразу же исчезал после выключения света (рис. 3). Эти данные соответствуют результатам Толлина по фотоокислению хлорофилла *n*-бензохиноном, который наблюдал лишь сигнал семихинона при действии света на растворы хлорофилла и феофитина с хиноном в этаноле ([10]). Полученные результаты подтверждают предположение, что продукт окисления бактериохлорофилла с максимумом при 680 нм представляет собой хлорофиллоподобное соединение и что переход от структуры бактериохлорина к структуре хлорина в результате отнятия двух атомов водорода в положении 3—4 от молекулы бактериохлорофилла существенно изменяет окислительно-восстановительные свойства пигмента. Так, катион-радикальная форма бактериохлорофилла b и a стабильна по сравнению с семихиноном, сохраняясь длительное время в темноте после выключения света, тогда как сигнал семихинона исчезает сразу же после выключения света. В отличие от этого, катион-радикальная форма хлорофиллоподобного продукта, так же как и хлорофилла, менее стабильна, чем семихинон.

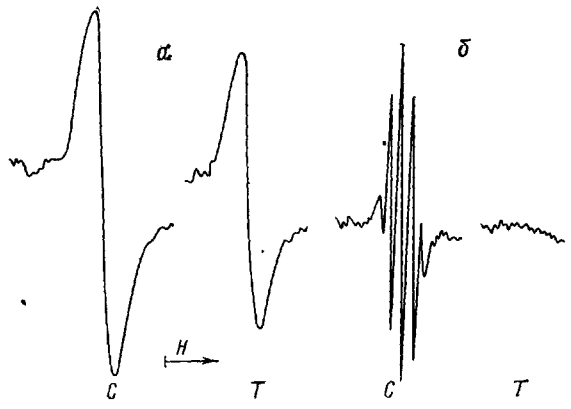


Рис. 3. Сигналы э.п.р., наблюдаемые на свету и в темноте для растворов бактериохлорофилла b и *n*-бензохинона в этаноле (*а*) и продукта окисления бактериохлорофилла b (П«680») с *n*-бензохиноном в этаноле (*б*)

Итак, фотоокисление бактериохлорофилла b протекает аналогично фотоокислению бактериохлорофилла a и приводит к образованию радикальной формы, менее стабильной (более активной), чем соответствующая форма бактериохлорофилла a. Окисленная форма дает синглетный сигнал э.п.р. с ΔH=13 э и g=2,0025, который наблюдается при −160—0°, стабильный в замороженной матрице, скорость исчезновения синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофилла b больше соответствующей скорости исчезновения сигнала э.п.р. окисленного бактериохлорофилла a. Стационарная концентрация данного типа свободного радикала зависит от соотношения скорости обратной реакции, диспропорционирования семихинона (а, возможно, и $^{\cdot}Бх^{+}$) и реакции с растворителем или содержащимися в нем примесями. Меньшая устойчивость $^{\cdot}Бх^{+}$ b может указывать на большую скорость его обратного взаимодействия с семихиноном (или гидрохиноном), растворителем, так как скорость превращения семихинона в опытах с бактериохлорофиллом a и b не должна изменяться.

Можно предположить, что реакция, подобная описанной выше, моделирует первичную фотореакцию в бактериях Rhodopseudomonas viridis.

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

Поступило
31 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, К. К. Войновская,* ДАН, т. 81, 879 (1951). [2] *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова,* ДАН, т. 158, 730 (1964). [3] *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 30, 605 (1965). [4] *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. М. Бокучава,* ДАН, т. 190, 464 (1970). [5] *Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 39, 188 (1974). [6] *D. Fleischman, J. Cooke,* Photochem. Photobiol., v. 14, № 1 (1971). [7] *А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко, А. А. Красновский,* Биофизика, т. 18, 565 (1973). [8] *А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко и др.,* ДАН, т. 221, № 4 (1975). [9] *А. А. Красновский, Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова,* ДАН, т. 211, 981 (1973). [10] *G. Tollin, G. Grin,* Biochim. et biophys. acta, v. 60, 524 (1962).

БИОФИЗИКА

Том XX, вып. 6 1975

УЧАСТИЕ КИСЛОРОДА В ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОМ ХЛОРОФИЛЛОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ МЕТИЛВИОЛОГЕНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ ДЕТЕРГЕНТА

А. Н. ЛУГАНСКАЯ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В аэробных условиях в водном растворе тритона X-100 изучалась зависимость фотосенсибилизированного хлорофиллом *a* восстановления метилвиологена тиомочевиной от температуры реакционой смеси. Найдено, что реакция делится на две стадии — световую и темновую. Фотосенсибилизированное окисление тиомочевины кислородом воздуха протекает при температурах вплоть до —70° С. Восстановление метилвиологена является темновой стадией, для которой необходимы диффузионные процессы. Выяснялась роль перекиси водорода в изучаемой реакции, в результате чего показано, что перекись водорода не является «инициатором» реакции, приводящей к восстановлению метилвиологена. В качестве донора электрона в фотосенсибилизированной реакции в присутствии кислорода воздуха использовались восстановленный глютатион и смесь восстановленного и окисленного глютатионов. Увеличение глубины и скорости восстановления метилвиологена в аэробных условиях по сравнению с реакцией в анаэробных условиях указывает на образование более активных восстановителей, чем исходный донор электрона. Высказывается предположение, что в изучаемых реакциях промежуточными активными восстановителями могут являться сульфиновые кислоты, получаемые при фотосенсибилизированном окислении кислородом тиосоединений.

Ранее было показано, что фотосенсибилизированное хлорофиллом и его аналогами восстановление метилвиологена (МВ) и других красителей тиомочевиной в водных растворах детергентов без предварительного удаления кислорода из реакционной системы протекает значительно глубже, нежели в вакууме [1, 2]. В случае отсутствия экзогенного акцептора электрона восстановлению подвергается сам пигмент-сенсибилизатор, образуя восстановленную «красную» форму.

Несмотря на присутствие кислорода в системе до освещения, восстановление осуществляется в анаэробной среде, так как вначале происходит эффективное фотосенсибилизированное восстановление кислорода, протекающее с квантовым выходом, близким к единице [3]. Эффективность реакции возрастает с повышением pH раствора. Следует отметить, что именно фотосенсибилизированное окисление тиомочевины является источником активных восстановителей, за счет которых и происходит восстановление красителя и самого фотосенсибилизатора.

В настоящей работе разделены стадии фотообразования активного восстановителя и восстановления виологена. Методика опытов описана ранее [2]. Реакция осуществлялась в аэробных условиях при значениях pH среды 8,5—12. В качестве растворителя использовалась смесь, которая отличается большой вязкостью и прозрачна при охлаждении вплоть до —70° С (0,5% тритона X-100, 72% глицерина и 7,5% этилового спирта). Для исследования реакции при низких температурах трубка Тунберга с реагентами погружалась в охлаждающий раствор (спирт+сухой лед), находящийся в прозрачном сосуде Дьюара.

Скорость фотосенсибилизированного восстановления МВ понижается с уменьшением температуры вплоть до —30° С. При более низкой температуре освещение до 30 *мин* вообще не приводит к восстановлению МВ (рис. 1, *А*).

Однако если освещать реакционную смесь в течение 20—30 *мин* при низких значениях температуры (от —70 до —40° С), а затем оставить ее в темноте без встряхивания при комнатной температуре, то с ней со временем происходят следующие изменения. По мере нагревания раствора в нем постепенно развивается синяя окраска восстановленного МВ (рис. 2). Аналогичный результат наблюдается и при быстром на-

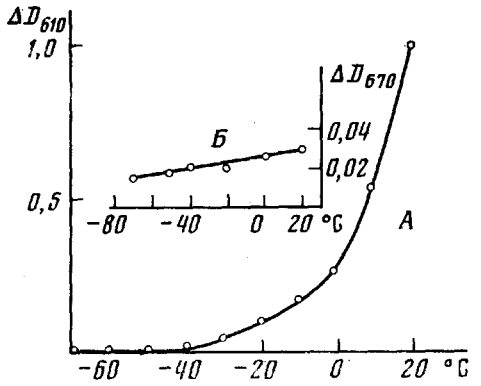


Рис. 1

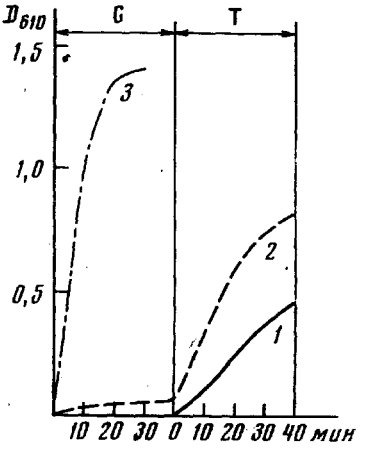


Рис. 2

Рис. 1. *А* — влияние температуры на аэробное фотовосстановление метилвиологена тиомочевиной в тритоне Х-100 при pH 10. Сенсибилизатор — хлорофилл *а*. По оси ординат ΔD_{610} за 10 *мин*; *Б* — изменение в максимуме поглощения хлорофилла *а* (ΔD_{670}) при фотосенсибилизированном восстановлении метилвиологена за 30 *мин* освещения. По оси абсцисс — температура реакционной смеси

Рис. 2. Восстановление метилвиологена в темноте при 20° С после предварительного освещения реакционной смеси в течение 20 *мин* при —70° С (*1*) и при —30° С (*2*); *3* — освещение при +20° С. 4 *мл* водного раствора тритона Х-100, pH 10, хлорофилл *а* 10^{-5} *М*, тиомочевина 0,08 *М*, метилвиологен 10^{-4} *М*. С — свет, Т — темнота при 20° С

гревании реакционной смеси после освещения, если не взбалтывать раствор.

Из этих данных можно заключить, что процесс накопления активных промежуточных продуктов фотосенсибилизированного окисления тиомочевины протекает и при —70° С. Темновая же стадия восстановления МВ осуществляется только от —30° С, т. е. требует наличия диффузионных процессов.

Ранее в качестве донора электрона в аэробных условиях испытывался цистеин. Было получено, что при фотосенсибилизированной реакции в присутствии кислорода с цистеином также образуются более сильные восстановители, чем исходный донор электрона [2].

Фотосенсибилизированное восстановление МВ в аэробных условиях наблюдается также и с восстановленным глютатионом. Следует отметить, что роль кислорода в изучаемых реакциях не ограничивается фотосенсибилизированным окислением донора электронов. Кислород также окисляет восстановленный акцептор и может окислять образованные при фотосенсибилизированной реакции восстановители. Конечный результат реакции в большой степени зависит от соотношения скоростей указанных реакций.

С уменьшением количества кислорода в системе можно ожидать ослабления явлений, мешающих наблюдению за восстановлением МВ.

Действительно, при парциальном давлении кислорода, равном ~25 *мм* рт. ст. удалось наблюдать явное увеличение глубины и скорости восстановления дипиридила по сравнению с реакцией в вакууме (рис. 3).

Известно, что смесь восстановленного и окисленного глютатионов обладает особыми свойствами и восстановленный глютатион в ней является более реакционноспособным [4]. Испытание этой смеси в качестве донора электронов показало, что при pH 9—11 скорость реакции и конечная глубина восстановления МВ на воздухе была больше, чем в вакууме (рис. 4).

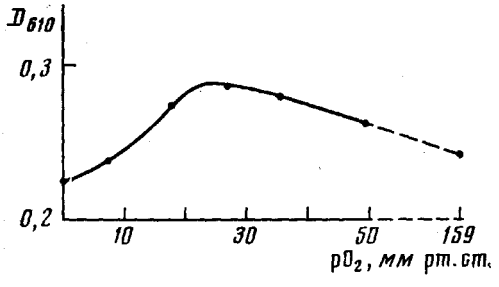


Рис. 3

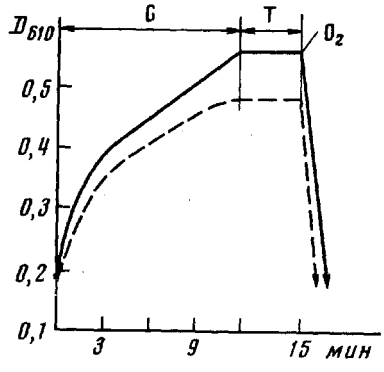


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость фотосенсибилизированного хлорофиллом *a* восстановления метилвиологена восстановленным глютатионом ($6 \cdot 10^{-2}$ *M*) в растворе тритона X-100 при pH 10 от парциального давления кислорода. Освещение красным светом в течение 3 *мин*

Рис. 4. Кинетика фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена смесью окисленного и восстановленного глютатионов ($1{,}22 \cdot 10^{-2}$ GSH и $6 \cdot 10^{-3}$ GSSG) в вакууме (пунктирная кривая) и в присутствии воздуха (сплошная линия) в растворе тритона X-100 при pH 10. C — свет, T — темнота

Обращает на себя внимание смещение длинноволнового максимума хлорофилла в коротковолновую сторону на 2—3 *нм* в первую минуту освещения. Это может быть следствием образования комплекса хлорофилла с восстановленным и окисленным глютатионами. Можно предполагать, что в таком комплексе облегчается реакция фотосенсибилизированного окисления кислородом восстановленного глютатиона. С другой стороны, комплекс, возможно, стабилизирует продукты этой реакции, что может способствовать восстановлению метилвиологена в присутствии кислорода.

В контрольном опыте (с использованием в качестве донора электронов одного окисленного глютатиона) восстановления МВ не обнаруживалось, наблюдалась только деструкция хлорофилла без сдвига длинноволнового максимума пигмента. Увеличение глубины восстановления МВ на воздухе по сравнению с реакцией в вакууме указывает на образование более активных восстановителей, чем исходный глютатион.

Что за вещества могут являться восстановителями МВ — акцептора электронов, обладающего высоким отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом? В литературе широко рассматривается возможность восстановления МВ возбужденным хлорофиллом или восстановленной формой пигмента. Эти активные молекулы являются короткоживущими образованиями. В нашем случае реакцию с МВ осуществляют долгоживущие вещества, образованные в результате фотосенсибилизированной реакции донора электронов с кислородом. При этом в реакции могут участвовать как продукты восстановления кислорода, так и продукты окисления доноров электрона. Рассмотрим каждую возможность в отдельности.

Известно, что окисление восстановленного МВ кислородом сопровождается образованием перекиси водорода [5]. В начальных стадиях фотовосстановления в аэробных условиях одновременно присутствуют кислород и восстановленный МВ, поэтому роль перекиси водорода требовала выяснений. Этому способствовали также эксперименты Гуревича [6, 7], в которых ортодинитробензол и метиловый красный более активно восстанавливались аскорбиновой кислотой, фенилгидразином и цистеином в темновой реакции при действии на донор электрона перекиси водорода и ионов железа или меди в качестве катализаторов. Растворителем в указанных реакциях служил водный этиловый спирт. Однако в условиях, описанных Гуревичем, нам не удалось наблюдать восстановления МВ аскорбиновой кислотой, цистеином и тиомочевиной.

Добавление каталазы в нашу систему (с тиомочевиной в тритоне Х-100) существенным образом не влияло на фотовосстановление МВ в присутствии кислорода. В некоторых опытах скорость фотореакции в присутствии каталазы была даже выше, чем без нее.

В случае добавки в реакционную смесь перекиси водорода из расчета 1 *М* перекиси на 1 *М* тиомочевины и $1 \cdot 10^{-4}$ *М* ионов меди восстановления метилвиологена вообще не наблюдается. Добавление меньших количеств перекиси водорода замедляло восстановление МВ. Добавление перекиси к предварительно восстановленному в присутствии кислорода МВ приводило к быстрому окислению последнего.

Таким образом, эффекты, описанные в экспериментах Гуревича, по-видимому, не связаны с теми явлениями, которые наблюдаются в фотосенсибилизированных реакциях.

Евстигнеев и Гаврилова нашли, что не только перекись водорода, но и органические перекиси, в частности перекись бензоила, индуцируют темновое восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой в диоксановом растворе [8], обнаруженное ранее в нашей лаборатории [9]. Участие органической перекиси (мольоксида хлорофилла) в световой стадии изучаемых нами реакций вполне возможно, хотя в настоящее время в литературе дискутируется вопрос об участии в фотосенсибилизированном окислении тиомочевины синглетного кислорода [10].

Известно, что промежуточными веществами при фотоокислении цистеина [11] и глютатиона [12], а также конечными продуктами фотосенсибилизированного порфиринами окисления тиомочевины [13] являются сульфиновые кислоты, которые представляют собой сильные восстановители. Опыты Шенка [14] показали, что фотосенсибилизированное бенгальской розой окисление тиомочевины кислородом в этиловом спирте приводит к образованию амино-имино-метансульфиновой кислоты.

Вытяжка реакционной смеси, взятая после окончания освещения по методике Шенка и прибавленная к солюбилизированному в тритоне Х-100 раствору МВ в вакууме, приводила при щелочных значениях pH к восстановлению дипиридила. Эти опыты указывают на возможность того, что в изучаемых нами реакциях промежуточными восстановителями, получаемыми при фотосенсибилизированном окислении кислородом тиосоединений, могут являться сульфиновые кислоты.

Описанная реакция фотосенсибилизированного восстановления МВ, сопряженная с окислением кислородом некоторых сульфгидрильных соединений, характеризуется парадоксальным, на первый взгляд, эффектом — образованием в результате реакции более активных восстановителей. Эта реакция может выходить за рамки узкоспецифичного класса реакций и иметь более широкое значение, указывая на возможность осуществления в фотосинтезирующих организмах окислительных реакций, приводящих к образованию активных восстановителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Луганская А. Н.,* Докл. АН СССР, *183*, 1441, 1968.
2. *Луганская А. Н., Красновский А. А.,* Мол. биол., *4*, 848, 1970.
3. *Гуринович Г. П., Пецольд О. М., Бытева И. М.,* Докл. АН БССР, *16*, 370, 1972.
4. *Painter A. A., Hunter F. E.,* Biochim. Biophys. Res. Communs., *40*, 2, 1970.
5. *Nam-Hai Chua,* Biochem. et biophys. acta, *245*, 277, 1971.
6. *Гуревич А. А.,* Докл. АН СССР, *82*, 431, 1952.
7. *Гуревич А. А., Голосова Н. А.,* Докл. АН СССР, *126*, 1125, 1959.
8. *Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А.,* Докл. АН СССР, *200*, 725, 1971.
9. *Красновский А. А., Гаврилова В. А.,* Докл. АН СССР, *81*, 1105, 1951.
10. *Foote C. S.,* Science, *162*, 963, 1968.
11. *Jolles-Bergeret B.,* Europ. J. Biochem., *10*, 569, 1969.
12. *Purdie J. W.,* Radiation Res., *48*, 474, 1971.
13. *Schenck G. O., Wirth H.,* Naturwissenschaften, *40*, 141, 1953.
14. *Schenck G. O.,* Angew. Chem., *69*, 579, 1957.

Поступила в редакцию
1.IV.1975

PARTICIPATION OF OXYGEN IN CHLOROPHYLL PHOTOSENSITIZED REDUCTION OF METHYLVIOLOGEN IN DETERGENT AQUEOUS SOLUTION

A. N. LUGANSKAYA, A. A. KRASNOVSKY

Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Dependence of chlorophyll «*a*» photosensitized reduction of methylviologene with tiourea on the temperature of reaction mixture was studied in aerobic conditions in triton X-100 aqueous solution. It was found that the reaction consisted of two stages: the light and dark ones. Photosensitized oxidation of tiourea with air oxygen proceeds at the temperatures up to —70° C. Reduction of methylviologen is a dark stage for which diffusion processes are necessary. The role of hydrogen peroxide in the reaction studied has been investigated. It has been shown that hydrogen peroxide is not the «initiator» of the reaction which results in the reduction of methylviologen. Reduced glutation and the mixture of reduced and oxidized glutations were used as electron donors in photosensitized reaction in the presence of air oxygen. An increase of the depth and rate of the reduction of methylviologen under aerobic conditions as compared to anaerobic ones points to the formation of more active reducers than the initial electron donor.

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 224, № 5

УДК 577.11

БИОХИМИЯ

Е. В. ПАКШИНА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФЕОФИТИНИЗАЦИЯ ЦИНКОВЫХ И КАДМИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ, ДЕЙСТВИЕ СВЕТА

Прочность связи металла с азотом в порфириновых комплексах варьирует в широких пределах, и интерес к этому вопросу связан с тем, что именно металло-порфирины (гем, хлорофиллы, цитохромы) выполняют важнейшие биологические функции. Вместе с тем имеются данные ([1], [2]), что бактериофеофитин входит как обязательный компонент в активный центр фотосинтезирующих бактерий. Изучение феофитинизации магниевых комплексов показало зависимость этой реакции от структурных особенностей пигментов и возможность образования феофитина из промежуточных продуктов обратимого фотовосстановления ([3–5]). В нашей лаборатории установлена возможность накопления цинкпорфирина клетками разнообразных фотосинтезирующих и гетеротрофных организмов и обсуждается вопрос о возможной функциональной роли цинк-порфиринов в указанных организмах ([6]). Цинковые комплексы, будучи по своим фотохимическим свойствам очень близки к магниевым комплексам ([7–9]) и соседствуя с ними в ряду прочности ([10]), используются исследователями для выяснения механизма обратимого фотовосстановления пигментов и фотовосстановления полуизолированной связи 7—8 при переходе от уровня восстановленности порфина до уровня хлорина ([11]).

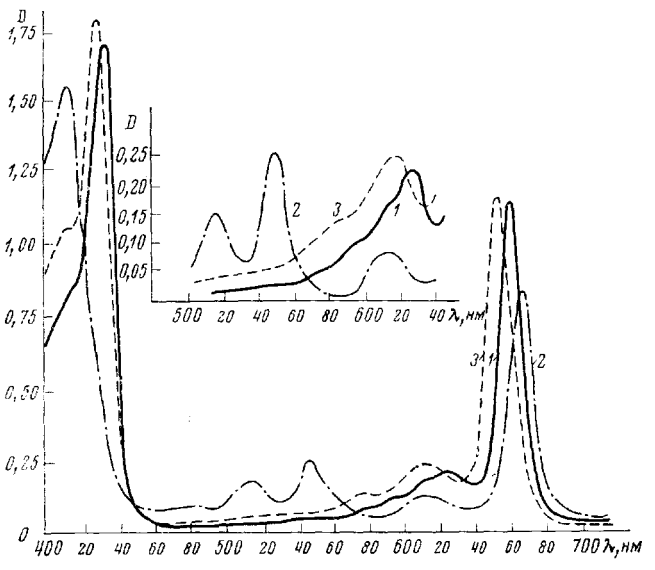


Рис. 1. Спектры поглощения: *1* – бактериовиридина, *2* – феофитина бактериовиридина, *3* – цинкового производного бактериовиридина в серном эфире в эквимолярных соотношениях. Концентрация бактериовиридина, рассчитанная по Хэлту ([12]), $1{,}2 \cdot 10^{-5}$ мол/л

Задачей данной работы было сравнительное исследование феофитинизации цинковых, магниевых и кадмиевых комплексов хлорифилла и его аналогов в идентичных условиях в темноте и при освещении с тем чтобы выяснить, насколько представления, развиваемые нами ранее относительно магниевых комплексов ([3–5]), можно распространять на другие металло-порфирины, у которых существенно изменяются пределы прочности связи металла с азотом. Мы исследовали цинковые комплексы феофитина a, феофитина b, бактериохлорофилла, бактериовиридина и протохлорофилла и кадмиевый комплекс феофитина a. Для получения названных комплексов безметальные аналоги хлорофилла в ацетоне или этиловом спирте подогревали

до 90° в присутствии ацетата кадмия или ацетата цинка, растворенных предварительно в метиловом спирте. Об образовании комплексов судили по изменению спектров поглощения, регистрируемых на спектрофотометре СФ-10. Кадмий-феофитинат а в ацетоне имел поглощение при 660 и 431 нм, что отличается от главных полос поглощения феофитина а (при 666 и 410 нм). Положение главных полос поглощения получаемых нами цинковых комплексов указано в табл. 1. От избытка ацетата освобождались, пе-

Таблица 1

Положение максимумов главных полос поглощения (нм) магниевых комплексов, феофитинов и соответствующих цинковых комплексов (в ацетоне)

Пигменты	Mg-комплексы	Феофитины	Zn-комплексы	Пигменты	Mg-комплексы	Феофитины	Zn-комплексы
Хлорофилл а	663; 430	666; 410	656; 426	Протохлорофилл	626; 437	590; 417	617; 434
Хлорофилл b	645; 456	654; 433	639; 453	Бактериовиридин	663; 434	666; 410	657; 430

Таблица 2

Скорость образования безметальных производных из хлорофилла и его аналогов в водно-ацетоновом растворе с кислотами при 20° ($T_{1/2}$ – время полупревращения, мин.)

Пигмент	Щавелевая кислота, 10% H_2O		Соляная кислота, 20% H_2O	
	концентрация, мол/л	$T_{1/2}$	концентрация	$T_{1/2}$
Бактериовиридин (Mg)	$5\cdot10^{-5}$	>100	$1\cdot10^{-3}$	2
	$1\cdot10^{-4}$	50	$4\cdot10^{-3}$	~0,1
	$2\cdot10^{-2}$	<1		
Бактериовиридин (Zn)	$2\cdot10^{-1}$	165	$4\cdot10^{-3}$	32
Хлорофилл а (Cd)	$5\cdot10^{-5}$	6		
	$1\cdot10^{-4}$	~0,1		
Хлорофилл а (Mg)	$2\cdot10^{-2}$	8	$1\cdot10^{-3}$	20
			$4\cdot10^{-3}$	~1
Хлорофилл а (Zn)	$2\cdot10^{-1}$	Реакция не идет	$4\cdot10^{-3}$	3300
			$4\cdot10^{-2}$	15
Протохлорофилл (Mg)	$2\cdot10^{-2}$	33	$1\cdot10^{-3}$	110
Протохлорофилл (Zn)	$2\cdot10^{-1}$	Реакция не идет	$4\cdot10^{-2}$	75
			$2\cdot10^{-1}$	0,5
Бактериохлорофилл (Mg)	$2\cdot10^{-1}$	51		
Бактериохлорофилл (Zn)	$2\cdot10^{-1}$	Реакция не идет	$2\cdot10^{-1}$	8
Хлорофилл b (Mg)	$2\cdot10^{-2}$	125	$1\cdot10^{-3}$	195
			$4\cdot10^{-3}$	7
Хлорофилл b (Zn)	$2\cdot10^{-1}$	Реакция не идет	$4\cdot10^{-2}$	4140
			$2\cdot10^{-1}$	25

реводя цинковый или кадмиевый комплекс из ацетона в серный эфир с последующим промыванием водой и осушкой прокаленным сернокислым натрием. Освещение растворов осуществляли светом лампы накаливания 750 вт с конденсором через светофильтр КС-13, освещенность $\sim10^5$ эрг/см^2·сек. Спектры поглощения, регистрируемые нами в ходе феофитинизации на спектрофотометре СФ-10, обнаруживали четкое сохранение изобестических точек, расчет количества образовавшегося феофитина осуществляли по падению поглощения в полосе Соре.

В табл. 2 представлены скорость превращения исследованных нами магниевых, цинковых и кадмиевых комплексов. Во всех случаях цинковые комплексы оказываются более устойчивыми, чем магниевые. Замена маг-

ния на цинк в самом лабильном магниевом комплексе — бактериовиридине делает его более устойчивым, чем хлорофилл b, — пигмент, завершающий ряд прочности магниевых комплексов, а введение кадмия в феофитин а ведет к образованию комплекса, значительно более лабильного не только по сравнению с хлорофиллом а, но и по сравнению с бактериовиридином. Таким образом, замена магния соседствующими с ними в ряду прочности металлами (Zn>Mg>Cd) приводит к перекрыванию различий в скоростях феофитинизации в ряду магниевых комплексов, которое от бактериовиридина до хлорофилла b составляет величину в два порядка. Замена магния цинком приводит к замедлению реакции в случае бактериовиридина на два порядка, хлорофилла а — на три и к еще большему замедлению скорости в случае хлорофилла b. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что последовательность пигментов в ряду возрастающей прочности цинковых комплексов соответствует таковой в ряду прочности магниевых комплексов, при этом степень различия структуры а и b в «цинковом» ряду на порядок больше, чем в «магниевом».

Таблица 3

Действие света на скорость феофитинизации хлорофилла а и его цинкового и кадмиевого производных (пиридин, 10% H_2O, щавелевая кислота, 20°)

Пигмент	Щавелевая кислота, мол/л	Время полупревращения, мин.	
		темнота	свет
Cd-феофитинат а	$1 \cdot 10^{-4}$	150	5
Хлорофилл а	$2 \cdot 10^{-2}$	180	10
Zn-феофитинат а	$4 \cdot 10^{-1}$	>1500	30

Различия в скорости темновой феофитинизации в ряду магнийсодержащих пигментов, как было показано нами ранее ([3], [4]); нивелируются при проведении реакции на свету. При этом оптимальный эффект ускоряющего действия света (в два порядка по сравнению с темнотой) наблюдался с наиболее устойчивым к воздействию кислот в темноте хлорофиллом b. В водно-пиридиновой среде, наиболее благоприятной для изучаемого явления, концентрация щавелевой кислоты ($2 \cdot 10^{-2}$ м/л), используемая в случае магнийсодержащих пигментов, оказалась недостаточной для пигментов, содержащих цинк, в условиях, когда хлорофилл а и хлорофилл b реагировали при освещении быстро, с временем полупревращения около 10 мин, превращения цинковых аналогов не удалось наблюдать ни в темноте, ни при освещении. После десятикратного увеличения концентрации кислоты и увеличения продолжительности освещения удалось наблюдать ускоряемое светом образование феофитина из цинк-феофитината а (табл. 3). Реакция сопровождалась деструкцией пигмента, что нарушало четкую картину фотофеофитинизации с сохранением изобестических точек, наблюдаемую в случае магнийсодержащих пигментов. После 7 мин. освещения цинкового аналога бактериовиридина (пиридин, 10% воды, $3 \cdot 10^{-1}$ мол/л щавелевой кислоты) около 50% исходного пигмента превращается в феофитин, дальнейшее освещение приводило к фотодеструкции, и мы не могли и в данном случае наблюдать полного фотопревращения цинкового аналога в феофитин. Фотофеофитинизация самого лабильного из исследуемых нами комплексов кадмий-феофитината а (табл. 3) проходила так же, как и магнийсодержащих пигментов, с сохранением изобестических точек, но при значительно меньшей концентрации кислоты.

Применение металло-аналогов, расширяющее шкалу прочности связи металла с азотом при изучении феофитинизации как в сторону усиления прочности этой связи (в случае цинковых комплексов), так и в сторону ослабления этой связи (в случае кадмиевого комплекса), не позволило, однако, наблюдать увеличение ускоряющего действия света на эту реакцию больше того увеличения, которое мы наблюдали для магнийсодержащих пигментов. Так, освещение, нивелирующее различия в скорости темновой феофитинизации магнийсодержащих пигментов при оптимальной заданной кислотности среды, оказалось недостаточным при фотофеофитинизации

цинковых аналогов. Для последнего необходимо значительное увеличение кислотности среды. У нас нет оснований сомневаться в том, что механизм фотофеофитинизации цинковых и кадмиевых комплексов отличен от механизма замещения магния на водород магнийсодержащих пигментов. Таким образом, мы показали, что явление фотофеофитинизации наблюдается у аналогов хлорофилла, содержащих в центре порфириновой молекулы кадмий или цинк.

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

Поступило
3 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *R. K. Clayton,* Biochim. et biophys. acta, v. 75, 312 (1963). [2] *L. Slooten,* Biochim. et biophys. acta, v. 314, 15 (1973). [3] *А. А. Красновский, Е. В. Пакшина,* ДАН, т. 148, 935 (1963). [4] *Е. В. Пакшина, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 29, 1132 (1964). [5] *Е. В. Пакшина, М. И. Быстрова, А. А. Красновский,* Молекулярная биол. т. 1, 154 (1967). [6] *В. А. Шувалов, А. А. Красновский,* Молекулярная биол. т. 5, 698 (1971). [7] *Н. В. Вострилова, В. И. Дулова,* Докл. АН УзССР, № 5, 19 (1958). [8] *Rackow B. Konigh,* Zs. Elektrochem. B. 62, 482 (1958). [9] *В. Б. Евстигнеев, Г. Д. Оловянишникова,* Молекулярная биол., т. 7, 195 (1973). [10] *Б. Д. Березин, О. И. Койфман,* Усп. хим., т. 42, 2007 (1973). [11] *В. П. Субоч, А. П. Лосев, Г. П. Гуринович,* ДАН, т. 194, 723 (1970). [12] *A. S. Holt,* Photochemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 1965.

Доклады Академии наук СССР
1975. Том 221, № 4

УДК 541.14+547.979.4

БИОФИЗИКА

А. В. УМРИХИНА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО, В. Н. БЕГИЧЕВ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В СИСТЕМЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛ — *n*-БЕНЗОХИНОН

В настоящее время обоснована гипотеза о том, что первичный акт фотосинтеза бактерий связан с фотопереносом электрона от бактериохлорофилла в активном центре к первичному акцептору электрона, при этом возможно образование пары ион-радикалов.

Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла хинонами было обнаружено и исследовано в нашей лаборатории ([1, 2]). Окисленная форма с максимумом поглощения 430 нм была приписана продукту одноэлектронного окисления пигмента. Мы описали возникновение синглетного сигнала э.п.р. при фотохимическом взаимодействии бактериохлорофилла с *n*-бензохиноном, что объяснили образованием радикала бактериохлорофилла ([3]). Образование радикала бактериохлорофилла показано измерениями э.п.р. при фотоокислении ([4, 5]) и при химическом и электрохимическом окислении ([6, 7]) этого пигмента.

В настоящей работе изучены свойства радикальной формы бактериохлорофилла, наблюдаемой при освещении красным светом системы бактериохлорофилл — *n*-бензохинон, в сравнении со свойствами семихинона, возникающего при действии белого света на спиртовые растворы *n*-бензохинона, так как было неясно, почему в системе бактериохлорофилл — *n*-бензохинон на свету наблюдается сигнал э.п.р., принадлежащий радикальной форме пигмента, и не наблюдается сигнал э.п.р. семихинона.

Измерения проводили на радиоспектрометре типа РЭ 1301 в стеклянных ампулах диаметром 3—4 мм, которые освещали в резонаторе радиоспектрометра фокусированным светом ксеноновой лампы ДКСШ-200 через светофильтры. Термостатирующее устройство позволяло проводить измерения в пределах от —196 до 100°. Бактериохлорофилл выделяли из фотосинтезирующих бактерий Rhodospirillum rubrum по принятому в лаборатории методу. В качестве растворителя использовали 96% этиловый спирт (ректификат); *n*-бензохинон — дважды возогнанный.

Освещение растворов бактериохлорофилла ($10^{-4}\,M$) с *n*-бензохиноном (10^{-2}—$10^{-3}\,M$) в этаноле в вакууме через красный светофильтр КС-19, пропускающий спектральную область поглощения бактериохлорофилла, приводило к возникновению синглетного сигнала э.п.р. с $\Delta H=12$ э и $g=2{,}0025$. Этот сигнал наблюдается при температуре от —160 до 0°. В диапазоне —160÷—70° синглетный сигнал длительное время (часы) сохраняется в темноте после выключения света, а при —70÷0° медленно исчезает в темноте после светового импульса. При этом не удается регистрировать отчетливого сигнала семихинона (пентет, $\Delta H=5$ э).

На рис. 1 приведены сигналы э.п.р., появляющиеся при действии красного света (светофильтр КС-19) на растворы бактериохлорофилла и хинона в этаноле (*а*) и при действии желтого света (светофильтр ЖС-17) на растворы *n*-бензохинона в этаноле (*б*) при температуре —70°. Из рис. 1*а* видно, что на свету возникает синглетный сигнал, амплитуда которого незначительно уменьшилась после 30 мин. темнового периода, причем это уменьшение сигнала э.п.р. произошло за первые 2—3 мин. темноты, после чего синглетный сигнал долгое время остается без изменения. На рис. 1*б*

напротив, видно, что действие возбуждающего света ($\lambda<400$ нм) на растворы *n*-бензохинона в этаноле приводит к возникновению при той же температуре сигнала э.п.р. со сверхтонкой структурой (пентет с $\Delta H=5$ э,

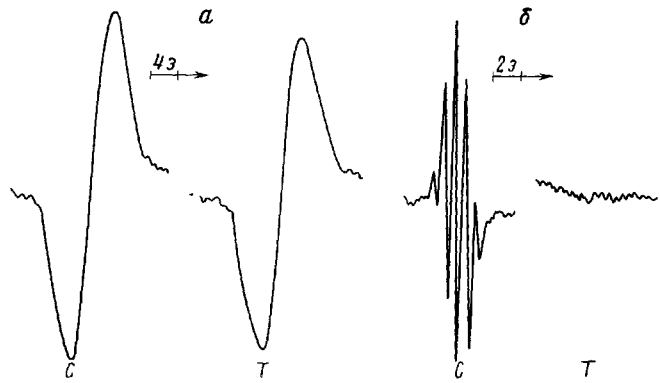


Рис. 1. Спектры э.п.р., наблюдаемые при действии красного света (светофильтр КС-19) на растворы бактериохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле (*а*) и при действии желтого света (светофильтр ЖС-17) на растворы *n*-бензохинона в этаноле (*б*) при −70°. *С* − свет; *Т* − темнота после действия света

$g=2{,}0048$), т. е. хорошо известного сигнала э.п.р. семихинона. Этот сигнал, в отличие от синглетного, сразу же исчезал после выключения света. Действие красного света (светофильтр КС-19) на растворы одного бактериохлорофилла в этаноле или на растворы одного *n*-бензохинона в этаноле даже при длительном освещении не приводило к появлению измеримых сигналов э.п.р.

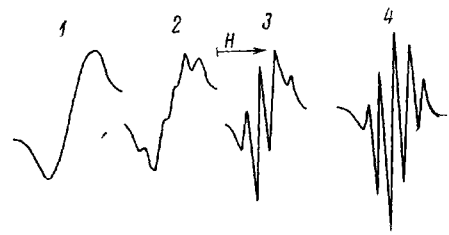


Рис 2 Изменение структуры спектра э п.р. семихинона в зависимости от температуры. *1* − −115°; *2* − −100°; *3* − −85°; *4* − −70°

Из приведенных данных следует, что синглетный сигнал э.п.р., возникающий в результате фотохимического взаимодействия пигмента с *n*-бензохиноном, принадлежит окисленной радикальной форме бактериохлорофилла, а не радикалу семихинона. Из этих данных следует также, что радикальная окисленная форма пигмента довольно стабильна и при низкой температуре может долгое время сохраняться в темноте, тогда как сигнал семихинона обладает малой длительностью жизни. Можно предположить, что именно нестабильность, т. е. крайне малая длительность жизни радикала семихинона, служит условием стабилизации синглетного сигнала бактериохлорофилла.

Мы исследовали зависимость формы и ширины линии э.п.р. этих радикалов от температуры. Оказалось, что оба радикала наблюдаются во всем исследованном диапазоне температур от −160 до 0°. Однако форма и ширина линии э.п.р. синглетного сигнала практически не изменялась в этом интервале температур (это синглет с $\Delta H=12$ э). В противоположность этому сигнал семихинона существенно зависел от температуры (рис. 2). Так, при температуре −80° и выше − это пентет с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой и $\Delta H=5$ э. При понижении температуры ниже −80° сверхтонкая структура семихинона постепенно сглаживается, пока, наконец, при температуре −100° и ниже спектр семихинона

не приобретет вид синглетной линии с ΔH=8–10 э (рис. 2, спектр 2). Такое изменение структуры спектра э.п.р. семихинона известно ([8]).

Однако остается неясным, почему мы регистрируем в системе бактериохлорофилл — *n*-бензохинон на свету только один, синглетный сигнал и не наблюдаем сигнала семихинона, хотя очевидно, что синглетный сигнал, принадлежащий радикальной форме пигмента, возникает в результате фотохимического взаимодействия фотовозбужденной молекулы пигмента с *n*-бензохиноном и это взаимодействие должно приводить к образованию пары ион-радикалов, а не одного радикала пигмента или радикала окислителя.

Ответ на этот вопрос может быть получен при сопоставлении длительности жизни обоих радикалов — пигмента и семихинона.

Выше уже указывалось, что синглетный сигнал в значительном диапазоне температур долгое время сохраняется в темноте после выключения света, а сигнал семихинона крайне неустойчив и сразу же исчезает после выключения света. Однако при температуре −100° и ниже, когда спектр семихинона приобретает форму синглетной линии, длительность жизни радикала семихинона несколько увеличивается и становится измеримой. Это позволило сравнить скорость исчезновения обоих сигналов э.п.р. На рис. 3*б* приведены кривые нарастания на свету и падения в темноте сигналов э.п.р. в растворах бактериохлорофилла и *n*-бензохинона (кривая *1*) и растворах одного *n*-бензохинона (кривая *2*) в этаноле при −115°.

Из рис. 3*б* видно, что синглетный сигнал (ΔH=12 э) после небольшого падения в темноте за первые 2–3 мин. при дальнейшем стоянии в темноте практически не изменяется, тогда как синглетный сигнал семихинона (ΔH=10 э) полностью исчезает за первые 2–3 мин. темноты. Из этих данных можно было сделать предположение, что (при −115°) в системе бактериохлорофилл — хинон на свету мы наблюдаем суммарный спектр сигналов э.п.р. обоих компонентов системы: окисленной формы пигмента и восстановленного *n*-бензохинона (семихинона), однако из-за близости *g*-факторов происходит наложение обеих линий э.п.р. После выключения света в первые 2–3 мин. темноты сигнал семихинона исчезает, так как он обладает меньшей длительностью жизни по сравнению с радикалом пигмента.

Исчезновение радикала семихинона происходит, по-видимому, в результате реакции диспропорционирования, идущей в этих условиях быстрее рекомбинации образующихся радикалов. Отсутствие в спектре э.п.р. сигнала семихинона при температуре выше −70÷−80° можно объяснить тем, что в этих условиях стационарная концентрация семихинона благодаря малой длительности его жизни слишком низка, чтобы внести изменения в форму светового сигнала э.п.р. в системе бактериохлорофилл — хинон. Однако следует отметить, что в ряде опытов мы наблюдали наложение на синглетный сигнал с ΔH=12 э сигнала семихинона, который сразу исчезал после выключения света. В суммарном спектре на свету и особенно в темноте из-за малой длительности жизни радикала семихинона в обычных условиях опыта мы регистрируем только сигнал окисленного пигмента.

Исследование температурной зависимости показало, что в диапазоне температур от −20 до −155° (рис. 4*а*) скорость нарастания и величина амплитуды синглетного сигнала э.п.р. увеличиваются с понижением температуры. Они минимальны при −20° и максимальны при −155°. Однако, если сравнить кривые роста амплитуды синглетного сигнала на свету с соответствующими кривыми падения этого сигнала в темноте, то, как можно видеть из сравнения рисунков 4*а* и 4*б*, минимальной скорости увеличения амплитуды синглетного сигнала соответствует максимальная скорость ее падения.

Приведенные данные показывают, что с повышением температуры скорость обратной реакции увеличивается. Это приводит к уменьшению

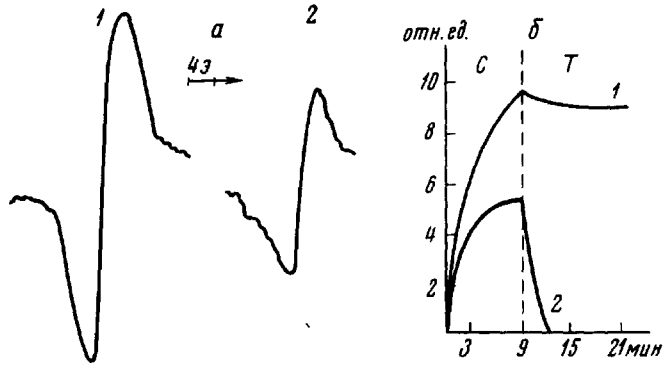


Рис. 3. Вид спектра сигнала э.п.р. на свету (*а*) и изменение амплитуды сигнала э.п.р. на свету и в темноте после действия света (*б*) для растворов бактериохлорофилла и *n*-бензохинона (кривая *1*, спектр *1*) и растворов одного *n*-бензохинона (кривая *2*, спектр *2*) в этаноле при −120°

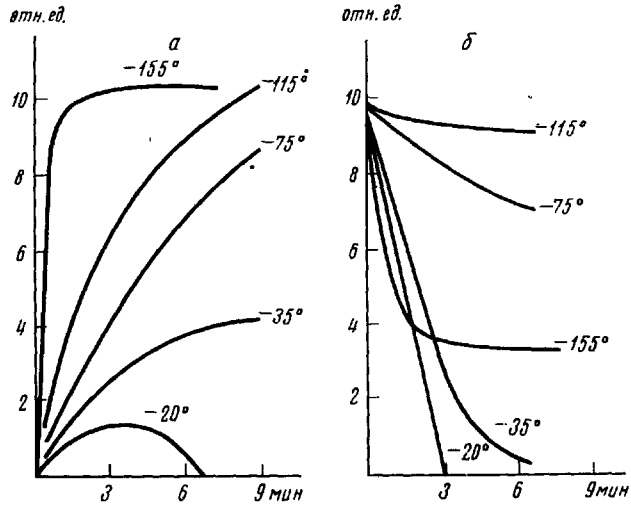


Рис. 4. Изменение амплитуды синглетного сигнала э.п.р. (H=12 э) на свету (*а*) и в темноте после действия света (*б*) в зависимости от температуры

стационарной концентрации синглетного сигнала на свету, в результате чего суммарная скорость накопления и общий выход синглетного сигнала на свету падают.

Таким образом, в результате взаимодействия возбужденного бактериохлорофилла с *n*-бензохиноном (в температурном диапазоне от −160 до −10°) удается наблюдать долгоживущий радикал окисленного бактериохлорофилла.

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

Поступило
31 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова,* ДАН, т. 158, 730 (1964). [2] *Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 30, 605 (1965). [3] *А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко, А. А. Красновский,* Биофизика, т. 18, 565 (1973). [4] *А. П. Бобровский, В. Е. Холмогоров,* Журн. прикл. спектроскоп., т. 18, 712 (1973). [5] *J. R. Harbour, G. J. Tollin,* Photochemistry and Photobiology, v. 19, 163 (1974). [6] *J. D. McElroy, G. Feher, D. C. Mauzerall,* Biochim. et biophys. acta, v. 172, 180 (1969). [7] *J. Fajer, D. C. Borg et al.,* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 994 (1974). [8] *Д. Ингрэм,* Электронный парамагнитный резонанс в биологии, М., 1972, стр. 107.

УДК 577.12

ИЗУЧЕНИЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛЮМИНОЛА И ХЛОРОФИЛЛА

В. А. ШУВАЛОВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва
Институт фотосинтеза АН СССР, Пущино

Изучено восстановление кислорода освещенными хлоропластами с целью выяснения локуса его действия в цепи фотосинтетического транспорта электрона. Хемилюминесцирующую систему, состоящую из люминола и пероксидазы, использовали для регистрации продуктов восстановления кислорода. В одном варианте опытов хемилюминесцирующую систему добавляли в надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования суспензии освещенных хлоропластов. В этом случае определяли перекись водорода, которая, как было показано, является конечным продуктом восстановления кислорода освещенными хлоропластами. В другом варианте опытов при освещении хлоропластов в присутствии хемилюминесцирующей системы и кислорода непосредственно после прекращения освещения обнаружено короткоживущее свечение люминола, кинетика затухания которого описывается уравнением второго порядка. Эта фотохемилюминесценция также связана с восстановлением кислорода освещенными хлоропластами, приводящим, вероятно, к первичному образованию радикалов $HO_2^{\cdot}$ или $^{-}O_2^{\cdot}$. Образование этих радикалов, так же как образование H_2O_2, блокируется диуроном, нагреванием хлоропластов при 45° и отмыванием ЭДТА и гидроксиламином. В присутствии метилвиологена скорость затухания фотохемилюминесценции увеличивается в несколько раз. Кинетика затухания фотохемилюминесценции люминола и красного послесвечения хлорофилла хлоропластов идентичны во временном интервале от 20 *мсек* до нескольких *сек*. Оба типа свечения подавляются супероксиддисмутазой. Предполагается, что один из локусов восстановления кислорода расположен, по-видимому, вблизи реакционного центра фотосистемы II фотосинтеза.

Исследование образования продуктов восстановления кислорода (H_2O_2 и $HO_2^{\cdot}$) в освещенных хлоропластах дает возможность изучить механизм взаимодействия кислорода с определенными компонентами цепи фотосинтетического переноса электрона.

Мелер [1—3] рассмотрел две возможности образования перекиси водорода в освещенных хлоропластах: при разложении воды с образованием радикалов OH_2 ($2OH_2 \rightarrow H_2O_2$) и при восстановлении кислорода хлоропластами с вероятным образованием радикалов $HO_2^{\cdot}$ ($2HO_2^{\cdot} \longrightarrow O_2 + H_2O_2$). Экспериментально было доказано существование только второго механизма.

Установлено, что кислород может являться конечным акцептором электрона в хлоропластах. Донором электрона в этой реакции может быть вода (в этом случае реакция подавляется диуроном [4]) или экзогенный донор электрона, например, восстановленный трихлорфенолиндофенол [5].

Так как в хлоропластах первичная окислительно-восстановительная реакция осуществляется с участием возбужденного хлорофилла реакционного центра, важно выяснить, насколько удален локус восстановления кислорода от первичной фотореакции в реакционном центре.

С этим связан также вопрос о возможности реакции кислорода непосредственно в реакционном центре с возбужденным хлорофиллом, что происходит с большой эффективностью в растворах хлорофилла.

Известно, что реакция восстановления кислорода в хлоропластах высших растений значительно ускоряется виологеном [4, 5] или ферредоксином [6] и лишь в частицах, выделенных из *Anabaena variabilis*, реакция не требовала добавления экзогенного окисляемого субстрата [5].

Так как восстановление кислорода с конечным образованием H_2O_2 должно происходить, по всей вероятности, путем промежуточного образования радикалов HO'_2, можно попытаться зарегистрировать наличие этих радикалов в хлоропластах, учитывая их относительно малую скорость рекомбинации ($\sim 10^6$ $M^{-1} \cdot сек^{-1}$ [7]). Кинетическое исследование образования и исчезновения радикалов совместно с исследованием кинетики других фотопроцессов в хлоропластах, например, послесвечения хлорофилла [8], может помочь решению вопроса о месте действия кислорода в хлоропластах.

Для исследования поставленных вопросов был использован весьма чувствительный метод хемилюминесценции люминола, который позволяет регистрировать наличие перекиси водорода [9] и радикалов HO'_2 [10].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали метод измерения хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы, описанной Кормьером и Ричардом [9]. Было показано, что в такой системе ряд последовательных реакций приводит к окислению люминола до аминофталата, испускающего люминесценцию:

$$E + H_2O_2 \rightarrow C_1$$

$$C_1 + LH_2 \rightarrow C_2 + LH'$$

$$C_2 + LH_2 \rightarrow E + LH'$$

$$2LH' + H_2O_2 \rightarrow h\nu + \text{продукты},$$

где E — пероксидаза, C_1 — комплекс I пероксидазы с H_2O_2, C_2 — комплекс II, LH_2 — люминол, LH· — радикал люминола.

Люминол очищали путем возгонки. Пероксидазу (препарат фирмы «Reanal», Венгрия) использовали без дополнительной очистки. Хемилюминесцирующему системе готовили в 0,05 *М* фосфатном буфере, pH 8,0, при концентрации люминола 10^{-4} *М* и пероксидазы 10^{-6} *М*.

Хлоропласты получали по ранее описанному методу [11] и хранили в сухом льду. Перед опытом хлоропласты суспендировали в 0,05 *М* фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 10 *мМ* NaCl и 3 *мМ* $MgCl_2$. Концентрация хлорофилла в реакционной смеси составляла 10 — 50 *мкг/мл*.

Для подавления реакции Хилла в донорной части фотосистемы II использовали три варианта обработок хлоропластов [12—14]. Суспензию хлоропластов нагревали при 45° в течение 1—5 *мин* [12], затем быстро охлаждали до комнатной температуры и производили измерения. Кроме того, хлоропласты отмывали в 0,5 *мМ* ЭДТА [13], а также инкубировали в 2 *мМ* гидроксиламине в течение 10 *мин* [14]. Во всех трех случаях реакция Хилла, измеренная по восстановлению дихлорфенолиндофенола, значительно ингибировалась. Однако восстановление красителя наблюдалось при освещении суспензии в присутствии 1 *мМ* гидроксиламина, причем реакция была чувствительна к диурону.

Хемилюминесценцию люминола и послесвечение хлорофилла хлоропластов измеряли с помощью импульсной фосфороскопической установки, описанной ранее [15]. Спектры излучения хемилюминесценции измеряли в специальной установке, состоящей из источника возбуждающего света, цилиндрического фосфороскопа, светосильного монохроматора, фотоумножителя ФЭУ-38, осциллографа С1-19, усилителя У1-2 и самописца ЭПП-09. Исследования показали, что спектр излучения хемилюминесцирующей системы в присутствии H_2O_2 совпадает со спектром флуоресценции аминофталата.

Для регистрации взаимодействия хемилюминесцирующей системы с фотопродуктами, образующимися в хлоропластах, использовали два метода.

Суспензию хлоропластов освещали красным светом (светофильтр КС-10) от лампы накаливания ($1{,}5 \cdot 10^5$ *эрг/сек·см²*). Затем хлоропласты осаждали путем центрифугирования и надосадочную жидкость помещали в кювету перед окном фотоумножителя (ФЭУ). Хемилюминесцирующую систему вводили в кювету под давлением с помощью шприца и тефлоновой трубки. По интенсивности хемилюминесценции, достигающей

стационарного уровня, определяли концентрацию перекиси водорода по калибровочной кривой.

Второй метод заключался в том, что хемилюминесцирующую систему добавляли к хлоропластам до их освещения. Суспензию освещали красным светом, не поглощаемым хемилюминесцирующей системой и не оказывающим влияния на ее собственную хемилюминесценцию. Перед ФЭУ помещали светофильтры СЗС-21 и СЗС-22, практически полностью поглощающие послесвечение хлорофилла, но пропускающие люминесценцию аминофталата. Прекращение освещения и открытие окна ФЭУ проводили в фосфороскопе при быстром повороте вала из одного его положения в другое. Таким способом регистрировали быстрозатухающую хемилюминесценцию люминола, вероятно связанную с образованием радикалов $HO_2^{\cdot}$.

В другом варианте опыта перед освещением в суспензию хлоропластов добавляли хемилюминесцирующую систему и 10^{-4} *М* H_2O_2. После того как хемилюминесценция люминола достигала стационарного уровня, соответствующего концентрации H_2O_2, хлоропласты освещали красным светом и после быстрого поворота вала фосфороскопа определяли интенсивность хемилюминесценции люминола. Таким способом был обнаружен эффект фотоингибирования хемилюминесценции, подробно описанный ранее [16]. Следует лишь указать, что величина ингибирования достигает 95% и что эффект сохраняется при использовании хлоропластов, в которых блокирована реакция Хилла диуроном, и в донорной части фотосистемы II. Так как в хемилюминесценции участвует пероксидаза и она развивается в водной фазе, можно предполагать, что ингибитор хемилюминесценции образуется на поверхности мембран хлоропластов при их освещении. Кинетические измерения позволили оценить время жизни фотоингибитора в хлоропластах, которое составило $2 \cdot 10^{-4}$ *сек.*

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фотообразование H_2O_2 в хлоропластах. Вначале был изучен механизм образования H_2O_2 по реакции Мелера в хлоропластах [1—3] с помощью метода хемилюминесценции люминола. С этой целью измеряли количество образованной H_2O_2 в хлоропластах при их освещении в присутствии и в отсутствие кислорода как конечного акцептора электрона, а также в присутствии других акцепторов реакции Хилла. Было также изучено влияние различных ингибирующих воздействий на образование перекиси водорода в хлоропластах для выявления возможного донора электрона в реакции восстановления кислорода. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Фотообразование H_2O_2 в хлоропластах при 20°

Объект	*мкмоль* H_2O_2 на 1 *мг* хлорофилла в 1 час
Хлоропласты *	25
Хлоропласты + 10^{-4} *М* метилвиологен	270
Хлоропласты + 10^{-5} *М* 2,6-дихлорфенолиндофенол	0
Хлоропласты + 10^{-4} *М* феррицианид	0
Хлоропласты + 10^{-6} *М* диурон	0
Хлоропласты + метилвиологен в вакууме	2

* Реакционная смесь (1 *мл*): 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 8,0, 10 *мМ* NaCl, 3 *мМ* $MgCl_2$, 15 *мкг* хлорофилла. (Освещение светом $1{,}5 \cdot 10^5$ *эрг/сек·см²*, светофильтр КС-10).

Для количественного определения H_2O_2 в хлоропластах проводили калибровку интенсивности хемилюминесценции люминола в зависимости от концентрации добавленной H_2O_2. В первый момент смещения H_2O_2 и хемилюминесцирующей системы наблюдался всплеск хемилюминесценции, вслед за этим следовало ее постепенное, в течение нескольких секунд увеличение до стационарного уровня, соответствующего определенной концентрации H_2O_2. После этого наблюдалось медленное затухание люминесценции, связанное с расходованием перекиси водорода. Интенсивность стационарного уровня линейно зависит от концентрации H_2O_2 выше $3 \cdot 10^{-6}$ *М*. При более низких концентрациях зависимость имеет более сложный характер.

Было найдено, что скорость фотообразования H_2O_2 в хлоропластах составляет ~25 *мкмоль/мг* хлорофилла в 1 час, при добавлении метилвиологена скорость увеличивается до 270 *мкмоль* H_2O_2 на 1 *мг* хлорофилла в 1 час. Те же хлоропласты при измерении реакции Хилла показывают скорость восстановления дихлорфенолиндофенола ~300 *мкмоль/мг* хлорофилла в 1 час. Эти данные свидетельствуют о высокой эффективности образования H_2O_2 и о низкой каталазной активности в данных хлоропластах.

Вакуумирование суспензии хлоропластов значительно подавляет выход H_2O_2 при освещении. Однако даже в условиях вакуума можно регистрировать образование небольшого количества перекиси водорода, что связано, видимо, с трудностью полного освобождения суспензии от следов кислорода.

Добавление к хлоропластам в присутствии кислорода других акцепторов реакции Хилла, таких, как феррицианид и 2,6-дихлорфенолиндофенол, приводило к практически полному подавлению фотообразования перекиси водорода. Диурон в концентрации 10^{-6} *М* полностью блокирует образование H_2O_2 (табл. 1), так же как воздействия, нарушающие донорную часть фотосистемы II, т. е. нагревание хлоропластов при 45° в течение 5 *мин*, отмывание ЭДТА и гидроксиламином.

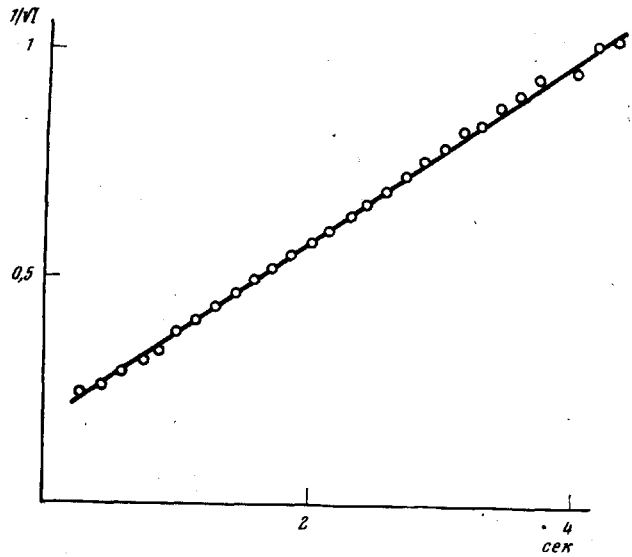


Рис. 1. Кинетика затухания послесвечения хлорофилла в хлоропластах, замороженных до —20° в присутствии 10^{-2} *М* $MgCl_2$

Возбуждающий свет: длительность 10^{-6} *сек*, энергия 2 *дж*, светофильтр КС-10. Реакционная смесь (1 *мл*); 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 8,0, 10^{-2} *М* $MgCl_2$, хлорофилл — 15 *мкг/мл*; *I* — интенсивность послесвечения

Приведенные факты согласуются с данными, полученными Мелером [1—3], и подтверждают, что H_2O_2 в суспензии освещенных хлоропластов образуется в результате восстановления кислорода воздуха. Восстановление блокируется более сильными акцепторами электрона, но катализируется метилвиологеном. Данные по ингибированию образования H_2O_2 указывают, что донором электрона в реакции является вода.

Образование H_2O_2 в хлоропластах при температуре ниже 0°, когда реакция Хилла не наблюдается, может являться критерием протекания необратимых фотохимических реакций в хлоропластах при этих температурах. Обратимый перенос электрона в хлоропластах при —40° был исследован ранее [16] с помощью послесвечения хлорофилла; было высказано предположение, что послесвечение возникает в результате реакций рекомбинации радикалов, образующихся при освещении.

Дальнейшее исследование хлоропластов, суспендированных в фосфатном буфере, pH 8,0, показало, что при —20° медленный компонент послесвечения хлорофилла, значительно активируемый предварительным добавлением $MgCl_2$, имеет кинетику затухания, подчиняющуюся уравнению второго порядка (рис. 1). Послесвечение подавляется ингибиторами радикальных реакций, такими, как α-нафтол в 10^{-6} *М* концентрации. Таким образом, свечение может действительно иметь рекомбинационный характер, причем по крайней мере один из компонентов реак-

ции должен быть достаточно низкомолекулярным продуктом для свободной диффузии при —20°.

С помощью хемилюминесценции люминола было обнаружено образование небольшого количества H_2O_2 в суспензии хлоропластов, освещенных при —20°. Процесс, так же как и при 20°, активировался в 3—4 раза добавлением метилвиологена и полностью ингибировался в присутствии феррицианида и дихлорфенолиндофенола. Однако в отличие от опытов, проведенных при 20°, образование H_2O_2 при —20° полностью ингибировалось в присутствии 10^{-2} *М* $MgCl_2$ (табл. 2).

Таблица 2

Фотообразование H_2O_2 в хлоропластах при —20°

Объект	*моль* H_2O_2 на 1 *моль* хлорофилла
Хлоропласты *	1/900
Хлоропласты + 10^{-4} *М* метилвиологен	1/250
Хлоропласты + 10^{-5} *М* 2,6-дихлорфенолиндофенол	0
Хлоропласты + 10^{-4} *М* феррицианид	0
Хлоропласты + 10^{-6} *М* диурон	0
Хлоропласты + метилвиологен в вакууме	1/1200
Хлоропласты + метилвиологен + 10^{-2} *М* $MgCl_2$	0

* Реакционная смесь (1 *мл*): 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 8,0, 15 *мкг* хлорофилла. Освещение светом $1{,}5 \cdot 10^5$ *эрг/сек·см²* (светофильтр КС-10) в течение 2 *мин*.

Таким образом, действие $MgCl_2$ на хлоропласты, замороженные до —20°, приводит к существенному активированию рекомбинационного послесвечения хлорофилла и блокирует фотообразование H_2O_2. Вероятно, эти два процесса находятся в конкурентных взаимоотношениях и отражают судьбу радикалов, образующихся в хлоропластах при освещении.

Фотохемилюминесценция люминола. В связи с тем что метод хемилюминесценции люминола позволяет регистрировать короткоживущие продукты восстановления кислорода, вероятно, в виде радикалов HO_2 [10], мы попытались исследовать возможность регистрации этих продуктов в освещенных хлоропластах. С этой целью хемилюминесцирующую систему добавляли к суспензии хлоропластов до их освещения. Хемилюминесценцию люминола регистрировали непосредственно после освещения суспензии красным светом.

Было обнаружено, что сразу после прекращения освещения хлоропластов в суспензии наблюдается быстрозатухающее свечение люминола. Этот компонент хемилюминесценции, обозначаемый нами как фотохемилюминесценция, имеет следующие основные особенности. Кинетика затухания (рис. 2) приближенно описывается уравнением второго порядка. Несмотря на малое время жизни, люминесценцию можно наблюдать только после некоторого периода освещения (~5—10 *сек*), значительно превышающего начальное время жизни. В дальнейшем было найдено, что это связано с необходимостью присутствия небольшого количества H_2O_2. Так, добавление H_2O_2 в 10^{-6} *М* концентрации делает возможным наблюдение свечения от одиночной вспышки света (10^{-6} *сек*). Характерно, что изменение стационарного уровня интенсивности этого компонента, измеряемого с помощью быстровращающегося фосфороскопа, повторяет кинетику развития медленной фазы хемилюминесценции люминола, связанной с наличием H_2O_2 (рис. 3). Когда исчезает после расходования H_2O_2 медленная фаза, исчезает также и фотохемилюминесценция. Возможность такого эксперимента достигается тем, что количество поглощенных квантов хлоропластами при вращении

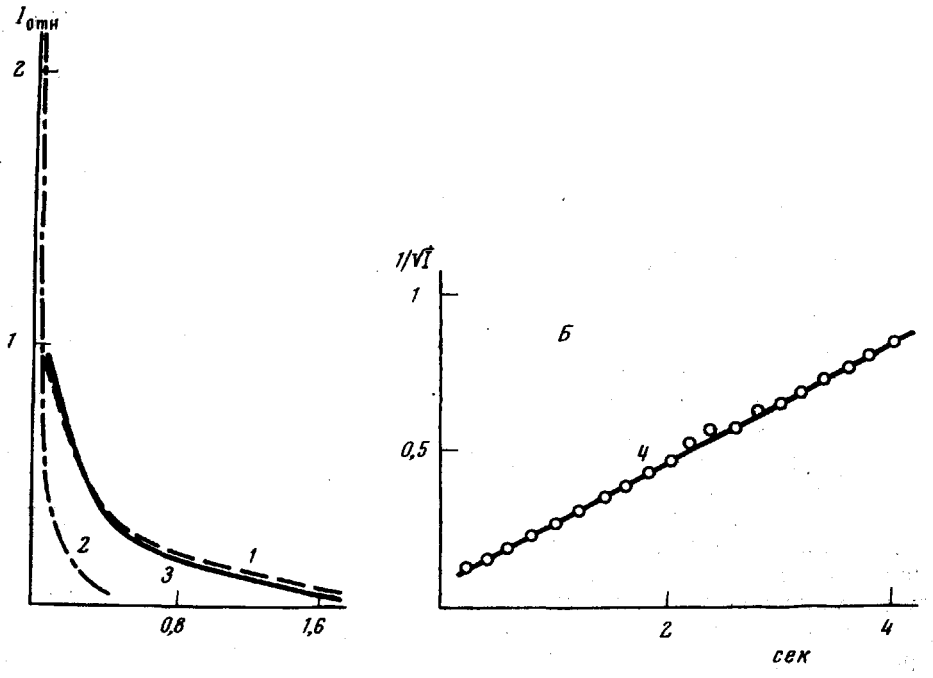


Рис. 2. Кинетика затухания хемилюминесценции люминола и хлорофилла в хлоропластах при 20° после освещения красным светом

Освещение красным светом ($1{,}5 \cdot 10^5$ *эрг/сек·см²*, светофильтр КС-10)—5 *сек*. Реакционная смесь (4 *мл*): 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 8,0, хлорофилл — 15 *мкг/мл*, пероксидаза — 10^{-6} *М*, люминол — 10^{-4} *М* и метилвиологен (на *2*) — 10^{-4} *М*. *А* — в координатах *I* и *t*; *1* — люминол (400 *нм*$<\lambda<$600 *нм*), *2* — то же+метилвиологен, *3* — хлорофилл ($\lambda>670$ *нм*). *Б* — в координатах $1/\sqrt{t}$ и *t*; *4* — хлорофилл ($\lambda>670$ *нм*)

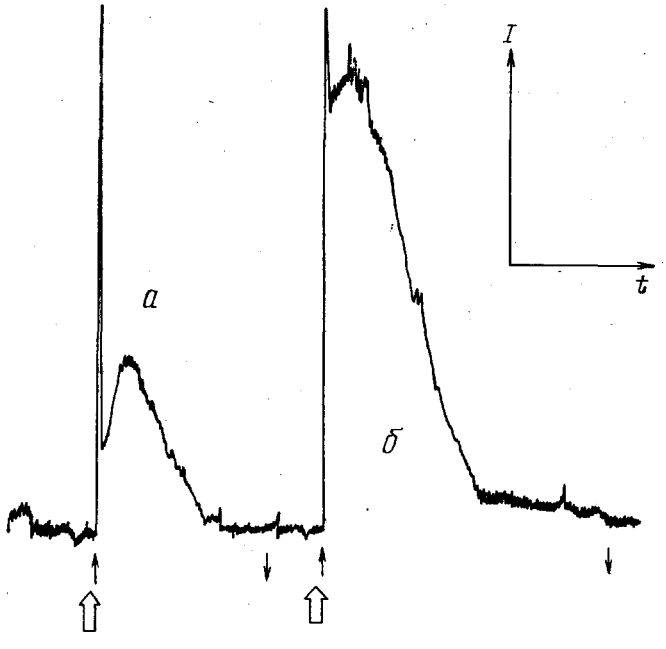


Рис. 3. Развитие хемилюминесценции люминола в присутствии хлоропластов после 10 *сек* освещения красным светом при 20° С.

Реакционная смесь — см. рис. 2. Тонкие стрелки: вверх — открытие, вниз — закрытие окна ФЭУ. Утолщенные стрелки — 10 *сек* освещения; *а* — суспензия находится в темноте после освещения, *б* — освещается импульсами света длительностью 4 *мсек* через каждые 0,3 *сек* после основного освещения

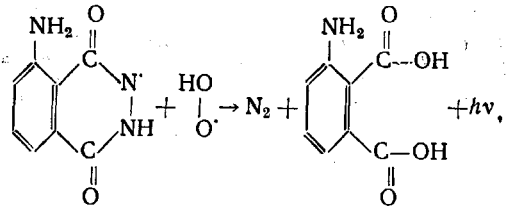
фосфороскопа недостаточно для накопления заметного количества H_2O_2, но достаточно для возбуждения быстрозатухающего компонента.

Фотохемилюминесценция люминола может также наблюдаться в отсутствие пероксидазы, хотя в этом случае ее интенсивность уменьшается в 2—4 раза. В отсутствие пероксидазы интенсивность хемилюминесценции, связанной с H_2O_2, уменьшается значительно сильнее. Различная природа двух видов хемилюминесценции проявляется также в том, что гидроксиламин (10^{-4} *M*) и 8-оксихинолин (10^{-5} *M*) полностью ингибируют хемилюминесценцию с H_2O_2, но не уменьшают, а 8-оксихинолин даже увеличивает фотохемилюминесценцию.

В условиях вакуума фотохемилюминесценция не наблюдается, даже если в суспензию предварительно добавляется H_2O_2. После пуска воздуха интенсивность хемилюминесценции восстанавливается.

Таким образом, кислород в совокупности с освещенными хлоропластами является источником продукта, вызывающего быстрозатухающий компонент хемилюминесценции люминола. Можно предположить, что этот продукт представляет собой радикал $HO_2^{\cdot}$ (или $^{-}O_2^{\cdot}$).

С этой точки зрения легко понять необходимость медленной фазы хемилюминесценции люминола в присутствии H_2O_2 для наблюдения быстрого компонента. Действительно, было показано [9], что в процессе хемилюминесценции в системе люминол — пероксидаза — H_2O_2 участвуют радикалы люминола, образующиеся при восстановлении комплекса пероксидазы с H_2O_2. Вследствие этого фотохемилюминесценция, вероятно, возникает в следующей реакции:



радикал люминола аминофталат

или в реакции анион-радикалов тех же соединений.

На образование в хлоропластах радикалов $HO_2^{\cdot}$, регистрируемых с помощью хемилюминесценции люминола, указывают опыты с применением фермента супероксиддисмутазы, который нам был любезно предоставлен Р. М. Бекиной. Было найдено, что супероксиддисмутаза, ускоряющая скорость рекомбинации радикалов $HO_2^{\cdot}$, значительно ингибирует фотохемилюминесценцию люминола в хлоропластах.

Вероятно также, что $HO_2^{\cdot}$ — предшественник образующегося в хлоропластах H_2O_2. Действительно, образование $HO_2^{\cdot}$ ингибируется всеми воздействиями, блокирующими выход H_2O_2: добавление диурона (10^{-6} *M*), нагревание при 45° в течение 5 *мин*, отмывание хлоропласта ЭДТА и гидроксиламином, добавление феррицианида и 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Особое воздействие на фотохемилюминесценцию оказывает метилвиологен (10^{-4} *M*). В его присутствии резко изменяется кинетика свечения: начальная интенсивность становится более высокой с одновременным увеличением скорости затухания (рис. 2).

Была определена зависимость количества образующихся радикалов $HO_2^{\cdot}$ от концентрации кислорода в среде. Сначала воздух из трубки Тунберга удаляли вакуумированием, а затем вводили порциями определенного объема. Перед освещением в суспензии присутствовало определенное количество H_2O_2, дающее «фоновый» уровень хемилюминесценции люминола, не зависящий от концентрации кислорода в среде. Считалось, исходя из вышепредложенного механизма, что интенсивность фотохемилюминесценции пропорциональна концентрации $HO_2^{\cdot}$. Зависимость на-

чальной интенсивности фотохемилюминесценции от концентрации O_2 представлена на рис. 4 в координатах модифицированного уравнения Штерна — Фольмера:

$$I_\infty/I = [HO_2^\cdot]_\infty/[HO_2^\cdot] = 1 + 1/K\tau_0\,[O_2],$$

где знак ∞ указывает максимальную концентрацию O_2, τ_0 — время жизни активного состояния в хлоропластах, с которым происходит взаимодействие кислорода, K — константа взаимодействия.

Из рис. 4 видно, что в первом приближении зависимость подчиняется вышеприведенному уравнению. Используя его и величину константы взаимодействия, близкую к диффузионной ($\sim 10^9$ $M^{-1}\cdot сек^{-1}$), была оценена величина τ_0, которая составила $\sim 10^{-4}$ *сек*.

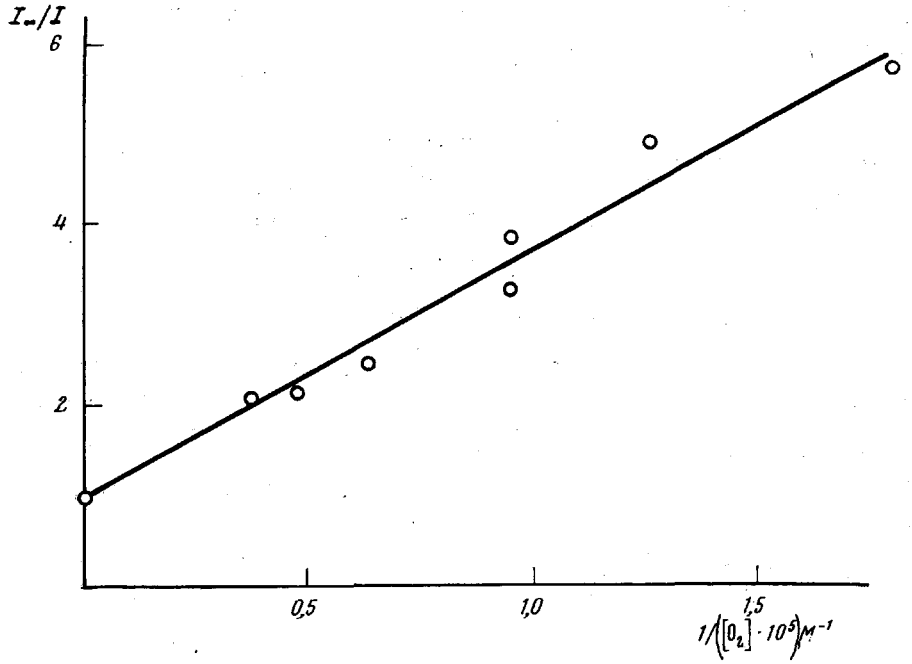


Рис. 4. Зависимость начальной интенсивности фотохемилюминесценции люминола в присутствии хлоропластов от концентрации кислорода в среде

Условия — см. рис. 2, но в присутствии H_2O_2 (10^{-5} M). I_∞ — интенсивность фотохемилюминесценции при максимальной концентрации O_2, I — при данной концентрации O_2

Характерно, что в отсутствие метилвиологена кинетика затухания фотохемилюминесценции сходна с кинетикой затухания послесвечения хлорофилла в интервале от 20 *мсек* до нескольких *сек* (рис. 2) и излучаемого, по всей вероятности, фотосистемой II фотосинтеза. Изображение кривой затухания послесвечения хлорофилла в этом интервале в координатах $1/\sqrt{I}$ и t дает прямую линию (рис. 2). Таким образом, затухание послесвечения хлорофилла следует уравнению второго порядка, причем интенсивность свечения пропорциональна произведению реагирующих продуктов. В этом случае можно предположить, что одним из продуктов, приводящих к послесвечению хлорофилла, является радикал $HO_2^\cdot$, так как кинетика его исчезновения, измеренная по хемилюминесценции люминола, сходна с кинетикой затухания послесвечения хлорофилла. Кроме того, супероксиддисмутаза в той же степени ингибирует данный компонент послесвечения хлорофилла, как и фотохемилюминесценцию люминола, отражающую образование радикалов $HO_2^\cdot$.

Однако при рассмотрении этого предположения необходимо учитывать следующие факты, указывающие на различные свойства радикалов $HO_2^{\cdot}$ и послесвечения хлорофилла. Так, образование $HO_2^{\cdot}$ блокируется полностью при вакуумировании суспензии хлоропластов в течение 5—8 *мин.* В то же время послесвечение хлорофилла уменьшается лишь в 2—3 раза. Дальнейшее обратимое уменьшение послесвечения возможно только при многочасовом продувании суспензии инертным газом. Метилвиологен, акцептирующий электрон от центров фотосистемы I, значительно больше ускоряет кинетику затухания фотохемилюмисценции люминола, чем послесвечения хлорофилла. Диурон, как указывалось, полностью блокирует образование $HO_2^{\cdot}$, но увеличивает послесвечение в исследованном временном интервале.

Эти факты могут быть, по-видимому, объяснены в рамках высказанного предположения, если учесть различную вероятность рекомбинации радикалов $HO_2^{\cdot}$ с окисленными реакционными центрами в мембранах хлоропластов и с радикалами люминола вне хлоропластов.

Полученные факты и высказанные предположения могут быть иллюстрированы следующей общей схемой:

$$[X_л] + O_2 + h\nu_{680} \rightleftarrows [X_л^+] + HO_2^{\cdot} \begin{cases} \xrightarrow{+H_2O} [Хл] + O_2 \\ \xrightarrow{+HO_2^{\cdot}} H_2O_2 + O_2 \end{cases} \quad (\text{или } {}^{-}O_2^{\cdot})$$

$$HO_2^{\cdot} + LH^{\cdot} \rightarrow h\nu_{425}$$

$$H_2O_2 + LH_2 \xrightarrow{\text{пероксидаза}} h\nu_{425},$$

где $[X_л]$ — обозначение реакционного центра фотосистемы II хлоропластов, включающего, возможно, первичный донор и акцептор электрона. Приведенные реакции в хлоропластах могут осуществляться как при 20°, так и при —20÷—40°, причем в последнем случае существенную роль играют соли типа $MgCl_2$. Метилвиологен активирует, по-видимому, восстановление O_2 в пределах центров фотосистемы I.

Таким образом, восстановление кислорода при освещении хлоропластов, вероятно, осуществляется при непосредственном взаимодействии кислорода с реакционным центром, минуя промежуточные стадии цепи переноса электрона.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mehler A. H.*, Arch. Biochem. and Biophys., *33*, 65, 1951.
2. *Mehler A. H.*, Arch. Biochem. and Biophys., *34*, 339, 1951.
3. *Mehler A. H., Brown A. H.*, Arch. Biochem. and Biophys., *38*, 365, 1952.
4. *Nam Hai Chua*, Biochim. et biophys. acta, *245*, 277, 1971.
5. *Honeycutt R. C., Krogmann D. W.*, Biochim. et biophys. acta, *197*, 267, 1970.
6. *Telfer A., Grammack R., Evans M. C. W.*, FEBS Letters, *10*, 21, 1970.
7. *Behar D., Czapski G., Rabani J., Dorfman L. M., Sehwarz H. A.*, J. Phys. Chem., *74*, *3209*, 1970.
8. *Strehler B. L., Arnold W. A.*, J. Gen. Physiol., *34*, 809, 1951.
9. *Cormier M. J., Richard P. M.*, J. Biol. Chem., *243*, 4706, 1968.
10. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., «Наука», 1972.
11. *Бекина Р. М., Красновский А. А.*, Биохимия, *33*, 178, 1968.
12. *Kimimura M., Katoh S., Ikegami I., Takamiya A.*, Biochim. et biophys. acta, *234*, 92, 1971.
13. *Isawa S., Heath R. L., Hind G.*, Biochim. et biophys. acta, *180*, 388, 1969.
14. *Chemiae G. M., Martin I. F.*, Plant Physiol., *47*, 568, 1971.
15. *Шувалов В. А., Красновский А. А.*, Мол. биол., *5*, 698, 1971.
16. *Шувалов В. А., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *207*, 746, 1972.

Поступила в редакцию
29.X.1973

STUDY OF OXYGEN PHOTOREDUCTION IN CHLOROPLASTS BY THE METHOD OF LUMINOL AND CHLOROPHYLL CHEMILUMINESCENCE

V. A. SHUVALOV and A. A. KRASNOVSKII

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Photosynthesis, Academy of Sciences of the USSR, Puschino

The reduction of oxygen by irradiated chloroplasts was studied for elucidation of oxygen action site in the electron transport chain of photosynthesis.

Chemiluminescence system, consisted of luminol and peroxidase, was used for registration of oxygen reduction products. In the first case chemiluminescence system was added to supernatant fraction after centrifugation of suspension of irradiated chloroplasts in order to determine H_2O_2 which was found to be the final product of oxygen photoreduction. In the second case when chloroplasts were illuminated in the presence of chemiluminescence system and oxygen the fact delayed luminescence of luminol was observed. This photoluminescence related also with the oxygen reduction in chloroplasts caused a possible formation of radicals $HO_2^{\cdot}$ (or $^{-}O_2^{\cdot}$). The formation of this radicals and H_2O_2 was inhibited by DCMU, heating of chloroplasts at 45° C for 5 min and by washing with EDTA and NH_2OH. The rate of $HO_2^{\cdot}$ dissappearance was increased by methylviologen. The kinetics of photoluminescence of luminol and afterglow of chlorophyll in chloroplasts was identical in the interval from 20 msec to several seconds. It is suggested that oxygen reaction site is located near the reaction centre of chloroplasts.

FLUORESCENCE INDUCTION OF NORMAL AND MUTANT MAIZE SEEDLINGS

N. V. KARAPETYAN, V. V. KLIMOV, F. LANG & A. A. KRASNOVSKIĬ

A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Moscow, U.S.S.R.

Introduction

At the beginning of illumination of green plants and algae complex kinetics of fluorescence changes are observed. These patterns are known as fluorescence induction (KAUTSKY & HIRSCH 1931). According to DUYSENS & SWEERS (1963) fluorescence (F) yield is determined by the redox state of the primary electron acceptor of Photosystem 2, Q, which in its oxidized form quenches F. Different stages in the complex kinetics of photoinduced changes of F (ΔF) reflect the interaction of photosystems mediated by the electron transport chain of photosynthesis (DUYSENS & SWEERS 1963; MUNDAY & GOVINDJEE 1969; KARAPETYAN et al. 1971). If the scheme of photosynthetic electron transport is

$$H_2O \rightarrow Z \rightarrow Chl\,a_2 \rightarrow Q \rightarrow A \rightarrow P700 \rightarrow X \rightarrow NADP,$$

then the photoreduction of Q by Photosystem 2 causes an increase in F, and the oxidation of QH by Photosystem 1 results in a decrease in F.

Induction of F is one of the important tests for the presence and functioning of Photosystem 2. Therefore it is often used to characterize the photosystems of mutants. In turn, the investigation of pigment mutants helps in understanding the mechanisms of photosynthetic electron transport and the role of different forms of chlorophylls in that process. For this reason we investigated lycopenic and ζ-carotenic mutants of maize having different pigment contents (SHLYK et al. 1967; LANG et al. 1969, 1971) and low rates of CO_2 uptake (GYURJÁN et al. 1969). We attempted to explain the low photosynthetic activity of mutants by studying changes in ΔF and oxygen evolution during the greening of their leaves in comparison to leaves of normal seedlings.

Methods

The kinetics of ΔF of maize leaves with $\lambda > 710$ nm was recorded oscilloscopically by means of a double-beam apparatus described by KARAPETYAN & KLIMOV

(1971) and KARAPETYAN (1972). A low intensity monochromatic beam (650 nm, 0.05 W m^{-2}) excited the F of the leaves; this light was exchanged for a perpendicular actinic beam (λ>710 nm, 1.7 x 10^3 W m^{-2}, absorbed mainly by Photosystem 1 or 600-700 nm, 1.5 x 10^2 W m^{-2}, more effectively absorbed by Photosystem 2). The initial level of F (F_i) excited by the monochromatic beam and its changes (ΔF) under actinic irradiance were successively recorded. The photosynthetic activity of the leaves was measured amperometrically as the rate of oxygen evolution (KLIMOV et al. 1972). The rate of oxygen evolution, ΔF and spectra of F were measured successively in the same leaf. Sometimes leaves attached to seedlings were used for ΔF measurements; this enabled utilization of the same leaf during the whole greening period.

Results

Green leaves

The values of ΔF of the leaves of normal and mutant seedlings are essentially different. The relationship $\Delta F/F_i$ is 2.5-3.0 for normal leaves, 1.0-1.5 for lyco-

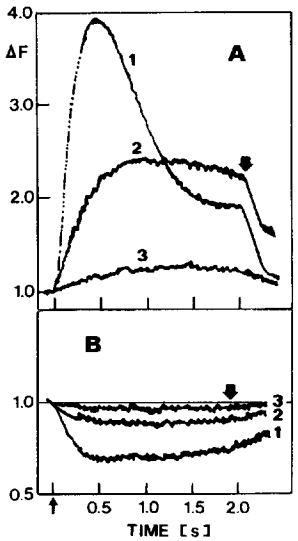


Fig. 1. The kinetics of ΔF of green maize leaves irradiated with λ = 600-700 nm (A) and λ>710 nm (B) in anaerobic conditions: 1 – normal seedlings, 2 – lycopenic, 3 – ζ-carotenic mutants. ΔF = $\Delta F/F_i$, when F_i = 1.

penic, and 0.1-0.15 for ζ-carotenic leaves (Fig. 1A). The kinetics of ΔF are different in mutant and normal leaves:

(1) Although the values of the fast component of ΔF for normal and lycopenic leaves are equal, the value of the slow component of the mutant is 1.5-2.0 times lower (Fig. 1A); the slow increase in F is observed only with the ζ-carotenic mutant.

(2) The increase in F to a maximal level and its decrease were slower in mutant leaves than in normal leaves.

Also, the rates of oxygen evolution in normal and mutant leaves are essentially different (Fig. 2): in normal and lycopenic leaves the maximum level is achieved in 6-8 min and a slow decrease follows. A constant rate is achieved more rapidly in normal leaves (curve 1) than in leaves of the lycopenic mutant which require more than 30 min (curve 2). The rate of oxygen evolution of the ζ-carotenic mutant is only 3-5% of that of normal leaves (curve 3).

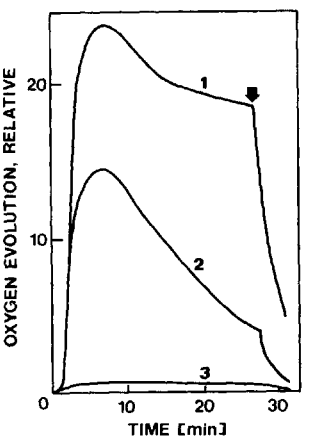


Fig. 2. The kinetics of oxygen evolution by green maize leaves of normal seedlings (1), and lycopenic (2) and ζ-carotenic (3) mutants under saturating irradiance (λ>640 nm, 100 W m^{-2}).

Illuminance of green normal and mutant leaves in anaerobic conditions with $\lambda > 700$ nm induces a decrease in F which is due to oxidation of QH by Photosystem 1. This effect is less apparent in mutant leaves. Illuminance of mutant leaves in anaerobic conditions with λ = 600-700 nm results in complex kinetics for ΔF with an intermediate dip characteristic of normal leaves. The addition of DCMU does not enhance ΔF during illumination with λ = 600-700 nm, because the reaction is saturated with radiant energy. However, the intermediate dip disappears in the presence of DCMU and only a fast rise of F to a miximal level is observed. The

decrease in F caused by $\lambda > 700$ nm disappears in the presence of DCMU in both normal and mutant leaves.

When the leaf structure is mechanically damaged by a glass stick, the complex kinetics for ΔF disappear and only an increase in F is observed, similar to that of chloroplasts. The addition of dithionite to buffer containing the damaged leaf results in a slow increase in F_i (KARAPETYAN et al. 1971; KARAPETYAN 1972). Wavelengths >700 nm cause only a decrease in F, and λ>680 nm result in an increase of F with an intermediate dip. The addition of hydroxylamine to damaged normal and mutant leaves does not increase the value of ΔF.

Etiolated and Greening Leaves

Irradiance of etiolated normal and mutant leaves with $\lambda = 600$-700 nm induces an increase in F which is irreversible and disappears only when the etiolated leaf is irradiated beforehand for several minutes. The observed ΔF is not related to the functioning of the electron transport chain; it is caused by a phototransformation of protochlorophyllide to chlorophyllide which is accompanied by a long-wave spectral shift of the maximum of F (KLIMOV et al. 1972).

A reversible ΔF was observed in normal maize leaves only after 2.5 h of illumination (Fig. 3A) (see also GOEDHEER 1961; BUTLER 1965). The ΔF increased during a further 24 h of greening and its kinetics was similar to the ΔF

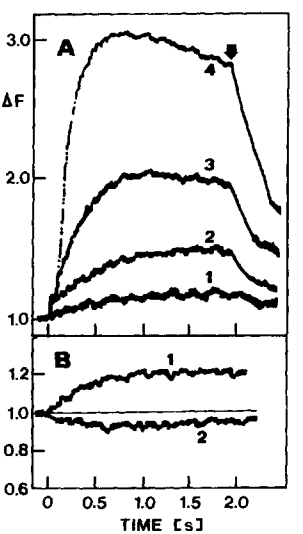


Fig. 3. The kinetics of ΔF in normal maize leaves: A – after 2.5 (1), 6 (2), 12 (3) and 24 (4) h of illumination of etiolated leaves; B – illumination of normal leaves with λ>700 nm (1) and $\lambda = 600$-700 nm (2) after 2.5 h of greening.

kinetics characteristic for a fully green leaf (curves 2-4). The increase of ΔF during greening was due to an increase in the slow component of ΔF. The reversible ΔF was observed in lycopenic leaves only after 4.5 h and in ζ-carotenic leaves only after 12 h of greening. The effect of wavelengths >700 nm on F is apparent at the same time as the effect of wavelengths 600-700 nm in both greening normal and greening mutant leaves (Fig. 3B). This shows that Photosystem 1 is already active when the activity of Photosystem 2 (ΔF) first appears.

The ability of leaves to evolve oxygen coincides with the appearance of ΔF and formation of a long-wave maximum of F. During greening the oxygen evolution rate increased in parallel with ΔF (Fig. 4A). Photoinhibition of greening leaves caused a parallel decrease and simultaneous disappearance of ΔF and oxygen evolution (Fig. 4B). These data present additional evidence for the relation of ΔF to the activity of the photosynthetic apparatus.

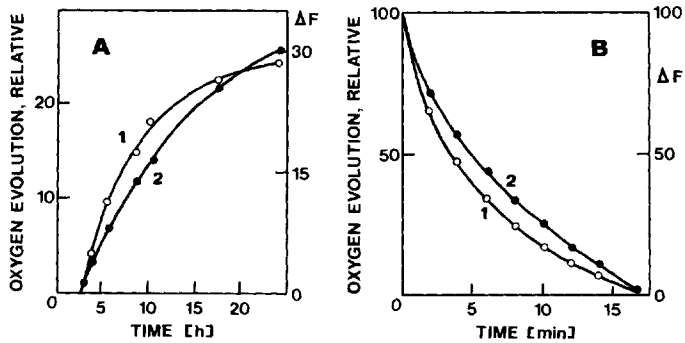


Fig. 4. The dependence of oxygen evolution rate (1) and the value of ΔF (2) on the time of greening of etiolated leaves (A) and on the time of photoinhibition of normal green leaves (B).

The ΔF kinetics of green mutant leaves and greening normal leaves are similar at different stages of greening. Mutants could be considered as greening normal leaves whose development of photosynthetic apparatus is blocked at a definite stage of greening. In the ζ-carotenic mutant this blocking takes place earlier than in the lycopenic mutant.

Discussion

The comparative study of the photosynthetic activity and ΔF of maize mutants allowed an estimation of their ability for the primary processes of photosynthesis. Both mutants have a functioning Photosystem 2. The decreasing ΔF under illuminance with λ>700 nm shows the presence of Photosystem 1 in mutants and a functioning electron transport chain between the photosystems.

However, in comparison with normal leaves, the mutants possess a lower rate of oxygen evolution. The low CO_2 incorporation of lycopenic and ζ-carotenic mutants found by GYURJÁN et al. (1969) was not only caused by a low chlorophyll content in mutant leaves. The chlorophyll content of the ζ-carotenic mutant is 20-25% of the normal value (LANG et al. 1971) but its photosynthetic activity is less then 5%.

The data presented above indicate that the low photosynthetic activity of both mutants is caused by a blocking of the light-induced reactions of photosynthesis, mainly of Photosystem 2. The low value of ΔF for leaves of these mutants under saturating illuminance without or with DCMU (which blocks electron transport between the photosystems) could be caused by a low content of active centres of Photosystem 2 or by a damaging of the structure of these centres and other sites of the photosynthetic electron transport chain.

If the low ΔF of mutants was caused by a low ratio of active centres to total chlorophyll content, then the kinetics of ΔF would be the same as for normal leaves. In fact, ΔF's of mutants and normal leaves differ not only in values but also in kinetics. This indicates some damage of the photosynthetic electron transport chain of mutants, possibly localized in either donor or acceptor parts of Photosystem 2.

Hence the results of our experiments suggest that the low photosynthetic activity of the studied mutants is related mainly to blocking of the activity of Photosystem 2.

Summary

The reversible light-induced fluorescence changes of greening and green leaves of normal and mutant (lycopene and ζ-carotene) maize seedlings are observed simultaneously with the appearance of oxygen evolution and long-wave fluorescence maximum. The activity of Photosystem 2 of normal leaves is observed after 2.5-3 h, that of the lycopene mutant after 5 h and that of the ζ-carotene mutant after 12 h of greening. The rate of oxygen evolution of the green mutant leaves is lower than that of normal leaves. The time course of photo-induced changes of fluorescence of mutant leaves is different from that of normal leaves. The interaction of Photosystem 1 and Photosystem 2 of normal and mutant leaves, detected as a fluorescence decrease upon irradiation of leaves with $\lambda > 700$ nm, takes place immediately after the appearance of Photosystem 2 activity, i.e. at this time Photosystem 1 is already active. It seems that the low photosynthetic activity of the studied mutants is due first of all to insufficient functioning of Photosystem 2.

REFERENCES

BUTLER,W. L., *Biochim. biophys. Acta* 102:1, 1965.

DUYSENS, L. N. M. & SWEERS, H. E., in: ASHIDA, J. (ed.): Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, p. 353, Univ. Tokyo Press, Tokyo 1963.

FALUDI-DÁNIEL, Á., AMESZ, J. & NAGY, A. H., *Biochim. biophys. Acta* 197: 60, 1970.

GOEDHEER, J. C., *Biochim. biophys. Acta* 51: 494, 1961.

GYURJÁN, I., RAKOVÁN, J.N. & FALUDI-DÁNIEL, Á., in: METZNER, H. (ed.): Progress in Photosynthesis Research, Vol. I, p. 63, Tübingen 1969.

KARAPETYAN, N.V., in: FORTI, G., AVRON, M. & MELANDRI, A. (ed.): Photosynthesis, Two Centuries after Its Discovery by Joseph Priestley, Vol. I, p. 180, Junk, The Hague 1972.

KARAPETYAN, N.V. & KLIMOV, V.V., *Fiziol. Rast.* 18: 223, 1971.

KARAPETYAN, N.V. & KLIMOV, V.V., *Fiziol. Rast.* 20: 545, 1973.

KARAPETYAN, N.V., KLIMOV, V.V., KRAKHMALEVA, I.N. & KRASNOVSKIĬ, A.A., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 201: 1244, 1971.

KARAPETYAN, N.V., KLIMOV, V.V., LANG, F. & KRASNOVSKIĬ, A.A., *Fiziol. Rast.* 18: 507, 1971.

KAUTSKY, H. & HIRSCH, A., *Naturwissenschaften* 19: 964, 1931.

KLIMOV, V.V., LANG, F., KARAPETYAN, N.V. & KRASNOVSKIĬ, A.A., *Fiziol. Rast.* 19: 151, 1972.

LANG, F., VOROB'EVA, L.M. & KRASNOVSKIĬ, A.A., *Biokhimiya* 34: 257, 1969.

LANG, F., VOROB'EVA, L.M. & KRASNOVSKIĬ, A.A., *Mol. Biol.* (Moskva) 5: 366, 1971.

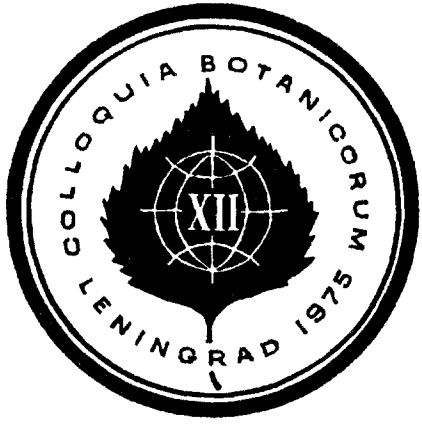
MUNDAY, J.C. Jr. & GOVINDJEE, *Biophys.J.* 9: 22, 1969.

SHLYK, A.A., FRADKIN, L.I., SAVCHENKO, G.E. & FALUDI-DÁNIEL, A., *Photosynthetica* 1: 241, 1967.

CHEMICAL EVOLUTION OF PHOTOSYNTHESIS

Prof. A.A. Krasnovsky

A.N.Bakh Institute of Biochemistry
Academy of Sciences of the USSR, Moscow, USSR



3 - 10 july 1975

XII INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS

I. INTRODUCTION

The conversion of solar energy by plants underlies now existing pattern of life on the Earth. Organic matter of plants and oxygen evolved are used in metabolism of diverse organisms living on our planet. Contemporary oxygen atmosphere of Earth was originated as a result of plant photosynthesis. Now the question arises: does the origin of life on the Earth depend on photosynthesis too?

We have no deceisive experimental data to solve this problem which is subject of hypotheses. So, A.I. Oparin fifty years ago put forward an idea that photosynthesis was developed after the primary heterotrophic organisms originated, their metabolism having been based on the use of organic matter of abiogenic origin (I).

J.B.S. Haldane pointed the possibility of abiogenic formation of organic matter by the way of photochemical reactions under the action of ultraviolet radiation on the components of primary anaerobic Earth atmosphere (2). The ideas on the rather late origin of photosynthesis is shared by H. Gaffron (3) and M. Calvin (4).

We will consider the following problems basing mainly on the data of model experiments:

The utilisation of solar energy in the period of chemical evolution;

The mode of solar energy conversion in the membranes of primary probionts;

The pathways of solar energy conversion during biological evolution.

II. SOLAR RADIATION AND CHEMICAL EVOLUTION

According to contemporary ideas the dating of chemical evolution covers a period of 3-5 billions of years. The traces of this period one may search in ancient rocks of our Earth on the way of carbonaceous matter evolution.

The data are available on the chemical composition of precambrian rocks having many organic substances including porphyrins. But now the problem of their origin (due to destruction of modern biological structures or by chemical transformations of simple molecules) is not clear yet. The same considerations are related to the analysis of meteorites.

With the progress in space exploration the samples from the planets become available for direct chemical analysis.

Impressive data were obtained simulating in the laboratory the reactions in models of the primary reducing atmosphere under the influence of ultraviolet, visible and corpuscular radiation, radioactivity and electric discharges.

The types of reactions are possible here: direct photochemical reactions in short-wave ultraviolet leading to primary photodissociation or photoionisation of gaseous compo-

nents of primary atmosphere and reactions photosensitized to more long-wave part of solar spectrum when the maximum of solar energy is situated.

The first type of reactions was considered in detail in the paper of Prof. C. Ponnamperuma; the success in this field of research is pronounced as in many laboratories the abiogenic syntheses of many organic substances being bricks of primary metabolism were shown.

The photosensitized reactions required appropriate photoreceptors absorbing light in more long-wave region than gaseous components of primary atmosphere. As photoreceptors might work inorganic components of Earth's crust or abiogenically formed colored matters such as porphyrin.

The photosensitized reactions is condensed phase represent usually reaction of hydrogen (electron) transfer. The gradual accumulation of potential chemical energy through conversion of solar energy may be carried out by sensitized redox reactions using organic matter of abiogenic origin or inorganic compounds of Earth's crust.

I n o r g a n i c p h o t o s e n s i t i z e r s. In the literature on chemical evolution, the use of inorganic photoreceptors has not yet been considered. But some inorganic substances that are components of the Earth's crust possess photosensitizing activity. They could play the role of primary photosensitizers. It is surprising that the oxides of titanium, zinc and tungsten possess high photosensitizing activity in redox reactions comparable with the activity of

porphyrins and chlorophylls. These compounds are able to sensitize reactions accompanied by light energy storage in terminal stable products (5,6).

It was shown in our laboratory that titanium, zinc and tungsten oxides under the action of near ultraviolet radiation (365 nm) are able, in water media, to photosensitize oxygen evolution coupled with exogenous electron acceptor reduction (ferric ions, ferricyanide ions, p-benzoquinone were used).

The reaction follows the stoichiometry:

$$2\ Fe^{+++} + H_2O \longrightarrow 2\ Fe^{++} + 2\ H^+ + I/2\ O_2$$

The origin of oxygen from the water molecules was recently confirmed experimentally with heavy water labelled by oxygen: $H_2{}^{18}O$ (7). The quantum yield of the reactions studied (Table I) ran up to I%.

Table I Photosensitization of Redox Reactions by TiO_2, ZnO and WO_3 (365 nm)

Electron donor	Electron acceptor	Reaction products
H_2O	Fe^{+++}, $Fe(CN)_6^{+++}$	Oxygen, Fe^{++}, $Fe(CN)_6^{++}$
H_2O	p-Benzoquinone	Oxygen, hydroquinone
H_2O	Viologens	Reduced viologens
Glycine	Redox-dyes	Dyes
Hydrazine		Oxidized electron donor
Thiourea, etc.		

These experiments reproduce the Hill reaction of chloroplasts or the photosystem II of photosynthesis.

When oxygen is used as a final electron acceptor it is possible to reproduce the chloroplast Mehler reaction accompanied by hydrogen peroxide formation.

Finally, inorganic photocatalysts are able to photosensitize viologen's reduction running up to the redox potential of the hydrogen electrode (8). So the action of photosystem I can also be simulated by using inorganic photocatalysts.

The mechanism of photocatalytic reactions may be the following. As a result of light quantum absorption by the crystalline lattice of the photocatalyst-semiconductor the electron transition from valence band to conduction band proceeds.

At the phase boundary, photocatalytic particles/aqueous solution, molecules - electron donors and acceptors are absorbed on the electron-accepting and electron-donating active centers of the photocatalytic surface. The primary redox reaction is realized by interaction of electron donor with a hole and acceptor with electron.

The dismutation of primary radicals on the catalytic surface takes place, in the case of oxygen evolution - recombination of OH radicals leading to oxygen evolution. So the photosensitizers possesses catalytic activity too.

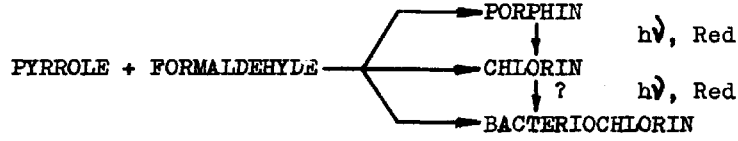
These observations point to a feasible mode of involvement of inorganic photosensitizers into the structure of probionts. Nevertheless, none of existing organisms includes

inorganic sensitizers in the patterns of their metabolism; those were probably "blind alleys" in the growth of the evolutionary tree.

In the course of evolution, most effective catalysts and photosensitizers had been developed by bonding inorganic ions to organic ligands, the porphyrin cycle being most widespread.

P o r p h y r i n s. Rothemund in 1936 described the synthesis of porphin from pyrrole and formaldehyde. This reaction is thermodynamically spontaneous, proceeding slowly at room temperature in the dark in the presence of some catalysts. The presence of oxidants (oxygen, quinones) enhances the synthesis of porphin since the condensation of pyrrole and formaldehyde proceeds with abstraction of hydrogen. Abiogenic formation of porphyrins in simulated primary atmosphere was found recently (9).

In the solution of pyrrole and formaldehyde not only porphin but also more reduced compounds are formed: chlorin and bacteriochlorin (10,11). The synthesis and analysis of the most reduced substances requires anaerobiosis as these pigments are spontaneously oxidized in the presence of the oxygen of air. Chlorin may be formed from porphin not only by condensation of pyrrole and formaldehyde but via photoreduction of porphin too. The following scheme summarizes the processes listed above:



Our studies have shown that interaction between pyrrole and formaldehyde is catalysed by some components of the Earth's crust, silica, titanium dioxide, and zinc oxide and some organic substances among them tryptophan, which is most active (IO,II).

When analyzing ancient rocks and samples from planets it is necessary to search alongside with porphin, the more reduced pigments - chlorins and bacteriochlorins.

All these compounds are photochemically active; they possess photosensitizing activity and are capable of undergoing reversible photooxidation and photoreduction.

However, in organisms free porphyrins are found mostly as intermediates of biosynthesis; among photosynthetic organisms magnesium complexes of porphyrins dominate and among catalysts, iron complexes dominate. The possibility of choosing the appropriate central metal atom in the porphyrin cycle in the process of evolution is illustrated by the following table.

Table 2

Element	Percent in Earth's crust	Activity of porphyrin complex	
		Catalysis	Photochemistry
Si	27,6	insoluble in aqueous media of biosphere	
Al	8,5		
Fe	5,0	+	-
Ca	3,5		
Na	2,6	easy hydrolysis	
K	2,5		
Mg	2,0	-	+
Ti	0,6	insoluble	

The compounds of silicon and titanium are practically insoluble in water; this insolubility probably prevented the incorporation of these metals into porphyrin complexes. Complexes of Na, K, and Ca with porphyrins are hydrolyzed in aqueous media.

Only complexes of magnesium and iron are sufficiently stable to win in the competition. These complexes, having auxiliary coordination vacancies perpendicular to the plan of the porphyrin ring, are also capable of bounding reacting molecules. In the course of evolution, they made it possible to bind specific proteins.

The vanadyl and nickel porphyrins have been found in petroleum; they are probably formed as a result of chlorophyll degradation and central magnesium atom substitution.

P h o t o c h e m i s t r y o f p o r p h y r i n s. The principal difference of magnesium porphyrin complexes from the ferric ones is that the first are active only after excitation by light quanta being converted into singlet or triplet excited states.

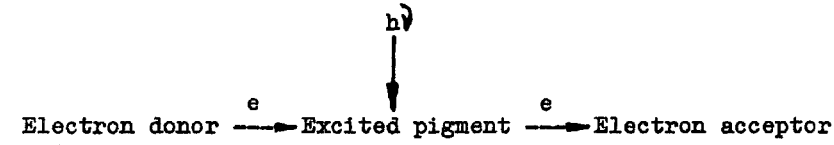
The studies in our laboratory have shown that excited porphyrins and their magnesium and zinc complexes are capable of reversible photochemical reduction or oxidation, that is of accepting or donating an electron to the partner molecule (see review of ref. I2).

Reversible photoreduction: $P^{*} + Red \longrightarrow \cdot P^{-} + \cdot Red^{+}$

Reversible photooxidation: $P^{*} + Ox \longrightarrow \cdot P^{+} + \cdot Ox^{-}$

The porphyrins are able to reversible photoreduction (I3). In the case of most longwave photosynthetic pigments, bacteriochlorophyll b of Rhodopseudomonas viridis, the ability to reversible photooxidation is highly pronounced (I4).

In the triple system composed of molecules: electron donor (Red), electron acceptors (Ox) and pigment-excited molecules (P^{*}) the photosensitization of the electron transport from Red molecules to Ox molecules proceeds at the expense of light energy absorbed by pigment molecules.



As electron donors it is possible to use dienols, SH-compounds, Ferrous compounds, NADH and NADPH, hydroquinone, etc. As electron acceptors - oxygen, quinones, ferric compounds, NAD and NADP, flavins, etc.

Thus, it is plausible that this type of photosensitized electron transfer to proceed in the period of chemical evolution.

III. PHOTOCHEMICAL REACTIONS IN MEMBRANES OF PROBIONTS

P h o t o c h e m i c a l a c t i v a t i o n o f b i o c a t a l y t i c s y s t e m s. In the case of an abundance of chemically active substances in the primary soup, the redox reactions would probably have determined the pattern of primary energetic metabolism.

As catalysts of these reactions, various inorganic components of the Earth's crust may have been involved, the catalytic action having been enhanced by complexing with the organic ligands of abiogenic origin such as simple organic bases or tetrapyrrolic compounds.

Along with components having catalytic properties, there were substances on the primary Earth such as abiogenic tetrapyrrole compounds, possessing photosensitizing activity.

At the first International Symposium on the Origin of Life (I5) we suggested that the photochemical activation of catalysts similar to contemporary coenzymes might be an intermediary metabolic step in light energy utilization.

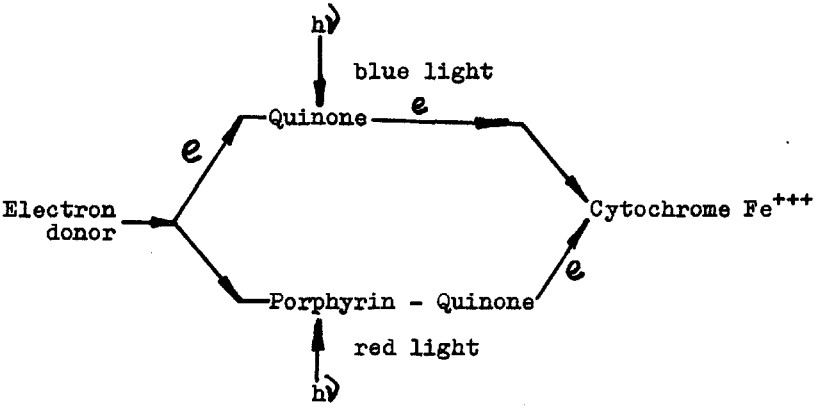
The photochemical activity of flavin coenzymes was already known at that time. Later we studied the photochemical activation of reduced pyridine nucleotides and analogs excited by near ultraviolet radiation (365 nm) (review I6). Photochemical activation enhanced NADH oxidation by electron acceptor molecules including viologens (and ferredoxin) which have a more negative redox potential than pyridine nucleotides. In the latter case it was possible to store some light energy in the reaction products (I7):

$$NADH^{*} + \text{Viologen} \longrightarrow NAD + \text{reduced Viologen}$$

$$NADH^{*} + \text{Ferredoxin} \longrightarrow NAD + \text{reduced Ferredoxin}$$

We have recently revealed catalytic action of quinones in cytochrome c autoreduction. Blue light absorbed by quinones greately enhanced this reaction; the superposition of

catalytic and photosensitizing activity is pronounced in this case (I8).



The photochemical activity of cytochromes and other Fe-porphyrins proper is negligible as compared to the activity of magnesium complexes, the latter being able to effective photosensitization of the redox transformations of cytochromes.

The examples of a possible transition from heterotrophic to an autotrophic mode of metabolism may be found in an extensive literature on the action of light on the metabolism of contemporary heterotrphs, for instance fungi (I9).

These chlorophyll-deficient organisms usually contain photochemically active pigments - flavins, quinones and porphyrins - as intermediates in heme biosynthesis.

In our laboratory were revealed Zn-porphyrins in variuos types of organisms using phosphorescence action spectra measurements in the cells (20). Finally, photochemically active reduced NAD and NADP are universal cell components.

We suggested (I5) that in the course of evolution the photosensitizing and biocatalytic functions became specialized. A good example is to compare the properties of iron and magnesium porphyrins, the latter being effective photosensitizers inactive in the dark and extremely active when excited. On the contrary, the biocatalysts - iron porphyrin complexes - being extremely active in the dark, possess rather low photochemical activity.

The significance of photosensitized substrate activation became more important in the course of exaustion of active substances in the primary ocean.

It is generally considered that on the primary Earth there was no ozone layer in the upper parts of the atmosphere to absorb the short-wave ultraviolet radiation of the Sun. But the water layer absorbs short-wave ultraviolet too. So, in the case of reactions occuring in the ocean the primary photochemical reactions required sensitization to the longer wavelengths of the solar spectrum.

P h o t o c h e m i c a l r e a c t i o n s i n m e m b r a n e s o f p r i m i t i v e p r o b i o n t s. Thus in the course of photochemical evolution homogenous and heterogenous reactions of electron transfer could take place.

The arrangement of these reactions to more complicated chains might proceed in the membranes of primitive probionts.

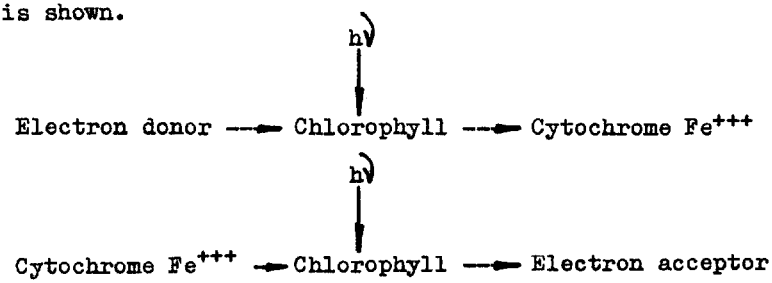
More advanced probionts possessed probably lipoproteinic membranes. The ability of porphyrins to incorporate themselves into the membrane required appearance in their molecule lipo-

philic tail: phytol or farnesol. The lipophilic tail does not influence the photochemical activity of pigments molecule determined mainly by porphyrin ring having circularly conjugated system of double bonds.

Photochemical reactions of porphyrins were studied in our laboratory in the simplest heterogenous systems - aqueous solutions of surface active substances - detergents (2I). Chlorophyll and analogs in aqueous detergent solutions possessed pronounced photochemical activity (22); these pigments are capable in detergent micelles to reverrible oxidation and reduction and to effective photosensitization (23).

So, in aqueous solutions of triton X-I00 chlorophyll and cytochrome c are solubilised. By red light illumination (when chlorophyll absorbs light) photosensitized cytochrome reduction was observed; in the presence of electron acceptors reduced cytochrome oxidation proceeded. The reaction was enhanced in the presence of flavins, quinones and other substances being intermediate electron carriers (24). In aqueous detergent solutions photosensitized reduction of viologen takes place too (see rev. I2).

At the scheme electron transfer in the detergent micelle is shown.

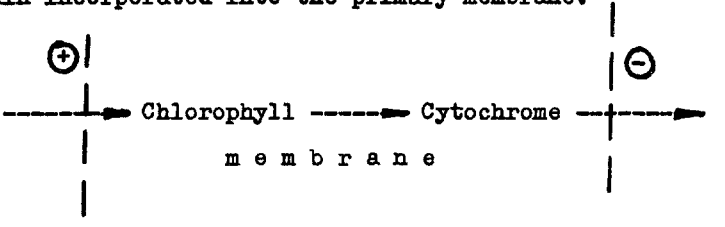


In this case the terminal aminoacid residues of cytochromes molecule are probably used as electron donors.

If simple chains of electron transfer are arranged perpendicular to the plane of membrane the possibility of charge translocation may procced according to Mitchell chemiosmotic theory. Such charge translocation may lead to proton translocation being prerequisite of adenosine triphosphate synthesis.

Thus photochemical mobilization of electron could lead to macroergic bonds formation.

I wish to put forward an idea that important stage of prebiological evolution comprises the transition from random to anisotropic arrangement of primitive electron transfer chain incorporated into the primary membrane.



C o u p l i n g o f p h o t o c h e m i c a l a n d c a t a l y t i c r e a c t i o n s. Thus it is possible to suppose that a primary photocatalytic block of chemical and biological evolution comprised the ternary system: electron donor-pigment-electron acceptor. This system works efficiently not only in models but also in biologically organized structures.

The photochemical and catalytic electron transport chains

were improved by diverse coupling of the primary photocatalytic blocks into the primary probiont membranes (25). In the processes of biological evolution diverse combinations of photocatalytic blocks were realized.

It is possible to trace several types of primitive photocatalytic electron transfer; we begin with noncyclic electron transfer. The excited pigment molecule reduces the activation energy and the overall reaction is thermodynamically possible ($-\Delta F$); here the photosensitizer acts as a photocatalyst.

$$Red + Ox + (P) \xrightarrow{-\Delta F} Red_{ox} + Ox_{red} + (P)$$

Another type of reaction which is more important for the use of an inactive hydrogen donor, that is the water molecule, is the overall process accompanied by increase of free energy of the system ($+\Delta F$). This case can be reproduced in a model system - in solutions of chlorophyll; here pyridine nucleotides and other electron acceptors are photoreduced at the expense of ascorbic acid as an electron donor. This case was studied in our laboratory (see rev I2).

$$Ascorbate + NAD + (CHL) \xrightarrow{\text{red light}} Ascorbate_{ox} + NADH + (CHL)$$

The modelling of Hill's reaction photosensitized by inorganic semiconductors also proceeds with a gain of free energy (see above).

It is possible to presume a primitive cyclic electron

Transfer coupled with phosphorylation. In the cyclic processes, Mg or Fe porphyrin may participate; chlorophyll and porphyrins photosensitize effectively oxido-reductive transformations of cytochromes. But the coupling of such cyclic photochemical electron transfer with ATP formation has not yet been achieved in any model systems.

It was found by Arnon (26) and Kamen (27) that ancient photosynthetic organisms (photosynthetic bacteria) possess both types of electron transfer, noncyclic and cyclic coupled with photophosphorylation. So, we may conclude that the primitive "bricks" of electron transfer may be used in biological evolution.

The use of water as an ultimate electron donor in more perfect photosynthetic organisms required coupling of two photoreactions for electron transport from water to pyridine nucleotides via ferredoxins (25), in other words, the coupling of two photocatalytic "bricks" which are denoted, according to contemporary ideas, as photosystems I and II.

The chemical and biological evolution from simple photocatalytic reactions to the perfectly organized systems of photosynthetic electron transfer required probably more than two billion years.

IV. EVOLUTION OF PIGMENTS

The ancestors of contemporary photosynthetic organisms probably possessed small quantities of pigments directly participating in photochemical electron transfer as the

effective pigment biosynthetic system was not yet developed.

As far as the catalysts - enzymes are concerned they are active in very low concentrations; on the contrary, the quantity of pigment-photosensitizer must be very high to absorb effectively the Sun's radiation so as to win in the competition for survival.

The development of metabolism in the course of biological evolution gradually led to the appearance of effective biosynthesis of chlorophylls, phycobilins and carotenoids.

In the course of origination of probionts various metabolic sets of pigment systems were probably formed. It is possible to suggest that primary photosynthetic cells were developed having various pigment combinations: carotenoids, linear tetrapyrroles and cyclic tetrapyrroles.

In the evolutionary process of development of pigment biosynthesis leading to pigment's accumulation in cells the mechanism of energy migration developed from the bulk of pigments to preexisting active center pigment. As we know in contemporary cells light quanta energy absorbed by the bulk of aggregated pigments efficiently migrate to the minor quantity of pigment functioning in the most longwave active center.

Magnesium complexes of reduced porphyrins when aggregated possessed the most longwave absorption determined their function as terminal trap in the excitation energy migration process. Really phycobilins possess more shortwave absorption and photochemical stability which favours their function as

intermediates in excitation migration.

Carotenoids possess absorption in shortwave range of visible spectrum though there are data that their triplet levels are situated lower than in chlorophyll molecules. This property points the possibility of energy migration on triplet level.

The organism survived which become a combination of pigments effectively absorbing the solar radiation chanelling excitation energy by migration to long-wave active centers. Such organisms became photosynthetic bacteria and blue-green alga.

In anaerobic photosynthetic bacteria the most reduced porphyrin pigments dominate - bacteriochlorophylls. In aerobic photosynthetics more oxidized chlorophylls a and b were accumulated. We may propose that most ancient forms are the most anaerobic. In this case we may consider that more ancient pigments are capable to rapid photooxidation.

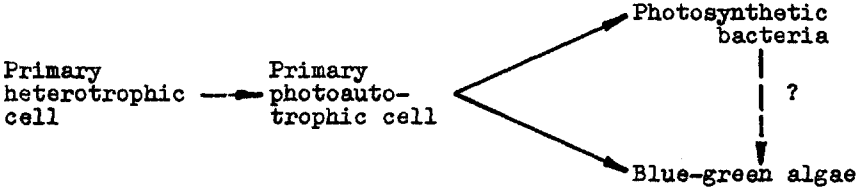
If this creterion is true the most ancient photosynthetic organisms contain bacteriochlorophyll b (Rhodopseudomonas viridis), they are followed by organisms having bacteriochlorophyll a and then - bacterioviridin which resembles chlorophyll a by his spectral properties.

Blue-green algae are usually regarded as the most ancient photosynthetic organisms. In the most ancient precambrian rocks dating 2-3 billions of years were found types of organisms included in quartz being prerequisite of their safety.

Some types of blue-green algae hardly bear high partial pressure of oxygen preferring environment near to anaerobiosis (28). This phenomenon points to their probable origin from anaerobic ancestors.

But the problem is not solved yet: does the blue-green algae develop from photosynthetic bacteria or both types of cells had a common ancestor?

The last hypothesis on the common primary photoautotroph being an ancestor or both types of organisms adopt many researchers:



The phylogenesis of higher plants is studied better being based on the study of contemporary organisms and reliable paleobotanic data. The pigments of higher photosynthetics are rather similar having chlorophylls a and b and carotenoids.

The problem of biochemical evolution of now existing organisms is developed in detail but we cannot find out on the Earth the organisms situated on the boundary of chemical and biological evolution.

Charles Darwin a hundred years ago in his well known letter to Hooker noted that the primary living matter is impossible to find nowadays as this matter would be eaten out or absorbed by more advanced organisms. It is worthly to

emphasise that primary organisms appeared in anaerobic conditions and so they could not tolerate the contemporary oxygen atmosphere of the Earth (2).

One of the possible ways to reveal ancient types of metabolism is to study photosynthesis of contemporary green cells in anaerobic conditions. H. Gaffron discovered in 1939 that green unicellular lagae when treated anaerobically evolve hydrogen. In the hydrogen atmosphere green alga require the ability to photoreduce carbon dioxide being probably ancient form of metabolism (3). In the case of blue-green alga the hydrogen evolution was observed in the course of dark metabolism (29).

V. CONCLUSION

The intensive development of the life on the Earth was possible to proceed at the expense of the energy of the foreign source - the radiant energy of the sun.

The most probable was the primary utilization of short-wave ultraviolet radiation of the sun replaced by gradual photosensitization of energy storing reaction to the long-wave region of sun radiation.

The main problem was to realise different ways of light quanta energy conversion into potential chemical energy of rather stable compounds formed photochemically. Such high energy compounds which store energy of light quanta as potential chemical energy could be easily used in the metabolism of various types of organisms.

The evolution of the process of light quanta conservation lead to accumulation of stable products of photosynthesis being carbon dioxide reduction compounds and molecular oxygen evolving as a result of photooxidation of water molecules.

It is probable that on the other planets light energy storage may lead to the products chemically different as compared with substances formed during photosynthesis on the Earth.

The data of model experiments described in the paper presented illustrate the plausible ways of light energy conversion at the primary stages of prebiological evolution.

References

I. Oparin, A.I., "Origin of Life", Izd. "Moskovskii rabochii", Moscow, I924

2. Haldane, J.B.S., (from Bernal, J.D., "Origin of Life", Izd. "Mir", Moscow, I969)

3. Gaffron, H., in "Horizons in Biochemistry" (Kasha, M., and Pullmann, B., eds.), p.59, Academic Press, New York, I962

4. Calvin, M., "Chemical Evolution", Clarendon Press, Oxford, I969

5. Krasnovsky, A.A., and Brin, G.P., Dokl. AN SSSR I47, 654, (I962)

6. Krasnovsky, A.A., and Brin, G.P., review in "Molecular photonics", p. I6I, Izd. "Nauka", I970

7. Fomin, G.V., Brin, G.P., Genkin, M.V., Lubimova, A.K., Blumenfeld, L.A., and Krasnovsky, A.A., Dokl. AN SSSR 2I2, 424 (I973)

8. Krasnovsky, A.A., and Brin, G.P., Dokl. AN SSSR 2I3, 207 (I973)

9. Hodgson, G.W., and Ponnamperuma, C., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 22 (I968)

IO. Krasnovsky, A.A., and Umrikhina, A.V., in "Molecular Evolution: Prebiological and Biological" (Rohlfing, D.L., and Oparin, A.I., eds.), p. I4I, Plenum Press, New York, I972

II. Krasnovsky, A.A., and Umrikhina, A.V., Dokl. AN SSSR I55, 69I (I964); 202, 22I (I972)

I2. Krasnovsky, A.A., Biophys. J. I2, 749 (I972)

I3. Krasnovsky, A.A., and Voinovskaja, K.K., Dokl. AN SSSR 96, I209 (I954)

I4. Bokuchava, E.M., Drozdova, N.N., and Krasnovsky, A.A., Biokhimia 39, I88 (I974)

I5. Krasnovsky, A.A., in: "Origin of Life on Earth" (Oparin, A.I., et al., eds.), p. 606, Pergamon Press, New York, I959

I6. Krasnovsky, A.A., and Brin, G.P., review in "Problems of Evolution and Technical Biochemistry" (Kretovich, V.L., ed.), p. 22I, Izd. "Nauka", Moscow, I964

I7. Krasnovsky, A.A., and Brin, G.P., Dokl. AN SSSR I63,76I (I965)

I8. Krasnovsky, A.A., and Mikhailova, E.S., Dokl. AN SSSR 2I2, 237 (I973)

I9. Carlile, M.J., in: "Photobiology of Microorganisms", p. 3I0, Wiley-Interscience, I970

20. Shuvalov, V.A., and Krasnovsky, A.A., Molekularnaja biologia 5, 698 (I97I)

2I. Brin, G.P., and Krasnovsky, A.A., Biokhimia 22, 776 (I957)

22. Shaposhnikova, M.G., Drozdova, N.N., and Krasnovsky, A.A., Biokhimia 36, 704 (I97I); 38, I97 (I973)

23. Krasnovsky, A.A., Jr., and Shaposhnikova, M.G., Molekularnaja biologia 8, 666 (I974)

24. Krasnovsky, A.A., and Mikhailova, E.S., Dokl. AN SSSR I85, 938 (I969); I94, 953 (I970)

25. Krasnovsky, A.A., in "Molecular Evolution" (Buvet, R., and Ponnamperuma, C., eds.), Vol. I, p. 279, North-Holland, Amsterdam, 1971

26. Arnon, D.I., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2883 (1971)

27. Kamen, M.D., "Primary Processes in Photosynthesis", Academic Press, New York, 1963

28. Gusev, M.V., Dokl. AN SSSR 147, No. 4 (1962)

29. Oschepkov, V.P., Nikitina, K.A., Gusev, M.V., and Krasnovsky, A.A., Dokl. AN SSSR 213, 243 (1973)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 10 1976 Вып. 1

УДК 541.144.7 : 547.963.4

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

М. И. БЫСТРОВА, И. Н. МАЛЬГОШЕВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Проведено сравнительное изучение ИК-спектров (в области 1800—1600 $см^{-1}$) твердых пленок протохлорофилла, хлорофиллов *a* и *b*, бактериовиридина, протофеофитина, феофитина *a*, содержащих агрегированные формы пигментов, различающиеся спектрами поглощения в видимой области. Образование различных агрегированных форм связано с реализацией разных способов межмолекулярного взаимодействия, что определяется химическим строением молекул пигментов и включением в структуру низкомолекулярных аддендов. Формы 677 *нм* хлорофилла *a* и 658 *нм* хлорофилла *b* образуются при возникновении межмолекулярных координационных связей кетогрупп циклопентаноновых колец и альдегидных групп с центральным атомом магния. Длинноволновые формы хлорофилла *a* (745 *нм*) и хлорофилла *b* (675 и 725 *нм*) образуются при включении молекул метанола в межмолекулярные связи. Длинноволновая форма бактериовиридина (750 *нм*) образуется без участия низкомолекулярного адденда при возникновении связей кетогрупп с центральным атомом магния. Образование формы протохлорофилла 635 *нм* и агрегированных форм безмагниевых пигментов, вероятно, происходит без участия карбонильных групп при непосредственном взаимодействии π-электронных систем молекул. У твердых пленок в присутствии паров диоксана, вызывающего образование форм с максимумами поглощения при 690 *нм* (хлорофилл *a*) и 670 *нм* (хлорофилл *b*), характеристические частоты карбонильных групп не изменяются по сравнению с растворами пигментов. Это указывает на межмолекулярное взаимодействие без участия C=O-групп.

Изучение агрегации хлорофилла и его аналогов в твердых пленках привлекает внимание исследователей в связи с тем, что в таких системах могут быть реализованы возможности межмолекулярного взаимодействия пигментов и имитировано их состояние в клетках фотосинтезирующих организмов.

Определяющими факторами в проявлении межмолекулярного взаимодействия хлорофилла и его аналогов являются химическое строение молекул пигментов и наличие низкомолекулярных аддендов, могущих играть роль «мостиков» между молекулами пигментов в агрегированных структурах [1]. Эти представления получили развитие при систематическом изучении спектральных эффектов агрегации пигментов в твердых пленках [2—11]. Ранее [5, 6, 9—11] было показано, что роль указанных низкомолекулярных аддендов могут играть аммиак, формальдегид, ацетальдегид, метиловый и этиловый спирты, вода, способствующие образованию агрегированных форм протохлорофилла, хлорофилла *a*, бактериохлорофилла.

Изучение молекулярной организации агрегированных форм необходимо для понимания строения пигментных систем в составе пигментно-липопротеиновых комплексов мембран хлоропластов и хроматофоров, где функциональные группировки полипептидных цепей белковых макромолекул могут играть комплексообразующую роль [12].

В настоящее время накоплен большой материал по ИК-спектроскопии хлорофилла и его аналогов в твердом состоянии — пленках и суспензиях в минеральном масле (нуйоле) [13—23]. Бóльшая часть указанных работ основана на наблюдении обратимых изменений поглощения в карбонильной области (1800—1600 $см^{-1}$), а также в области характеристических частот связей ОН-групп (3700—3200 $см^{-1}$) у препаратов твердых пигментов в присутствии воды и при ее удалении.

В работе Холмогорова и сотр. [17] отмечено непосредственное участие молекул воды в создании длинноволновых кристаллических структур пигмента, что получило подтверждение в дальнейшем. В исследованиях Катца и сотр. [21—24] разработаны основные принципы взаимодействия хлорофилла и его аналогов с водой и молекулярной организации агрегированных структур, построенных с включением молекул воды в качестве необходимых компонентов.

Ранее [11] нами при помощи измерения ИК-спектров были получены данные о природе межмолекулярного взаимодействия в твердых пленках бактериохлорофилла, содержащих формы пигмента с различной степенью агрегации. Установлено, что в создании форм с поглощением 800, 850 и 875 *нм* принимают участие ацетильные группы I-х пиррольных колец молекул пигмента и кетогруппы циклопентаноновых колец, которые взаимодействуют с центральными атомами магния и молекулами воды при образовании межмолекулярных связей.

В данной работе при помощи ИК-спектроскопии мы изучали молекулярную организацию агрегированных форм различного типа в твердых пленках протохлорофилла, хлорофиллов *a* и *b* и бактериовиридина. Нас интересовало в сравнительном аспекте участие карбонильных группировок молекул пигментов в создании агрегированных форм, различающихся спектрами поглощения, в том числе длинноволновых форм, образующихся в присутствии метилового спирта (у протохлорофилла и хлорофилла [5, 6, 9, 10]) и в отсутствие экзогенного комплексообразующего адденда (у бактериовиридина [8]). Данные по Mg-комплексам сопоставлены с особенностями структуры агрегированных форм безмагниевых пигментов.

Для выяснения участия карбонильных групп в образовании межмолекулярных связей мы проводили обработку твердых пленок пигментов парами пиридина, полагая, что пиридин за счет сольватации молекул пигмента по атому магния будет способствовать выводу карбонильных групп из сферы координационного взаимодействия с металлом.

МЕТОДИКА

В работе использовали хроматографически и спектрально чистые препараты пигментов, получаемые из сухих листьев крапивы (хлорофиллы *a* и *b*), семян тыквы сорта Столовая (4-винилпротохлорофилл) и бактериальной массы клеток *Chloropseudomonas ethylica* (бактериовиридин).

Безмагниевые производные получали обработкой эфирных растворов пигментов 2 н. HCl с последующим промыванием водой и хроматографическим разделением на колонках из сахарозы.

Твердые пленки получали при испарении эфира из эфирных растворов на пластинках из NaCl с последующим высушиванием в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 в течение 12 *час*. Для получения пленок использовали серный эфир, высушенный над металлическим натрием и свежеперегнанный.

Спектры регистрировали на двухлучевом ИК-спектрофотометре IR-20 (К. Цейсс, Иена) с призмами LiF и NaCl. Нас интересовала область характеристических частот валентных колебаний C=O-групп (1800—1600 $см^{-1}$) и в ряде случаев — область валентных колебаний ОН-групп (3700—3200 $см^{-1}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хлорофилл *a* в твердой пленке, получаемой при испарении серного эфира, обладает основным максимумом поглощения ~677 *нм* [4, 5]. Такие пленки обнаруживают характерные полосы в карбонильной области ИК-спектров с четырьмя основными максимумами — ~1738, ~1695, ~1660 и ~1610 $см^{-1}$ (спектр *1* на рис. 1), что согласуется с данными работ [11, 15—17]. Пленки, получаемые из раствора в CCl_4, имеют практически тот же спектр.

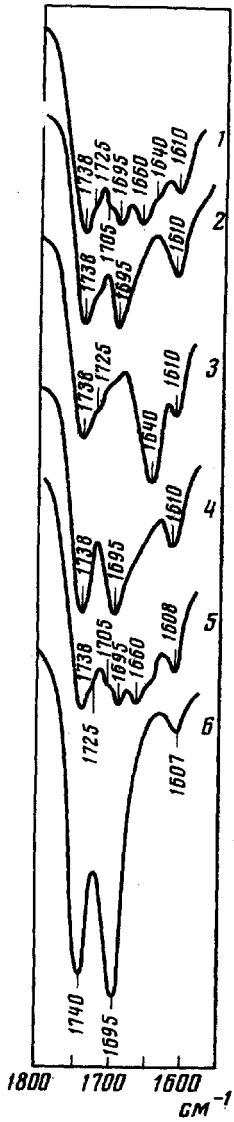


Рис. 1

Рис. 1. ИК-спектры твердых пленок хлорофилла *a*: *1* — исходная; *2* — после обработки парами пиридина (7 *мин*, 20°); *3* — после обработки парами метанола (45 *мин*, 20°); *4* — та же пленка после обработки парами пиридина; *5* — после эвакуации (10^{-3} *мм рт. ст.*, 3 *час*, 20°); *6* — после обработки парами диоксана (30 *мин*, 20°)

Рис. 2. ИК-спектры твердых пленок пигментов: *1* — хлорофилл *a*; *2* — хлорофилл *b*; *3* — протохлорофилл; *4* — бактериовиридин

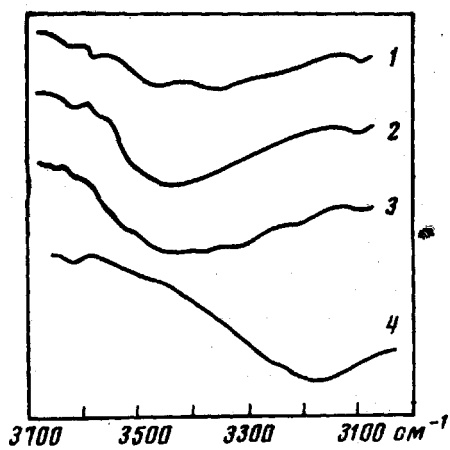


Рис. 2

Обработка пленок парами пиридина (при 20° 5—7 *мин*) вызывает заметное увеличение интенсивности поглощения при ~1695 $см^{-1}$ и уменьшение при 1660 $см^{-1}$ (спектр *2* на рис. 1). В видимом спектре при этом наблюдается «сужение» основного максимума поглощения и его смещение в коротковолновую сторону (до 672 *нм*). Удаление пиридина в вакууме восстанавливает исходный вид ИК-спектра.

Обработка пленок парами метанола (45 *мин* при 20°) приводит практически к полному исчезновению поглощения при 1695 $см^{-1}$ и появлению интенсивной полосы при ~1640 $см^{-1}$ (спектр *3* на рис. 1) [8]. Эти изменения соответствуют образованию в видимом спектре максимума ~745 *нм*.

Действие пиридина на «метаноловые» пленки вызывает исчезновение полосы 1640 $см^{-1}$ в спектре и резкое увеличение поглощения ~1695 $см^{-1}$ (рис. 1, спектр *4*). Следует отметить, что длительное откачивание пленок в вакууме (~10^{-3} *мм* рт. ст.) приводит к воспроизведению исходных спектров (рис. 1, спектр *5*). Вторичная обработка метиловым спиртом и пиридином вызывает те же эффекты.

При действии паров диоксана на пленки (20—30 *мин* при 20°) спектры последних приобретают сходство со спектрами растворов (рис. 1, спектр *6*), что связано с образованием максимума при 690 *нм* в электронном спектре [5, 26, 27]. Эти результаты согласуются с данными работы [28].

Наша трактовка ИК-спектров и их изменений основана главным образом на работах Катца и сотр. [18, 23—25], в которых дан детальный анализ ИК-спектров хлорофилла и его аналогов.

Максимум ~1738 $см^{-1}$ (карбонилы сложноэфирных групп у $C_{(7)}$ и $C_{(10)}$ [13, 18, 19]) практически не отличается от соответствующей полосы безводных растворов пигмента [13, 18, 19, 24]. Максимум ~1695 $см^{-1}$ (свободные кетогруппы циклопентаноновых колец молекул [13, 18, 19]) по сравнению с растворами несколько сдвинут в низкочастотную область. Максимум ~1610 $см^{-1}$ (связи C=C и C=N молекулярного скелета [13, 18, 19]) в пленках не отличается от соответствующего максимума растворов. Происхождение максимума ~1660 $см^{-1}$, отсутствующего у растворов в полярных растворителях [13, 18, 19, 25], связано с межмолекулярным координационным взаимодействием кетогрупп с магнием (кето- C=O...Mg) [18, 19].

Во многих случаях в спектре пленок у максимума ~1738 $см^{-1}$ наблюдали слабое «плечо» ~1725 $см^{-1}$, которое, по-видимому, обусловлено влиянием межмолекулярного взаимодействия в твердых пленках или присоединением воды к части карбометоксильных групп. В условиях наших опытов пленки пигментов содержали некоторое количество связанной воды, о чем свидетельствует характер спектра в области 3700—3200 $см^{-1}$ (рис. 2, спектр *1*).

Указанное раздвоение полосы эфирных групп ранее не было замечено у твердых пленок хлорофилла [11, 14—23], но отчетливо наблюдалось у содержащих воду растворов пигмента в углеводородах [24] и у суспензий в минеральном масле [13, 20].

Максимуму 1695 $см^{-1}$, как правило, сопутствует более или менее явно выраженный коротковолновый компонент (1700—1705 $см^{-1}$). Неоднородность структуры максимума свободных кетогрупп ранее не была замечена [11, 13—23] и, возможно, связана с различием ориентации молекул в составе агрегированных форм.

Значительная интенсивность полосы ~1695 $см^{-1}$, соизмеримая с поглощением эфирных группировок, свидетельствует о том, что часть кетогрупп не участвует в создании формы 677 *нм*. Кетогруппы другой части молекул оказываются связанными при межмолекулярном взаимодействии, что приводит к появлению поглощения ~1660 $см^{-1}$. Ранее аналогичную полосу наблюдали у препаратов хлорофилла *а* и этихлорофиллида в минеральном масле [20, 21], у твердых пленок [11, 14—17, 19, 21—23] и растворов хлорофилла в углеводородах с высокой концентрацией пигмента [21, 24]. Ее происхождение связано с образованием межмолекулярных связей кето-C=O...Mg в структуре олигомеров, имеющих предполагаемый состав $(Хл_2)_n$, где n не больше 9 [23, 24]. Агрегаты та-

кого типа [23] образуются в твердых пленках хлорофилла *a*, получаемых при испарении CCl_4 в условиях тщательного обезвоживания. Присутствие воды в исследованных нами пленках определяет некоторые особенности их спектров по сравнению с безводными пленками [23], хотя общее сходство спектров в обоих случаях разительно.

В пленках хлорофилла *a* в наших опытах обнаружен с низкочастотной стороны «агрегационного» максимума компонент ~ 1640 *см*$^{-1}$. Последний, в согласии с данными работ [23, 24], обязан образованию водородной связи кетогруппы с водой, которая в то же время координационно взаимодействует с атомом Mg другой молекулы пигмента (кето-C=O... H(OH)...Mg). Доля участия таких связей в образовании формы 677 *нм* невелика. Однако в создании структур с крайним длинноволновым поглощением — в гидратированных растворах в углеводородах [21, 24] и твердых пленках в присутствии воды [17, 22, 23] — указанным связям принадлежит определяющая роль.

Метиловый спирт, так же как и вода, играет роль комплексообразующего адденда, способствующего образованию высокоагрегированных форм в твердых пленках пигментов [5, 6, 9—11]. В работе Катца и сотр. [29] для растворов хлорофилла *a* в CCl_4 при помощи спектроскопии ЯМР показана способность метанола к координационному взаимодействию с центральным атомом магния молекул пигмента. Известно [30], что у метанола, координационно связанного с Mg^{2+}, способность к образованию водородных связей увеличивается во много раз.

Структура, создаваемая при действии метилового спирта, по всей вероятности, аналогична предложенной ранее [24] для кристаллического хлорофилла, построенного с включением молекул воды.

Дезагрегирующее действие пиридина связано с его способностью координационно присоединяться к центральному атому магния молекул пигмента с образованием сольватов [31—33]. Это приводит к освобождению карбонильных групп из сферы взаимодействия с металлом. Координационное взаимодействие пиридина с кислородом карбонильных группировок, по-видимому, также имеет место. Однако влияние этого взаимодействия на характеристические частоты карбонилов, по всей вероятности, незначительно, так как в противном случае карбонильные полосы растворов пигмента в присутствии пиридина и без него обнаруживали бы различие.

Под действием паров пиридина в спектрах твердых пленок, содержащих формы 677 и 745 *нм*, исчезают агрегационные максимумы (~ 1660 и ~ 1640 *см*$^{-1}$) и увеличивается интенсивность поглощения в области свободных кетогрупп (~ 1690 *см*$^{-1}$) (рис. 1, спектры *2*, *4*). Это свидетельствует о непосредственном участии кетогрупп $C_{(9)}$ в образовании межмолекулярных связей у форм с разной степенью агрегации. Карбонилы 7-го и 10-го атомов С молекул хлорофилла *a*, по всей вероятности, не участвуют в образовании межмолекулярных связей в твердых пленках.

При создании «диоксановой» формы хлорофилла *a* все имеющиеся карбонильные группировки оказываются свободными.

Хлорофилл *b* при испарении эфира образует пленку с основным максимумом поглощения 658 *нм*. Спектры таких пленок в карбонильной области обнаруживают четыре основных максимума — ~ 1738, ~ 1705, ~ 1665 и ~ 1608 *см*$^{-1}$, а также небольшой максимум ~ 1640 *см*$^{-1}$ (рис. 3, спектр *1*). По общему характеру этот спектр сходен со спектром безводных олигомеров пигмента [23], имеющих предполагаемый состав $(Chl_3)_n$.

Обработка пленок парами пиридина (45 *мин* при 20°) приводит к заметному увеличению поглощения при ~ 1665 *см*$^{-1}$ и уменьшению полосы ~ 1605 *см*$^{-1}$, которая проявляется в виде плеча у вновь образованного максимума ~ 1595 *см*$^{-1}$. Относительная интенсивность полосы ~ 1700 *см*$^{-1}$ сохраняется практически без изменения (рис. 3, спектр *2*).

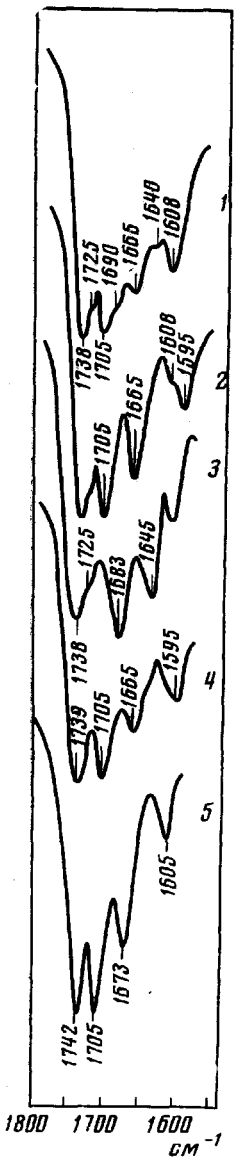


Рис. 3

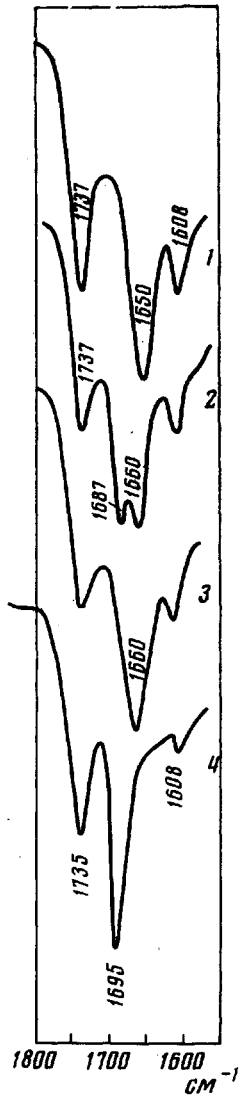


Рис. 4

Рис. 3. ИК-спектры твердых пленок хлорофилла *b*: *1* — исходная; *2* — после обработки парами пиридина (45 *мин*, 20°); *3* — после обработки парами метанола (1,5 *час*, 20°); *4* — та же пленка после обработки парами пиридина; *5* — после обработки парами диоксана (45 *мин*, 20°)

Рис. 4. ИК-спектры бактериовиридина: *1* — твердая пленка; *2* — после обработки парами пиридина (>1 *час*, 20°); *3* — после эвакуации (10^{-2} *мм рт. ст.*, 30 *мин*); *4* — раствор в серном эфире ($\sim 10^{-2}$ *М*)

Отмеченные изменения спектра соответствуют сужению основного максимума поглощения и его смещению в коротковолновую сторону.

Обработка пленок парами метанола (1,5 *час* при 20°) резко изменяет ИК-спектр (рис. 3, спектр *3*). Полосы ~1705 и ~1665 $см^{-1}$ исчезают, поглощение при ~1605 $см^{-1}$ уменьшается; возникают новые максимумы — ~1645 и 1680—1685 $см^{-1}$. Эти изменения сопровождаются появлением в спектре поглощения максимумов ~675 и 725 *нм*.

Действие пиридина (7—10 *мин*) приводит к вторичному появлению полос ~1705 и 1665 $см^{-1}$ взамен исчезающих ~1685 и 1645 $см^{-1}$ (рис. 3, спектр *4*). После удаления пиридина в вакууме снова наблюдается эффект обработки метанолом. Последовательное действие паров пиридина и метанола можно наблюдать многократно на одной и той же пленке, как и в случае хлорофилла *a*.

В парах диоксана пленки хлорофилла *b*, так же как и хлорофилла *a*, претерпевают структурную перестройку, которая выражается в появлении максимума ~670 *нм* и плеча ~705 *нм* в спектре поглощения, что не было замечено ранее [5]. После обработки диоксаном ИК-спектры пленок приобретают сходство со спектрами растворов (рис. 3). Такая же особенность отличает спектры диоксановой формы хлорофилла *a* и пленок безмагниевых пигментов.

Трактовка ИК-спектров пленок хлорофилла *b* менее определенна, чем для хлорофилла *a*, из-за наличия дополнительной карбонильной группы во втором пиррольном кольце, на что было указано ранее [23].

Максимум ~1738 $см^{-1}$ (карбонилы сложноэфирных групп у $C_{(7)}$ и $C_{(10)}$ [13, 18, 25]) по положению мало отличается

от соответствующего максимума растворов [13, 18, 19, 25]. Его некоторая асимметричность в пленках, по-видимому, так же как и у хлорофилла *a* в углеводородах, может быть объяснена координационным присоединением молекул воды к части карбометоксильных групп.

Максимум ~1705 $см^{-1}$ (свободные кетогруппы [13, 18, 25]) обладает довольно большой интенсивностью, которая соизмерима с поглощением эфирных группировок и лишь немного отличается от соответствующей величины для растворов в CCl_4 и в полярных растворителях. У этого максимума обнаруживается плечо с низкочастотной стороны (1695—1690 $см^{-1}$), что ранее не было отмечено для твердого хлорофилла *b* [13, 18, 19, 23, 25]. Происхождение указанного компонента может быть связано с различием ориентации четырехпиррольных циклов молекул в агрегированных формах.

Максимум ~1665 $см^{-1}$ (свободные альдегидные группы II-х пиррольных колец молекул) по положению практически не отличается от соответствующего максимума растворов пигмента в полярных растворителях [13, 18, 19, 25], хотя у пленок интенсивность его гораздо меньше. У растворов хлорофилла *b* в неполярных растворителях максимум в области 1665—1670 $см^{-1}$, по данным работ [18, 24, 25], содержит вклад за счет колебаний межмолекулярных координационных связей кетогрупп с магнием. В твердых пленках с основной формой 658 *нм* образование межмолекулярных связей с участием кетогрупп, по-видимому, не имеет места. Об этом свидетельствует высокая интенсивность максимума свободных кетогрупп, не изменяющаяся при дезагрегации пиридином.

Происхождение небольшого поглощения ~1640 $см^{-1}$, по всей вероятности, связано с включением молекул воды в структуру агрегированных форм. Некоторое количество связанной воды всегда присутствовало в исследованных нами пленках хлорофилла *b*, о чем свидетельствует ИК-спектр в гидроксильной области с основным максимумом ~3450 $см^{-1}$ (рис. 2, спектр *2*).

Образование формы 658 *нм* в твердых пленках происходит главным образом при возникновении координационных связей между альдегидными группами и магнием (альдегид-C=O...Mg). Колебания этих связей проявляются в области колебаний связей C=C и C=N молекулярного скелета (~1610 $см^{-1}$). Возможно, поэтому интенсивность указанного поглощения в твердых пленках гораздо выше по сравнению с растворами в полярных растворителях [18, 19, 25]. Связи альдегид-C=O...Mg в пленках при дезагрегации пиридином разрушаются, в результате чего интенсивность полосы ~1610 $см^{-1}$ падает при одновременном увеличении поглощения свободных альдегидных групп (~1665 $см^{-1}$).

После обработки пиридином у пленок хлорофилла *b* обнаруживается максимум ~1595 $см^{-1}$. Аналогичный максимум ранее [14] был замечен у раствора хлорофилла *a*+*b* в CCl_4 в присутствии пиридина и объяснен образованием комплекса основания с пигментом.

Действие метанола на пленки способствует образованию высокоагрегированных форм с максимумами поглощения ~675 и ~725 *нм*. В ИК-спектре это проявляется в исчезновении поглощения свободных кето- и альдегидных групп (~1705 и ~1665 $см^{-1}$ соответственно), уменьшении поглощения в области 1608 $см^{-1}$ и появлении двух отчетливых максимумов — 1680—1685 и ~1645 $см^{-1}$. Полосы ~1680 и ~1645 $см^{-1}$ наблюдали авторы работы [23] у твердых пленок хлорофилла *b* в присутствии воды, объяснив их соответственно взаимодействием кето-C=O...H(OH)...Mg и альдегид-C=O...H(OH)...Mg.

«Агрегационные» максимумы у метаноловых форм пленок хлорофилла *b* в наших опытах, в согласии с данными работы [23], могут быть интерпретированы следующим образом. Максимум ~1680 $см^{-1}$ обязан, по-видимому, образованию водородных связей кетогрупп с метиловым спир-

том, который в то же время координационно взаимодействует с магнием по кислороду (кето-C=O...HO(CH_3)...Mg). Образование связей такого рода сопряжено с расходом свободных кетогрупп и, следовательно, с исчезновением их максимума в ИК-спектре.

Максимум ~ 1645 *см*$^{-1}$ может быть приписан межмолекулярным связям, образованным с участием альдегидных групп молекул (альдегид-C=O...HO(CH_3)...Mg). На образование указанных связей расходуются не только свободные альдегидные группы, но и те, которые освобождаются при разрушении метиловым спиртом связей альдегид-C=O...Mg. Поэтому появление полосы ~ 1645 *см*$^{-1}$ у метаноловых форм сопровождается исчезновением полосы ~ 1665 *см*$^{-1}$ и падением интенсивности максимума ~ 1608 *см*$^{-1}$.

Пиридин разрушает межмолекулярные связи у метаноловых форм, в результате исчезают агрегационные максимумы (~ 1680 и ~ 1645 *см*$^{-1}$) и восстанавливается интенсивность поглощения свободных кето- (~ 1705 *см*$^{-1}$) и альдегидных групп (~ 1665 *см*$^{-1}$).

Можно допустить, что структура метаноловых форм хлорофилла *b* аналогична структуре, которая предложена в работе [23] для кристаллического хлорофилла *b*, построенного с включением молекул воды в качестве необходимых компонентов.

Бактериовиридин при испарении эфира образует пленку, обладающую основным максимумом поглощения ~ 750 *нм* [3, 4, 6, 7]. В согласии с данными работы [8], такие пленки обнаруживают интенсивный, резко выраженный максимум в карбонильной области — ~ 1650 *см*$^{-1}$ (рис. 4), который доминирует в спектре при отсутствии поглощения свободных кетогрупп. Два других максимума — ~ 1737 *см*$^{-1}$ (C=O-группы у $C_{(7)}$) и ~ 1608 *см*$^{-1}$ (C=C- и C=N-связи молекул) — являются симметричными, по положению и интенсивности близки к соответствующим максимумам пигмента в растворах (рис. 4, спектр *4*).

Максимум ~ 1650 *см*$^{-1}$ — агрегационный [8] — по положению сходен с максимумом растворов хлорофилла *a* в CCl_4, проявляющимся за счет межмолекулярных связей кето-C=O...Mg [18, 19, 25]. У твердых пленок пирохлорофилла * также наблюдался [23] максимум 1650 *см*$^{-1}$, приписанный тем же связям. Однако он значительно уступает по интенсивности указанному максимуму бактериовиридина. Растворы бактериовиридина в CCl_4, по данным нашей предыдущей работы [8], как и твердые пленки, обладают интенсивным максимумом ~ 1650 *см*$^{-1}$ в карбонильной области ИК-спектра.

Метанол даже после длительного действия на пленки бактериовиридина (несколько часов при 20°) не изменяет их спектры.

Проявление дезагрегации в пленках бактериовиридина можно заметить только после длительной обработки парами пиридина (более 1 *час* при 20°). При этом понижается интенсивность основного максимума, который смещается в высокочастотную область (~ 1660 *см*$^{-1}$), и появляется новый компонент — ~ 1687 *см*$^{-1}$ (рис. 4, спектр *2*). Дальнейшее действие пиридина не приводит к усилению эффекта дезагрегации, и удаление его в вакууме и даже на воздухе в значительной степени восстанавливает исходный вид ИК-спектра (рис. 4, *3*).

Максимум ~ 1687 *см*$^{-1}$ принадлежит кетогруппам, которые освобождаются при частичном разрушении связей кето-C=O...Mg в процессе дезагрегации. Его более низкочастотное положение в пленках по сравнению с растворами пигмента [8] (рис. 4, спектр *4*) связано, по-видимому, с влиянием твердого состояния (кристаллической решетки) на колебания свободных кетогрупп.

---

* Пирохлорофилл — пигмент, получаемый при пиролизе хлорофилла *a* в пиридине, отличающийся от последнего отсутствием карбометоксильной группы у $C_{(10)}$ [25, 34].

Таким образом, бактериовиридин в отличие от хлорофилла *а* обнаруживает предельно высокую степень агрегации без участия экзогенных комплексообразующих аддендов. Форма с поглощением 750 *нм*, имеющая, по-видимому, кристаллическую структуру, образуется за счет непосредственных координационных связей кетогрупп с атомами магния. На образование этих связей, вероятно, расходуются все имеющиеся кетогруппы. Можно думать, что указанные связи не являются единственными в построении агрегированных структур бактериовиридина. Не исключено участие гидроксиалкильной группы I-го пиррольного кольца в образовании межмолекулярных связей при агрегации. Во всяком случае, пирохлорофилл, отличающийся от бактериовиридина отсутствием этой группы, обнаруживает и гораздо меньшую склонность к агрегации [23].

При воздействии пиридина не удается освободить кетогруппы из сферы взаимодействия с магнием в той мере, в какой это можно осуществить в пленках хлорофилла *а*. Полученные результаты согласуются с данными нашей предыдущей работы [8].

Протохлорофилл образует твердую пленку с основным максимумом поглощения ~635 *нм*. На рис. 5 (спектр *1*) представлен ИК-спектр такой пленки, в котором не обнаруживается агрегационного максимума. Полоса ~1738 $см^{-1}$ (эфирные группы $C_{(7)}$ и $C_{(10)}$) по положению сходна с соответствующей полосой растворов хлорофилла *а* [13, 18, 19, 25]. У пленок протохлорофилла она часто асимметрична из-за наличия более или менее явно выраженного плеча с низкочастотной стороны (~1725 $см^{-1}$), что может быть связано с присоединением молекул воды к части карбометоксильных групп, как и в случае пленок хлорофилла *а*.

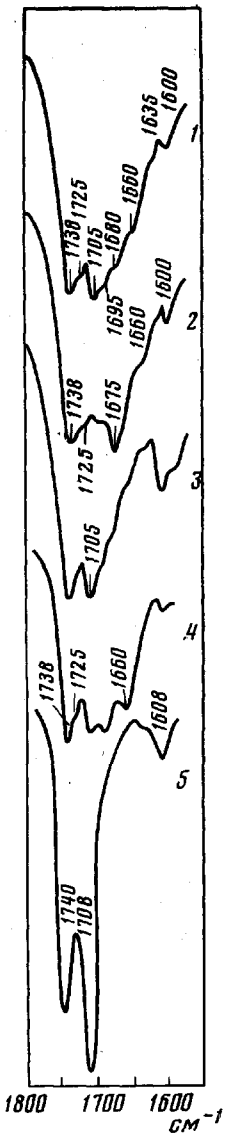


Рис. 5

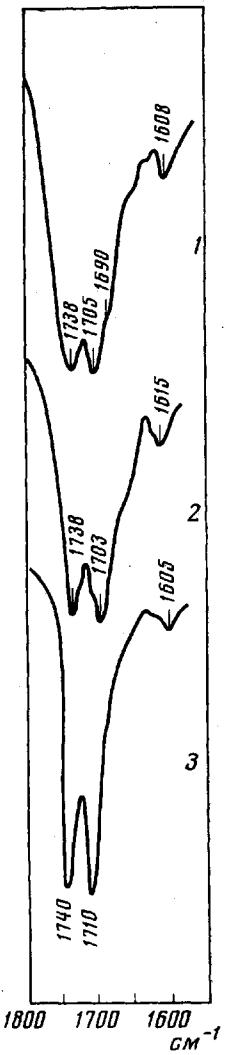


Рис. 6

Рис. 5. ИК-спектры твердых пленок винилпротохлорофилла: *1* — исходная; *2* — после обработки парами метанола (20 *час*, 10°); *3* — после обработки парами пиридина (10 *мин*, 20°); *4* — другой образец пленки после обработки парами метанола; *5* — раствор в серном эфире (~10^2 *М*)

Рис. 6. ИК-спектры безмагниевых пигментов: *1* — твердая пленка протофеофитина; *2* — твердая пленка феофитина *а*; *3* — раствор протофеофитина в серном эфире

Максимум ~ 1705 *см*$^{-1}$ (свободные кетогруппы) доминирует в спектре. Ему, как правило, сопутствуют более длинноволновые компоненты, проявляющиеся в виде плеч (~ 1695, ~ 1680, ~ 1660 *см*$^{-1}$). Последние сохраняются при обработке пленок парами пиридина и не наблюдаются у растворов (рис. 5, спектр *5*) [35]. Их происхождение, возможно, обусловлено влиянием межмолекулярного взаимодействия в твердом состоянии и структуры пленки на колебания кетогрупп.

Максимум ~ 1600 *см*$^{-1}$ (связи C=C и C=N) у пленок, как и у растворов (рис. 5, спектр *5*) [35], имеет низкую относительную интенсивность по сравнению с другими пигментами хлорофиллового типа. Это обусловлено высокой степенью симметрии молекул протохлорофилловых пигментов [35].

Кроме отмеченных максимумов у пленок, как и у растворов (рис. 5, спектр *5*) [35], всегда обнаруживается небольшой компонент ~ 1635 *см*$^{-1}$, не имеющий определенной интерпретации.

Таким образом, твердые пленки протохлорофилла с максимумом поглощения ~ 635 *нм* не обнаруживают четко выраженных агрегационных максимумов в карбонильной области спектра. Уширение спектра пленки по сравнению с раствором, по всей вероятности, обусловлено влиянием межмолекулярного взаимодействия.

Обработка пленок парами пиридина не вызывает изменений в структуре спектра. Дезагрегации по электронным спектрам также не наблюдается.

Обработка парами метанола (более 20 *час* при 10°) приводит к уменьшению поглощения свободных кетогрупп и появлению нового максимума ~ 1675 *см*$^{-1}$ (рис. 5, спектр *2*). У некоторых образцов пленок, обработанных метиловым спиртом, можно было наблюдать более низкочастотное положение вновь возникающего максимума (~ 1660 *см*$^{-1}$) и отчетливое раздвоение максимума свободных кетогрупп (рис. 5, спектр *4*). Удаление метанола в вакууме приводит к восстановлению исходного вида спектра.

Появление максимума ~ 1675 *см*$^{-1}$ у «метаноловых» пленок коррелирует с образованием формы 650 *нм* * в спектре поглощения [9, 10] и обусловлено, по всей вероятности, возникновением межмолекулярных связей кето-C=O...HO(CH_3)...Mg. Обращает внимание более высокочастотное положение этого максимума по сравнению с аналогичным максимумом твердых пленок хлорофилла *а* (~ 1640 *см*$^{-1}$). Это связано, по-видимому, с различием структуры агрегированных форм в обоих случаях и бо́льшим расстоянием между взаимодействующими молекулами в твердых пленках протохлорофилла. В связи с этим следует указать на работу [36], в которой авторы высказали предположение о различии в структуре димеров протохлорофилла и хлорофилла *а* на основании измерения спектров кругового дихроизма в CCl_4.

Обработка пиридином (5—10 *мин* при 20°) вызывает разрушение межмолекулярных связей и освобождение кетогрупп из сферы взаимодействия с магнием. Это проявляется в исчезновении максимума 1675 *см*$^{-1}$ и возрастании интенсивности поглощения свободных кетогрупп в ИК-спектрах (рис. 5, спектр *3*). Максимум 650 *нм* в электронном спектре при этом также исчезает. Вторичная обработка метанолом после удаления пиридина в вакууме приводит к повторению эффекта.

Таким образом, у протохлорофилла, как и у хлорофилла, молекулы метилового спирта приводят к усилению межмолекулярного взаимодействия, включаясь в структуру агрегированных форм.

---

* При обработке метанолом пленок на пластинках NaCl мы не смогли наблюдать заметного образования форм с более длинноволновым поглощением, чем у формы 650 *нм*.

Феофитины — протофеофитин и феофитин *a* — в твердых пленках обладают спектрами, представленными на рис. 6. Можно видеть сходство общей структуры спектров с растворами в полярных растворителях; агрегационные максимумы отсутствуют, доминируют полосы свободных кетогрупп (~ 1705 *см*$^{-1}$). Ранее [11] это было отмечено для бактериофеофитина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образование агрегированных форм у безмагниевых пигментов, как и у хлорофиллов *a* и *b* в присутствии диоксана, осуществляется за счет неспецифического взаимодействия хромофорных π-электронных систем молекул, возникающего при непосредственном контакте плоскостей четырехпиррольных циклов [11, 25, 37]. Такое взаимодействие, по-видимому, определяет те особенности ИК-спектров, которые отличают пленки безмагниевых пигментов от растворов (уширение и изменение относительной интенсивности максимумов, некоторое смещение частот, появление плеч).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительное исследование ИК-спектров агрегированных форм пленок, различающихся по поглощению в видимой области, позволило выявить различные способы межмолекулярного взаимодействия. Реализация того или иного из них определяется включением в структуру низкомолекулярных аддендов и особенностями химического строения молекул пигментов.

Безмагниевые пигменты образуют агрегированные формы, вероятно, за счет непосредственного взаимодействия облаков π-электронов, которое развивается без посредства координационных межмолекулярных связей. Карбонильные группы сохраняются свободными, что выражается в сходстве карбонильных областей спектров пленок и растворов. Такой же способ взаимодействия обнаруживают диоксановые формы хлорофиллов *a* и *b*. «Встраивание» молекул диоксана в структуру пленок Mg-комплексов способствует, по-видимому, определенной ориентации четырехпиррольных циклов и взаимодействию π-электронных систем, которое осуществляется без участия связей кетогрупп с магнием и выражается в появлении максимумов поглощения 690 *нм* (у хлорофилла *a*) и 670, 700 *нм* (у хлорофилла *b*).

У протохлорофилла образование формы с максимумом поглощения 635 *нм* в пленках, по-видимому, также происходит при непосредственном взаимодействии π-электронных систем молекул и не связано с возникновением координационных межмолекулярных связей. Однако в отличие от хлорофилла у протохлорофилла указанный способ взаимодействия реализуется без участия комплексообразующего адденда, чему, возможно, способствует наличие невосстановленной двойной связи в IV-м пиррольном кольце, повышающее симметрию макроцикла.

У хлорофилла *a*, имеющего в отличие от протохлорофилла гидрированную связь $C_{(7)}$—$C_{(8)}$ начальная агрегация в пленках происходит при координационном взаимодействии кетогрупп с магнием. Однако часть кетогрупп при этом сохраняется свободной. Создание формы с длинноволновым поглощением (~ 745 *нм*) связано с расходованием всех имеющихся кетогрупп в межмолекулярных связях, которые образуются через посредство молекул метилового спирта как комплексообразующего адденда (кето-C=O...HO(CH_3)...Mg). Такой же способ взаимодействия установлен и для формы протохлорофилла с поглощением 650 *нм*, хотя при создании этой формы часть кетогрупп остается не связанной.

Хлорофилл *b* имеет дополнительную карбонильную группу во II-м пиррольном кольце; его агрегация (в отсутствие диоксана) протекает при участии этой группировки. Образование формы, поглощающей при 658 *нм*, осуществляется при возникновении координационных связей

между альдегидными группами и магнием (альдегид-C=O...Mg) и не требует участия других карбонилов, в том числе кетогрупп, в межмолекулярном взаимодействии. Увеличение степени агрегации при обработке метанолом, проявляющееся в образовании форм с поглощением при ~675 и ~725 *нм*, происходит при включении альдегидных групп в межмолекулярные связи, которые возникают, по всей вероятности, при посредстве молекул метилового спирта (альдегид-C=O...HO(CH_3)...Mg). Этим связям принадлежит, по-видимому, определяющая роль, хотя в создании указанных форм принимают участие и кетогруппы молекул, которые также вступают во взаимодействие с метиловым спиртом (кето-C=O...HO(CH_3)...Mg).

Бактериовиридин занимает особое место среди всех исследованных Mg-комплексов. Образование высокоагрегированных форм у этого пигмента (750 *нм*) скорее всего не требует включения комплексообразующего адденда и происходит за счет непосредственных координационных связей кетогрупп с магнием (кето-C=O...Mg). Таким связям принадлежит, по-видимому, определяющая роль, и в их образовании участвуют кетогруппы всех молекул. Вместе с тем не исключено, что в агрегации бактериовиридина участвуют гидроксиалкильные группировки I-х пиррольных колец, которые также могут координационно взаимодействовать с магнием [8]. Можно предположить, что межмолекулярному взаимодействию способствует отсутствие фитола, который у бактериовиридина заменен на фарнезол, обладающий более короткой углеродной цепью.

Проведенное в данной работе сравнительное изучение межмолекулярного взаимодействия ряда пигментов по ИК-спектрам поглощения определяет необходимость исследования пространственного расположения молекул в агрегированных формах с использованием других методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Войновская К. К., Кособуцкая Л. М. (1952). Докл. АН СССР, **85**, 389.
2. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., Войновская К. К. (1953). Докл. АН СССР, **92**, 1201.
3. Красновский А. А., Пакшина Е. В. (1959). Докл. АН СССР, **127**, 913.
4. Красновский А. А., Быстрова М. И., Пакшина Е. В. (1966). Докл. АН СССР, **167**, 691.
5. Красновский А. А., Быстрова М. И. (1967). Докл. АН СССР, **174**, 480.
6. Быстрова М. И., Красновский А. А. (1967). Мол. биол., **1**, 362.
7. Быстрова М. И., Красновский А. А. (1968). Мол. биол., **2**, 847.
8. Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н. (1969). Докл. АН СССР, **189**, 885.
9. Красновский А. А., Быстрова М. И., Ланг Ф. (1971). Докл. АН СССР, **201**, 1485.
10. Быстрова М. И., Ланг Ф., Красновский А. А. (1972) Мол. биол., **6**, 77.
11. Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н. (1972). Докл. АН СССР, **204**, 1473.
12. Ерохин Ю. Е., Синегуб О. А. (1970). Мол. биол., **4**, 401.
13. Holt A. S., Jacobs E. E. (1955). Plant Physiol., **30**, 553.
14. Сидоров А. Н., Теренин А. Н. (1960). Оптика и спектроскопия, **8**, 482.
15. Карякин А. В., Кутюрин В. М., Чибисов А. К. (1961). Докл. АН СССР, **140**, 1321.
16. Карякин А. В., Чибисов А. К. (1962). Биофизика, **7**, 561.
17. Холмогоров В. Е., Сидоров А. Н., Теренин А. Н. (1962). Докл. АН СССР, **147**, 954.
18. Katz J. J., Closs G. L. et al. (1963). J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3801.
19. Anderson A. F. H., Calvin M. (1964). Arch. Biochem. Biophys., **107**, 251.
20. Sherman G., Wang S. F. (1967). Photochem. Photobiol., **6**, 239.
21. Ballschmiter K., Katz J. J. (1968). Nature, **220**, 1281.
22. Ballschmiter K., Cotton T. M., Strain H. H., Katz J. J. (1969). Biochim. Biophys. Acta, **180**, 347.
23. Ballschmiter K., Katz J. J. (1972). Biochim. Biophys. Acta, **256**, 307.
24. Ballschmiter K., Katz J. J. (1969). J. Amer. Chem. Soc., **91**, 2661.
25. Katz J. J., Dougherty R. C., Boucher L. J (1966). In: The Chlorophylls, L. P. Vernon, G . R. Seely, eds, p. 185, Acad. Press, N. Y.

26. Красновский А. А., Брин Г. П. (1954). Докл. АН СССР, **95**, 611.
27. Белавцева Е. М., Воробьева Л. М., Красновский А. А. (1959). Биофизика, **5**, 521.
28. Sherman G., Fujimori E. (1964). Arch. Biochem. Biophys., **130**, 624.
29. Katz J. J., Strain H. H., Leussing D. L., Dougherty R. C. (1968). J. Amer. Chem. Soc., **90**, 784.
30. Nakamura S., Meiboom S. (1967). J. Amer. Chem. Soc., **89**, 1765.
31. Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А., Красновский А. А. (1950). Докл. АН СССР, **70**, 261.
32. Красновский А. А., Брин Г. П. (1953). Докл. АН СССР, **89**, 527.
33. Сидоров А. Н. (1966). Успехи химии, **35**, 366.
34. Pennington F. C., Strain H. H., Svec V. A., Katz J. J. (1964). J. Amer. Chem. Soc., **86**, 1418.
35. Houssier C., Sauer K. (1969). Biochim. Biophys. Acta, **172**, 476.
36. Houssier C., Sauer K. (1970). J. Amer. Chem. Soc., **92**, 779.
37. Closs G. L., Katz J. J. et al. (1963). J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3809.

Поступила в редакцию
19.VII.1974 г.

THE STUDY OF MOLECULAR ARRANGEMENT OF AGGREGATED FORMS OF CHLOROPHYLL AND ITS ANALOGUES

M. I. BYSTROVA, I. N. MALGOSHEVA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Infrared spectra (in the region of 1800—1600 cm^{-1}) of aggregated protochlorophyll, chlorophyll *a* and *b*, bacterioviridin, protopheophytin, pheophytin *a* (in the solid films) with different absorption spectra were studied. The formation of various types of aggregates is due to the realization of different modes of intermolecular bonding. The mode of interaction depends upon the chemical structure of the pigment and upon the inclusion of low-molecular ăddenda into the structure of aggregates. The forms 677 *nm* of chlorophyll *a* and 658 *nm* of chlorophyll *b* appear when the coordination bonds between the keto groups of the cyclopentanone ring and central magnesium atom are formed. The longwave forms of chlorophyll *a* (745 *nm*) and chlorophyll *b* (675 *nm*, 725 *nm*) are formed when methanol molecules are involved in the intermolecular bonds. The coordination bonds between C=O and magnesium atom in the longwave aggregate of bacterioviridin (750 *nm*) are observed without participation of the low-molecular addenda. The formation of the protochlorophyll 635 *nm* form and aggregated forms of magnesium-free pigments occurs without participation of carbonyl groups probably by direct interaction between the π-electron systems of molecules. The frequencies of carbonyl groups of the solid films in dioxane vapours causing absorption maxima at 690 *nm* (chlorophyll *a*) and 670 *nm* (chlorophyll *b*) are not shifted as compared to the dissolved pigments. Thipoints to the intermolecular interaction without participation of C=O groups.

УДК 581.17

ИЗМЕНЕНИЯ ВЫХОДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА ПРИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ БАКТЕРИОФЕОФИТИНА В ХРОМАТОФОРАХ ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

В. В. КЛИМОВ, В. А. ШУВАЛОВ, И. Н. КРАХМАЛЕВА, Н. В. КАРАПЕТЯН и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт фотосинтеза АН СССР, Пущино
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Показано, что освещение хроматофоров серных бактерий *Chromatium minutissimum* при E_h среды —200÷—620 *мв*, когда фотоокисление пигмента P_{890} полностью подавлено, вызывает уменьшение выхода флуоресценции бактериохлорофилла, обратимое в темноте. В этих условиях обнаруживается обратимое фотовосстановление бактериофеофитина (выцветание полос поглощения при 543 и 760 *нм* и появление полосы при 650 *нм*), сопровождающееся коротковолновым сдвигом полосы поглощения при 800 *нм*. В качестве возможного объяснения этих эффектов делается предположение о функционировании бактериофеофитина как первичного акцептора электрона в реакционных центрах серных бактерий. Фотовосстановление бактериофеофитина, сопровождающееся уменьшением выхода флуоресценции, наблюдается также у других серных бактерий *Thiocapsa roseopersicina* и *Ectothiorodospira shaposhnikovii*, но не обнаруживается у несерных бактерий *Rhodospirillum rubrum* и *Rhodopseudomonas spheroides*, что рассматривается как доказательство различия в функциональной организации реакционных центров этих двух групп бактерий.

Реакционные центры фотосинтезирующих пурпурных бактерий построены по общему принципу и включают в себя первичный донор электрона — агрегат бактериохлорофилла, P_{870} [1—2], и акцептор электрона, функции которого осуществляет, по-видимому, убихинон [2]. Как фотоокисление первичного донора электрона [2—5], так и фотовосстановление акцептора [2, 5] приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции бактериохлорофилла.

Однако между отдельными видами бактерий имеются определенные различия в свойствах реакционных центров. Такое различие можно проследить между центрами серных бактерий *Chromatium* и несерных *R. rubrum* (или *R. spheroides*): по положению инфракрасного максимума поглощения первичного донора [1], по величине окислительно-восстановительного потенциала (E_m) первичного донора [1, 6] и акцептора электрона [1, 7], по составу выделенных препаратов реакционных центров [2, 8] и по способности окислять цитохром при низкой температуре [9]. Различие между фотосистемами этих бактерий проявляется также в том, что при низком окислительно-восстановительном потенциале среды (E_h) у *Chromatium* наблюдается светоиндуцированное уменьшение квантового выхода флуоресценции бактериохлорофилла [10], которое не обнаруживается у *R. rubrum* [5].

Выяснение природы различий в функциональной организации реакционных центров серных и несерных бактерий способствовало бы более глубокому пониманию механизма первичных процессов фотосинтеза. Кроме того, исследование спектральных эффектов при низких значениях

E_h позволило бы выявить возможность функционирования более низкопотенциального акцептора электрона, чем убихинон. С этой целью в данной работе было проведено сравнительное исследование фотопревращений реакционных центров ряда серных и несерных бактерий при различных E_h, благоприятных для накопления окисленного донора (P_{870}, P_{890}) или восстановленного акцептора электрона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили главным образом на хроматофорах серных бактерий *Chromatium minutissimum* и несерных бактерий *Rhodospirillum rubrum*, выделенных, как ранее [5, 10]. Для подавления эффектов, связанных с возникновением трансмембранного потенциала при освещении [11], хроматофоры обрабатывали 0,05%-ным тритоном X-100. Пигмент-белковые комплексы B890 и B850 *Chromatium*, предоставленные нам А. А. Москаленко, выделялись, как ранее [12].

Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции ($\Delta\Phi$) и изменения поглощения (ΔA) измеряли в 10-*мм* кювете с помощью фосфороскопической установки, описанной ранее [5]. Цилиндрический фосфороскоп разделял во времени действующий и измерительный свет темновым интервалом в 2 *мсек*. Флуоресценцию бактериохлорофилла (λ>900 *нм*) возбуждали монохроматическим светом 600 или 770 *нм*. В качестве действующего использовали свет 720—1000 *нм* с интенсивностью $9\cdot10^4$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$.

Зависимость фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ и ΔA хроматофоров от величины E_h среды измеряли с помощью герметичной кюветы с платиновым и каломельным электродами в анаэробных условиях. Измеряемые значения E_h насыщенного раствора хингидрона при различных pH среды совпадали со справочными [13] с точностью 2—5 *мв*. Все измерения проводили в 0,05 *М* трис-HCl-буфере pH 7,5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Добавление феррицианида к хроматофорам *R. rubrum* вызывает увеличение «темнового» уровня флуоресценции (рис. 1, *А*). Это сопровождается уменьшением фотоиндуцированных $\Delta\Phi$, так что сумма темновой флуоресценции и световых $\Delta\Phi$ почти не изменяется. Параллельно с уменьшением $\Delta\Phi$ при повышении E_h среды от +250 до +450 *мв* происходит уменьшение фотоиндуцированных ΔA при 870 *нм*, связанных с фо-

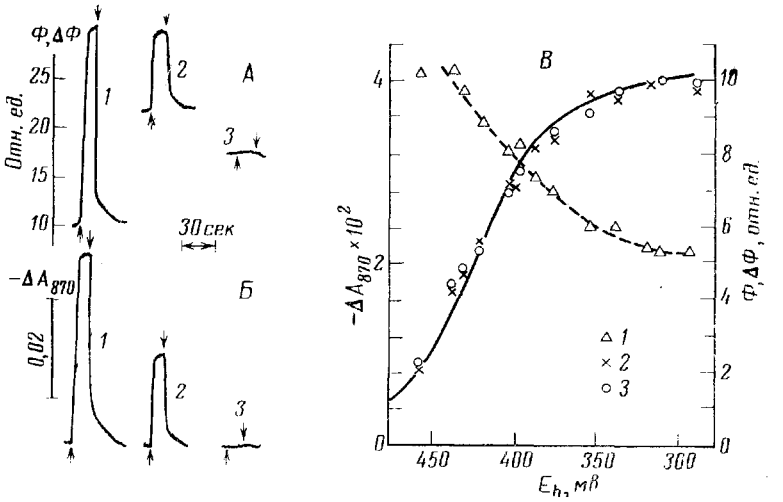


Рис. 1. Зависимость фотоиндуцированных спектральных изменений хроматофоров *Rhodospirillum rubrum* от E_h среды

А, *Б* — кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции ($\Delta\Phi$) с λ>900 *нм* и изменений поглощения (ΔA) при 870 *нм* при E_h = +310 *мв* (1 *мМ* ферроцианид) — *1*; при E_h = +440 *мв* (1,6 *мМ* феррицианид и 0,4 *мМ* ферроцианид) — *2*; при E_h = −430 *мв* (0,5 *мг/мл* дитионита) — *3*. *В* — зависимость величины «темновой» флуоресценции (*1*), фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ (*2*) и изменений поглощения при 870 *нм* (*3*) от E_h среды. Сплошная кривая — теоретическая зависимость по уравнению Нернста для одноэлектронного перехода с E_m = +420 *мв*. Окислительно-восстановительное титрование проводили с помощью растворов (2 *мМ*) ферри/ферроцианида. Флуоресценцию возбуждали светом 600 *нм*. Поглощение образца при 870 *нм* составляло 0,9 ед. оптической плотности

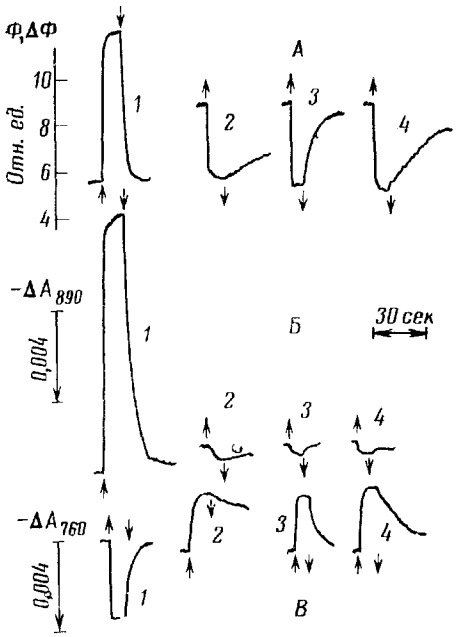


Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции с $\lambda > 900$ *нм* (*А*) и изменений поглощения при 890 *нм* (*Б*) и 760 *нм* (*В*) хроматофоров *Chromatium* при различных E_h среды

1 — $E_h = +310$ *мв*; *2* — $E_h = -300$ *мв* (в отсутствие медиаторов); *3* — $E_h = -300$ *мв* (в присутствии 2 *мкМ* нейтрального красного); *4* — $E_h = -450$ *мв* (в присутствии 2 *мкМ* нейтрального красного). Флуоресценцию возбуждали светом 770 *нм*. Поглощение образца при 890 *нм* составляло 0,8 ед. оптической плотности

Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения «свет минус темнота» хроматофоров *Chromatium* в присутствии 1 *мкМ* метилвиологена при $E_h = +300$ *мв* (*А*) и $E_h = -450$ *мв* (*Б*)

Поглощение образца при 890 *нм* составляло 0,8 ед. оптической плотности

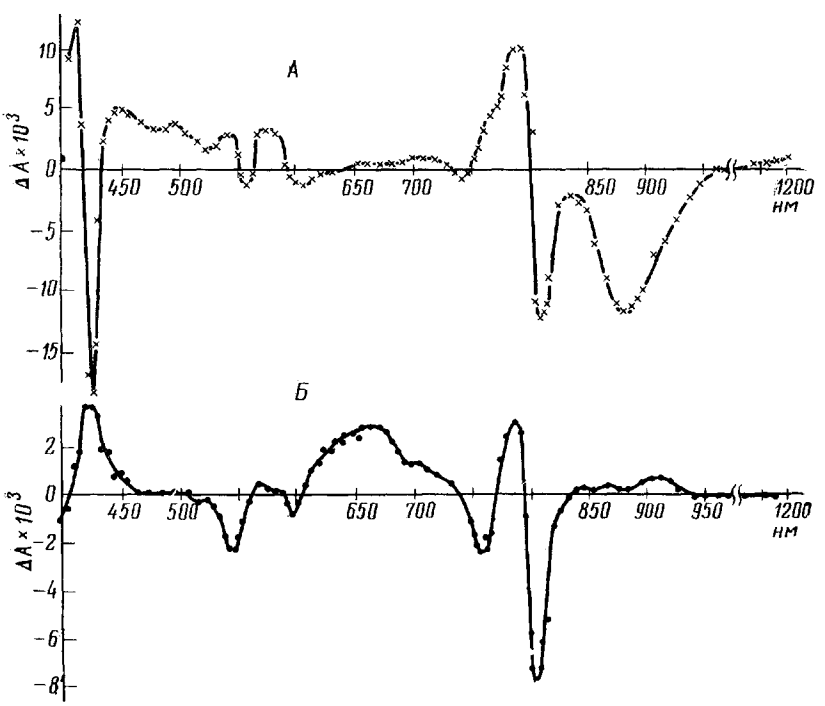


Рис. 3

тоокислением P_{870} (рис. 1, *Б*). При этом экспериментальные точки укладываются на теоретическую кривую уравнения Нернста для одноэлектронного перехода, когда E_m пары P^+_{870}/P_{870} равно $+430$ *мв* (рис. 1, *В*). При добавлении феррицианида к хроматофорам *Chromatium* (в отличие от хроматофоров *R. rubrum*) темновая флуоресценция и световые ΔФ практически полностью подавлялись, что связано с деструктивным окислением пула бактериохлорофилла, описанным ранее [14].

При $E_h = +300 \pm 10$ *мв* у хроматофоров *Chromatium* наблюдается фотоиндуцированное увеличение выхода флуоресценции (рис. 2), соответствующее по кинетике и зависимости от интенсивности действующего света фотоокислению P_{890}. При добавлении дитионита в анаэробных условиях ($E_h = -300 \pm 20$ *мв*) происходит увеличение темнового уровня флуоресценции, связанное с восстановлением первичного акцептора электрона [2, 5, 7, 10], а при включении действующего света вместо увеличения наблюдается уменьшение флуоресценции, обратимое в темноте (рис. 2). В этих условиях изменения поглощения при 890 *нм*, связанные

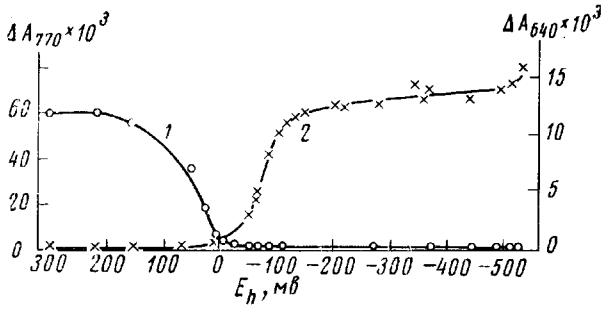


Рис. 4. Зависимость от E_h среды фотоокисления P_{890}, регистрируемого по ΔA_{770} в изобестической точке спектра фотовосстановления бактериофеофитина (*1*) и фотовосстановления бактериофеофитина, регистрируемого по ΔA_{640} в изобестической точке фотоокисления P_{890} (2), у хроматофоров *Chromatium*

E_h в области $+300 \div -530$ *мв* задавали с помощью аскорбата (0,1—1 *мМ*) и дитионита (0,2—2,0 *мг/мл*) в присутствии следующих медиаторов (в скобках указаны значения нормального редокс-потенциала по Кларку [13]): 2,6-дихлорфенолиндофенол (+217 *мв*), феназинметасульфат (+60 *мв*), индиготетрасульфонат калия (—46 *мв*), индигодисульфонат калия (—124 *мв*), рибофлавин (—208 *мв*), нейтральный красный (—325 *мв*), бензилвиологен (—360 *мв*) и метилвиологен (—440 *мв*); концентрация каждого из медиаторов 1 *мкМ*. При понижении E_h от —530 *мв* до —620 *мв* с помощью 0,2 *М* NaOH pH среды изменяли от 7,5 до 10,5

с фотоокислением P_{890}, не обнаруживаются, но появляются новые по спектру изменения поглощения, совпадающие по кинетике с фотоиндуцированным уменьшением флуоресценции (рис. 2 и 3). Добавление окисленного нейтрального красного при E_h среды —300 *мв* вызывает ускорение темновой релаксации отрицательных $\Delta\Phi$ и соответствующих им ΔA. При последующем понижении E_h до —450 *мв*, обусловливающем восстановление нейтрального красного, время 50%-ной темновой релаксации $\Delta\Phi$ и ΔA вновь возрастает от 2 до 15 *сек* (рис. 2), что свидетельствует о восстановительной природе этих фотоиндуцированных спектральных изменений.

В отличие от известного спектра фотоокисления P_{890} и цитохрома *с* при $E_h = +300$ *мв* (рис. 3, *А*) дифференциальный спектр «свет минус темнота» хроматофоров *Chromatium* при $E_h = -450$ *мв* характеризуется выцветанием полос поглощения бактериофеофитина при 543 и 760 *нм* и бактериохлорофилла при 595 и 805 *нм* (рис. 3, *Б*). При этом появляются полосы при 430 и 790 *нм* и широкая полоса при 650 *нм* (рис. 3, *Б*).

Фотовыцветание бактериофеофитина наблюдается при тех E_h среды, при которых фотонакопление окисленного P_{890} уже не обнаруживается (рис. 4). Величина фотоиндуцированного увеличения поглощения при 640 *нм* (в изобестической точке спектра фотоокисления P_{890}) возрастает при понижении E_h от 0 до —150 *мв* и практически не изменяется при дальнейшем понижении E_h до —530 *мв* при pH 7,5 (рис. 4) и до —620 *мв* при pH 10,5. Такая же зависимость от E_h среды наблюдалась для ΔA при 760 *нм*. Из этих данных следует, что окислительно-восстановительный потенциал бактериофеофитина, восстанавливающегося при освещении, лежит в области ниже —620 *мв*.

Световые $\Delta\Phi$ и ΔA при $E_h = -450$ *мв* наблюдались при освещении как светом $\lambda > 720$ *нм*, так и светом $\lambda > 850$ *нм*, поглощаемым длинноволновой формой бактериохлорофилла. Проявляются они при гораздо бóльших интенсивностях света, чем ΔA и $\Delta\Phi$, связанные с фотоокислением P_{890}. Так, интенсивность света, необходимая для получения 50%-ного сигнала, на два порядка больше для ΔA и $\Delta\Phi$ при $E_h = -450$ *мв*, чем для ΔA и $\Delta\Phi$ при $E_h = +300$ *мв* (рис. 5). Положительные $\Delta\Phi$ хроматофоров *Chromatium*, связанные с фотоокислением P_{890}, наблюдались во всей области температур от 20 до —196° и были полностью обратимы в темноте. Отрицательные $\Delta\Phi$ при $E_h = -450$ *мв* подавлялись наполовину

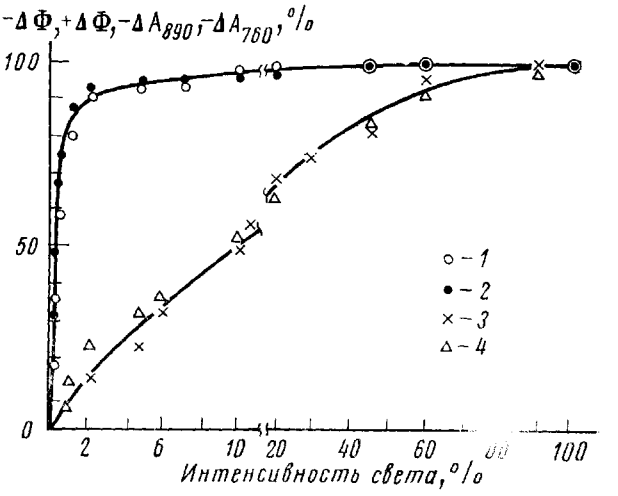


Рис. 5. Зависимость от интенсивности действующего света фотоиндуцированного увеличения флуоресценции (*1*) и ΔA_{890} (*2*) при $E_h = +310$ *мв*, а также фотоиндуцированного уменьшения флуоресценции (*3*) и ΔA_{760} (*4*) при $E_h = -450$ *мв* хроматофоров *Chromatium* в присутствии 1 *мкМ* метилвиологена

Максимальная интенсивность (100%) света 720—1000 *нм* составляла $9 \cdot 10^4$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$

при температуре —20° и не наблюдались при температуре ниже —40°.

Фотореакция при $E_h = -450$ *мв* обнаруживалась только на тех объектах, которые обладали фотоактивным P_{890}. Так, при термоинактивации хроматофоров *Chromatium* наблюдалось параллельное подавление положительных и отрицательных фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ в области температур от +60 до +80°. Кроме того, отрицательные $\Delta\Phi$ и фотовыцветание бактериофеофитина наблюдались на пигмент-белковых комплексах B890 *Chromatium* и не обнаруживались на комплексах B850, не содержащих фотоактивного P_{890}.

Реакция фотовыцветания бактериофеофитина и светового уменьшения флуоресценции при $E_h \leqslant 300$ *мв* наблюдались также на хроматофорах и клетках серных бактерий *Thiocapsa roseopersicina* и *Ectothiorodospira shaposhnicovii*. Добавление дитионита к хроматофорам (и клеткам) несерных бактерий *R. rubrum* (рис. 1) и *R. spheroides* вызывало увеличение темнового уровня флуоресценции, однако при освещении никаких обратимых спектральных изменений не было обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фотоиндуцированное увеличение квантового выхода флуоресценции *Chromatium* и *R. rubrum* при E_h среды $+300 \div +450$ *мв* связано с фотоокислением бактериохлорофилла реакционного центра, что доказывается корреляцией между окислением P_{870} (P_{890}) и увеличением квантового выхода флуоресценции в различных экспериментальных условиях.

При низких значениях E_h среды ($-300 \div -620$ *мв*) обнаруживается существенное различие в свойствах представленных здесь серных и несерных бактерий, которое заключается в наличии фотоиндуцированных изменений флуоресценции и поглощения у первой группы и отсутствии

их во второй группе бактерий. Это различие связано, по-видимому, с особенностями организации реакционных центров серных и несерных бактерий, поскольку фотореакция серных бактерий при $E_h \leqslant -300$ *мв* наблюдается только на объектах, содержащих фотоактивный P_{890}.

Результаты спектральных исследований показывают, что эта реакция заключается в обратимом фотовосстановлении бактериофеофитина, так как наблюдается выцветание полос поглощения при 543 и 760 *нм* и возникновение широкой полосы в области 620—680 *нм*, что характерно для восстановления бактериофеофитина в растворе [15—17]. Уменьшение поглощения при 805 *нм* и появление полосы при 790 *нм* связано, по-видимому, со сдвигом полосы поглощения бактериохлорофилла при 800 *нм*. Причиной такого сдвига может быть электростатическое поле восстановленного бактериофеофитина (по аналогии с фотоокислением P_{890} [1, 2, 11]). Возможно, фотоиндуцированное уменьшение флуоресценции бактериохлорофилла в этих условиях также является результатом появления заряда на бактериофеофитине.

Так как фотовосстановление бактериофеофитина идет в условиях, когда восстановлен «первичный» акцептор электрона (убихинон), можно полагать, что бактериофеофитин в реакционных центрах серных бактерий, в отличие от представленных здесь несерных бактерий, является промежуточным звеном в переносе электрона от возбужденного P_{890} к убихинону. В то же время низкий квантовый выход, а также отсутствие фотоиндуцированного уменьшения флуоресценции при низких температурах могут указывать на побочный характер данной фотореакции активного центра серных бактерий. Вполне возможно, однако, что квантовый выход накопления восстановленного бактериофеофитина понижен в результате быстрой рекомбинации продуктов первичной фотореакции, окисленного P_{890} и восстановленного бактериофеофитина в отсутствие окисленного «вторичного» акцептора электрона — убихинона. В этом случае зависящие от температуры фотоиндуцированные $\Delta\Phi$ могут в действительности представлять собой фотоиндуцированное уменьшение выхода рекомбинационной люминесценции, связанное с фотовосстановлением бактериофеофитина. Для выяснения действительного механизма фотовосстановления бактериофеофитина необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, фотореакция активного центра хроматофоров при E_h среды ниже —300 *мв*, сопровождающаяся обратимым фотовосстановлением бактериофеофитина и уменьшением выхода флуоресценции, характерна только для серных бактерий *C. minutissimum*, *Th. roseopersicina* и *Ect. shaposhnikovii* и не обнаруживается у представленных здесь несерных бактерий, что подчеркивает различие в функциональной организации реакционных центров этих двух групп бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kuntz J. D., Loach P. A., Calvin M.*, Biophys. J., *4*, 227, 1964.
2. *Clayton R. K., Szuts E. Z., Fleming H.*, Biophys. J., *12*, 64, 1972.
3. *Карапетян Н. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *171*, 1201, 1966.
4. *Clayton R. K.*, Photochem. Photobiol., *5*, 807, 1966.
5. *Климов В. В., Крахмалева И. Н., Шувалов В. А., Карапетян Н. В., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *221*, 1207, 1975.
6. *Cuzanovich M. A., Bartsch R. G., Kamen M. D.*, Biochim. et biophys. acta, *153*, 397, 1968.
7. *Cramer W. A.*, Biochim. et biophys. acta, *189*, 54, 1969.
8. *Lyn L., Thornber J. Rh.*, Photochem. Photobiol., *22*, 37, 1975.
9. *Kihara T., Chance B.*, Biochim. et biophys. acta, *189*, 116, 1969.
10. *Карапетян Н. В., Климов В. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *201*, 1244, 1971.
11. *Барский Е. Л., Самуилов В. Д.*, Биохимия, *37*, 1005, 1972.
12. *Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А.*, Докл. АН СССР, *212*, 1195, 1973.

13. *Clark W. M.*, Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, Williams and Wilkins, Baltimore, 1960.
14. *Beugeling T.*, Biochim. et biophys. acta, *153*, 143, 1968.
15. *Красновский А. А., Войновская К. К.*, Докл. АН СССР, *81*, 879, 1951.
16. *Пакшина Е. В., Красновский А. А.*, Биофизика, *19*, 238, 1974.
17. *Возняк В. М., Ким В. А., Евстигнеев В. Б.*, Ж. прикл. спектроскопии, *23*, 54, 1975.

Поступила в редакцию
12.I.1976

BACTERIOCHLOROPHYLL FLUORESCENCE CHANGES RELATED TO THE BACTERIOPHEOPHYTIN PHOTOREDUCTION IN THE CHROMATOPHORES OF PURPLE SULFUR BACTERIA

V. V. KLIMOV, V. A. SHUVALOV, I. N. KRAKHMALEVA, N. V. KARAPETYAN and A. A. KRASNOVSKY

*Institute of Photosynthesis, USSR Academy of Sciences, Pushchino;
A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow*

It is shown that illumination of chromatophores of sulfur bacterium *Chromatium minutissimum* at E_h of the medium —200 *mV*÷ —620 *mV* (when the photooxidation of pigment P_{890} is completely inhibited) induces a decrease in bacteriochlorophyll fluorescence yield, reversible in the dark. Under these conditions a reversible photoreduction of bacteriopheophytin is detected (bleaching of absorption bands at 543 and 760 *nm* and development of a band at 650 *nm*), which is accompanied by a blue shift of the absorption band at 800 *nm*. As a possible interpretation of these effects the suggestion is made on the function of bacteriopheophytin as a primary electron acceptor in reaction centers of bacteria. The bacteriopheophytin photoreduction, followed by a decrease in fluorescence yield, is also observed in other sulfur bacteria, *Thiocapsa roseopersicina* and *Ectothiorodospira shaposhnikovii*, but it is not detected in nonsulfur bacteria, *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas spheroides*. This is considered as an evidence for the difference in the functional organization of the reaction centers of these two groups of bacteria.

Доклады Академии наук СССР
1976. Том 229, № 4

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Г. П. БРИН, В. В. НИКАНДРОВ

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ КИСЛОРОДА И ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ ФОТОКАТАЛИЗАТОРАХ

Мы описали фотообразование кислорода и фотовосстановление метилвиологена на неорганических фотокатализаторах — электронных полупроводниках ([1–4]). Эти реакции моделируют аналогичные фотопроцессы, идущие в хлоропластах. В отличие от хлорофилла неорганические фотокатализаторы играют двоякую роль: фотосенсибилизатора, преобразующего энергию света, и катализатора, на поверхности которого происходит рекомбинация первичных фотопродуктов.

Около 50 лет тому назад в лаборатории Баура ([5]) наблюдалось образование перекиси водорода при освещении ультрафиолетовым светом водной суспензии окиси цинка. При этом кислород воздуха играл роль конечного акцептора электрона ([6]). Аналогичную реакцию наблюдали в хлоропластах: Мелер ([7]) показал, что акцептором электрона при реакции Хилла может служить кислород, который восстанавливается до перекиси водорода. При этом наблюдалось промежуточное образование супероксид-радикала ([8]).

Целью настоящей работы было исследование способности неорганических фотокатализаторов к фотосенсибилизированному восстановлению кислорода (до супероксид-радикала и перекиси водорода) и восстановлению водородного иона, т. е. к реакциям, моделирующим аналогичные процессы в хлоропластах.

Применялись препараты окислов цинка и титана те же, что и в предыдущих исследованиях ([1–4]). Использовался чувствительный метод определения перекиси водорода, основанный на измерении хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы ([9]). Опыты проводились в трубке Тунберга; в нижней части трубки находилась реагирующая система, в головке трубки — люминесцирующая смесь, которая состояла из $0{,}5\cdot10^{-6}\,M$ пероксидазы хрена (фирма «Реанал»), $10^{-4}\,M$ люминола и $1{,}5\cdot10^{-2}\,M$ двузамещенного фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4). В нижней части трубки проводили фотохимический опыт — реагирующую систему освещали линиями ртути 365 нм лампой СВД-120А интенсивностью 10^5 эрг/см$^2\cdot$сек. После освещения сливали из головки трубки 2 мл люминесцирующей смеси в трубку и переносили в камеру фотоумножителя ФЭУ-38 для регистрации интенсивности хемилюминесценции люминола. Сигнал усиливался с помощью потенциометра ЛПУ-01 и регистрировался самописцем ЭПП-09.

Измерение водорода осуществлялось с помощью газового хроматографа на установке, описанной ранее ([10]), в кювете, которая освещалась линиями ртути 365 нм. Водная суспензия 1 мл фотокатализатора продувалась в кювете аргоном для удаления кислорода, после чего добавляли 0,1 мл раствора гидрогеназы и следили за выделением водорода при освещении.

Мы подтвердили данные ([5]) об образовании перекиси водорода при освещении водной суспензии окиси цинка в присутствии кислорода воздуха. В этих условиях двуокись титана также образует перекись водорода в количестве, на два порядка меньшем, чем в опытах с окисью цинка

(табл. 1). Следует отметить, что ранее не удавалось обнаружить образование перекиси водорода на двуокиси титана, хотя фотосенсибилизирующее действие этого соединения при образовании перекисей непредельных жирных кислот известно давно ([11]).

Контрольные опыты с различной концентрацией перекиси водорода в присутствии окислов цинка и титана показали, что в первые секунды после приливания люминесцирующей смеси величина сигнала (интенсивность хемилюминесценции) была пропорциональна концентрации перекиси водорода. Однако при стоянии наблюдалось каталитическое разложение водных растворов перекиси водорода на использованных

Таблица 1

Образование перекиси водорода при освещении водной суспензии окиси цинка и двуокиси титана (5 мг) в 4 мл воды в присутствии метилвиологена (MB^{2+}) (концентрация 10^{-4} *M*) и без него. Освещение 1 мин.

Фотокатализаторы	Образование перекиси водорода, *M*	
	без MB^{2+}	с MB^{2+}
Освещение и измерение на воздухе		
Окись цинка	$2{,}0 \cdot 10^{-5}$	$8{,}0 \cdot 10^{-4}$
Двуокись титана	$1{,}7 \cdot 10^{-6}$	$7{,}0 \cdot 10^{-5}$
Без катализатора	0,0	0,0
Освещение и измерение в вакууме		
Окись цинка	0,0	0,0
Двуокись титана	0,0	0,0
Освещение в вакууме, измерение на воздухе		
Окись цинка	0,0	$6{,}2 \cdot 10^{-6}$
Двуокись титана	0,0	$8{,}0 \cdot 10^{-6}$

фотокатализаторах. Оказалось, что наиболее активно разлагает перекись водорода вольфрамовая кислота; действительно, в случае применения этого соединения фотообразования перекиси водорода не удалось наблюдать.

Известно, что при добавлении метилвиологена к суспензии хлоропластов образование перекиси водорода при освещении возрастает за счет взаимодействия восстановленного метилвиологена с кислородом воздуха ([8]). Мы нашли ранее ([4]), что окислы цинка и титана способны к фотосенсибилизации восстановления метилвиологена, поэтому следовало ожидать, что в присутствии этого соединения будет возрастать количество образующейся перекиси водорода. Действительно, в присутствии метилвиологена (10^{-4} *M*) количество перекиси водорода при освещении значительно увеличивается (табл. 1). В отсутствие кислорода перекись водорода не образуется, также не удается наблюдать образования перекиси водорода в темноте.

Как уже указывалось ([4]), освещение водной суспензии фотокатализатора приводит к восстановлению метилвиологена. Эквимолярное количество перекиси водорода образуется после пуска кислорода воздуха. Если освещение суспензии фотокатализатора с метилвиологеном проводится в присутствии воздуха, то количество образованной перекиси водорода возрастает на 1—2 порядка по сравнению с «одноактным» раздельным фотовосстановлением метилвиологена и последующим пуском воздуха (табл. 1).

В табл. 1 приведены данные, полученные при 1 мин. освещения. Более длительное освещение приводит к вторичному каталитическому раз-

ложению перекиси водорода, при этом наблюдается нарушение эквимолярности количества восстановленного метилвиологена и образованной перекиси водорода (рис. 1).

Элементарный механизм этих реакций можно представить следующим образом ([3]): при действии кванта света на кристаллическую решетку фотокатализатора электрон переходит в зону проводимости, оставляя за собой «дырку». На фазовой границе электрон (е) и дырка (+) реагируют с потенциальными донорами и акцепторами электрона.

В присутствии воздуха происходит фотовосстановление кислорода электроном (е), и этот элементарный акт уравновешен взаимодействием ионов OH^- с дыркой (+) на поверхности фотокатализатора:

$$(e) + O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-} \qquad (+) + OH^- \rightarrow OH^{\cdot}$$

$$O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot} \qquad 2OH^{\cdot} \rightarrow H_2O + {}^1/_2\,O_2$$

$$2HO_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Итоговая реакция $H_2O + {}^1/_2\,O_2 \rightarrow H_2O_2$

В присутствии метилвиологена (MB^{2+}) накладывается реакция его восстановления: $(e) + MB^{2+} \rightarrow MB^{+\cdot}$, которая, вероятно, более эффективна, чем реакция (е) с кислородом. Далее следуют элементарные процессы:

$$MB^{+\cdot} + O_2 \rightarrow MB^{2+} + O_2^{\cdot-};$$

$$O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}; \qquad 2HO_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + {}^1/_2\,O_2.$$

При этом нельзя исключить возможность гидроксилирования метилвиологена образованными OH-радикалами ([13]).

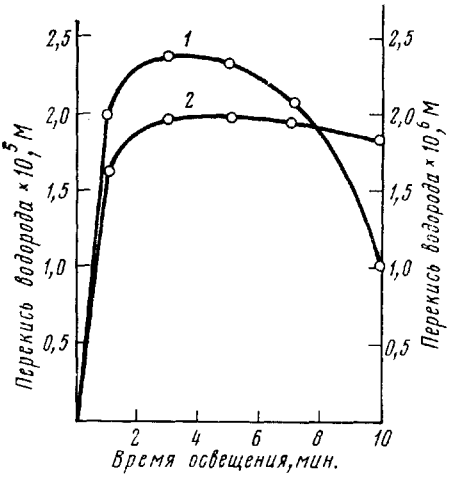


Рис. 1. Зависимость скорости образования перекиси водорода от времени освещения водных суспензий: окиси цинка (*1*, левая ордината) и двуокиси титана (*2*, правая ордината) в присутствии кислорода воздуха

В предыдущей работе было описано выделение водорода в системах, содержащих доноры электрона: хлорофилл, метилвиологен и препараты гидрогеназы ([14]). Количественное фотовосстановление метилвиологена, обладающего потенциалом $E_0' = -0{,}44$ в, с помощью фотокатализаторов указывает на доведение системы до потенциала водородного электрона, поэтому при введении соответствующего катализатора следовало ожидать выделения молекулярного водорода.

Действительно, введение гидрогеназы в водную суспензию окиси цинка и двуокиси титана приводит при освещении к выделению молекулярного водорода. В этом случае опыт проводили следующим образом: 1 мл водной суспензии фотокатализатора (5 мг) продували аргоном до полного удаления кислорода, после чего добавляли 0,1 мл водного раствора гидрогеназы (0,62 мг в расчете на белок, удельная активность 9,0 мкл H_2 на 1 мл). Кювету освещали ультрафиолетовым светом в области поглощения фотокатализатора (365 нм), при 20°.

Выделение водорода (в мкл/мин) было следующим: двуокись титана 0,009; двуокись титана+MB^{2+} 0,094; окись цинка 0,002; окись цинка+ +MB^{2+} 0,005.

Предполагается следующий элементарный механизм реакции: при возбуждении светом фотокатализатора электрон восстанавливает адсор-

бированные на поверхности фотокатализатора ионы H^+ или MB^{2+}; в присутствии гидрогеназы происходит выделение молекулярного водорода:

$$(e) + H^+ \xrightarrow{\text{гидрогеназа}} {}^1/_2 H_2,$$

$$MB^{+\cdot} + H^+ \xrightarrow{\text{гидрогеназа}} MB^{2+} + {}^1/_2 H_2.$$

Можно предположить, что дырка на поверхности фотокатализатора реагирует с OH^-, однако в этих опытах не удалось наблюдать ни образование H_2O_2, ни выделение кислорода. Возможно, что образованные OH-радикалы гидроксилируют присутствующие в системе органические вещества (белок гидрогеназу или метилвиологен). Возможно также, что использованный метилвиологен дихлорид играет роль донора электрона.

Сходство балансовых реакций, идущих в хлоропластах и в системах, содержащих неорганические фотокатализаторы, объясняется тем, что в том и другом случае в результате фотовозбуждения происходит элементарный фотопроцесс разделения электрона и «дырки» с последующими окислительно-восстановительными процессами, в которых участвуют различные доноры и акцепторы электрона.

Приносим глубокую благодарность И. Н. Гоготову за предоставление препаратов гидрогеназы, выделенной им из фототрофных пурпурных бактерий.

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

Поступило
17 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 139, 142 (1961). [2] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 147, 656 (1962). [3] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* Сб.: Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 161. [4] *А. А. Красновский, Г. П. Брин,* ДАН, т. 213, 1431 (1973). [5] *E. Baur, C. Neuweiler,* Helv. chim. acta, v. 10, 901 (1927). [6] *J. G. Calvert, K. Theurer et al.,* J. Am. Chem. Soc., v. 76, 2575 (1954). [7] *A. H. Mehler,* Arch. Biochem. and Biophys., v. 33, 65 (1951). [8] *В. А. Шувалов, А. А. Красновский,* Биохимия, т. 40, 358 (1975). [9] *M. J. Cormier, P. M. Prichard,* J. Biol. Chem. v. 234, 4706 (1968). [10] *В. П. Ощепков, А. А. Красновский,* Прикл. биохим. и микробиол., т. 10, 760 (1974). [11] *А. А. Красновский, Т. Н. Гуревич,* ДАН, т. 74, 569 (1950). [12] *R. C. Honeycutt, D. W. Krogman,* Biochim. et biophys. acta, v. 197, 267 (1970). [13] *Г. А. Корсуновский,* ЖФХ, т. 34, 510 (1960). [14] *А. А. Красновский, В. В. Никандров и др.,* ДАН, т. 225, 231 (1975).

СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ
№ 2 • 1976

УДК 581.19 : 581.133

А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. Н. ЛУГАНСКАЯ

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Изучены спектры поглощения и люминесценции различных пигментов в растворах трех типов поверхностно-активных веществ (ПАВ). Выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) в неионогенном детергенте тритоне Х-100 все пигменты, за исключением феофитина, солюбилизируются в мономерной форме, тогда как в цетилтриметиламмонийбромиде (ЦТАБ) и додецилсульфате натрия (ДСН) в спектрах поглощения и люминесценции пигментов обнаруживаются мономерные и агрегированные формы, соотношение которых зависит от pH и концентрации ПАВ. Предполагается, что солюбилизация пигментов в растворах детергентов происходит при участии гидрофобного «хвоста» и функциональных групп, которые определяют взаимодействие между молекулами пигмента при агрегации (атом магния, карбонильные, карбоксильные группы).

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) находят широкое применение для солюбилизации клеточных структур и биологически активных веществ, нерастворимых в воде. Этим определяется необходимость изучения свойств биологически важных соединений в водных растворах ПАВ. В детергентах удается солюбилизировать хлорофилл и его аналоги. При этом пигменты находятся в растворах ПАВ в мономерной форме и обладают фотохимической активностью, сравнимой с их активностью в органических растворителях (Красновский, Брин, 1949; Брин, Красновский, 1957).

Растворы ПАВ применяются в нашей лаборатории для изучения различных фотосенсибилизированных хлорофиллом и его аналогами реакций (Красновский, Луганская, 1968; Красновский, Михайлова, 1969, 1970, 1973; Луганская, Красновский, 1970; Шапошникова, Красновский, 1973).

Спектральные свойства хлорофиллов *а* и *б*, а также феофитина *а* в растворах детергентов изучали многие исследователи (Massini. Voorn, 1968; Hochapfel et al., 1969; Journeaux et al., 1969; Шапошникова, Красновский, 1973; Зенькевич с соавт., 1972); свойства бактериохлорофилла исследовал Ким (Kim, 1966). Аналоги хлорофилла — протохлорофилл и бактериовиридин в растворах ПАВ не изучались.

Мы провели систематическое исследование спектров поглощения и люминесценции различных пигментов хлорофиллового типа в растворах ПАВ трех главных видов: неионогенном — тритоне Х-100, катионоактивном — цетилтриметиламмонийбромиде (ЦТАБ) и анионоактивном — додецилсульфате натрия (ДСН). Тритон Х-100 представляет собой (9, 10)-оксиэтилированный изооктилфенол с мицеллярным весом 90 000 и критической концентрацией мицеллообразования (ККМ) $9 \cdot 10^{-4}$ *моль/л* (Шенфельд, 1965). Мицелла ЦТАБ состоит из положительно заряженных ионов цетилтриметиламмония с мицеллярным весом 61 700 и ККМ 10^{-3} *моль/л*. Анионоактивный ДСН при растворении в воде диссоциирует с образованием отрицательно заряженных ионов додецилсульфата; мицеллярный вес ДСН 23 200 и ККМ 10^{-2} *моль/л* (Шинода с соавт., 1966).

МЕТОДИКА

Все пигменты получали методами, принятыми в нашей лаборатории, с конечным хроматографическим разделением на сахарозе. Концентрация ПАВ в воде от 0,001 до 1%. В водный буферный раствор ПАВ (буфер боратно-щелочной или бура — борная кислота) вносили несколько капель концентрированного раствора пигмента в этиловом спирте, чтобы конечная концентрация пигментов в растворе ПАВ составляла $0{,}75—1 \cdot 10^{-5}$ М. Спектры поглощения измерялись на саморегистрирующем спектрофотометре СФ-14 через 2—5 *мин* после приливания пигмента в раствор ПАВ, затем вторично через 2—3 *час*. Запись спектров люминесценции производилась на приборе, состоящем из спектрографа ИСП-51, фотоэлектрической приставки ФЭП-1 с фотоумножителем ФЭУ-22 и усилителем ЛПУ-01. Регистрация спектров производилась с помощью самописца ЭПП-09. Для возбуждения люминесценции использовалась ртутно-кварцевая лампа ДРШ-250 со светофильтрами ЗС-3 и ФС-6, пропускающими линии ртути 365 и 404 *нм*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Солюбилизация пигментов в тритоне Х-100

Хлорофилл *а* хорошо солюбилизируется в водном растворе тритона Х-100 вплоть до концентрации ПАВ 0,01%. Спектры поглощения соответствуют мономерной форме пигмента с максимумом поглощения 670 *нм*. При pH 12 за 2 *час* наблюдается начало разрыва циклопентанового кольца, а при pH 4 — феофитинизации пигмента. С увеличением концентрации ПАВ интенсивность люминесценции растет до 0,1%, при которой наступает насыщение (рис. 1). При этом спектры люминесценции обладают максимумом 677—680 *нм* и более слабым при 733 *нм* (pH 4—8) и 710—720 *нм* (pH 12). Кроме того, при pH 12 со стороны коротковолнового склона основного максимума флуоресценции вырастает «плечо» при 650 *нм*, связанное, по-видимому, с разрывом циклопентанового кольца молекулы хлорофилла *а*. Спектры поглощения и люминесценции всех пигментов в тритоне Х-100 представлены на рис. 2.

Хлорофилл *б* в тритоне Х-100 солюбилизируется хуже, нежели хлорофилл *а*. (Следует отметить, что для обозначения присутствия в растворе ПАВ преимущественно мономерной формы пигментов в тексте применяется термин «солюбилизируется лучше» или «солюбилизиру-

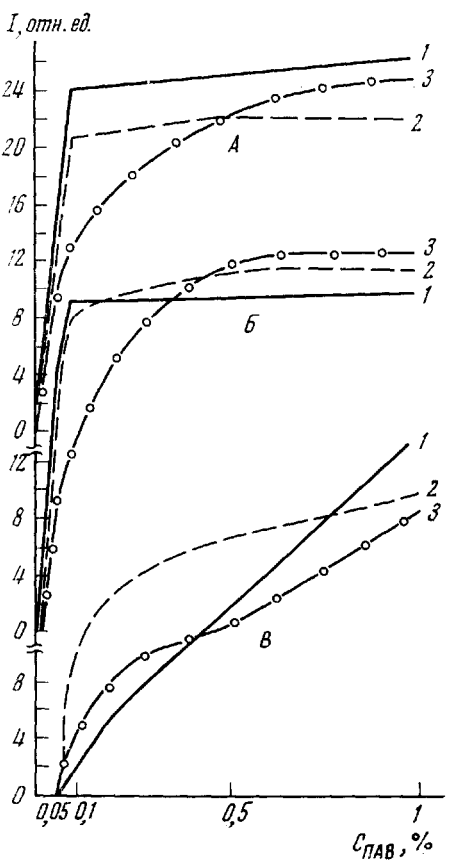


Рис. 1. Зависимость интенсивности люминесценции пигментов при pH 8 от концентрации поверхностно-активного вещества: *А* — тритон Х-100, *Б* — цетилтриметиламмониумбромид, *В* — додецилсульфат натрия; *1* — хлорофилл *а*; *2* — хлорофилл *б*; *3* — феофитин *а*

ется хорошо», тогда как тремин «солюбилизируется хуже» используется для обозначения существования в растворе ПАВ наряду с мономерной и агрегированных форм.) Максимум поглощения пигмента при концентрации ПАВ больше ККМ находится при 653 *нм* и несколько расширен со стороны длинноволнового склона в области pH 4—8. При pH 12 наблюдается разрыв циклопентанового кольца молекулы пигмента, который протекает быстрее и глубже, нежели у хлорофилла *а*. За 2 *час* при pH 4

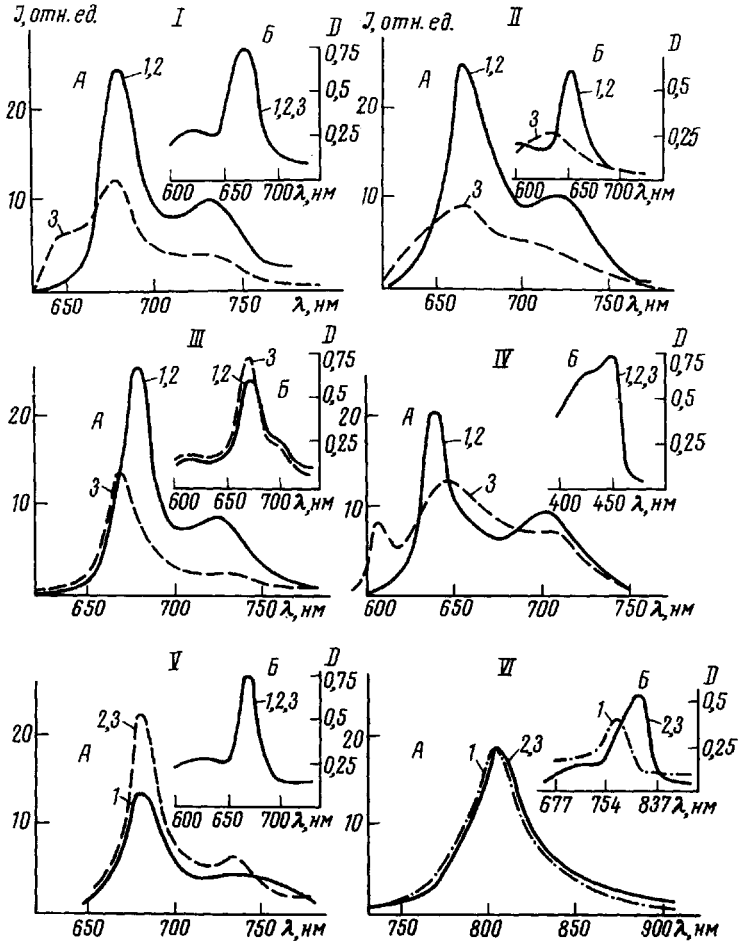


Рис. 2. Спектры люминесценции (*А*) и поглощения (*Б*) хлорофилла *а* (*I*), хлорофилла *б* (*II*), феофитина *а* (*III*), протохлорофилла (*IV*), бактериовиридина (*V*) и бактериохлорофилла (*VI*) в 0,5%-ном растворе тритона X-100; *1* — pH 4, *2* — pH 8, *3* — pH 12

обнаруживается феофитинизация пигмента. Спектры люминесценции характеризуются максимумами 664—667 и 708—717 *нм*. Последний максимум растет с уменьшением концентрации ПАВ.

Феофитин *а*. Даже при 0,5—1%-ном ПАВ наряду с максимумом 670—672 *нм* в спектрах поглощения феофитина *а* присутствует максимум 700 *нм*, характерный для агрегированных форм. После стояния раствора в течение 3—4 *час* при 20° наступает дезагрегация пигмента при всех pH. При более низких концентрациях ПАВ при pH 4—6 наблюдается увеличение агрегации феофитина *а*. В спектрах люминесценции пигмента при pH 4—8 обнаруживаются две полосы — с максимумом 679 *нм* и более слабым при 724 *нм*. При pH 12 максимумы сдвинуты к

671 и 720-750 *нм*. Обращает на себя внимание при pH 4—8 отсутствие резкого изгиба на кривой концентрационной зависимости амплитуды основного максимума от ПАВ (рис. 1).

Протохлорофилл в 0,05—1%-ном ПАВ при pH 4—8 обладает спектрами поглощения, практически не отличающимися от спектров в спиртовом растворе. В связи с разрывом карбоциклического кольца при pH 12 со временем резко меняется весь спектр поглощения. Спектры люминесценции при pH 4—10 обладают максимумами при 638—640 и 700 *нм*, а при pH 12 — тремя дискретными максимумами при 605, 644 и 703 *нм*. При понижении концентрации детергента до области, несколько превышающей ККМ (при константе солюбилизации пигмента), наблюдается резкое исчезновение люминесценции.

Бактериовиридин хорошо солюбилизируется в 0,5—1%-ном растворе ПАВ с максимумом поглощения при 670 *нм*. За 2—3 *час* при pH 4 наблюдается значительная феофитинизация. При более низкой концентрации ПАВ четко разрешается длинноволновый максимум, сдвигающийся в сторону коротких длин волн при уменьшении концентрации ПАВ. Этот максимум в растворах разных концентраций ПАВ может находиться при 755, 750, 745, 740, 712 и 708 *нм*.

Основной максимум люминесценции пигмента находится при 680 *нм*, тогда как второй, в области 730—745 *нм*, меняет свое положение при вариации концентрации и pH раствора ПАВ.

Бактериохлорофилл имеет максимум поглощения при концентрации ПАВ выше 0,1% при 784 *нм*. При pH 4 пигмент претерпевает феофитинизацию, развивающуюся со временем. С уменьшением концентрации ПАВ ниже 0,1% в области 805—850 *нм* появляется максимум агрегированных форм, положение которого варьирует с изменением pH и концентрации детергента. Спектры люминесценции обнаруживают максимум 807 *нм* при всех pH, кроме pH 4, где он сдвинут к 800—803 *нм*.

Солюбилизация пигментов в ЦТАБ

Хлорофилл *а* обладает максимумом поглощения при 672 *нм* вплоть до ККМ ПАВ. Однако ЦТАБ оказывает более сильное воздействие на пигмент — при pH 12 разрыв карбоциклического кольца протекает быстрее, чем в растворе тритона X-100. За 2 *час* максимум 672 *нм* полностью сдвигается к 646 *нм*. В домицеллярной области разрыв кольца наблюдается даже при pH 8. При pH 4—8 в спектре люминесценции наблюдаются максимумы 682 и 732 *нм*, при pH 12 — три максимума, мало отличающихся по интенсивности — при 652, 677 и 708 *нм*. При уменьшении концентрации детергента интенсивность свечения падает и при ККМ оно вообще не обнаруживается (рис. 3).

Хлорофилл *б* имеет максимум поглощения 655 *нм* при pH 4 вплоть до ККМ. Разрыв циклопентанового кольца молекулы наблюдается уже при pH 8. При pH 12 в момент приливания спиртового раствора пигмента в раствор детергента происходит изменение зеленой окраски хлорофилла на бурую. Следует отметить, что через несколько минут исходная окраска пигмента восстанавливается. Спектры флуоресценции пигмента в 0,5—1%-ном ПАВ обнаруживают максимум 663—665 *нм* при pH 4—8 и 660 *нм* при pH 10—12, а также пологое «плечо» в области 700—720 *нм*.

Феофитин *а*. При pH 4—8 максимум поглощения феофитина *а* 675—680 *нм* со стороны длинноволнового склона имеет «плечо» при 698—700 *нм*. За 2—3 *час* агрегация усиливается, а при pH 8 появляется максимум при 725 *нм*. При pH 12 в момент приливания спиртового раствора пигмента в раствор ПАВ происходит изменение окраски феофитина и за 2—3 *час* наступает полная дезагрегация пигмента. Люминесценция интенсивна при pH 12 с максимумом 673 *нм* и «плечом» при 720—740 *нм* и весьма слаба при pH 4—8 с максимумами 682—706 и

760 *нм*, соотношения амплитуд которых изменяются в зависимости от концентрации ПАВ. Люминесценция теряется при 0,1%-ном ПАВ.

Протохлорофиллл. По виду и положению полосы Соре можно судить о наличии в растворе ПАВ мономерной и агрегированной форм пигмента. При pH 12 максимум 635 *нм* практически исчезает из-за разрыва циклопентанового кольца. Спектры люминесценции при pH 4—8 характеризуются максимумами 640 и 710 *нм*, при pH 12 — при 606, 660

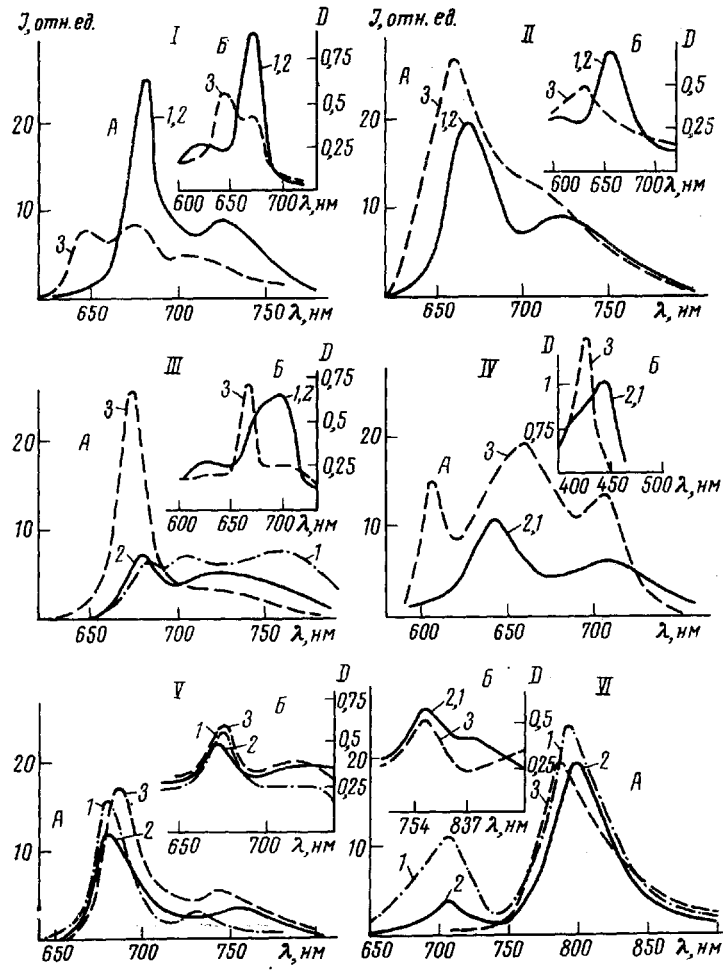


Рис. 3. Спектры люминесценции (*А*) и поглощения (*Б*) хлорофилла *а* (*I*), хлорофилла *б* (*II*), феофитина *а* (*III*), протохлорофилла (*IV*), бактериовиридина (*V*) и бактериохлорофилла (*VI*) в 0,5%-ном растворе цетилтриметиламмониумбромида; *1* — pH 4, *2* — pH 8, *3* — pH 12

и 705 *нм*. С уменьшением концентрации ПАВ интенсивность свечения падает и при ККМ свечение исчезает.

Бактериовиридин даже в 1%-ном растворе ПАВ имеет два максимума поглощения, соответствующие мономерной и агрегированной формам — при 675 и 720—725 *нм*. Увеличение концентрации H^+-ионов ведет к росту максимума агрегированной формы пигмента, который, вследствие переупаковки пигмента, за 2—3 *час* смещается к 743—744 *нм*. Люминесценция характеризуется максимумом 683 *нм* и более слабым в области 730—767 *нм*, точное положение которого определяется концентрацией ПАВ и pH. Уменьшение концентрации ПАВ

влечет за собой рост интенсивности длинноволнового максимума. В области ККМ ПАВ люминесценция пигмента не обнаруживается.

Бактериохлорофилл обладает максимумом поглощения 786 *нм* при pH 10—12 и 780 и 845 *нм* при pH 4—8. При pH 12 за 2 *час* мономерный максимум сдвигается в коротковолновую сторону на 15 *нм* вследствие разрыва карбоциклического кольца. С уменьшением концентрации ПАВ максимум агрегированной формы пигмента растет за счет уменьшения максимума мономерной формы. Максимумы люминесценции: 794 *нм* при pH 12, 797 *нм* при pH 4 и 803 *нм* при pH 8. Кроме того, при pH 10 и ниже регистрируется максимум окисленной формы пигмента при 701—706 *нм* (Красновский с соавт., 1970).

Солюбилизация пигментов в ДСН

Хлорофилл *а*. В спектрах поглощения хлорофилла *а* имеется максимум 677 *нм*, а также второй, в области 700—720 *нм*, положение которого варьирует в зависимости от pH. При pH 12 в 0,5—1%-ных растворах ПАВ за 2—3 *час* наблюдается незначительный разрыв циклопентанового кольца, а также дезагрегация пигмента. При более низких pH имеют место феофитинизация и дальнейшая агрегация, увеличивающаяся с уменьшением концентрации ПАВ. В спектрах люминесценции в 0,5—1%-ном ПАВ при pH 8—12 максимумы 685 и 743 *нм* и при pH 4—6 — 687 и 724 *нм*. Структура спектров люминесценции не постоянна: при 0,25%-ном ПАВ и ниже обнаруживаются максимумы 686—690, 710—712 и 745—767 *нм* (рис. 4), соответствующие агрегированным формам пигмента.

Хлорофилл *б* солюбилизируется при концентрации ПАВ большей ККМ и pH 8 с максимумом поглощения 658 *нм*. За 2 *час* при pH 12 виден небольшой разрыв циклопентанового кольца, при pH 4—6 пигмент подвергается феофитинизации и агрегации — вырастает максимум 678 *нм* и основной максимум сдвигается к 667 *нм*. Испускание хлорофилла *б* в 1%-ном растворе ПАВ характеризуется максимумами 672—680 *нм* и более слабым, в области 730—743 *нм*. С уменьшением концентрации ПАВ максимумы люминесценции сдвигаются в длинноволновую область.

Феофитин *а*. Спектры поглощения феофитина даже в 1%-ном растворе ПАВ характеризуются широкой полосой в области 660—710 *нм* с максимумами 676 и 695 *нм*. За 3 *час* при pH 10—12 начинается разрыв циклопентанового кольца пигмента, при pH 4—6 наблюдается рост максимума агрегированной формы пигмента, усиливающийся с уменьшением концентрации ПАВ. В 1%-ном растворе ПАВ спектры люминесценции обладают интенсивным максимумом 687 *нм* и более слабым при 733—736 *нм*. При остальных концентрациях ПАВ основной максимум сдвигается к 707 *нм* и на его склонах обнаруживаются два других в виде «плеч» при 687 и 745 *нм*.

Протохлорофилл в 0,5—1%-ном растворе ПАВ обладает максимумом 637 *нм* при pH 6—12, а при pH 4, вследствие феофитинизации пигмента, максимум сдвигается к 480 *нм*. При pH 8—12 в спектрах флуоресценции отчетливо выступают максимумы 647 и 707 *нм*. При pH 4—6 обнаруживаются три максимума в области 645—730 *нм*, интенсивность и положение которых меняется в зависимости от концентрации ПАВ и pH раствора. При 0,5% ДСН люминесценция протохлорофилла исчезает.

Бактериовиридин. Спектры поглощения бактериовиридина имеют максимумы 671—676 и 718—720 *нм*. Последний максимум за 2 *час* сдвигается к 726 *нм*, при pH 8 и ниже наблюдается дезагрегация с параллельной феофитинизацией пигмента. В спектрах люминесценции пигмента при pH 8 наблюдается максимум 685 *нм*, который сдвигается

к 690 *нм* при увеличении pH, и более слабый при 731 *нм*, сдвигающийся к 754—760 *нм* с изменением pH. В случае увеличения pH последний сдвиг объясняется ростом агрегатов пигмента, тогда как при низких pH это, по-видимому, свечение безмагниевого аналога бактериовиридина (Быстрова, Красновский, 1968). Исчезновение флуоресценции наблюдается в 0,01%-ном ПАВ.

Бактериохлорофилл при pH 6—12 имеет максимумы поглощения 786 и 842—837 *нм*, при pH 4—770 и 852 *нм*. За 2 *час* мономерный

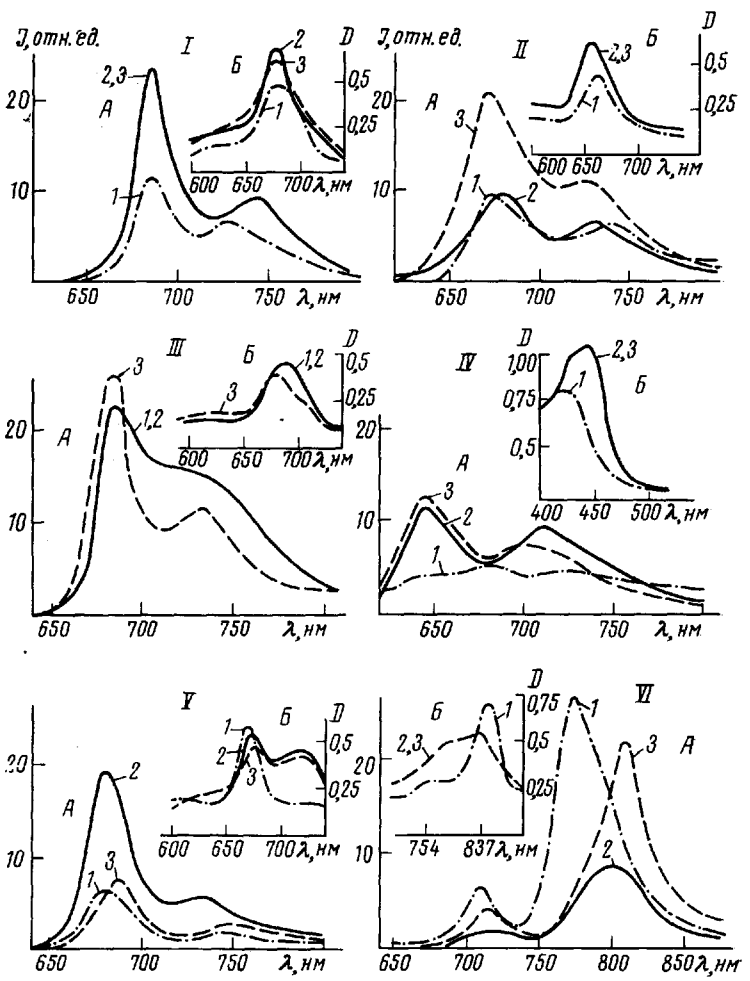


Рис. 4. Спектры люминесценции (*А*) и поглощения (*Б*) хлорофилла *а* (*I*), хлорофилла *б* (*II*), феофитина (*III*), протохлорофилла (*IV*), бактериовиридина (*V*) и бактериохлорофилла (*VI*) в 1%-ном додецилсульфате натрия; *1* — pH 4, *2* — pH 8, *3* — pH 12

максимум при pH 12 сдвигается к 712 *нм*, параллельно с чем наблюдается дезагрегация пигмента, при pH 4—6 происходит феофитинизация и дальнейшая агрегация. Уменьшение концентрации ПАВ ниже 0,25% влечет за собой относительный рост максимума агрегированной формы пигмента. В мицеллярной области ПАВ в спектрах люминесценции четко разрешен коротковолновый максимум 810 *нм* при pH 4, 807 *нм* при pH 8 и 807 *нм* при pH 12, а также максимум окисленной формы пигмента при 712 *нм*.

* * *

Молекулы пигментов состоят из гидрофильной системы четырех пиррольных колец с атомом магния в центре и гидрофобного углеводородного «хвоста» (фарнезола у бактериовиридина и фитола у других пигментов). Наличие или отсутствие атома магния в центре порфиринового кольца молекулы и различные заместители у пиррольных колец определяют молекулярную структуру каждого изученного пигмента.

При добавлении концентрированных растворов пигментов в водный раствор ПАВ, содержащий мицеллы, наблюдается солюбилизация всех исследованных пигментов, что проявляется спектрально в возрастании амплитуды красной полосы поглощения и уменьшении полуширины полос поглощения по сравнению с коллоидными растворами пигментов.

Положение полос поглощения пигментов в растворе тритона X-100 при концентрациях ПАВ 0,5—1% указывает на то, что все пигменты, за исключением феофитина *а*, находятся в мицелле этого детергента в мономерной форме. То же самое можно сказать и про пигменты в растворе ЦТАБ. В ДСН даже при высоких концентрациях ПАВ в спектрах поглощения всех пигментов наблюдаются наряду с максимумами мономерных форм максимумы агрегированных форм. Возможно, что солюбилизация пигментов в этом детергенте затруднена вследствие электростатического отталкивания между отрицательно заряженной мицеллой детергента и частицами хлорофилла, имеющими в водной среде также отрицательный заряд (Massini et al., 1968).

Известно, что в водных коллоидных растворах хлорофилл не обладает люминесценцией. Для ее появления необходимо присутствие добавок, обеспечивающих дезагрегацию, поскольку взаимодействие между близко расположенными молекулами хлорофилла в коллоидных частицах приводит к тушению флуоресценции и сдвигу поглощения в длинноволновую сторону спектра (Воробьева, Красновский, 1956).

В растворах детергентов при концентрации ПАВ$\geqslant$ККМ все исследованные пигменты обладают отчетливой люминесценцией при комнатной температуре и в присутствии воздуха. В спектрах всегда обнаруживается коротковолновая полоса, расположенная в области 645—806 *нм*, соответствующая основному максимуму поглощения пигментов и обусловленная свечением мономерной формы. Вторая полоса люминесценции, обусловленная колебательными уровнями пигментов, находится в той же области, где и длинноволновые максимумы испускания, характеризующие люминесценцию агрегированных форм пигментов. Ниже ККМ поверхностно-активных веществ люминесценция пигментов при комнатной температуре обычно незначительна, поскольку в домицеллярной области ПАВ пигменты находятся в агрегированном виде.

Более всего похожа на люминесценцию пигментов в полярных органических растворителях их люминесценция в растворе тритона X-100. В растворах ЦТАБ и ДСН спектры испускания во многих случаях характеризуются наличием новых максимумов агрегированных форм пигментов, интенсивность и положение которых находятся в зависимости от pH и концентрации ПАВ в среде.

Хорошим показателем солюбилизации пигментов является зависимость интенсивности основного максимума люминесценции от концентрации ПАВ. Если пигмент находится в растворе детергента в мономерной форме, как, например, в растворе тритона X-100, то кривые имеют резкий подъем в области, несколько превышающий ККМ ПАВ (при константе солюбилизации пигмента). Это происходит в связи с установлением равновесного распределения хлорофилла между дисперсионной средой и мицеллами детергента. Если амплитуда свечения мономерной формы пигмента увеличивается постепенно и продолжает расти в области концентраций ПАВ, значительно превышающих ККМ, это харак-

геризует наличие в растворе ПАВ наряду с мономерными формами пигментов агрегированных. Примером может являться ДСН (рис. 1).

При стоянии растворов пигментов в ПАВ при щелочных значениях pH наблюдается разрыв циклопентанового кольца молекул пигментов, в кислых средах — феофитинизация, причем в разных детергентах это нарушение структуры молекул пигментов проявляется в разной степени. Это явление можно объяснить следующим образом. Положительно заряженные ионы цетилтриметиламмония в мицеллах ЦТАБ могут взаимодействовать с отрицательно заряженными функциональными группами пигментов и, в первую очередь, с карбонильным кислородом циклопентанового кольца. Вероятно, возникающее при этом напряжение связи $C_9 — C_{10}$ облегчает разрыв карбоциклического кольца в щелочных средах. Разрыв этой связи особенно энергично протекает в растворе ЦТАБ даже при pH 8, тогда как в тритоне X-100 и ДСН этот разрыв наблюдается лишь при pH 12. Обращает на себя внимание тот факт, что параллельно с разрывом кольца в щелочных средах ПАВ проявляется тенденция пигментов к дезагрегации. Последнее объяснимо в свете представлений о роли карбонильного кислорода циклопентанового кольца при агрегации (Closs et al., 1963).

Известно, что отрицательно заряженная мицелла ДСН легко образует лиганды с центральным атомом магния порфириновых молекул (Kim, 1966), в результате чего связь магния с пиррольными кольцами ослабевает. При наличии в среде избытка водородных ионов легко может произойти обмен атома магния на два водородных атома. Этим можно объяснить то, что феофитинизация пигментов в ДСН при низких pH происходит более эффективно, чем в растворах других исследованных ПАВ.

Рассмотрим возможные способы взаимодействия пигментов с ПАВ. Существует предположение, что молекулы хлорофилла расположены в мицеллах так, что их гидрофобные «хвосты» находятся в углеводородной части мицелл, тогда как гидрофильное порфириновое кольцо — снаружи мицелл, в водной фазе. Однако в действительности различия, наблюдаемые при солюбилизации пигментов в разных детергентах, указывают на то, что во взаимодействии с мицеллой детергента могут принимать участие не только углеводородный «хвост» молекулы пигмента, но и другие функциональные группы.

По-видимому, центральный атом магния в молекуле пигмента может взаимодействовать не только с молекулами ДСН. В мицеллярном растворе тритона X-100 только у феофитина образуются агрегированные формы. Можно полагать, что в солюбилизации Mg-содержащих пигментов участвует центральный атом магния, который при помощи координационных связей может взаимодействовать с кислородом эфирных группировок оксиэтилированных цепей мицеллы тритона X-100. При этом достигается лучшая солюбилизация пигментов в растворе тритона X-100 по сравнению с другими ПАВ. С другой стороны, связывание центрального атома магния, вероятно, затрудняет агрегирование пигментов, поскольку атом магния принимает участие в образовании агрегированных форм пигментов (Katz et al., 1963).

Обращает на себя внимание, что феофитин *a* не только в тритоне X-100, но и в других детергентах агрегирован в большей степени, нежели магнийсодержащие пигменты. Кроме того, параллельно феофитинизации пигментов при низких pH в ПАВ наблюдается рост, имеющихся и образование новых длинноволновых максимумов. Вероятно, в молекулах феофитиновых производных пигментов реализуется возможность более тесного сближения порфириновых частей молекул пигментов друг с другом, что затруднено для магнийсодержащих молекул в силу стерических факторов (Быстрова, Красновский, 1967). Вероятно, не только атом магния и кислород карбонильной группы циклопентано-

вого кольца молекул пигментов участвуют в солюбилизации пигментов. В этой связи необходимо вернуться к данным по спектрам люминесценции пигментов. Обращает на себя внимание наличие длинноволновой люминесценции феофитина, бактериовиридина и протохлорофилла в растворах ПАВ. Известно, что агрегированный протохлорофилл не люминесцирует при комнатной температуре (Быстрова, Красновский, 1965), что, возможно, связано с тепловой инактивацией энергии электронного возбуждения. Бактериовиридин в агрегированном состоянии люминесцирует либо в вакууме, либо при низких, до —196° температурах (Красновский с соавт., 1962). Наличие в водной среде ПАВ делает возможным обнаружение длинноволновой люминесценции агрегированных форм пигментов в присутствии кислорода и при комнатной температуре.

Согласно данным М. Г. Шапошниковой (1973), даже при высоких концентрациях хлорофилла ($C=6\cdot10^{-4}$ М) пигмент находится в ПАВ в мономерной форме, тогда как длинноволновые формы пигментов образуются в водной фазе раствора. Центрифугирование концентрированных растворов хлорофилла и феофитина обнаружило в надосадочной жидкости мицеллы ПАВ и мономеры пигментов, в то время как агрегаты находились в осадке, где не было мицелл. Данные Э. И. Зенькевича с соавторами (1972) по изучению поляризации и квантового выхода люминесценции представили доказательства наличия агрегированных форм хлорофиллов *а* и *б* и феофитина *а*, связанных с мицеллой ПАВ. Показанное в настоящей работе наличие длинноволновой флуоресценции пигментов в растворах ПАВ дает основание предполагать, что ассоциированные пигменты могут быть связаны с мицеллами детергентов. Вполне возможно, что жесткая фиксация агрегированных пигментов на поверхности мицелл способствует уменьшению межмолекулярной инактивации энергии возбуждения, а эффективная миграция энергии с более коротковолновых форм пигментов приводит к проявлению свечения форм с самым длинноволновым поглощением.

Поскольку один и тот же пигмент в зависимости от условий в растворе ПАВ может иметь различные длинноволновые максимумы люминесценции агрегированных форм, можно полагать, что взаимодействие молекул пигментов с мицеллами детергента происходит при участии различных функциональных группировок. Совместное участие разных типов межмолекулярного взаимодействия в процессах ассоциации пигментов в растворах ПАВ и взаимодействии с мицеллами детергентов может привести к образованию агрегатов высокого порядка, в которых происходит полная потеря энергии возбуждения агрегированных форм, как, например, у бактериохлорофилла.

Различное влияние pH растворов и самих ПАВ (их специфики и концентрации) на спектры поглощения и люминесценции пигментов позволяет прийти к заключению, что солюбилизация последних протекает не только за счет гидрофобных взаимодействий между фитолом и углеводородными цепями мицелл ПАВ, но и путем образования координационных и водородных связей между пигментом и мицеллой детергента. В образовании этих связей, скорее всего, участвуют те же функциональные группы, которые ответственны за пигмент — пигментное взаимодействие (атом магния, карбонильные и карбоксильные группы). Таким образом, способ связи пигментов с мицеллами детергентов определяется химической структурой взаимодействующих партнеров.

ЛИТЕРАТУРА

Брин Г. П., Красновский А. А. 1957. Биохимия, *22*, № 5, 776.
Быстрова М. И., Красновский А. А. 1965. Биофизика, *10*, вып. 3, 433.—1967. Мол. биол., *1*, № 3, 362.—1968. Там же, *2*, № 6, 847.
Воробьева Л. М., Красновский А. А. 1956. Биохимия, *21*, вып. 1, 126.
Зенькевич Э. И., Лосев А. П., Гуринович Г. П. 1972. Мол. биол., *6*, 827.

Красновский А. А., Брин Г. П. 1949. Докл. АН СССР, *67*, № 325.
Красновский А. А., Дроздова Н. Н., Бокучава Е. М. 1970. Докл. АН СССР, *190*, № 2, 464.
Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй Цюнь. 1962. Докл. АН СССР, *143*, 456.
Красновский А. А., Луганская А. Н. 1968. Докл. АН СССР, *183*, № 6, 1441.
Красновский А. А., Михайлова Е. С. 1969. Докл. АН СССР, *185*, № 4, 938.—1970. Там же, *194*, № 4, 953.—1973. Там же, *212*, 237.
Луганская А. Н., Красновский А. А. 1970. Мол. биол., *4*, № 848.
Шапошникова М. Г. 1973. Изучение фотоокислительных реакций хлорофилла в водных растворах детергентов. Канд. дис., М.
Шапошникова М. Г., Красновский А. А. 1973. Биохимия, *38*, № 1, 193.
Шенфельд Н. 1965. Неионогенные моющие средства, М., «Химия».
Шинода К., Накагава Т., Тамамуси Б., Исемура Т. 1966. Физико-химические свойства поверхностно-активных веществ. М., «Мир».
Closs G. L., Katz J. J., Pennington F. C. 1963. J. Chem. Soc., *885*, 3009.
Journeaux R., Hochapfel R., Viovy R. 1969. J. Chem. Phys., *66*, 1474.
Hochapfel A., Journeaux R., Viovy R. 1969. J. Chem. Phys., *66*, 1467.
Katz J. J., Closs G. L., Pennington F. C., Thomas M. R. 1963. J. Amer. Chem. Soc., *85*, 3801.
Kim W. S. 1966. Biochim. et Biophys. Acta, *112*, 392.
Massini P., Voorn G. 1968. Biochim. et Biophys. Acta, *153*, 589.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР,
Москва
Институт фотосинтеза
АН СССР, Пущино

Поступила в редакцию
7.I.1975

A. A. KRASNOVSKY, A. N. LUGANSKAYA

SPECTRAL PROPERTIES OF CHLOROPHYLL AND ITS ANALOGUES IN AQUEOUS SOLUTIONS OF DETERGENTS

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow and the Institute of Photosynthesis. Academy of Sciences of the USSR, Pushchino on the Oka

Absorption and luminescence spectra of various photosynthetic pigments in aqueous solutions of three kinds detergents are investigated. All pigments (exept pheophytin) are solubilized in nonionic detergent (triton X-100) in monomeric forms, while in cethyl-threemethylammoniumbromide (CTAB) and sodium dodecylsulphate (SDS) absorbtion and luminescence spectra of the pigments reveal both monomeric and aggregated forms. Their ratio depends on the pH and concentration of the detergents.

It is supposed, that solubilisation of pigments in the aqueous solutions of the detergents occurs with participation of hydrophobic «tail» and functional groups, which responsible for interaction of the molecules of pigments during aggregations (central magnium atom, carbonylic and carboxylic groups).

Том XXI, вып. 2 1976

УДК 577.3

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА *a* В ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЕ ТРИАЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Н. Н. ЛЕБЕДЕВ, ЯН НАУШ, А. А. КРАСНОВСКИЙ мл.

Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова; Факультет математики и физики Карлова университета, Прага

В [1—3] изучены спектральные и кинетические свойства различных сольватов и агрегатов хлорофилла *a* и его производных в замороженных (—196°) растворах. В настоящей работе предпринята попытка получить фосфоресценцию хлорофилла при комнатной температуре в твердой матрице полимера — триацетатцеллюлозы.

Измерения проводились на установках, описанных ранее [2—4]. Хлорофилл *a* выделяли из проростков пшеницы с использованием хроматографического метода [5]. Для приготовления образцов раствор триацетатцеллюлозы в смеси метиленхлорида и метилового спирта (9 : 1) смешивали в темноте в атмосфере инертного газа с раствором хлорофилла в петролейном эфире и затем выпаривали растворители. В результате получали пленки толщиной 0,5 *мм*.

При исследовании свойств пленок оказалось, что включение в полимерную матрицу приводит к частичной деградации пигмента и появлению примесей, в основном феофитина и порфиринов, которые проявляются по спектрам поглощения (максимумы при 509 и 538 *нм*, высокое относительное поглощение при 418 *нм*), производным спектрам (структура в красной полосе) (рис. 1) и спектрам послесвечения (полоса 837 *нм*,

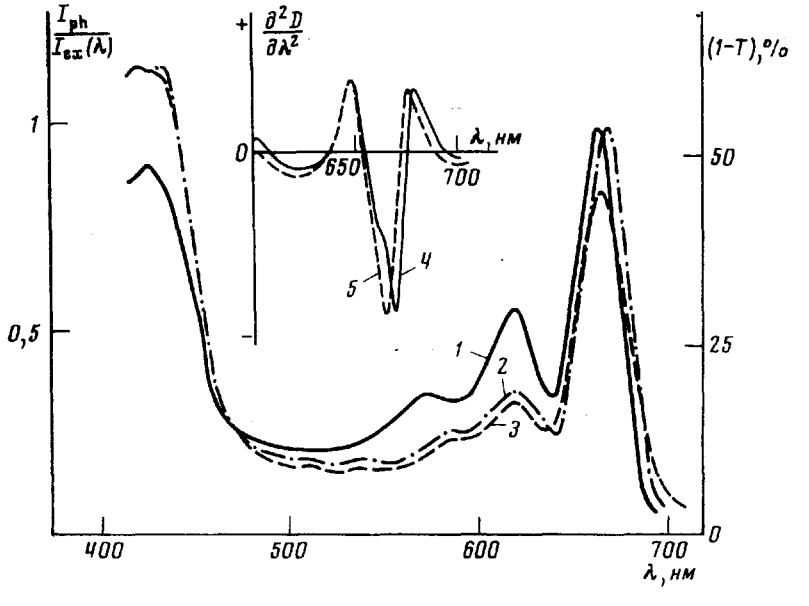


Рис. 1. Спектры поглощения и возбуждения фосфоресценции хлорофилла *a* в триацетатцеллюлозе. *1* — спектр возбуждения фосфоресценции 950 *нм* при —196°; *2, 4* — спектр поглощения и его вторая производная при —196°; *3, 5* — то же, при +22°

которая наблюдалась при возбуждении светом $\lambda \geqslant 600$ *нм*, но исчезала при более длинноволновом возбуждении; рис. 2. На фосфоресценцию самого хлорофилла полимер существенного влияния не оказывает. Так же как и у замороженных растворов [2, 3], главная полоса в спектрах низкотемпературного послесвечения у пленок расположена в ИК-области (максимум при 950 *нм*, рис. 2). Спектр возбуждения этой полосы близок к спектру поглощения хлорофилла *а* (рис. 1). (Некоторое несоответствие в области полосы Соре, вероятно, обусловлено вкладом порфиринов.) Время жизни (2,2 *мсек*) также совпадает с данными, полученными на растворах.

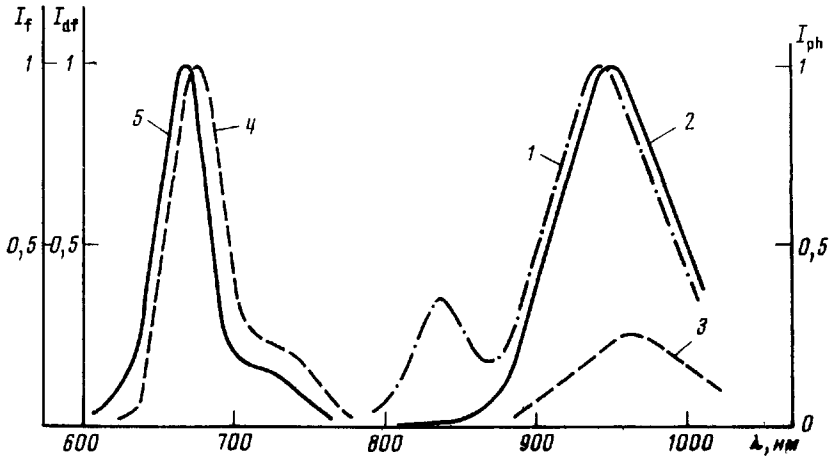


Рис. 2. Люминесценция хлорофилла *а* в триацетатцеллюлозе. *1* — фосфоресценция при —196°. Возбуждение светом $\lambda \geqslant 600$ *нм*; *2* — то же, при возбуждении $\lambda \geqslant 630$ *нм*; *3* — фосфоресценция при +22° ($\lambda_{возб} \geqslant 600$ *нм*); *4* — замедленная флуоресценция при +22° ($\lambda_{возб} \geqslant 600$ *нм*); *5* — флуоресценция при +22° (375 *нм* $\leqslant \lambda_{возб} \leqslant 425$ *нм*). Спектры исправлены с учетом спектральной чувствительности детектора. Спектры флуоресценции, замедленной флуоресценции и фосфоресценции при низкой температуре нормированы в главном максимуме

Измерения при комнатной температуре осложнялись быстрым выцветанием пигмента под действием возбуждающего света, что вносило значительные искажения в регистрируемые спектры Однако и в этом случае достоверно обнаруживалась фосфоресценция в области 940—960 *нм*, возбуждаемая светом $\lambda \geqslant 630$ *нм* (рис. 2). Одновременно с фосфоресценцией при 20° наблюдалось послесвечение, сходное по спектру с флуоресценцией хлорофилла и являющееся, вероятно, его замедленной флуоресценцией (рис. 2).

На основании полученных данных можно заключить, что встраивание хлорофилла *а* в полимерную матрицу мало влияет на его собственные фосфоресцентные свойства, но приводит к разрушению части пигмента. С другой стороны, использование полимерной среды позволяет регистрировать как фосфоресценцию, так и замедленную флуоресценцию при комнатной температуре.

* * *

Авторы приносят глубокую благодарность Ф. Ф. Литвину за обсуждение результатов, советы и замечания, а также З. Скорковской за приготовление образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А. мл., Шувалов В. А. и др.*, Докл. АН СССР, *199*, 1181, 1971.
2. *Красновский А. А. мл., Романюк В. А., Литвин Ф. Ф.*, Докл. АН СССР, *209*, 965, 1973.
3. *Красновский А. А. мл., Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.*, Докл. АН СССР, *216*, 1406, 1974; *225*, 1, 1975.
4. *Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф., Веденеев Е. П.*, Научн. докл. высш. школы. Биол. науки, *4*, 49, 1971.
5. *Vavrinec E., Skorkovska Z.*, Chem. listy, *67*, 307, 1973.

Поступила в редакцию
16.IX.1975

PHOSPHORESCENCE OF CHLOROPHYLL A IN POLYMER MATRIX OF TRIACETATE CELLULOSE

N. N. LEBEDEV, JAN NAUŠ, A. A. KRASNOVSKY JR.

Biological Department, M. V. Lomonosov Moscow State University; Department of Mathematics and Physics, Charles University, Prague

Phosphorescence spectra of chlorophyll *a* in triacetate cellulose foil are given. The ability of pigment to phosphorescence at room temperature is demonstrated.

СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ
№ 1 · 1976

УДК 541.144.7

В. П. ОЩЕПКОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА ЗЕЛЁНЫМИ ВОДОРОСЛЯМИ

Дан обзор литературы по исследованию механизма выделения молекулярного водорода при освещении зеленых водорослей. Сопоставление результатов по действию специфических ингибиторов, доноров электрона, температуры, интенсивности и качества действующего света, а также опыты с мутантами позволяют сделать вывод о том, что функции выделения водорода и кислорода находятся в конкурентных взаимоотношениях. Динамическое равновесие этих функций ($O_2 \rightleftharpoons H_2$) возможно регулировать условиями опыта. Восстановитель для фотообразования молекулярного водорода зелеными водорослями образуется в результате ферментативного катаболизма соединений углерода, продуктов предшествовавшего фотосинтеза. Энергия света поглощаемого всеми формами хлорофилла используется для доведения системы до потенциала водородного электрода. Наиболее аргументирована точка зрения, согласно которой биохимические механизмы фотообразования молекулярного водорода у зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий сходны.

Сравнительное исследование фотосинтеза растений и бактерий позволило Ван Нилю (Van Niel, 1931, 1962) постулировать обобщенное уравнение процесса:

$$CO_2 + 2H_2A \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + 2A, \qquad (1)$$

где (CH_2O) — символическая запись образующихся углеводов, H_2A — вода в случае фотосинтеза зеленых растений, а для бактериального фотосинтеза органический либо неорганический экзогенный донор электрона.

Из уравнения следовало, что выделяющийся при фотосинтезе растений кислород происходит из воды, но не может быть выделения кислорода фотосинтезирующими бактериями. Для случая, когда в качестве донора электрона бактериями используется молекулярный водород, уравнение (1) приобретает вид

$$CO_2 + 2H_2 \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O. \qquad (2)$$

С эволюционной точки зрения можно было предположить, что должны существовать организмы, способные переключаться с растительного типа фотосинтеза на бактериальный, так как последний по целому ряду признаков относительно проще и, вероятно, возник раньше. Действительно, возможность водородного метаболизма, соответствующая уравнению (2), была установлена в опытах Гаффрона на зеленых одноклеточных водорослях Scenedesmus и Rhaphidium (Gaffron, 1939, 1940). Он показал, что после нескольких часов адаптации указанных водорослей в атмосфере молекулярного водорода освещение объекта светом небольшой интенсивности приводит к поглощению углекислоты и водорода, причем отношение $(-H_2)/(-CO_2)$ было равно 2, что хорошо согласовывалось с аналогичными опытами на фотосинтезирующих бак-

териях. Выделения кислорода при этом не наблюдалось. Гаффрон предложил для этого процесса термин «фоторедукция» с целью отличия его от фотосинтетического процесса ассимиляции углекислоты, сопровождающегося выделением молекулярного кислорода. Таким образом, было экспериментально установлено наличие в клетках зеленых водорослей фермента гидрогеназы, катализирующего обратимую реакцию (Stephenson, Sticland, 1931):

$$H_2 \rightleftarrows 2H^+ + 2\bar{e}.$$

В дальнейшем было показано (Gaffron, 1942), что клетки зеленых водорослей, обладающие гидрогеназой, после предварительной водородной адаптации способны осуществлять кислородно-водородную реакцию в темноте по типу водородных бактерий:

$$6H_2 + 2O_2 + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + 5H_2O. \quad (3)$$

Как процесс фоторедукции, так и кислородно-водородная реакция проходили в присутствии углекислоты, при условии предварительной адаптации объекта в атмосфере водорода. Позже Гаффрон установил, что адаптация зеленых водорослей к водородному метаболизму может наступить после нескольких часов инкубации объекта в атмосфере инертного газа или азота. При освещении таких адаптированных клеток Scenedesmus obliquus в отсутствие углекислоты Гаффрон и Рубин (Gaffron, Rubin, 1942) обнаружили выделение молекулярного водорода, причем в количестве, приблизительно на порядок превосходящем темновое образование водорода теми же клетками в результате ферментации. Основные результаты авторов сводились к следующему: фотообразование молекулярного водорода клетками Scenedesmus увеличивалось при повышении интенсивности действующего света до определенного уровня, после которого наблюдалось уменьшение скорости выделения водорода, а при достижении некоторого порогового уровня освещения выделение молекулярного водорода прекращалось и клетки переходили к нормальному фотосинтезу с выделением кислорода. Наступала так называемая необратимая деадаптация объекта, так что снижение интенсивности света не приводило к процессу фотообразования водорода. Для наблюдения явления фотообразования молекулярного водорода на таких клетках вновь требовалась многочасовая анаэробная адаптация в темноте. Процесс фотообразования молекулярного водорода стимулировался при добавлении глюкозы, однако Гаффрон и Рубин сделали вывод, что это не является простым усилением темнового процесса выделения водорода, так как при добавлении к суспензии водорослей 2,4-динитрофенола (ДНФ) можно было полностью ингибировать темновое образование водорода. Фотообразование водорода при этом не ингибировалось, но даже усиливалось. Было высказано предположение о фотохимическом механизме процесса фотообразования молекулярного водорода водорослями. При воздействии света происходит сенсибилизируемое хлорофиллом окисление молекулы воды с образованием первичного окислителя (YOH) и восстановителя (XH). В присутствии CO_2 первичный восстановитель идет на ее восстановление, а рекомбинация первичных окислителей приводит к выделению молекулярного кислорода. В отсутствие CO_2 в анаэробных условиях рекомбинация первичного окислителя и восстановителя приводит вновь к образованию молекулы воды, в результате чего не происходит ни выделения кислорода, ни выделения водорода. Положение резко меняется в случае, если опыт проводится в отсутствие CO_2 в анаэробных условиях на адаптированных клетках, т. е. клетках с активной гидрогеназой. В этом случае образующийся окислитель может быть восстановлен подходящим эндогенным либо экзогенным донором электрона, а водород восстановителя при взаимодействии с гидрогеназой молизуется и выделяется в газообразной форме.

С другой стороны, Гаффрон и Рубин не исключали возможности непосредственного окисления органического донора на свету и переноса водорода на гидрогеназу. Важным аргументом в пользу такой точки зрения были опыты с голодающими клетками Scenedesmus, на которых эффект фотообразования молекулярного водорода сильно уменьшался, однако после периода активного фотосинтеза вновь усиливался.

Таким образом, хотя еще не было достаточного количества экспериментальных данных для определенного представления механизма фотообразования молекулярного водорода водорослями, уже наметилась тенденция двойственной интерпретации происхождения выделяющегося водорода — непосредственно из воды или из восстановленных соединений углерода.

Позже (Gest, Kamen, 1949) было открыто явление фотообразования молекулярного водорода фотосинтезирующими бактериями Rhodospirillum rubrum. В отличие от водорослей процесс фотообразования водорода у бактерий не требовал длительной адаптации объекта, не ингибировался при достаточно больших физиологических интенсивностях света, проявлялся только при добавлении экзогенных органических доноров. Эффект можно было наблюдать в атмосфере инертного газа, но не в атмосфере азота, так как последний полностью ингибировал процесс фотообразования молекулярного водорода пурпурными бактериями. Это обстоятельство навело на мысль, что процесс фотообразования молекулярного водорода у фотосинтезирующих бактерий связан с их способностью фиксировать атмосферный азот. В опытах с использованием N^{15} (Kamen, Gest, 1949) это предположение было экспериментально подтверждено.

Хотя сходство процессов фотообразования молекулярного водорода у водорослей и пурпурных бактерий было значительно меньшим, чем различие, дальнейшее изучение механизма этого явления неизбежно носило характер сравнения и сопоставления.

Френкель (Frenkel, 1952) провел опыты на Chlamydomonas moewusii и установил, что для наблюдения явления фотообразования водорода на этом объекте не требуется длительная анаэробная адаптация, достаточно было всего нескольких минут. Сопоставив количество выделявшегося молекулярного водорода при низкой интенсивности света в анаэробных условиях с количеством молекулярного кислорода, выделявшегося при той же интенсивности света теми же клетками водорослей в аэробных условиях, Френкель получил величину близкую 2, что, по его мнению, свидетельствовало в пользу вывода об идентичности фотохимической реакции, лежащей в основе этих двух процессов. В противоположность ингибирующему влиянию азота и ионов аммония на функцию фотообразования водорода пурпурными фотосинтезирующими бактериями в случае водорослей влияния этих факторов не наблюдалось.

Длительное время фотообразование молекулярного водорода не удавалось наблюдать у зеленых водорослей Chlorella. В систематическом отношении водоросли Chlorella и Scenedesmus входят в один порядок (Chlorococcales) и по многим биохимическим характеристикам близки.

В работах Дамашке (Damaschke, 1957; Damaschke, Lubke, 1958) было показано, что клетки Chlorella pyrenoidosa способны осуществлять процессы фоторедукции и фотообразования молекулярного водорода, однако для этого требуется предварительная анаэробная адаптация объекта от 1 до 4 дней.

Спруит (Spruit, 1954), сочетая волюмометрический метод определения кислорода (Кок, 1955) и электродную технику для измерения водорода, сообщил, что два штамма Chlorella после кратковременной (несколько минут) анаэробной адаптации активно выделяли на свету кислород и водород одновременно. Соотношение этих газов изменялось

в процессе опыта и зависело от интенсивности действующего света и некоторых других условий. По мнению Спруита, не было указаний на то, что оба газа имеют общее происхождение, например, как результат разложения воды на компоненты «гремучего газа». В то время как кислород выделяется в результате нормального фотосинтеза, водород происходит из органических продуктов, образовавшихся при нефотохимических реакциях. В этих опытах отмечалось, что водород выделялся в присутствии значительных количеств кислорода. Спустя 4 года Спруит вернулся к опытам по измерению выделения водорода и кислорода при освещении Chlorella. В новой работе (Spruit, 1958) подтверждалась возможность одновременного выделения кислорода и водорода на свету, причем в случае устранения побочных явлений поглощения газов (дыхание и инактивация гидрогеназы кислородом), достигавшегося предварительным замораживанием объекта, наблюдалось выделение кислорода и водорода в отношении 1 : 2. Автор пришел к выводу, что кислородный и водородный метаболизм тесно взаимосвязаны и что оба газа возникают на свету из одного и того же источника — воды.

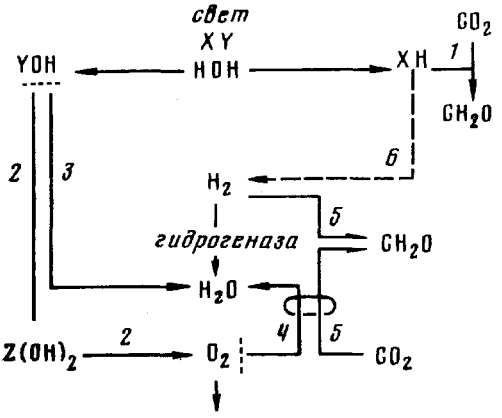


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая сопряжение гидрогеназы с фотохимическим механизмом у адаптированных водорослей (Gaffron, 1960)

В 1960 г. Гаффрон резюмировал состояние вопроса схемой, представленной на рис. 1. На рисунке основные метаболические пути обозначены номерами 1—6. Путь 1 представляет восстановление углекислоты, 2 — путь кислорода при аэробных условиях. Линии 3—6 обозначают реакции, которые осуществляются в условиях активированной гидрогеназы. Путь 3 конкурирует с путем 2, приводя к фоторедукции. Путь 4 представляет кислородно-водородную реакцию. Она протекает в темноте при наличии экзогенного кислорода или на свету за счет кислорода фотосинтеза при условии, что YOH не выводится через путь 3. Линия 5 представляет восстановление углекислоты, связанное с реакцией 4, а линия 6 (гипотетический) — путь фотохимического выделения водорода при условии, что какой-либо другой донор водорода окисляется в реакции 3. До тех пор пока реакция 2 не блокирована продуктами ферментации, дефицитом марганца или специфическими ядами, реакции 1—5 могут протекать в клетке одновременно. Слишком высокая концентрация $Z(OH)_2$ или кислорода инактивирует гидрогеназу и приводит к возвращению аэробных условий.

Развитие исследований по механизму фотообразования молекулярного водорода зелеными водорослями с 60-х годов шло под влиянием предложенной Хиллом и Бендоллом «двухквантовой» гипотезы переноса электрона при фотосинтезе растений, так называемой «Z»-схемы пе-

реноса электрона. Детальное описание этапов переноса электрона и критический анализ схемы имеются в целом ряде обзоров и монографий.

Непосредственным резонансом на появление «двухквантовой» гипотезы была работа Бишопа и Гаффрона (Bishop, Gaffron, 1963), посвященная исследованию механизмов взаимодействия выделения кислорода и водорода у адаптированных водорослей. В опытах на «кислородной мутанте» Scenedesmus № 11 (штамм водоросли, утративший коротковолновую систему II и не способный к осуществлению фотосинтеза с выделением кислорода, но осуществляющий ассимиляцию углекислоты в процессе фоторедукции) было показано отсутствие способности фотообразования молекулярного водорода в анаэробных условиях. Напротив, штаммы Scenedesmus с генетической блокировкой фотосинтетической ассимиляции углекислоты, а также нормальные (немутантные) штаммы выделяли в соответствующих условиях и кислород и водород одновременно. Количественное соотношение выделявшихся газов точно оценить не удавалось, так как оно менялось в процессе опыта. Ингибирование функции выделения кислорода диуроном (специфический ингибитор фотосистемы II) либо дефицитом ионов марганца в ростовой среде приводило к ингибированию функции фотообразования молекулярного водорода. На нормальных штаммах Scenedesmus при одновременном освещении объекта двумя монохроматическими лучами светом I и II авторы наблюдали эффект усиления (Эмерсона) по выделению кислорода и водорода. Добавление разобщителя фотофосфорилирования ХКФ (карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон) вызывало стимуляцию выделения водорода, но этот эффект ингибировался диуроном. Все эти данные склоняли авторов к выводу, что процесс фотообразования молекулярного водорода у зеленых водорослей — результат фотохимического разложения молекулы воды в отсутствие конечного акцептора электрона при последовательном взаимодействии фотосистемы II и I. Однако вскоре появились данные, сильно поколебавшие высказанную точку зрения. Калтвассер и Гаффрон (Kaltwasser, Gaffron, 1964) установили, что адаптированные клетки Scenedesmus при освещении выделяют водород значительно сильнее при одновременном добавлении к суспензии водорослей разобщителя фотофосфорилирования ХКФ и глюкозы, причем в этом случае наблюдается также выделение углекислоты. Отмечалось сильное ингибирование процесса диуроном. В том же году Абелз (Abeles, 1964), применив масс-спектрометрическую технику, обнаружил фотообразование молекулярного водорода на бесклеточных препаратах Chlamydomonas eugametos при добавлении восстановленных пиридиннуклеотидов, в присутствии диурона.

В обзоре Бишопа (Bishop, 1966) была высказана более осторожная точка зрения, согласно которой источником выделяющегося на свету водорода у водорослей может быть вода и некоторые другие более восстановленные соединения, но механизм переноса электрона от донора к гидрогеназе в любом случае предполагался нециклический — через I или II и I фотосистемы.

Калтвассер, Стюарт и Гаффрон (Kaltwasser, Stuart, Gaffron, 1969), применив меченную по углероду глюкозу, установили, что углекислота, выделявшаяся при фотообразовании водорода Scenedesmus obliquus, содержит метку из 3-го и 4-го положения. Это указывало на гликолитический распад экзогенной глюкозы по пути Эмбдена — Мейергофа. Однако при этом отмечалось, что количество фотостимулированного выделения CO_2 не коррелировало с количеством выделяющегося водорода. Стимуляция выделения CO_2 на свету была значительно меньше стимуляции выделения H_2. При концентрациях ХКФ $5 \cdot 10^{-5}$ М наблюдалось ингибирование фоторедукции и процесса выделения кислорода, чем

можно было объяснить эффект стимуляции фотообразования водорода при добавлении разобщителей фотофосфорилирования. В противоположность данным Бишопа и Гаффрона на мутанте S. obliquus № 11, утратившем функцию выделения O_2, было показано выделение H_2, а на немутантных штаммах установлено, что H_2 и O_2 необязательно выделяются одновременно. Эти аргументы говорили против предположения о фотохимическом разложении воды на кислород и водород. В то время как кислород выделяется в процессе усвоения углекислоты, выделение водорода зависит от метаболизма органических соединений. Роль света в процессе фотообразования молекулярного водорода, по предположению авторов, сводилась либо к образованию АТФ, либо к индуцированию фотохимического переноса электрона от неизвестного восстановленного соединения к более сильному восстановителю.

Сходные результаты получил Хили на Chlamydomonas moewusii. Им было показано (Healey, 1970a), что выделение водорода в темноте и на свету сопровождается выделением CO_2, причем процесс стимулировался при добавлении ацетата либо периодом предварительного фотосинтеза. Диурон не ингибировал фотообразования H_2. В отличие от опытов Бишопа и Гаффрона на Scenedesmus в опытах Хили на Chlamydomonas наблюдалось полное ингибирование процесса выделения водорода монофторацетатом (МФА). Это, по мнению автора, свидетельствовало о том, что восстановитель образуется в ходе ферментативного окисления соединений углерода в цикле Кребса, вероятно $НАДН_2$. Таким образом, согласно Хили, темновое образование водорода связано с переносом электрона от $НАДН_2$ до ферредоксина за счет энергии субстратного фосфорилирования, так как процесс ингибировался разобщителями фосфорилирования. Напротив, фотообразование молекулярного водорода зависит только от «темнового» образования восстановителя в цикле Кребса, но не зависит от процессов фосфорилирования, так как усиливается при добавлении разобщителей. Поскольку отсутствовал эффект усиления фотообразования водорода при одновременном освещении объекта двумя монохроматическими лучами, Хили пришел к выводу, что в процессе принимает участие только одна фотосистема. Хили предположил, что $НАДН_2$ донирует электрон между фотосистемами II и I. Нециклический перенос электрона через фотосистему I приводит к фотохимическому выделению молекулярного водорода. Такой вывод подтверждался спектром действия фотообразования водорода, снятым в красной области (600—720 *нм*). Спектр действия был получен на культуре C. moewusii в присутствии ингибитора фотосинтетического выделения кислорода (диурона) и разобщителя фотофосфорилирования (ХКФ). На том же объекте без добавления указанных ингибиторов был снят спектр действия фотосинтеза по выделению кислорода. Полученный спектр действия фотообразования водорода коррелировал со спектром поглощения фотосистемы I, и его максимум был смещен в длинноволновую область относительно максимума спектра действия фотосинтеза приблизительно на 20 *нм*.

Ранее (Bishop, 1967) был получен спектр действия фоторедукции на Scenedesmus obliquus, который также коррелировал со спектром поглощения фотосистемы I и имел приблизительно такой же сдвиг максимума в длинноволновую область относительно максимума спектра действия фотосинтеза. Следует отметить, что в опытах Бишопа спектр действия фоторедукции снимался в присутствии ингибитора фотосинтетического выделения кислорода (диурона), так как было показано (Horwitz, Allen, 1957), что адаптированные зеленые водоросли осуществляют и фотосинтез и фоторедукцию одновременно. Минимальный квантовый расход фоторедукции, по данным Бишопа, составил 10 квантов на молекулу фиксированной углекислоты. Квантовый расход фотообразования молекулярного водорода не измерялся.

В дальнейшем Хили (Healey, 1970b) провел обширное исследование на 33 видах различных водорослей с целью выявления у них способности к образованию молекулярного водорода. Альгофлора включала представителей зеленых, красных, диатомовых, сине-зеленых и эвгленовых. Выделение водорода наблюдалось на зеленых водорослях рода Chlamydomonas, Chlorella и Scenedesmus. На всех этих объектах отмечалась стимуляция фотообразования H_2 при добавлении разобщителей фотофосфорилирования и органических субстратов (ацетат либо глюкоза). Добавление ингибитора фотосинтетического выделения кислорода (диурона) вызывало на разных водорослях различные эффекты — от полного ингибирования фотообразования H_2 до отсутствия влияния. На этом основании Хили предположил, что механизм фотообразования H_2 у зеленых водорослей может быть представлен тремя вариантами.

1. Донор электрона — вода. Восстановление H^+ происходит при переносе электрона через обе фотосистемы, в результате чего наблюдается фотохимическое одновременное выделение кислорода и водорода (диурон полностью ингибирует процесс).

2. Донор электрона образуется в ходе окислительного углеродного метаболизма, и H^+ восстанавливается в результате переноса электрона только через фотосистему I (влияние диурона отсутствует).

3. Смешанный вариант 1-го и 2-го случая. И вода и восстановленный органический донор могут давать электрон на восстановление H^+ (частичное ингибирование диуроном).

Поскольку во всех случаях не наблюдалось ингибирования фотообразования H_2 разобщителями фотофосфорилирования, Хили пришел к выводу, что выделение H_2 при освещении водорослей не зависит от процесса фосфорилирования. Только нециклический перенос электрона через фотосистемы приводит в соответствующих условиях к фотообразованию молекулярного водорода.

Стюарт и Калтвассер (Stuart, Kaltwasser, 1970) продолжили исследования фотообразования водорода на различных мутантах Scenedesmus, выделенных в лаборатории Бишопа. В работе использовался мутант № 11 (блокированный по фотосистеме II), мутант № PS-50 (утративший цитохром С-552) и мутант № 8 (с частично блокированной фотосистемой I). Характеристики указанных штаммов описаны в ряде работ Бишопа и сотр. Мутант № 11 выделял водород с такой же эффективностью, как и дикий штамм. Мутант № PS-50 вообще не выделял водорода. Мутант № 8 выделял водород с меньшей эффективностью, чем дикий штамм. Разобщитель фотофосфорилирования ХКФ ($5 \cdot 10^{-5}$ М) стимулировал фотообразование водорода на мутантах № 11 и PS-50, но ингибировал этот процесс на мутанте № 8. Авторы заключили, что в процессе фотообразования молекулярного водорода у S. obliquus фотосистема II не принимает участия, работает только фотосистема I, причем ее функция сводится либо к образованию АТФ в процессе циклического фотофосфорилирования, либо к нециклическому переносу электрона от органического донора электрона, донирующего электрон между фотосистемами до цитохрома С-552. Последняя точка зрения представлялась им более вероятной, так как факт ингибирования фотообразования водорода ХКФ на мутанте № 8 мог объясняться неспецифическим действием этого разобщителя (Weinbach, Garbus, 1969), либо тем, что на данном мутанте конкурирующий процесс фоторедукции блокирован в большей степени, чем участок фотосистемы I, ответственный за фотообразование молекулярного водорода.

Для определенного решения вопроса относительно участия фотосистем в процессе фотообразования молекулярного водорода зелеными водорослями необходимо было функционально разделить фотосистемы и исключить фотофосфорилирование.

Было показано (Tagawa, Arnon, 1962; Katoh, San Pietro, 1968), что прогретые в течение 5 *мин* при 50—55° хлоропласты шпината и эвглены не проявляли реакцию Хилла, но восстанавливали НАДФ от пары аскорбат — ДХФИФ (донор фотосистемы I). Хлоропласты шпината, прогретые в течение 10 *мин* при 55°, все еще проявляли способность к фотовосстановлению НАДФ, а процесс фотофосфорилирования полностью утрачивался (De Kiewiet, Hall, Jenner, 1965). Чени и Мартин (Cheniae, 1970) нашли, что прогретые в течение 4 *мин* при 50° частицы хлоропластов утрачивали реакцию Хилла с феррицианидом. Подобное действие оказывал на хлоропласты высших растений салицилальдоксим (САЛ). Имеются данные (Avron, 1967; Hind, Olson, 1968), что САЛ ингибирует реакцию Хилла и фотофосфорилирование, в то время как восстановление НАДФ и метилового красного не затрагивается.

Стюарт (Stuart, 1971) исследовал влияние нагревания (1—2 *мин*, 55°) и добавление САЛ (10^{-2} М) на адаптированных клетках S. obliquus. При этих воздействиях имело место сильное ингибирование фотосинтеза, фоторедукции, циклического фотофосфорилирования, реакции Хилла с *п*-бензохиноном и потребления глюкозы. Фотообразование H_2 клетками и восстановление метилового красного частицами хлоропластов при этих воздействиях стимулировалось либо сохранялось на прежнем уровне. Эти результаты Стюарт интерпретировал как определенное указание о независимости процесса фотообразования H_2 у Scenedesmus от циклического фотофосфорилирования. Фотообразование H_2, по Стюарту,— нециклический перенос электрона от неизвестного органического донора через фотосистему I к гидрогеназе. В то же время в этой работе Стюарт отметил, что добавление диурона к объекту, к которому уже был добавлен САЛ, вызывало небольшое ингибирование (до 20%) фотообразования H_2. Поэтому он предположил, что эндогенный органический донор может давать электрон в фотосинтетическую цепь переноса — в фотосистему II до места действия диурона, но после локуса выделения кислорода, так как последний не выделялся в присутствии САЛ. Такое предположение подтверждалось известными литературными данными о том, что некоторые органические и неорганические соединения могут донировать электрон на окислительном участке фотосистемы II вместо воды (Cheinae, 1970).

Кинетические исследования фотообразования молекулярного водорода на S. obliquus выявили двухфазный характер процесса (Stuart, Gaffron, 1971). Вначале освещения наблюдалось интенсивное выделение H_2, которое затем спадало до более низкого уровня. Стюарт и Гаффрон предположили, что в период предварительной анаэробной адаптации образуется «пул» неизвестного органического донора водорода (электрона) для фотосистемы I, который при освещении объекта быстро истощается, и дальнейшее выделение H_2 определяется сравнительно медленным процессом темнового ферментативного окисления глюкозы. С другой стороны, на основании опытов с добавлением ХКФ, САЛ и диурона авторы допускали, что некоторый вклад в процесс фотообразования H_2 у Scenedesmus (особенно в начальной быстрой фазе) обусловлен фотосистемой II. Донор электрона для фотосистемы II в этом случае оставался неизвестен. В опытах с экзогенной глюкозой было показано, что на 1 моль глюкозы образуется 0,5 моля H_2. Такое отношение говорило о том, что только часть продуктов ферментативного катаболизма глюкозы может служить источником водорода (электрона) во второй фазе фотообразования H_2, и объясняло медленный характер этой фазы, а также ее слабую зависимость от интенсивности света.

Две работы Стюарта и Гаффрона под общим заголовком «Механизм фотообразования водорода некоторыми водорослями» подводят итог 30-летнему периоду исследований (Stuart, Gaffron, 1972a, b). Сравнительное исследование явления фотообразования молекулярного водо-

рода на зеленых водорослях Ankistrodesmus, Chlorella, Chlamydomonas и Scenedesmus привело к следующим выводам: ни один из исследованных объектов не требует участия фотосистемы II в процессе фотообразования H_2, которое наблюдается даже в присутствии диурона (10^{-5} М); не требуется также фотофосфорилирования, поскольку два потенциальных ингибитора этого процесса (ХКФ и САЛ) почти всегда стимулировали фотообразование H_2. Все же влияние этих ингибиторов меняется в зависимости от вида водорослей, возраста и условий выращивания культуры. Большие концентрации САЛ (10^{-2} М) всегда стимулировали фотообразование H_2 у гетеротрофно выращенных клеток, но нередко ингибировали этот процесс у культур, выращенных автотрофно. При инкубировании клеток водорослей с САЛ отмечалось значительное изменение пигментного аппарата, что легко обнаруживалось по спектрам поглощения. Влияние ХКФ на фотообразование H_2 тоже менялось в за-

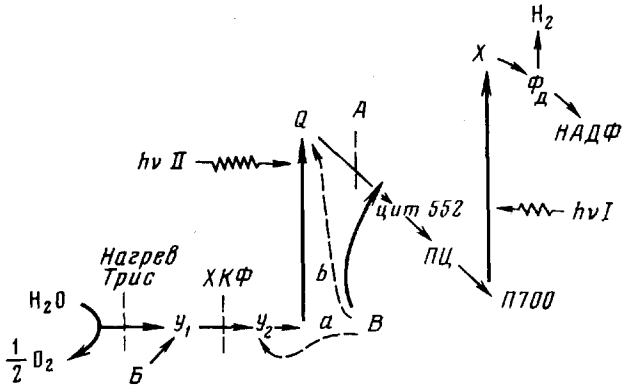


Рис. 2. Схема процесса фотообразования молекулярного водорода зелеными водорослями (Stuart, Gaffron, 1972): *a*, *b* — возможные пути донации электрона неизвестным органическим донором в фотосистему II; *Q* — первичный неидентифицированный акцептор фотосистемы II; *X* — первичный неидентифицированный акцептор фотосистемы I; *A* — диурон, *Б* — марганец, аскорбат, *B* — восстановленные органические соединения

висимости от условий культивирования, особенно на культуре Chlorella vulgaris. На автотрофных культурах отмечалось только слабое стимулирование фотообразования H_2, в то время как на клетках, выращенных гетеротрофно, стимуляция достигала 450%. Клетки Chlamydomonas обнаруживали приблизительно в 10 раз более высокую чувствительность к ХКФ и САЛ.

Таким образом, все исследованные водоросли способны к фотообразованию H_2 в результате нециклического переноса электрона от неизвестного органического донора через фотосистему I к гидрогеназе. Опыты с добавлением диурона давали основание предполагать, что на водорослях Chlorella, Ankistrodesmus и Scenedesmus в процессе фотообразования водорода частично участвует фотосистема II. На Chlamydomonas moewussi не было чувствительности к диурону и, следовательно, процесс связан только с фотосистемой I. На клетках, к которым был добавлен ХКФ, относительный вклад фотосистемы II в процессе фотообразования H_2 менялся от нуля на автотрофно выращенных культурах Chlamydomonas reinhardii до ~20% на фотогетеротрофных культурах и до ~50% на автотрофно выращенных клетках Ankistrodesmus braunii, Chlorella fusca, Chlorella vulgaris и Scenedesmus obliquus. Обобщенная схема процесса фотообразования молекулярного водорода различными видами зеленых водорослей (по Стюарту и Гаффрону) представлена на рис. 2.

К принципиально иным выводам привели исследования механизма фотообразования молекулярного водорода у фотосинтезирующих бактерий Athiorodaceae, проведенные в основном в лабораториях Геста, Кондратьевой и Гоготова. Детальный анализ этих работ имеется в ряде обзоров (Gest, 1963, 1972; Кондратьева, 1963; Кондратьева, Гоготов, 1976; Гоготов, 1968). В настоящее время хорошо аргументирована точка зрения, согласно которой фотообразование молекулярного водорода

фотосинтезирующими бактериями наблюдается в случае, когда и АТФ и восстановленные пиридиннуклеотиды образуются в избытке по сравнению с биосинтетическими потребностями клетки. Окисление экзогенных органических субстратов в цикле Кребса, функционирующего в анаэробных условиях,— источник восстановленных НАД. Кванты света индуцируют в хроматофорах процесс циклического фотофосфорилирования, что приводит к образованию АТФ либо высокоэнергетических предшественников ($X\sim$). Энергия этого процесса используется для переноса электрона от $НАДН_2$ до ферредоксингидрогеназного комплекса, осуществляющего катализ выделения молекулярного водорода (Gest, 1966). С биологической точки зрения выделение молекулярного водорода — один из регуляторных процессов поддержания необходимого клетке уровня восстановителей и макроэргических соединений в анаэробных условиях (Gray, Gest, 1965).

В сравнительном отношении фотообразование молекулярного водорода у фотосинтезирующих бактерий отличается от внешне сходного процесса у зеленых водорослей по целому ряду характеристик.

1. Фотообразование H_2 у водорослей требует предварительной анаэробной адаптации объекта. Для проявления этого процесса у фотосинтезирующих бактерий такая адаптация не требуется.

2. Выделение H_2 у водорослей происходит за счет эндогенных источников электрона, у бактерий — экзогенных.

3. Разобщители фотофосфорилирования стимулируют фотообразование H_2 у водорослей, но ингибируют этот процесс у бактерий.

4. Фотообразование H_2 у бактерий непосредственно связано с механизмом фиксации атмосферного азота. Фиксация атмосферного азота зелеными водорослями не установлена.

Следует отметить, что открытие фотообразования молекулярного водорода водорослями и бактериями, а также основной экспериментальный материал были получены при использовании манометрической методики Варбурга. В настоящее время все шире внедряются новые инструментальные методы газового анализа. Недавно предложена высокочувствительная амперометрическая методика измерения водорода, выделяемого водорослями (Wang, Healey, Myers, 1971). На модифицированном варианте такой методики обнаружено фотоиндуцированное выделение водорода бактериями, водорослями и высшими растениями (Ефимцев, Бойченко, Литвин, 1975).

Описана простая комбинация масс-спектрометра и кислородного электрода для определения газов, растворенных в жидкостях (Stuart, Herold, Gaffron, 1972). Методика позволяет одновременно регистрировать изменения концентрации O_2, H_2 и CO_2 с высокой чувствительностью. Возможно определение изотопного состава изучаемых компонентов. Для измерения газообмена, сопровождающего метаболизм фотосинтезирующих объектов, в нашей лаборатории была разработана газохроматографическая методика (Ощепков, Красновский, 1974b).

В опытах на Chlorella pyrenoidosa (Ощепков, Красновский, 1972) было установлено, что освещение объекта, находящегося в анаэробных условиях, белым светом низкой интенсивности приводит к выделению молекулярного водорода, при этом не регистрируется выделение кислорода. Увеличение интенсивности действующего света приводит к постепенному переходу от регистрируемого выделения водорода к кислороду. Такие переходы ($O_2 \rightleftharpoons H_2$) обратимы. Можно подобрать экспериментальным путем промежуточную интенсивность света, при которой не будут проявляться на хроматограммах пики O_2 и H_2 (точка перехода функций, или «нулевая» точка), но нельзя подобрать интенсивность света, при которой кислород и водород выделялись бы интенсивно и одновременно. Как отмечалось ранее (Gaffron, Rubin, 1942), добавление глюкозы стимулирует выделение водорода. Нам удалось установить, что при этом

происходит сдвиг точки перехода функций $O_2 \rightleftharpoons H_2$ в сторону больших интенсивностей света и даже возможен переход от регистрируемого выделения кислорода к водороду ($O_2 \rightarrow H_2$). Такой переход возможен также при освещении объекта длинноволновым светом ($\lambda > 700$ *нм*), а также при действии ингибитора фотосинтетического выделения кислорода — диурона (10^{-6} М). Однако увеличение концентрации диурона до 10^{-5} М приводило к инактивации функций выделения O_2 и H_2, что, по-видимому, указывает на неспецифичность воздействия.

Нагревание объекта в процессе опыта в пределах физиологических температур (24—40°) может приводить к смене функций — от выделения O_2 к выделению H_2 а охлаждение до исходной комнатной температуры — к обратному переходу $H_2 \rightarrow O_2$. Примечательно, что выделение O_2 после нагревания при 24° в несколько раз больше выделения O_2 при той же температуре в начале опыта. В специальных опытах с применением той же хроматографической методики было показано, что фотообразование H_2 у хлореллы сопровождается выделением CO_2. Эти данные коррелируют с результатами на Scenedesmus (Kaltwasser, Gaffron, 1964). В наших опытах при интенсивностях света, близких к переходу $H_2 \rightarrow O_2$, выделение H_2 наблюдалось без регистрируемого выделения CO_2, что указывает на протекающую одновременно фотосинтетическую ассимиляцию углекислоты, количественно соизмеримую с процессами ее образования в клетке. Прогревание суспензии водорослей при 55° в течение 5 *мин* в процессе опыта в ячейке инактивирует фотосинтетическое выделение O_2 практически полностью и необратимо. Фотообразование H_2 при этом регистрируется в значительно меньших количествах по сравнению с оптимальным выделением H_2 на тех же клетках, не подвергавшихся такому воздействию, но находившихся в условиях оптимального выделения H_2. Интересно отметить, что коэффициент Вант-Гоффа Q_{10} в диапазоне температур 25—35° для фотообразования H_2 (в случае скрытой, но потенциально активной функции образования O_2) больше 1, а на объектах, утративших способность выделять O_2, меньше 1, т. е. такой же, как у Rh. rubrum.

В полном соответствии с известными литературными данными добавление ДНФ (10^{-4} М) либо ХКФ (10^{-5} М) приводило к стимуляции фотообразования H_2. Однако действие этих разобщителей удалось понять при сочетании эффекта спектрального разделения функций выделения кислорода и водорода с добавлением этих веществ. Выяснилось, что разобщители фотофосфорилирования ингибируют обе функции, но в анаэробных условиях динамическое равновесие ($O_2 \rightleftharpoons H_2$) оказывается сдвинутым в пользу фотообразования водорода. Важным условием активного выделения водорода водорослями является наличие достаточного количества ионов железа в культуральной среде. Стимулирующее влияние железа наблюдается на зеленых водорослях и по фоторедукции (Kessler, 1957; Janagi, Sasa, 1966). Показано, что при этом увеличивается активность гидрогеназы (Kessler, 1968).

Как отмечалось выше, систематические исследования были проведены нами на культуре Chlorella pyrenoidosa. Сравнительные исследования на автотрофных культурах Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus, Chlamydomonas reinhardii и C. humicola подтвердили вышеизложенные закономерности.

Совокупность имеющихся в настоящее время данных позволяет сделать вывод, что функции выделения кислорода и водорода при освещении зеленых водорослей в анаэробных условиях находятся в конкурентных взаимоотношениях, что приводит к альтернативному выходу O_2 и H_2 в регистрируемых количествах. Длительная анаэробная адаптация объекта — не обязательное условие проявления функции фотообразования H_2, но желательна для увеличения эффекта. Возможно, что при этом имеет место не только восстановительная активация конститутив-

ной гидрогеназы, но и дополнительный синтез фермента de novo (Kessler, 1974). В анаэробных условиях и в темноте клетка переходит на гетеротрофный метаболизм за счет ферментативного окисления эндогенных запасов углерода — продуктов предшествовавшего фотосинтеза. Узким местом темновых биохимических реакций, вероятно, является стадия гидролиза запасенных полимерных соединений углерода до мономеров. Обратимые переходы $O_2 \rightleftharpoons H_2$ при изменении интенсивности света, а также факт существования «нулевой» точки говорят о том, что при освещении в анаэробных условиях водоросли сохраняют способность к фотосинтезу с выделением O_2 даже в том случае, если они «адаптированы», т. е. способны к интенсивному гетеротрофному обмену веществ. Выделяющийся кислород может быть терминальным акцептором в процессе ферментативного окисления соединений углерода в цикле Кребса либо его модификациях, а также может приводить к инактивации гидрогеназы при достаточной внутриклеточной концентрации.

Воздействия на объект, ингибирующие одну из функций или смещающие их динамическое равновесие, приводят к более явному проявлению другой функции.

С другой стороны, имеющиеся данные позволяют высказать предположение о сходстве механизмов фотообразования H_2 у зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий.

Правомерно поставить вопрос о том, как далеко заходит это сходство. Могут ли зеленые водоросли фиксировать атмосферный азот, или этот процесс — привилегия прокариотных микроорганизмов? Как положительный, так и отрицательный ответ на этот вопрос будет иметь большое теоретическое и практическое значение.

Дополнительным аргументом в пользу сходства механизмов фотообразования H_2 у зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий можно считать отсутствие фотообразования водорода и эффектов перехода $O_2 \rightarrow H_2$ у сине-зеленых водорослей в условиях, при которых эти явления наблюдаются у зеленых водорослей, хотя было установлено темновое образование молекулярного водорода культурами сине-зеленых водорослей (Ощепков с соавт., 1973). Сине-зеленые водоросли по целому ряду биохимических и морфологических признаков занимают промежуточное положение между бактериями и зелеными водорослями (Гусев, 1968). В основном это автотрофные микроорганизмы, способные к осуществлению фотосинтеза с выделением молекулярного кислорода по универсальному для растительных объектов механизму, но в отличие от зеленых водорослей темновой катаболизм соединений углерода сине-зелеными водорослями не связан с работой цикла Кребса, так как у них отсутствует полный набор необходимых ферментов.

Принципиальный интерес имеет спектральная и квантовая эффективность процесса фотообразования водорода у зеленых водорослей. Спектр действия фотообразования H_2 для культуры Chlorella pyrenoidosa, снятый в мягких физиологических условиях (без добавления ингибиторов, в режиме резкого смещения динамического равновесия $O_2 \rightleftharpoons H_2$ в направлении $O_2 \rightarrow H_2$), соответствует спектру поглощения хлорофиллов *a* и *b* в клетках хлореллы (Ощепков, Красновский, 1974). Спектр относительного квантового выхода фотообразования водорода близок к таковому для функции выделения кислорода (Emerson, Lewis, 1943), но в длинноволновой области ($\lambda > 680$ *нм*) не наблюдается так называемого красного падения квантового выхода. При одновременном освещении объекта двумя разными монохроматическими лучами в диапазоне 409—743 *нм* не наблюдается эффект усиления фотообразования H_2. Минимальный квантовый расход, рассчитанный при 680 *нм*, составил 5 квантов на молекулу выделившегося H_2, причем есть основания предполагать, что он может быть и меньше найденной величины.

Хорошее совпадение спектра действия фотообразования молекулярного водорода хлореллой со спектром поглощения ее хлорофиллов in vivo указывает, что все формы хлорофилла, присутствующие в клетке, эффективны в этом процессе. С другой стороны, совпадение указанных спектров не дает основания связывать процесс фотообразования H_2 у водорослей с активностью фотосистемы I или II, а отсутствие эффектов усиления не подтверждает гипотезы последовательного взаимодействия фотосистем. Полученные результаты допускают возможность функционирования циклического фотофосфорилирования в механизме фотообразования H_2.

В целом фотоэнергетический метаболизм зеленых водорослей находит более удовлетворительное объяснение не с позиций «двухквантовой» гипотезы, а исходя из представлений о том, что роль света при фотосинтезе растений сводится к образованию высокоэнергетических соединений (Emerson, Stauffer, Umbreit, 1944). Фиксация углекислоты и выделение кислорода — темновые ферментативные реакции. Вероятно, процесс циклического фотофосфорилирования обеспечивает образование АТФ, а также энергозависимый перенос электрона от воды до НАДФ.

При недостатке углекислоты происходит усиленное ферментативное окисление продуктов предшествовавшего фотосинтеза в цикле Кребса, что приводит к выделению углекислоты и образованию восстановленных молекул НАД. Энергия циклического фотофосфорилирования при перепроизводстве восстановителей может использоваться для обратного

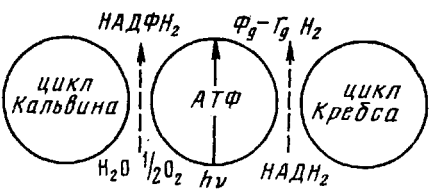


Рис. 3. Схема фотоэнергетического метаболизма зеленых водорослей (Ощепков, 1974)

переноса электрона от $НАДН_2$ до ферредоксингидрогеназного комплекса, осуществляющего катализ выделения молекулярного водорода. Следовательно, три циклических процесса — цикл Кальвина, циклическое фотофосфорилирование и цикл Кребса — определяют фотоэнергетический метаболизм зеленых водорослей (рис. 3).

Источником выделяющегося при фотосинтезе кислорода являются молекулы воды. Выделяющийся при освещении водорослей водород происходит в конечном счете из молекул воды, так как в системе нет иного источника атомов водорода. Однако имеющийся экспериментальный материал указывает на то, что выделение водорода происходит не в результате фотолиза воды, а путем сложной цепи превращений органических соединений, образованных при фотосинтезе.

ЛИТЕРАТУРА

Гоготов И. Н. 1968. Образование молекулярного водорода пурпурными и зелеными фотосинтезирующими бактериями. Автореф. канд. дис. М.

Гусев М. В. 1968. Биология синезеленых водорослей. Изд. МГУ.

Ефимцев Е. И., Бойченко В. А., Литвин Ф. Ф. 1975. Докл. АН СССР, *220*, 986.

Кондратьева Е. Н. 1963. Фотосинтезирующие бактерии. Изд-во АН СССР.

Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. 1976. Изв. АН СССР, № 1.

Ощепков В. П. 1974. Фотообразование молекулярного водорода зелеными водорослями. Автореф. канд. дис. МГУ.

Ощепков В. П., Красновский А. А. 1972. Физиол. растений, *19*, вып. 5, 1090.—1974а. Физиол. растений, *21*, вып. 3, 462.—1974б. Прикл. биохим. и микробиол., *10*, вып. 5, 760.

Ощепков В. П., Никитина К. А., Гусев М. В., Красновский А. А. 1973. Докл. АН СССР, *213*, 739.

Abeles F. B. 1964. Plant Physiol., *39*, 169.

Avron M. 1967. In: Current Topics in Bioenergetics (D. R. Sanadi, ed.), *11*, p. 1. Acad. Press, N. Y.
Bishop M. I. 1966. Ann. Rev. Plant Physiol., **17**, 185.—1967. Photochem. and Photobiol., *6*, 621.
Bishop N. I., Gaffron H. 1963. In: Photosynthetic Mechanisms in Green Plants. Publ. N1145, Nat. Acad. Sci. Nat. Rec. Counc., 441.
Cheniae G. M. 1970. Ann. Rev. Plant Physiol., *21*, 467.
Damaschke K. Z. 1957. Z. Naturforsch., *12b*, 441.
Damaschke K., Lubke M. 1958. Z. Naturforsch., *13b*, 54.
De Kiewiet D. Y., Hall D. O., Jenner E. L. 1965. Biochim. et Biophys. Acta, *109*, 284.
Emerson R., Lewis C. 1943. Amer. J. Bot., *30*, 165.
Emerson R. L., Stauffer J. F., Umbreit W. W. 1944. Amer. J. Bot., *31*, No. 2, 107.
Frenkel A. W. 1952. Arch. Biochem. and Biophys., *38*, 219.
Gaffron H. 1939. Nature, *143*, 204.—1940. Amer. J. Bot., *27*, No. 5, 273.—1942. J. Gener. Physiol., *26*, 241.—1960. In: Plant Physiology (ed. by F. C. Steward), *1B*, Acad. Press.
Gaffron H., Rubin J. 1942. J. Gener. Physiol., *26*, 219.
Gest H. 1963. In: Bacterial Photosynthesis., Antioch. Press. Yellow Springs, Ohio, 129.—1966. Nature, *209*, 879.—1972. Advances Microbiol. Physiol., *7*, 243.
Gest H., Kamen M. D. 1949. Science, *109*, 558.
Gray C. T., Gest H. 1965. Science, *148*, No. 3667, 186.
Healey F. P. 1970a. Plant Physiol., *45*, 153.—1970b. Planta, *91*, 220.
Hind G., Olson J. M. 1968. Ann. Rev. Plant Physiol., *19*, 249.
Horwitz L., Allen F. L. 1957. Arch. Biochem. and Biophys., *66*, No. 1, 45.
Kaltwasser H., Gaffron H. 1964. Plant Physiol., Suppl. *39*, XIII.
Kaltwasser H., Stuart T. S., Gaffron H. 1969. Planta, *89*, 309.
Kamen M. D., Gest H. 1949. Science, *109*, 560.
Katoh S., San Pietro A. 1968. In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis. (K. Shibata, A. Takamiya, A. T. Jagendorf and R. C. Fuller, eds). Tokyo, Univ. Tokyo Press. 148:
Kessler E. 1957. Planta, *49*, 435.—1968. Arch. Mikrobiol., *61*, 77.—1974. In: Algal Physiology and Biochemistry. Ed.: W. D. P. Stewart. Blackwell, Oxford, 456.
Kok B. 1955. Biochim. Biophys. Acta, *16*, 35.
Spruit C. J. P. 1954. Proceedings Ist Int. Photobiological Congr., Amsterdam, 323.—1958. Meded. Landbouwhogeschool, *58*, 1.
Stephenson M., Sticland L. H. 1931. Biochem. J.. *25*, 205.
Stuart T. S. 1971. Planta, *96*, 81.
Stuart T. S., Gaffron H. 1971. Planta, *100*, 228.—1972a. Planta, *106*, 91.—1972b. Planta, *106*, 101.
Stuart T. S., Herold E. W., Gaffron H. 1972. Analyt. Biochem., *46*, 91.
Stuart T. S., Kaltwasser H. 1970. Planta, *91*, 302.
Tagawa K., Arnon D. I. 1962. Nature, *195*, 537.
Van Niel C. B. 1931. Arch. Mikrobiol., *3*, 1.—1962. Ann. Rev. Plant Physiol., *13*, 1.
Wang R., Healey F. P., Myers J. 1971. Plant Physiol., *48*, 108.
Weinbach E. C., Garbus J. 1969. Nature, *221*, 1016.
Yanagi S., Sasa T. 1966. Plant Cell Physiol., *7*, 593.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР,
Москва

Статья поступила в редакцию
26.V.1975

V. P. OSHCHEPKOV, A. A. KRASNOVSKI

PHOTOPRODUCTION OF MOLECULAR HYDROGEN BY GREEN ALGAE

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The works on the mechanism of hydrogen evolution upon illumination of green algae are reviewed. Comparison of the effects of specific inhibitors, electron donors, change of temperature, intensity and quality of light as well as of the experiments with mutants give ground to conclude that the functios of oxygen and hydrogen evolution are competitive. The dynamic equlibrium of these functions ($O_2 \rightleftharpoons H_2$) can be regulated by the conditions of the experiment. The reductant for hydrogen photoproduction by green algae is formed as a result of enzymic catabolism of carbon compounds, the products of the previous photosynthesis. The energy of the light absorbed by all forms of chlorophyll is used to bring the redox potential of the system up to the hydrogen electrode value. The concept of biochemical mechanisms of hydrogen photoproduction by green algae and photosynthetic bacteria being similar is the most valid.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 10 1976 Вып. 2

УДК 541.141.4

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ФОТОПРОЦЕССОВ В ЛЕГКИХ ФРАГМЕНТАХ ХЛОРОПЛАСТОВ

В. А. ШУВАЛОВ, В. В. КЛИМОВ и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пущино, Московская область
Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Предпринята попытка исследования механизма светового разделения зарядов и их рекомбинации в активных центрах фотосистемы 1 легких фрагментов хлоропластов. Показано, что изученные свойства донора электрона системы соответствуют пигменту P700 (с максимумами поглощения при 430 и 700 *нм*), свойства акцептора электрона — соединению P430 типа ферредоксина (с максимумами поглощения при 420, 445 и 717 *нм*), а также низкопотенциальному термостабильному соединению Px. Найдено, что накопление зарядов в центрах как в виде $P700^+ \cdot P430$, так и в виде $P700 \cdot P430^-$ сопровождается увеличением выхода флуоресценции и сдвигом полосы поглощения хлорофилла от 680 до ~690 *нм*. Процесс рекомбинации $P700^+$ с $P430^-$ сопровождался длительной люминесценцией. Исследование кинетики взаимодействия возбужденных состояний хлорофилла с активными центрами, а также кинетики рекомбинации зарядов и рекомбинационной люминесценции показало, что первичный фотопроцесс в фотосистеме 1 происходит при взаимодействии не менее трех центров разделения зарядов ($P700 \cdot P430$).

В ряде работ показано, что первичный донор электрона в световой реакции фотосистемы 1 зеленых растений — хлорофилл реакционного центра этой фотосистемы, P700, окисление которого сопровождается выцветанием полос поглощения при 700, 685 и 430 *нм* [1], появлением сигнала ЭПР с $g=2{,}003$ и полушириной ~8 *э* [2], а также изменение выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 1 [3, 4]. Предполагается, что первичным акцептором электрона фотосистемы 1 является вещество, ответственное за появление сигнала ЭПР фотосистемы 1 при 25° К, спектр которого соответствует спектру «связанного ферредоксина» с $g=1{,}86$, 1,94 и 2,05 [5, 6]. Освещение при 25° К приводит к образованию эквимолярного количества $P700^+$ и восстановленного ферредоксина [2]. Окислительно-восстановительный потенциал (E_6) связанного ферредоксина имеет различные значения в области от —520 до —600 *мв* для разных полос поглощения микроволнового поля [7]. Хияма и Ки при помощи импульсной фотометрии обнаружили соединение P430, отвечающее по своим свойствам первичному акцептору электрона фотосистемы 1 [8]. Дифференциальный спектр поглощения P430, а также величина E_0 указывает на то, что P430 может быть связанным ферредоксином, который определяет появление сигнала ЭПР при 25° К [9, 10].

Не решен вопрос о том, как осуществляется перенос электрона: в изолированных одиночных комплексах донора и акцептора или при взаимодействии нескольких центров разделения заряда. Ответ на этот вопрос необходим для исследования физической сущности механизма разделения заряда в центрах фотосистемы 1. Необходимо знание природы и свойств донора и акцептора реакции, кинетической и температурной характеристики процесса фоторазделения зарядов и их рекомбинации, а также кинетики взаимодействия возбужденных состояний с центрами

разделения заряда. В связи с этим нами проведено совместное изучение свойств Р700, Р430, изменений квантового выхода флуоресценции (ΔФ), а также длительной люминесценции фотосистемы 1.

МЕТОДИКА

Легкие фрагменты хлоропластов гороха, необходимые для исследования, получали по методике Андерсон и Бордмана [11] с некоторыми изменениями. Хлоропласты, суспендированные в 0,05 *М трис*-HCl-буфере, pH 8, содержащем 0,5 *М* NaCl при концентрации хлорофилла 0,5 *мг/мл*, обрабатывали 50 *мин* 1%-ным дигитонином и 10 *мин* 1%-ным дигитонином и 0,1%-ным тритоном X-100. Суспензию центрифугировали 30 *мин* при 80 000 *g*. Супернатант центрифугировали 3,5 *час* при 175 000 *g*. Осадок (ДТ-175) суспендировали в *трис*-буфере с добавлением 10% глицерина и хранили при —196°. Перед опытом фрагменты суспендировали в 0,05 *М* буфере *трис*-HCl, pH 8. Фрагменты не были способны к восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) даже в присутствии гидроксиламина (искусственного донора электрона для фотосистемы 2 [12]). Однако примесь фотосистемы 2 обнаруживали по наличию компоненты световых изменений флуоресценции [3, 4] и послесвечения [13], характерных для фотосистемы 2. После прогревания фрагментов при 45° в течение 5 *мин* эти проявления активности фотосистемы 2 исчезали, тогда как активность фотосистемы 1 полностью сохранялась. Фрагменты имели соотношения: хлорофилл *a*/хлорофилл *b*=4,95; Р700/хлорофилл *a*=1/150; квантовый выход окисления Р700 ~ 35%; скорость фотоокисления 2,6-дихлорфенолиндофенола фотосистемой 1 [4] в присутствии пластоцианина составляла 320 *мкмоль/мг* хлорофилла в 1 *час*.

Дифференциальные спектры поглощения (свет минус темнота) и световые изменения флуоресценции измеряли в 1-см кювете при помощи фосфороскопической установки, аналогичной описанной ранее [14]. Цилиндрический фосфороскоп разделял во времени действующий и измерительный свет темновым интервалом в 2 *мсек*. Интенсивность пропущенного измерительного света или интенсивность возбуждаемой им флуоресценции измеряли при помощи ФЭУ-38, усиленный сигнал от которого поступал на самописец. Интенсивность действующего света с $600<\lambda<800$ *нм* составляла $1{,}8\cdot 10^5$ *эрг·сек*$^{-1}$·*см*$^{-2}$, а с $700<\lambda<800$ *нм* — $0{,}9\cdot 10^5$ *эрг·сек*$^{-1}$·*см*$^{-2}$. Чувствительность установки составляла 10^{-4} ед. *А*. Флуоресценцию ($\lambda>660$ *нм*) возбуждали измерительным светом 480 *нм* с интенсивностью 45 *эрг·см*$^{-2}$·*сек*$^{-1}$.

Для исследования длительной люминесценции использовали импульсную фосфороскопическую установку, описанную ранее [15]. Установка состояла из лампы-вспышки ИСШ-100-3 (длительность импульса $2\cdot 10^{-6}$ *сек*, Е равно 5 *дж*), дискового фосфороскопа (время разрешения $2\cdot 10^{-4}$ *сек*), ФЭУ-38, усилителя, осциллографа, усилителя постоянного тока и самописца.

Установка для импульсной дифференциальной спектрофотометрии состояла из лампы-вспышки ИСШ-100-3, источника стабилизированного измерительного света, монохроматора, ФЭУ-38 и осциллографа.

Спектры ЭПР при —196° измеряли на 3-см спектрометре ЭПР.

Зависимость светоиндуцированных изменений абсорбции (ΔA) и изменений флуоресценции фрагментов от величины окислительно-восстановительного потенциала среды (E_h) измеряли при помощи герметичной кюветы с платиновым и каломельным электродами. Измеряемые значения E_h насыщенного раствора хингидрона при различных pH среды совпадали со справочными [16] с точностью до 2—5 *мв*. E_h в области от +580 до +330 *мв* задавали с помощью системы ферри — ферроцианид (0,005 *М*) в 0,1 *М* фосфатном буфере (pH 7); от +300 до 0 *мв* — при помощи аскорбата Na (10^{-3}—10^{-4} *М*) и 2,6-дихлорфенолиндофенола ($2\cdot 10^{-5}$ *М*) в том же буфере; от —400 до —600 *мв* — при помощи дитионита (0,2—2,0 *мг/мл*) и нейтрального красного (10^{-5} *М*) после удаления воздуха из кюветы. В последнем случае использовали 0,1 *М* фосфатный буфер (pH от 7 до 8) и 0,05 *М* буфер *трис*-HCl (pH от 7,5 до 9,5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Постановка экспериментов и обсуждение результатов основывались на предположении, что в результате поглощения кванта света фотосистемой 1 происходит разделение зарядов со стабилизацией электрона

на акцепторе типа Р430, а дырки — на хлорофилле Р700. Последующие процессы в центре могут протекать по-разному [17]. Если в системе нет вводимых извне эффективных акцепторов и доноров электрона, то происходит рекомбинация зарядов (режим рекомбинации):

$$P700 \cdot P430 \underset{k_0}{\overset{h\nu}{\rightleftharpoons}} P700^+ \cdot P430^-.$$

В этом режиме кинетика восстановления $P700^+$ и окисления $P430^-$ совпадает [9], и процесс, как нами было показано, сопровождается длительной люминесценцией. Если в системе присутствует экзогенный акцептор электрона (A), электрон покидает центр со стабилизацией состояния $P700^+ \cdot P430$ (режим накопления $P700^+$):

$$P700^+ \cdot P430^- + A \rightarrow P700^+ \cdot P430 + A^-.$$

Напротив, в случае наличия экзогенного эффективного донора электрона (Д) происходит стабилизация состояния $P700 \cdot P430^-$ (режим накопления $P430^-$):

$$P700^+ \cdot P430^- + Д \rightarrow P700 \cdot P430^- + Д^+.$$

Режим накопления $P700^+$ и $P430^-$ использовали для измерения дифференциальных спектров, величин E_0 и других свойств Р700 и Р430, а также для изучения кинетики взаимодействия активных центров с возбужденными состояниями пигментов.

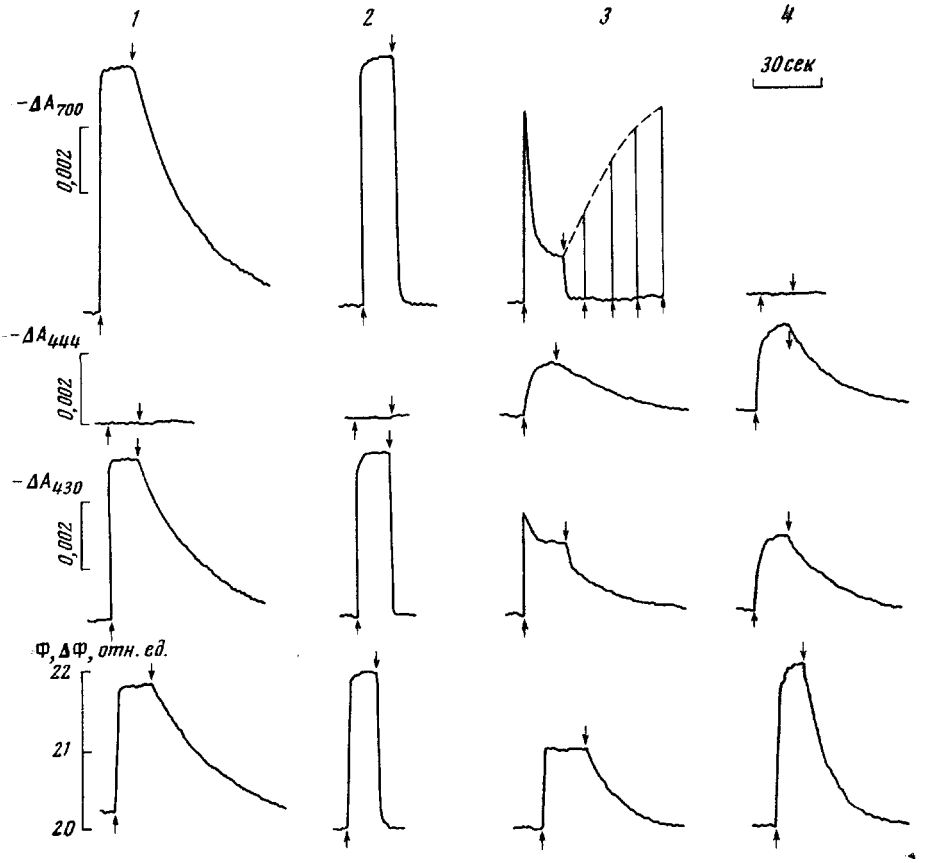


Рис. 1. Фотоиндуцированные спектральные изменения абсорбции (ΔA_{700}, ΔA_{444}, ΔA_{430}), флуоресценции (Ф) и изменения выхода флуоресценции (ΔФ) легких фрагментов хлоропластов (ДТ-175). Действующий свет $660 < \lambda < 800$ *нм*, $1{,}8 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$. Содержание хлорофилла 13 *мкг/мл*. *1* — аскорбат Na (1 *мМ*), *2* — аскорбат Na, ДХФИФ (10 *мкМ*), *3* — дитионит (1 *мг/мл*), *4* — дитионит, нейтральный красный (10 *мкМ*)

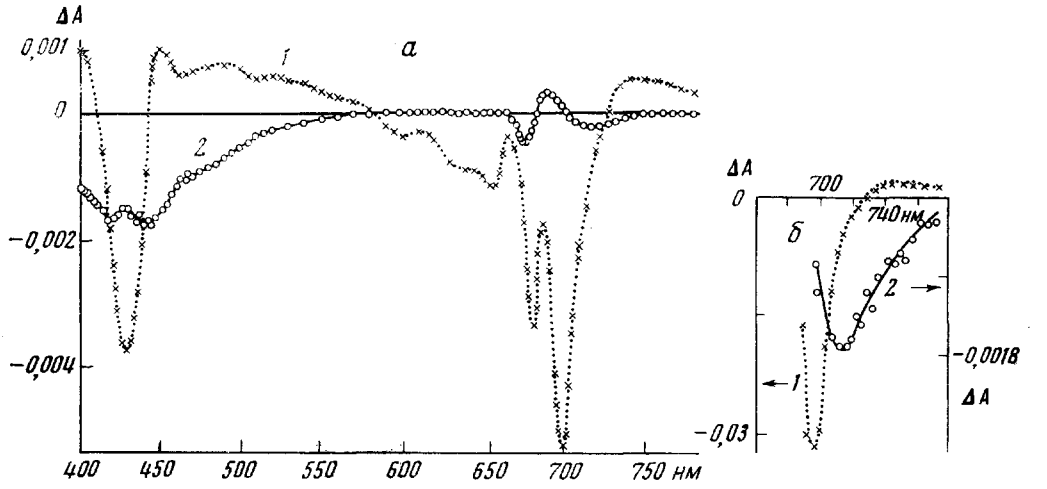


Рис. 2. Дифференциальные спектры абсорбции «свет минус темнота» фрагментов ДТ-175: *1* — в присутствии 25 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата Na (режим фотонакопления $P700^+$); *2* — в присутствии 1 *мг/мл* дитионита и 10 *мкМ* нейтрального красного (режим фотонакопления $P\,430^-$). *а* — содержание хлорофилла 10 *мкг/мл*; *б* — 70 *мкг/мл*. Действующий свет для кривых *1* — $660<\lambda<800$ *нм*, $1{,}8\cdot10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$; для *2* — $700<\lambda<800$ *нм*, $0{,}9\cdot10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$

Дифференциальные спектры поглощения P700 и P430. При включении постоянного действующего света во фрагментах ДТ-175 наблюдали изменения абсорбции в области 700 и 430 *нм* (ΔA_{700} и ΔA_{430}). Скорость фотовыцветания возрастала при добавлении акцептора электрона для фотосистемы 1 (метилвиологена). Темновая релаксация этих изменений определялась скоростью восприятия электрона от внешнего донора и ускорялась при добавлении восстановленного 2,6-дихлорфенолиндофенола (рис. 1). Спектр изменений абсорбции (рис. 2, *1*) совпадал с известным дифференциальным спектром P700 [1, 9]. Таким образом, в данном случае ΔA_{700} и ΔA_{430} отражают накопление $P700^+$.

В этих же условиях наблюдали световые изменения выхода флуоресценции ($\Delta\Phi$) (рис. 1), которые по своим свойствам (влияние аскорбата, восстановленного 2,6-дихлорфенолиндофенола, метилвиологена) сходны с ΔA_{700} и, как отмечалось ранее [3, 4], обусловлены изменением выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 1 вследствие фотовыцветания P700.

Для перехода к режиму накопления акцептора в систему добавляли донор электрона — дитионит. После добавления дитионита ΔA_{700}, достигнув в первый момент освещения максимального значения, быстро уменьшалась при дальнейшем освещении до стационарного уровня (рис. 1). Величина этого уровня уменьшалась с увеличением концентрации дитионита. В этих же условиях в изобестической точке спектра P700 (444 *нм*) наблюдали новый сигнал — уменьшение абсорбции (ΔA_{444}), кинетика возникновения которого соответствовала кинетике светового уменьшения ΔA_{700}. Темновая релаксация ΔA_{444} соответствовала кинетике появления обратимых ΔA_{700} после светового их ингибирования (рис. 1) и замедлялась при понижении E_h среды. Последующее добавление медиаторов переноса электрона типа феназинметасульфата ($E_0=+80$ *мв*) или нейтрального красного ($E_0=-350$ *мв*) при E_h около -450 *мв* приводило к резкому ускорению светового спада ΔA_{700}, так что ΔA_{700} практически не регистрировалась используемой установкой. Величина ΔA_{444} в этих условиях увеличивалась (рис. 1).

Спад ΔA_{700} во время освещения может быть вызван накоплением восстановленного акцептора за счет превышения скорости темнового вос-

становления $P700^+$ над скоростью окисления акцептора. Комплементарность кинетики ΔA_{700} и ΔA_{444} может указывать на то, что ΔA_{444} отражает накопление восстановленного акцептора.

Светоиндуцированные изменения флуоресценции в этих условиях, оставаясь близкими по амплитуде, существенно менялись по кинетике, которая становится подобной кинетике ΔA_{444} (рис. 1). Этот факт может указывать на то, что основной путь растраты энергии возбуждения хлорофилла связан в этих условиях с восстановлением соединения, ответственного за ΔA_{444}.

В присутствии дитионита или дитионита и нейтрального красного спектр изменений абсорбции, тождественных по кинетике ΔA_{444} (рис. 2, *2*), в синей области спектра имел максимумы при 420 и 445 *нм*. Благодаря использованию режима накопления акцептора при отсутствии изменений абсорбции, связанных с фотоокислением P700, удается наблюдать изменения в красной области спектра, соответствующие по кинетике ΔA_{444}.

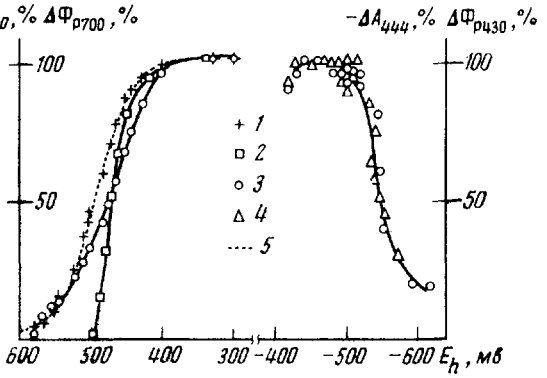


Рис. 3. Зависимость величин световых ΔA_{700} (*1*, *2*), изменений флуоресценции (*3*) и ΔA_{444} (*4*) фрагментов ДТ-175 от окислительно-восстановительного потенциала (E_h) среды. Интенсивность измерительного света (*эрг·см*$^{-2}$·*сек*$^{-1}$): *1* — 0,03, *2* — 0,3; *3* — 13, *4* — 0,5. *5* — теоретическая зависимость по уравнению Нернста для одноэлектронного перехода с $E_0 = +493$ *мв*. Действующий свет $660 < \lambda < 800$ *нм*, $1{,}8 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$·*сек*$^{-1}$. Содержание хлорофилла 10 *мкг/мл*. Условия титрования см. в «Методике»

В этой области наблюдалось выцветание поглощения при 677 и 717 *нм* и появление полосы 690 *нм* (рис. 2, *2*).

Режим накопления восстановленного акцептора сходен с режимом накопления $P430^-$ [17], а спектр изменений абсорбции в этом режиме (рис. 2, *а*) сходен со спектром P430 в синей области. Полоса 717 *нм*, как и полосы 420 и 445 *нм*, по положению, полуширине и относительной интенсивности сходны с полосами дифференциального спектра абсорбции (восстановленный минус окисленный) ферредоксина [18], что ранее отмечалось для акцептора P430 [17]. Все это позволяет приписывать сигналу ΔA_{444} связь с P430.

Равные по величине полосы 677 и 690 *нм* (рис. 2, *а*, *2*) могут быть связаны с электрохромным сдвигом полосы абсорбции хлорофилла ~680 *нм*, вызванным электростатическим полем восстановленного акцептора. Аналогичное происхождение, возможно, имеют полосы 677 и 685 *нм* в дифференциальном спектре абсорбции, измеренном при —196° (см. рис. 5), а также максимум 682 и минимум 689 *нм* в дифференциальном спектре P700 при 20° (рис. 2, *а*, *1*). В последнем случае инициирующее поле, возможно, создается электронной вакансией на $P700^+$, подобно тому как это предполагается для происхождения полос в дифференциальном спектре абсорбции бактериохлорофилла [19].

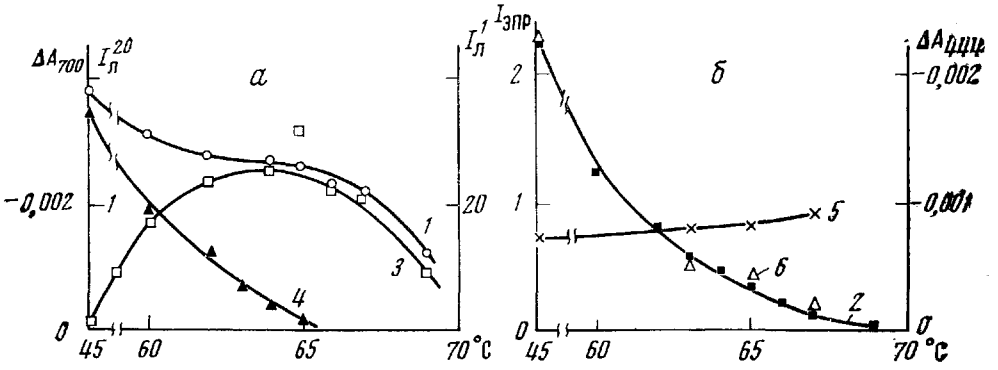


Рис. 4. Влияние термоинактивации фрагментов ДТ-175 на величину ΔA_{700} (*1*), ΔA_{444} (*2*), на интенсивность длительной люминесценции, измеряемой через 1 *мсек* ($I_л^1$) (*3*) и через 20 *мсек* ($I_л^{20}$) (*4*) после вспышки света при 20°, и сигнала ЭПР при —196° ($I_{ЭПР}$ для обратимой (*5*) и необратимой (*6*) фаз. (Условия измерения ΔA_{700} и ΔA_{444} см. на рис. 2, *а*, а сигнала ЭПР — на рис. 5, *б*. Люминесценцию измеряли в присутствии 5 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата Na при содержании хлорофилла 10 *мкг*/*мл*. По оси абсцисс — температура, при которой проводили инактивацию в течение 5 *мин*)

Окислительно-восстановительный потенциал (E_0) Р700 и Р430. E_0 для пары Р430/Р430$^-$ определяли по зависимости величин ΔA_{444} и соответствующих им изменений флуоресценции ($\Delta\Phi_{Р430}$) от E_h среды. При уменьшении E_h от —430 до —500 *мв* величины ΔA_{444} и $\Delta\Phi_{Р430}$ не изменялись, ниже —500 *мв* наблюдали их падение, причем 50%-ное сохранение сигнала соответствовало —550 *мв* (рис. 3). Однако уменьшение величин ΔA_{444} и $\Delta\Phi_{Р430}$ при $E_h<$—520 *мв* было необратимым, вследствие чего измеренное значение E_0 можно рассматривать только как предварительное.

На рис. 3 представлены также данные для ΔA_{700}: при минимальных интенсивностях измерительного света E_0 для пары Р700$^+$/Р700 составляет +493 *мв*. При более высоких интенсивностях измерительный свет сам вызывает фотоокисление Р700, что ведет к уменьшению измеряемого значения E_0 (рис. 3, *2*). По этой причине, возможно, ранее [20] для E_0 пары Р700$^+$/Р700 была получена меньшая величина (+430 *мв*). Такое несоответствие величин E_0 могло быть вызванным также использованием различных по структуре объектов. Величина E_0 для пары Р700$^+$/Р700, измеренная по титрованию изменений флуоресценции, соответствующих фотоокислению Р700 ($\Delta\Phi_{Р700}$), составляла 475 *мв*, а не 493 *мв*, что также может быть связано с влиянием интенсивности измерительного света. В области изменения E_h среды от 0 до —400 *мв* наблюдали исчезновение сигнала Р700, сопровождающееся появлением сигнала Р430. При этом происходил соответствующий переход $\Delta\Phi_{Р700}$ к $\Delta\Phi_{Р430}$.

Термостабильность Р700 и Р430. Нами установлено, что сигнал ΔA_{444}, регистрируемый при E_h=—450 *мв* (Р430), исчезает в диапазоне от 60 до 65° (рис. 4). Сигнал ΔA_{700}, измеряемый при $E_h\approx 0$ *мв* (Р700), устойчивее и исчезает в диапазоне от 67 до 75° (рис. 4). Таким образом, термостабильность Р700 и Р430 оказывается различной, причем окисление Р700 после инактивации Р430 осуществляется, по-видимому, через акцептор другой природы. Наличие акцепторов двух типов демонстрируется при изучении процесса при —196°.

Две фазы фотоокисления Р700 при —196°. При регистрации ΔA_{700} и сигнала ЭПР (с $g=2{,}0025\pm0{,}0005$) при —196° наблюдаются обратимая и необратимая фазы фотоокисления Р700 в отношении 1 : 3 (рис. 5). Уменьшение E_h среды ниже —520 *мв*, сопровождающееся исчезновением световых ΔA_{444}, приводило к исчезновению необратимой фазы фотоокис-

ления P700, тогда как обратимая оставалась неизменной. Необратимая при —196° фаза фотоокисления P700 подавлялась также в результате термоинактивации фрагментов при 60—67°, причем это происходило параллельно с инактивацией P430 (рис. 4, *б*). В этих условиях обратимая при —196° фаза фотоокисления P700 сохранялась.

На основании этих данных можно предположить, что необратимый захват электрона связан с восстановлением акцептора P430, тогда как обратимый захват — с восстановлением другого акцептора, более низкопотенциального и термостабильного соединения Px. Ранее было выска-

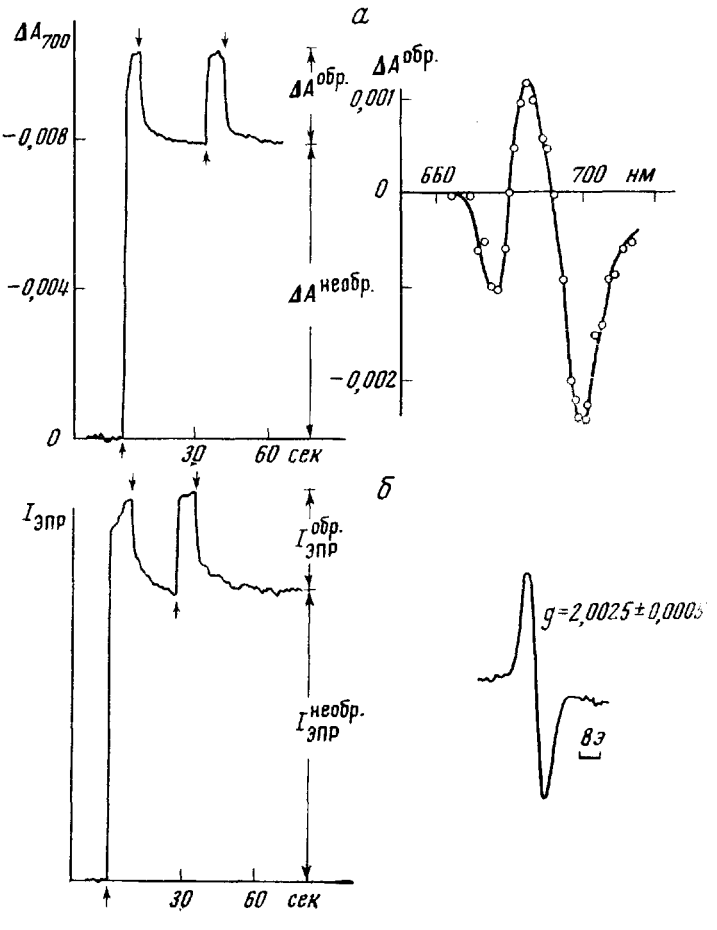


Рис. 5. Фотоокисление P 700 фрагментов ДТ-175 при —196° в присутствии 25 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата: *а* — кинетика ΔA_{700} и спектр обратимой компоненты изменений абсорбции; *б* — кинетика и спектр сигнала ЭПР. Содержание хлорофилла: *а* — 0,3 *мг/мл*, *б* — 0,6 *мг/мл*. Действующий свет $700 < \lambda < 800$ *нм*, $0{,}9 \cdot 10^5$ *эрг·см*$^{-2}$*·сек*$^{-1}$. Длина оптического пути для *а* — 2 *мм*

зано предположение, что обратимая фаза отражает восстановление первичного, а необратимая — вторичного акцептора электрона [21]. Однако наличие изменений флуоресценции, связанных с восстановлением P430 при 20° (рис. 1), может указывать на то, что сечение захвата электрона выше для P430, чем для Px.

Длительная люминесценция фотосистемы 1. Захват электронов акцепторами (ловушками электронов) и их освобождение при положительных температурах можно проследить также по длительной люминесценции, испускаемой хлорофиллом фотосистемы 1 [22]. Предварительное исследование, проведенное в данной работе, показало, что по своим свойствам

люминесценция фотосистемы 1 резко отличается от наиболее устойчивой (из пяти компонентов [13]) миллисекундной люминесценции фотосистемы 2 тяжелых фрагментов (таблица), которая частично сохраняется при выделении легких фрагментов. Это отличие проявляется по энергии активации, времени жизни, термостабильности и в особенности по действию феррицианида, значительно активирующего люминесценцию фотосистемы 2 и полностью подавляющего люминесценцию фотосистемы 1. Термоинактивация легких фрагментов при 45° в течение 5 *мин* полностью ингибировала люминесценцию фотосистемы 2.

Свойства длительной люминесценции двух фотосистем хлоропластов

Характеристики люминесценции	Фотосистема 2, тяжелые фрагменты	Фотосистема 1, легкие фрагменты	
	компонент I	спонтанное свечение, компонент VI	свечение, связанное с глубокой ловушкой, компонент VII
Время жизни при 20°, *мсек*	0,5	1	20
Энергия активация свечения, *эв*	0,2	0,45	0,63
Редокс-потенциал, оптимальный для наблюдения, *в*	$>+0,4$	$<-0,5$	от $+0,4$ до $-0,4$
Температура инактивации, *град*	50	69—75	60—66
Начальная интенсивность послесвечения, *отн. ед.*	100	8	1

В результате исследования длительной люминесценции фотосистемы 1 удалось показать, что она определяется в основном двумя типами свечения со временем жизни 20 *мсек* и 1 *мсек* при 20° (таблица). В обычных условиях люминесценция полностью определяется глубокой ловушкой, тогда как после термоинактивации при 65° или при E_h среды ниже —500 *мв* возникает спонтанно затухающее свечение (таблица). Спектр излучения обоих типов люминесценции сдвинут в длинноволновую область по отношению к спектру флуоресценции фрагментов и имеет максимум ~ 710 *нм*.

Световое накопление P700 в виде $P700^+$ (без соответствующего накопления восстановленного акцептора) сопровождалось параллельным уменьшением стационарной интенсивности люминесценции, связанной с глубокой ловушкой. Следовательно, интенсивность люминесценции пропорциональна доле центров с неокисленным P700. Так как именно центры с неокисленным P700 дают при освещении равное количество $P700^+$ и восстановленного акцептора, можно предположить, что люминесценция испускается в результате рекомбинации этих двух продуктов, сопровождающейся с определенной вероятностью возбуждением P700.

Действительно, после одиночного импульса света затухание люминесценции, связанной с глубокой ловушкой, резко ускоряется с увеличением концентрации экзогенного акцептора электрона, метилвиологена, а кинетика затухания аппроксимируется экспонентой (рис. 6, *а*). Время жизни люминесценции ($\tau_{1/2}$) приближается к измеренному ранее [9] $\tau_{1/2}$ для экспоненциально затухающего сигнала $P430^-$ в присутствии тех же концентраций метилвиологена (время жизни $P700^+$ в этих условиях увеличивается). Константа скорости взаимодействия акцептора с метилвиологеном, вычисленная из данных по люминесценции (рис. 6, *а*), соответствует измеренной ранее по окислению $P430^-$ [9] и составляет $1{,}4 \cdot 10^7\ M^{-1} \cdot сек^{-1}$.

С другой стороны, затухание люминесценции ускорялось при добавлении эффективного донора электрона — системы: восстановленный нейтральный красный + дитионит (рис. 6, *б*). В этом случае время жизни экспоненциально затухающей люминесценции уменьшалось с увеличе-

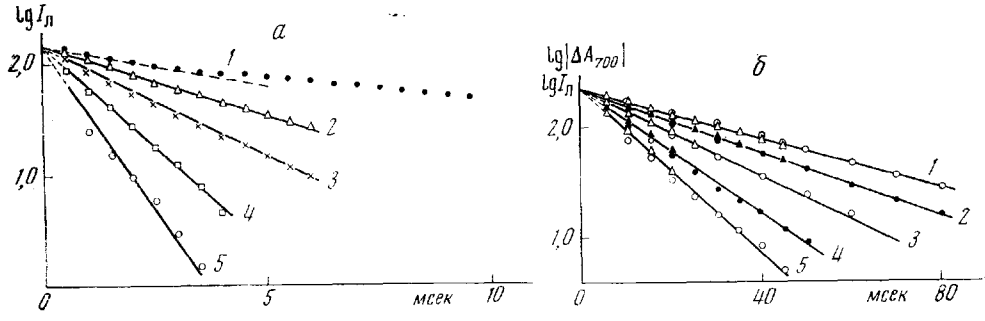


Рис. 6. Кинетика затухания длительной люминесценции (компонент VII) фрагментов ДТ-175 после одиночных вспышек света (10^{-6} *сек*, 5 *дж*): *а* — в присутствии 5 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата Na и различных концентраций метилвиологена (*мкМ*): *1* — 0, *2* — 10, *3* — 20, *4* — 40, *5* — 100; *б* — в присутствии 1 *мг/мл* дитионита и различных концентраций нейтрального красного (*мкМ*): *1* — 0, *2* — 0,8, *3* — 1,6, *4* — 3,2, *5* — 5,6; на рис. *б* дана кинетика затухания ΔA_{430} ($P700^+$) в присутствии тех же концентраций реагентов (▲, △). Содержание хлорофилла 10 *мкг/мл*

нием концентрации восстановленного нейтрального красного, совпадая со временем жизни $P700^+$ в тех же условиях (рис. 6, *б*) (время жизни $P430^-$ в подобных условиях увеличивается [17]). Константа взаимодействия восстановленного нейтрального красного с $P700^+$ составляла $1{,}2 \cdot 10^7$ $M^{-1} \cdot сек^{-1}$.

Таким образом, люминесценция, связанная с глубокой ловушкой (компонент VII), зависит от концентрации как $P430^-$, так и $P700^+$ и, по всей вероятности, есть проявление процесса рекомбинации этих продуктов.

Связь компонента VII люминесценции с P430 подтверждается также данными о параллельности уменьшения величин люминесценции и ΔA_{444} в результате обработки фрагментов при температурах от 60 до 66° (рис. 4). В этих же условиях наблюдается возрастание спонтанной люминесценции (компонент VI, рис. 4, *а*).

Было найдено, что компонент VI люминесценции, возникающий при тепловой инактивации P430 или при химическом восстановлении P430, наблюдается как при 20°, так и при —196°. Однако спектр излучения люминесценции в последнем случае сдвинут в длинноволновую область и имеет максимум ~960 *нм*. Таким образом, можно считать, что при —196° наблюдается фосфоресценция, а при 20° замедленная флуоресценция хлорофилла *а*, т. е. свечение связано с образованием триплетных состояний пигмента. Следует подчеркнуть, что триплетные состояния образуются только в отсутствие активной формы акцептора P430.

P700 и длительная люминесценция в режиме рекомбинации. Информацию о механизме рекомбинации $P700^+$ и $P430^-$ можно получить при измерении кинетики затухания компонента VII люминесценции, окисления $P430^-$ и восстановления $P700^+$ в условиях, когда концентрации последних равны. Такое равенство соблюдается в режиме рекомбинации, при этом $P430^-$ и $P700^+$ исчезают по одинаковой кинетике, описываемой гиперболой [9]. На рис. 7, *а* приведены кинетики затухания люминесценции и восстановления $P700^+$ в режиме рекомбинации после импульса света. Кинетика темнового восстановления $P700^+$ аппроксимируется гиперболой и соответствует по своим параметрам гиперболе, полученной ранее для $P700^+$ и $P430^-$ в подобных условиях [9]. Затухание люминесценции в этих условиях происходит быстрее: ее интенсивность в каждый данный момент времени пропорциональна $[P700^+]^2$, что видно из кривой *2* на рис. 7, *а*. Квадратичная зависимость люминесценции от концентрации $P700^+$ наблюдается также при измерении зависимости начальной интенсивности люминесценции от начальной концентрации $P700^+$ после импульса света определенной интенсивности (рис. 7, *б*).

Таким образом, если в режиме рекомбинации соблюдается равенство: $[P700^+]=[P430^-]$, как это показано ранее [9], гиперболическая зависимость означает, что $-d[P700^+]/dt=k_1[P700^+]\cdot[P430^-]=k_1[P700^+]^2$. Так как люминесценция зависит от концентрации $P700^+$ и $P430^-$ (рис. 6), то интенсивность люминесценции должна быть равна: $I_л=k_2[P700^+]\cdot[P430^-]=k_2[P700^+]^2$, что подтверждается экспериментально.

Если рекомбинация $P700^+$ и $P430^-$ происходила бы в изолированных друг от друга комплексах, то кинетика восстановления $P700^+$ и окисления $P430^-$, а также кинетика затухания рекомбинационной люминесценции должны были совпадать и следовать экспоненциальному закону. Данные о гиперболическом характере кинетики и квадратичной зависи-

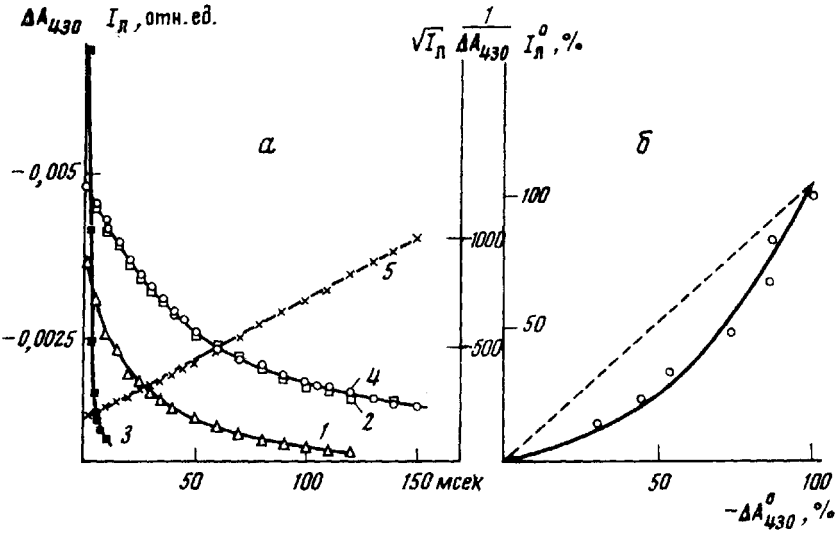
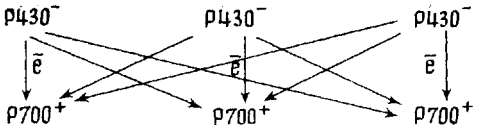


Рис. 7. Соотношение между интенсивностью длительной люминесценции ($I_л$) и ΔA_{430} ($P700^+$) фрагментов ДТ-175: *а* — в процессе затухания после одиночных вспышек света: *1* — $I_л$, *2* — $\sqrt{I_л}$, *3* — $I_л$ фрагментов, обработанных при 65°, *4* — ΔA_{430}, *5* — $1/\Delta A_{430}$; *б* — в начальный момент после вспышки света ($I^0_л$, ΔA^0_{430}). Суспензия содержала 10 *мкг/мл* хлорофилла, 5 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата

мости ($I_л=k[P700^+]^2$) указывают на то, что рекомбинация каждого $P700^+$ происходит не с одним определенным акцептором ($P430^-$), а с любым из группы $P430^-$. Схематически взаимодействие центров можно представить так:



Анализ кривой темнового восстановления $P700^+$ и затухания люминесценции в режиме рекомбинации показывает, что во взаимодействующую группу может входить не менее трех молекул P700 и трех молекул P430.

Изменения флуоресценции в режиме накопления $P700^+$ и $P430^-$. Взаимодействие центров, проявляющееся при рекомбинации $P700^+$ и $P430^-$, может также наблюдаться в процессе разделения заряда на свету. Для выяснения этого вопроса исследовали соотношение между состоянием активного центра и квантовым выходом флуоресценции в режиме накопления $P700^+$ и $P430^-$. Фотоиндуцированное увеличение вы-

хода флуоресценции хлорофилла фотосистемы I связано, по всей вероятности, с потерей способности активных центров фотосистемы I использовать энергию возбуждения хлорофилла в фотохимической реакции. Это может быть вызвано или фотовыцветанием (фотоокислением) P700, являющимся ловушкой энергии возбуждения, или фотовосстановлением P430 — партнера P700 в фотохимической реакции. В первом случае происходит усиление флуоресценции молекул хлорофилла, ближайших к P700, тогда как во втором случае флуоресцировать, вероятно, может

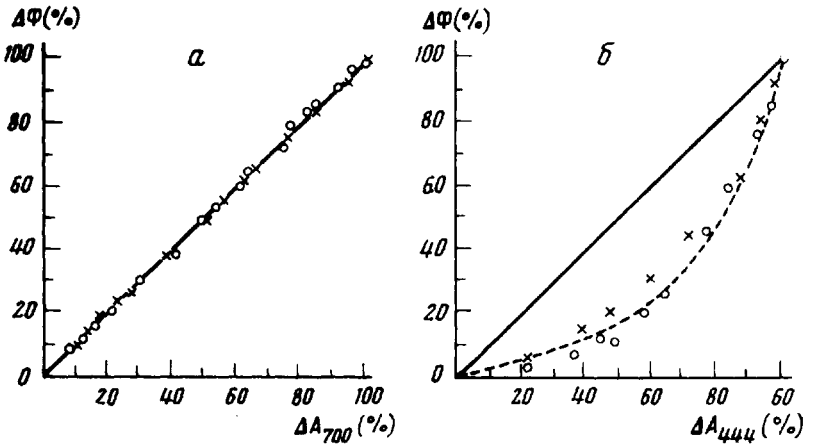
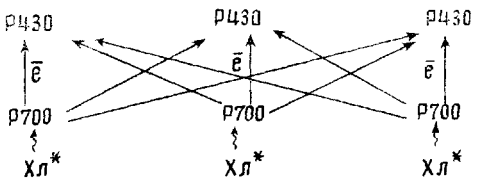


Рис. 8. Изменение флуоресценции (ΔФ) как функция величины ΔA_{700} (*а*) и ΔA_{444} (*б*) при освещении фрагментов ДТ-175 светом 600—800 *нм* различной интенсивности ($I_{макс} = 1{,}8 \cdot 10^5$ *эрг·сек*$^{-1}$·*см*$^{-2}$): *а* — в присутствии 25 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата (○) и после добавления 100 *мкМ* метилвиологена (×); *б* — в присутствии 1 *мг/мл* дитионита (○) и после добавления 10 *мкМ* нейтрального красного (×). Пунктир — теоретическая кривая для квантового выхода разделения заряда, равного 0,8. Содержание хлорофилла 10 *мкг/мл*

также и P700. Соотношение величин $\Delta\Phi_{P700}$ и $\Delta\Phi_{P430}$ (рис. 1) может свидетельствовать о том, что по своим флуоресцентным свойствам P700 существенно не отличается от ближайших к нему молекул хлорофилла.

Из рис. 8, *а* видно, что величина $\Delta\Phi_{P700}$ линейно зависит от величины ΔA_{700}, в согласии с данными ранних работ [3, 4]. Эти данные (с учетом теоретических выводов [23]) могут указывать на то, что миграция энергии с молекул хлорофилла на P700 осуществляется по «уницентральному» типу, т. е. каждая молекула P700 обслуживается своим пулом флуоресцирующих молекул хлорофилла. Если P700 и P430 находятся попарно в изолированных друг от друга комплексах, то $\Delta\Phi_{P430}$ должна также подчиняться линейной зависимости от количества $P430^-$ (в режиме его накопления). Однако в действительности эта зависимость явно нелинейна (рис. 8, *б*), что может соответствовать кооперативному характеру переноса электрона с P700 на любой из группы P430, как показано на схеме:



Следует отметить, что этот вывод справедлив для случая, когда $\Delta\Phi_{P430}$ действительно связана с восстановлением P430, а сам P430 не является ловушкой для энергии возбуждения хлорофилла. Из сопоставления кривых зависимости $\Delta\Phi_{P430}$ от $P430^-$ — экспериментальной и теоретической для квантового выхода кооперативного переноса электрона

от P700 на P430, равного 0,8, видно, что квантовый выход разделения заряда составляет $\geqslant 0{,}8$. По-видимому, кооперативность характерна также для переноса электрона с Px^- на $P700^+$, так как после выключения света кинетика восстановления $P700^+$ при —196° описывается гиперболой. При этом начальная скорость восстановления $P700^+$ увеличивается с увеличением концентрации накопленного на свету $P700^+$.

Энергетическая схема центров разделения заряда фотосистемы 1. Исследование температурной характеристики длительной люминесценции дает информацию об энергетической структуре реакционных центров [13]. Измеряя энергию активации для начальной интенсивности

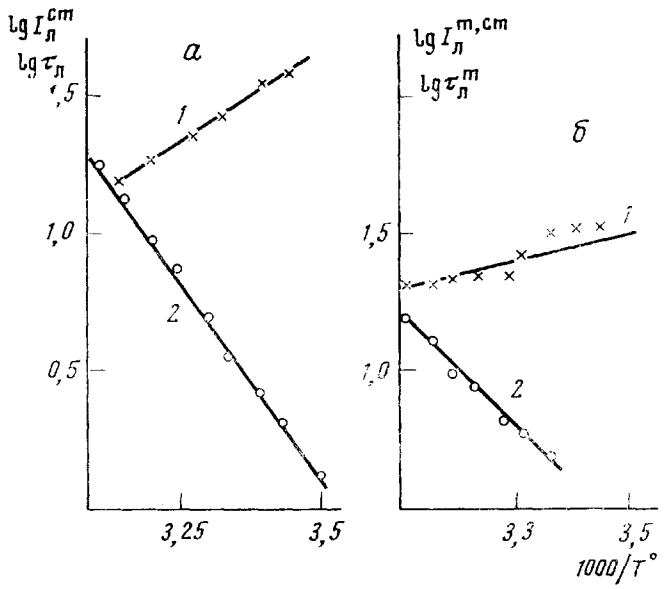


Рис. 9. Температурная зависимость времени жизни ($\tau_{1/2}$) (*1*) и стационарной интенсивности длительной люминесценции ($I_л^{ст}$) (*2*) нормальных (VII компонент) (*а*) и термоинактивированных в течение 5 *мин* при 65° (VI компонент) (*б*) фрагментов ДТ-175 в присутствии 25 *мкМ* 2,6-дихлорфенолиндофенола и 1 *мМ* аскорбата Na. Содержание хлорофилла 10 *мкг/мл*. $\tau_{1/2}$ измеряли после одиночных вспышек света, $I_л^{ст}$ — при возбуждении постоянным светом ($640 < \lambda < 800$ *нм*, 10^4 *эрг·сек*$^{-1}$·*см*$^{-2}$)

люминесценции ($E_н$) можно оценить разницу между энергией, освобождающейся в результате рекомбинации $P700^+$ и $P430^-$ и энергией перехода $P700^* \rightarrow P700 + h\nu$. Измеряя энергию активации для времени жизни люминесценции ($E_т$), можно оценить барьер, который преодолевает электрон, выходя из ловушки и рекомбинируя безызлучательным путем с окисленным центром. Этот барьер оказывается обычно ниже, чем барьер для выхода на возбужденный уровень, что определяет низкий квантовый выход рекомбинационной люминесценции.

На рис. 9 приведены температурные зависимости стационарной интенсивности и $\tau_{1/2}$ для VI и VII компонентов люминесценции. Из этих данных следует, что для компонента VII $E_т = 0{,}2 \pm 0{,}02$ *эв*, а $E_н$ (вычисленная из энергии активации стационарной интенсивности свечения $E_{ст} = 0{,}47 \pm 0{,}02$ *эв* с поправкой на изменение времени жизни свечения от температуры при данных параметрах фосфороскопа) составляет $0{,}63 \pm 0{,}04$ *эв*; для компонента VI $E_т = 0{,}08 \pm 0{,}04$ *эв*, а $E_н$ составляет $0{,}43 \pm 0{,}06$ *эв* ($E_{ст} = 0{,}35 \pm 0{,}02$ *эв*). На основе этих данных была построена энергетическая схема уровней, приведенная на рис. 10. Энергия перехода $P700 \rightarrow P700^*$ принята равной $\sim 1{,}7$ *эв*. Уровень, через который происходит безызлучательная рекомбинация (дно «зоны проводимости»),

ниже уровня P700* на 0,43 *эв*. Уровень P430 ниже дна зоны проводимости на 0,2 *эв*.

Глубина ловушки P430 (0,2 *эв*) обеспечивает захват электрона, время жизни которого в этой ловушке при —196° составляет по расчетам несколько месяцев, что соответствует стабильности связанного ферредоксина при —196° [7].

Сечение захвата для P430, по-видимому, выше чем для Px, так как с накоплением $P430^-$ прекращается сток энергии возбуждения на фотохимические реакции — восстановление P430 сопровождается увеличе-

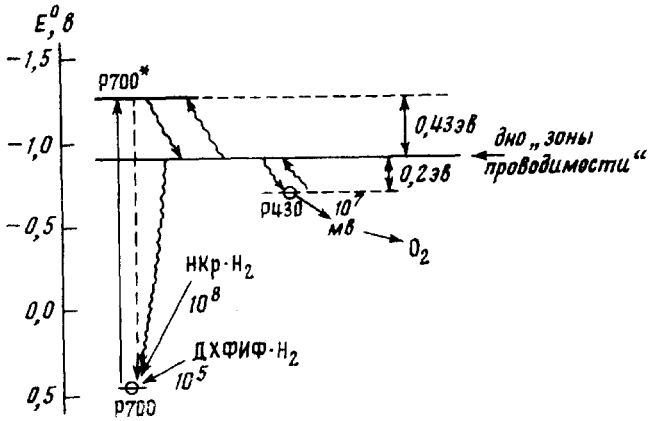


Рис. 10. Энергетическая схема реакционных центров фотосистемы I (цифрами указаны значения бимолекулярных констант скорости переноса электрона)

нием флуоресценции хлорофилла (рис. 8). В случае термоинактивированных фрагментов окисление P700 происходит, вероятно, через Px. Отправной точкой для сопоставления энергетической схемы со шкалой редокс-потенциалов служит E_0 для $P700^+/P700$, равный 0,49 *в*. В этом случае E_0 для P430 лежит в области —0,6 *в*.

Итак, совокупность использованных методов позволила исследовать по нескольким параметрам процесс светового разделения зарядов и их рекомбинации в активных центрах фотосистемы 1. Исследование кинетики взаимодействия возбужденных состояний хлорофилла с активными центрами, а также кинетики рекомбинации зарядов с излучением люминесценции показало, что первичный фотопроцесс в фотосистеме 1 происходит при взаимодействии не менее трех центров разделения зарядов (P700·P430).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kok B. (1956) Biochim. Biophys. Acta, **22**, 399.
2. Bearden A. J., Malkin R. (1972) Biochim. Biophys. Acta, **283**, 456.
3. Карапетян Н. В., Климов В. В., Красновский А. А. (1973) Докл. АН СССР, **122**, 729.
4. Karapetyan N. V., Klimov V. V., Krasnovskii A. A. (1973) Photosynthetica, **7**, 330.
5. Malkin R., Bearden A. J. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 16.
6. Bearden A. J., Malkin R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Communs, **46**, 1299.
7. Ke B., Hansen R. E., Beinert H. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 2941.
8. Hiyama T., Ke B. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 1010.
9. Hiyma T., Ke B. (1971) Arch. Biochem. Biophys., **147**, 99.
10. Ke B. (1972) Arch. Biochem. Biophys., **152**, 70.
11. Anderson J. M., Boardman N. K. (1966) Biochim. Biophys. Acta, **112**, 403.
12. Bennoun P., Joliot A. (1969) Biochim. Biophys. Acta, **189**, 85.
13. Шувалов В. А., Литвин Ф. Ф. (1969) Мол. биол., 3, 59.
14. Карапетян Н. В., Климов В. В. (1971) Физиол. растений, **18**, 223.
15. Шувалов В. А., Красновский А. А. (1971) Мол. биол., **5**, 698.
16. Clark W. M. (1960) in: Oxidation-Reduction of Organic Systems, Williams and Wilkins, eds., Baltimore, Maryland.

17. Ke B. (1973) Biochim. Biophys. Acta, **301**, 1.
18. Rawings J., Siman O., Gray H. O. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 125.
19. Ostroumov S. A., Samuilov V. D., Skulachev V. P. (1973) FEBS Letters, **31**, 27.
20. Kok B. (1961) Biochim. Biophys. Acta, **48**, 527.
21. Lozier R. H., Butler W. Z. (1974) Biochim. Biophys. Acta, **333**, 465.
22. Венедиктов П. С., Маторин Д. Н., Кренделева Т. Е., Низовская Н. В., Рубин А. Б. (1971) Биол. науки, **11**, 50, 1971.
23. Борисов А. Ю. (1967) Докл. АН СССР, **173**, 208.

Поступила в редакцию
16.X.1974

THE STUDY OF PRIMARY PHOTOPROCESSES IN THE LIGHT FRAGMENTS OF CHLOROPLASTS

V. A. SHUVALOV, V. V. KLIMOV and A. A. KRASNOVSKY

Institute of Photosynthesis, Academy of Sciences of the USSR, Poustchino, Moscow Region and A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

An attempt has been made to study the mechanism of photoinduced separation of charges and their recombination in reaction centres of the photosystem 1 of the light fragments of chloroplasts. It has been shown, in agreement with recent papers, that the studied properties of electron donor of the photosystem 1 correspond to P700 pigment (with absorption maxima at 430 and 700 *nm*), the properties of electron acceptor correspond to that of ferredoxin type compound (P430) (with absorption maxima at 420, 444 and 717 *nm*) and heat stable compound (Px). Accumulation of the charges both for $P700^+ \cdot P430$ and $P700 \cdot P430^-$ has been accompanied by increase of the fluorescence yield and shift of chlorophyll absorption band from 680 *nm* to $\sim$690 *nm*. The recombination process of $P700^+$ and $P430^-$ has been accompanied by the delayed luminescence. The study of kinetics of interaction between chlorophyll excited states and reaction centres and also kinetics of charge recombination and luminescence decay has shown that the primary photoprocesses in the photosystem 1 occur with interaction of several (>3) centres of charge separation ($P700 \cdot P430$).

Доклады Академии наук СССР
1976. Том 227, № 4

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

В. А. ШУВАЛОВ, В. В. КЛИМОВ, И. Н. КРАХМАЛЕВА,
А. А. МОСКАЛЕНКО, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ БАКТЕРИОФЕОФИТИНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ RHODOSPIRILLUM RUBRUM И CHROMATIUM MINUTISSIMUM

Исследование первичных фотопроцессов в реакционных центрах необходимо для понимания механизма конверсии энергии кванта света при фотосинтезе. Особая роль в этих процессах принадлежит пигментам хлорофилловой природы, способным к окислительно-восстановительным превращениям (1). Известно, что бактериохлорофилл и бактериофеофитин способны к обратимому фотоокислению и фотовосстановлению; способность к обратимому фотовосстановлению (восприятию электрона) наиболее характерна для бактериофеофитина (2). В бактериальных центрах бактериохлорофилл P_{870} является первичным донором электрона в первичной фотореакции (3). Согласно данным (4), две молекулы бактериофеофитина входят составной частью в структуру реакционного центра фотосинтезирующих бактерий вместе с четырьмя молекулами бактериохлорофилла. При окислении P_{870} в бактериальных центрах наряду со сдвигом полосы поглощения бактериохлорофилла при 800 нм наблюдается небольшой сдвиг полосы поглощения бактериофеофитина при 760 нм (5). При восстановлении акцептора электрона — убихинона наблюдается сдвиг полосы поглощения бактериофеофитина в реакционных центрах R. spheroides (6). Однако возможность участия бактериофеофитина в переносе электрона в реакционных центрах не ясна.

Задачей данной работы явилось исследование влияния на спектр бактериофеофитина зарядов первичного донора и акцептора электрона, как индикатора локализации пигментов в реакционном центре, а также изучение возможности фотовосстановления бактериофеофитина, содержащегося в центрах при низких редокс-потенциалах среды.

Бактерии R. rubrum выращивали на среде Молиша в анаэробных условиях при освещении 1000 лк. В работе использовали 5—6-дневные клетки. Хроматофоры из них получали по методу, описанному ранее (7). Реакционные центры выделяли из хроматофоров R. rubrum при помощи 0,25% лаурилдиметиламиноокcида и очищали осаждением с сульфатом аммония по методу (8).

Использованные нами комплексы B890 и B850 Ch. minutissimum были получены А. А. Москаленко по методу (9) путем обработки хроматофоров тритоном X-100 с последующим разделением электрофорезом в полиакриламидном геле и очисткой гель-фильтрацией.

Измерение фотоиндуцированных изменений поглощения и флуоресценции в области 400—1000 нм проводили с помощью однолучевого дифференциального спектрофотометра, описанного ранее (10). Действующий свет ($\lambda > 720$ нм, 10^5 эрг/сек·см^2) и измерение поглощения разделялись темновым интервалом в 2 мсек. Фотоиндуцированные изменения поглощения в области 250—400 нм измеряли на дифференциальном спектрофотометре «Хитачи-356».

На рис. 1 представлен спектр поглощения реакционных центров R. rubrum в исходном и окисленном (с помощью света) состояниях. На том же рисунке представлен дифференциальный спектр свет — темнота. Из ри-

сунка видно, что при окислении центра наблюдается выцветание полосы при 870 нм (P_{870}), сдвиг полосы при 800 нм в коротковолновую область и небольшой сдвиг полосы поглощения бактериофеофитина при 760 нм в длинноволновую область в соответствии с ([8]). Время темнового восстановления P^+_{870} в этом случае составляет ~25 сек., что свидетельствует о переносе электрона с восстановленного «первичного» акцептора на P^+_{870} через

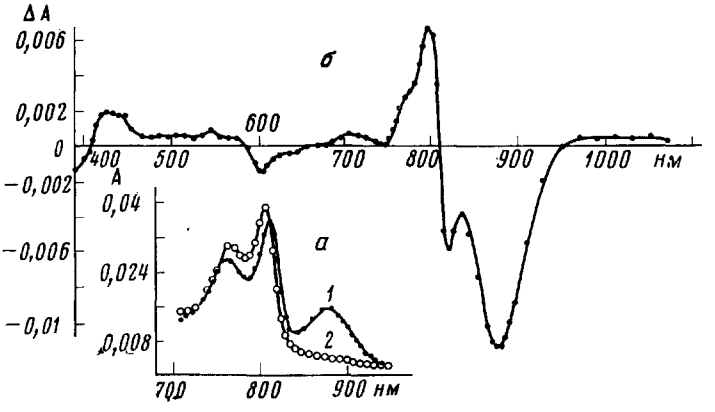


Рис. 1. *а* – спектр поглощения (*A*) реакционных центров R. rubrum, измеренный в отсутствие (*1*) и при действии (*2*) актиничного света (10^5 эрг·сек$^{-1}$·см$^{-2}$, λ>720 нм); *б* – дифференциальный (свет – темнота) спектр (ΔA) реакционных центров R. rubrum, 20° С

пул вторичных акцепторов, исходя из ранее полученных данных ([11]). Сдвиг полосы поглощения бактериохлорофилла при 800 нм и бактериофеофитина при 760 нм может быть интерпретирован как влияние локального электрического поля P^+_{870} на спектр пигментов центра ([6]).

Известно, что при низких температурах обратимый перенос электрона в бактериальных центрах осуществляется между P_{870} и «первичным» акцептором; при этом время обратной рекомбинации зарядов составляет 20—30 мсек. ([11]). При измерении низкотемпературного дифференциального спектра свет — темнота в нем наблюдается, кроме обычного сдвига полосы поглощения при 800 нм, длинноволновый сдвиг полосы поглощения бактериофеофитина при 760 нм. Выявление максимумов бактериофеофитина в спектре может быть связано как с влиянием низких температур на ширину полос спектра, так и с одновременным влиянием локальных электрических полей P^+_{870} и восстановленного первичного акцептора на спектр пигментов реакционного центра.

Последнее предположение подтверждается измерением светоиндуцированных изменений поглощения реакционных центров R. rubrum в присутствии аскорбата и *о*-фенантролина, блокирующих перенос электрона с первичного на вторичные акцепторы ([13]). В этих условиях вспышка света вызывает окисление P_{870}, темновое восстановление которого происходит с $\tau_{1/2} \simeq 60$ мсек. Это соответствует времени рекомбинации P^+_{870} с «первичным» акцептором при 20° ([11]). В первый момент освещения центров в этих условиях постоянным действующим светом наблюдается окисление P_{870}, затем его восстановление под действием света (рис. 2). Последний процесс сопровождается выцветанием полосы при 295 нм, появлением структурной широкой полосы поглощения в области от 300 до 470 нм и сдвиг полосы поглощения бактериофеофитина при 760 нм в длинноволновую область спектра (рис. 2). Изменение в спектре в области от 250 до 470 нм соответствует восстановлению убихинона до анион-радикала ([14]). Количество фотохимически изменяющейся части P_{870} эквимолярно количеству восстанавливающегося убихинона, исходя из ε_{870}=115 мM^{-1}·см$^{-1}$ для P_{870} ([4]) и ε_{280}=9 мM^{-1}·см$^{-1}$ для убихинона ([14]).

Обратимое в этих условиях восстановление P^{+}_{870} на свету, сопровождающееся восстановлением убихинона, приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции реакционных центров в 2—3 раза (рис. 2) в согласии с ([10], [13]), что указывает на прекращение стока энергии возбуждения на фотохимические реакции в реакционном центре.

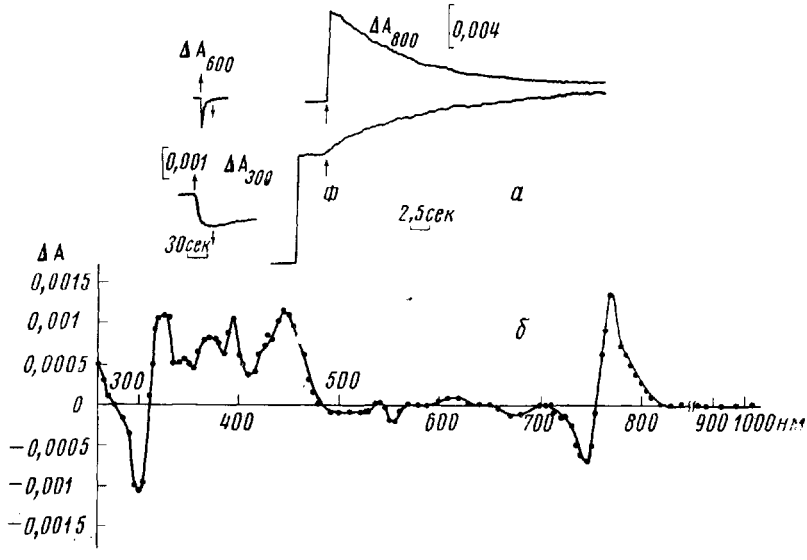


Рис. 2. *а* — кинетика светоиндуцированных изменений поглощения (ΔA) и флуоресценции (Φ) и *б* — дифференциальный (свет — темнота) спектр реакционных центров R. rubrum в присутствии аскорбата (1 м*М*) и *о*-фенантролина (0,1 м*М*), 20° С. Стрелки — включение и выключение действующего света, то же на рис. 3

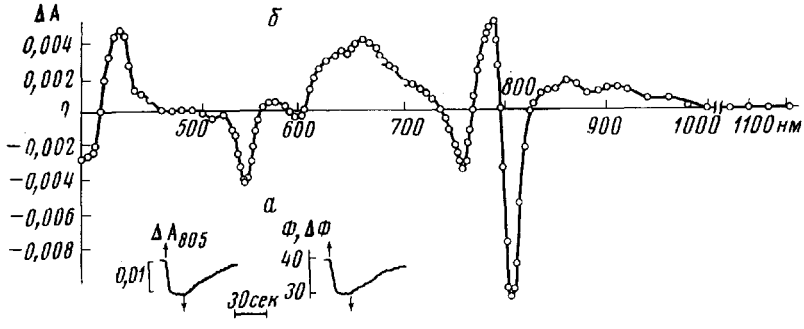


Рис. 3. *а* — кинетика светоиндуцированных изменений поглощения (ΔA) и флуоресценции (Φ) и *б* — дифференциальный (свет — темнота) спектр комплексов B890 Ch. minutissimum в присутствии дитионита (1 мг/мл), 20° С. Поглощение при 890 нм составляет 0,4 ед. оп. пл.

Следовательно, полученные данные указывают на то, что убихинон является первичным акцептором электрона. Существенно при этом, что восстановление убихинона сопровождается сдвигом полосы поглощения бактериофеофитина без изменений спектра поглощения бактериохлорофилла (рис. 2).

При понижении с помощью дитионита E_h среды до —300 мв и ниже в реакционных центрах R. rubrum не проявляются обратимые изменения поглощения при постоянном действующем свете, что связано с восстановлением первичного акцептора в темноте. Однако обратимые изменения поглощения при постоянном освещении светом с $\lambda \geqslant 850$ нм, поглощаемым

бактериохлорофиллом, наблюдаются в комплексах B890 Ch. minutissimum при E_h от −300 мв до −500 мв. Дифференциальный спектр этих изменений представлен на рис. 3. Из рис. 3 видно, что в этих условиях наблюдается выцветание полос поглощения бактериофеофитина при 543 и 760 нм, сдвиг полосы поглощения бактериохлорофилла при 800 нм, а также появление широкой полосы поглощения при 650 нм, характерной для фотовосстановленной формы (анион-радикала) бактериальных пигментов ([1]). Этот процесс наблюдается в комплексе B890, содержащем реакционные центры, и не обнаруживается в комплексе B850, в который входят светособирающие пигменты, в том числе и бактериофеофитин.

Наблюдаемый комплекс спектральных изменений связан, вероятно, с восстановлением бактериофеофитина в реакционных центрах. Характерно, что этот процесс сопровождается уменьшением квантового выхода флуоресценции комплексов B890 (рис. 3) в соответствии с ранее наблюдаемым уменьшением выхода флуоресценции хроматофоров Ch. minutissimum в аналогичных условиях ([15]). Следовательно, восстановление бактериофеофитина сказывается на состоянии реакционного центра.

Таким образом, если смещение полос поглощения пигментов при изменении состояния центров действительно связано с влиянием локальных полей донора и акцептора электрона на близлежащие пигменты, измерение сдвига полос поглощения пигментов может являться методом исследования локализации пигментов по отношению к первичному донору и акцептору электрона. Данные о том, что окисленный донор электрона P^+_{870} сдвигает полосы поглощения бактериохлорофилла при 800 нм и бактериофеофитина при 760 нм и что восстановленный акцептор, анион-радикал убихинона, смещает только полосу поглощения бактериофеофитина при 760 нм, указывают, вероятно, на то, что бактериофеофитин локализован между P_{870} и первичным акцептором, тогда как бактериохлорофилл-800 связан преимущественно с P_{870}. Если перед освещением убихинон восстановлен, то свет, поглощаемый бактериохлорофиллом, вызывает фотовосстановление бактериофеофитина в центрах Ch. minutissimum. Можно полагать поэтому, что перенос электрона от возбужденного бактериохлорофилла к убихинону может происходить с участием бактериофеофитина в качестве промежуточного звена.

Выражаем благодарность Ю. Е. Ерохину за помощь в работе.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

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

Поступило
12 XII 1975

ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский,* Преобразование энергии света при фотосинтезе, М., «Наука», 1974. [2] *А. А. Красновский, К. К. Войновская,* ДАН, т. 81, 879 (1951). [3] *R. K. Clayton,* Photochem. Photobiol., v. 1, 201 (1962). [4] *S. C. Straley, W. W. Parson et al.,* Biophim. et biophys. acta, v. 305, 597 (1973). [5] *W. W. Parson, R. J. Cogdell,* ibid., v. 416, 105 (1975). [6] *R. K. Clayton, S. C. Straley,* Biophys. J., v. 12, 1221 (1972). [7] *Н. В. Карапетян, И. Н. Крахмалева, А. А. Красновский,* Молекулярная биология, т. 6, 773 (1972). [8] *H. Noel, M. Van Der Rest, G. Gingas,* Biochim. et biophys. acta, v. 275, 219 (1972). [9] *А. А. Москаленко, Ю. Е. Ерохин,* Микробиология, т. 43, 654 (1974). [10] *В. В. Климов, И. Н. Крахмалева и др.,* ДАН, т. 221, 1207 (1975). [11] *R. K. Clayton, H. Yau,* Biophys. J., v. 12, 867 (1972). [12] *W. Arnold, R. C. Clayton,* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 46, 769 (1960). [13] *R. K. Clayton, E. Z. Szuts, H. Fleming,* Biophys J., v. 12, 65 (1972). [14] *R. Bensasson, E. J. Land,* Biochim. et biophys. acta, v. 325, 175 (1973). [15] *Н. В. Карапетян, В. В. Климов и др.,* ДАН, т. 201, 1244 (1971).

EVOLUTIONARY BIOLOGY, Praha, 1976, 45-60

Chemical Evolution of Photosynthesis

A. A. Krasnovsky
A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Moscow, U.S.S.R

I. Introduction

The conversion of solar energy by plants forms the basis of the present pattern of life on the Earth. Organic compounds as well as oxygen produced by plants are used in metabolism of diverse organisms living on our planet. Contemporary oxygen atmosphere of Earth originated as a result of plant photosynthesis. The question now arises : does the origin of life on the Earth depend on photosynthesis, too ?

We have no decisive experimental data to solve this problem which is a subject of hypotheses. A.I.Oparin fifty years ago put forward the idea that photosynthesis developed after the primary heterotrophic organisms originated, their metabolism having been based on the use of organic matter of abiogenic origin (1).

J.B.S.Haldane pointed to the possibility of abiogenic formation of organic matter by photochemical reactions under the action of ultraviolet radiation on the components of primary anaerobic Earth atmosphere (2). The ideas on the rather late origin of photosynthesis are shared by H.Gaffron (3) and M.Calvin(4).

We will consider the following problems taking into account mainly the data of model experiments :

The utilization of solar energy in the course of chemical evolution;

The mode of solar energy conversion in the membranes of primary probionts ;

The pathways of solar energy conversion during biological evolution.

II. Solar Radiation and Chemical Evolution

According to the contemporary ideas the chemical evolution covers a period of 3-5 billions of years. The traces of this period can be found in primeval rocks.

Available data show that Pre-Cambrian rocks contain many organic substances; including porphyrins. However, the problem of their origin is not yet clear : did they arise by decomposition of highly developed biological structures or by chemical transformations of simple molecules ? The same considerations apply to the analysis of meteorites.

The progress in the space research made it possible to obtain samples from the planets for a direct chemical analysis.

Impressive data were obtained when simulating in the laboratory conditions the reactions in the primary reducing atmosphere under the influence of ultraviolet, visible and corpuscular radiation, radioactivity and electrical discharges .

Two types of reactions are possible under these conditions : direct photochemical reactions in short-wave ultraviolet light leading to photodissociation or photoionisation of gaseous components of primary atmosphere and reactions sensitive to the long-wave part of solar spectrum, where the maximum of solar-radiation energy is situated.

The success in this field of research is remarkable; in many laboratories abiogenic syntheses of many organic substances, which may serve as bricks of primary metabolism, were accomplished.

The photosensitive reactions required photoreceptors absorbing light in the region of higher wave-length than it would correspond to the gaseous components of primary atmosphere. Inorganic components of Earth's crust or abiogenically formed coloured matters such as porphyrin might act as photoreceptors.

The photosensitive reactions in condensed phase involve usually hydrogen or electron transfer. Gradual accumulation of potential chemical energy by conversion of solar energy may be carried out by photosensitive redox reactions with organic substances of abiogenic origin or inorganic components of Earth's crust as starting compounds.

Inorganic photosensitizers

In the literature concerning the chemical evolution, the possibility of inorganic photoreceptors has not yet been considered. However, some inorganic substances which are components of the Earth's crust do possess photosensitizing activity and hence could play the role of primary photosensitizers. It is surprising that the oxides of titanium, zinc and tungsten possess a high photosensiting activity in redox reactions, comparable with the activity of porphyrins and chlorophylls. These compounds are able to sensitize reactions accompanied by light energy storage in the stable terminal products (5,6).

It was shown in our laboratory that titanium, zinc and tungsten oxides are able to photosensitize in aqueous media under the action of near ultraviolet radiation (365 nm) oxygen evolution, coupled to exogenous electron acceptor reduction (ferric ions, ferricianide ions and p-benzoquinone were used).

The reaction follows the stoichiometry :

$$2\ Fe^{+++} + H_2O \dashrightarrow 2\ Fe^{++} + 2\ H^{+} + I/2\ O_2$$

The oxygen was shown to originate from the water molecules using ^{18}O labelled water (7). The quantum yield of the reactions studied (Table I) could reach 1%.

Table I Photosensitization of Redox Reactions by TiO_2, ZnO and WO_3 (365 nm)

Electron donor	Electron acceptor	Reaction products
H_2O	Fe^{+++}, $Fe(CN)_6^{+++}$	Oxygen, Fe^{++}, $Fe(CN)_6^{++}$
H_2O	p-benzoquinone	Oxygen, hydroquinone
H_2O	Viologens	Reduced viologens
Glycine	Redox-dyes	Dyes
Hydrazine		Oxidized electron donor
Thiourea, etc.		

These reactions are analogous to the Hill reaction in chloroplasts and to the photosystem II of photosynthesis.

When oxygen is used as the terminal electron acceptor it is possible to simulate the chloroplast Mehler reaction, accompanied by hydrogen peroxide formation.

Finally, inorganic photocatalysts are able to photosensitize the reduction of viologen, near the redox potential of the hydrogen electrode (8). Thus also the photosystem I can be simulated using inorganic photocatalysts.

The mechanism of photocatalytic reactions may consist in an electron transition from valence band to conduction band, taking place as a result of light quantum absorption by the crystalline lattice of the photocatalyst-semiconductor.

At the phase boundary of the photocatalytic particles and the aqueous solution electron donors and acceptors are adsorbed to form active centers of the photocatalytic surface. The primary redox reaction occurs by interaction of the electron donor with a hole and of the acceptor with an electron.

The dismutation of primary radicals on the catalytic surface takes place; in the case of oxygen evolution the recombination of OH radicals leads to the oxygen formation. Thus the photosensitizers possess catalytic activity, too.

These observations point to a feasible mode of involvement of inorganic photosensitizers in the structure of probionts. Nevertheless, none of existing organisms includes inorganic sensitizers in their metabolic patterns ; those were probably "blind alleys" of the tree of evolution.

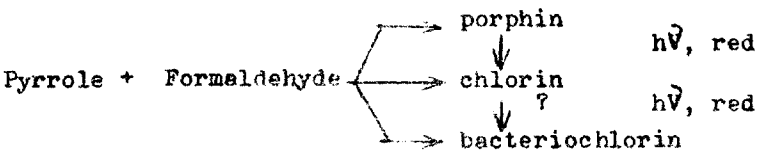
In the course of evolution, most effective catalysts and photosensitizers were developed by binding inorganic ions to organic ligands, the porphyrin cycle being the most common of them.

Porphyrins

Rothemund in 1936 described the synthesis of porphin from pyrrole and formaldehyde. The reactions is thermodynamically spontaneous, proceeding slowly in the dark at room temperature in the pre - sence of catalysts. The presence of oxidants (oxygen, quinones)

enhances the synthesis of porphin, since the condensation of pyrolle and formaldehyde is accompanied by evolution of hydrogen. Abiogenic formation of porphyrins in simulated primary atmosphere was demonstrated recently (9).

In the solution of pyrrole and formaldehyde not only porphin but also more reduced compounds are formed : chlorin and bacteriochlorin (IO, II). The synthesis and analysis of completely reduced substances is possible only under anaerobic conditions since these pigments are spontaneously oxidized in the presence of air oxygen. Chlorin may be formed from porphin not only by condensation of pyrrole and formaldehyde but also via photoreduction of porphin. The following scheme summarizes the processes listed above :



Our studies have shown that interaction between pyrrole and formaldehyde is catalyzed by some components of the Earth's crust; silica, titanium dioxide, zinc oxide and some organic substances, among them tryptophan, which is the most active (IO, II).

When analyzing primeval rocks and samples from planets it is necessary to supplement the assay for porphin by that for the more reduced pigments - chlorins and bacteriochlorins.

All these compounds are photochemically active; they possess photosensitizing activity and are capable of undergoing reversible photooxidation and photoreduction.

In organisms, however, free porphyrins are found mostly as intermediates of biosynthesis ; magnesium complexes of porphyrins dominate among photosynthetic organisms and iron complexes dominate among catalysts. The possibility of selecting an appropriate central metal atom of the porphyrin cycle in the process of evolution is illustrated by the following table.

The compounds of silicon and titanium are practically insoluble in water; this insolubility probably prevented the incorpora -

tion of these metals into porphyrin complexes. Complexes of Na, K, and Ca with porphyrins are hydrolyzed in aqueous media.

Table 2

Element	Percent in Earth's crust	Activity of porphyrin complex	
		Catalysis	Photochemistry
Si	27,6	insoluble in aqueous media of bio-	
Al	8,5	sphere	
Fe	5,0	+	-
Ca	3,5		
Na	2,6	easy hydrolysis	
K	2,5		
Mg	2,0	-	+
Ti		insoluble	

Only complexes of magnesium and iron are sufficiently stable to win in the competition. These complexes, having auxiliary coordination bonds perpendicular to the plan of the porphyrin ring, are also capable of binding reacting molecules. In the course of evolution, they made it possible to bind specific proteins.

The vanadyl and nickel porphyrins have been found in petroleum; they are probably formed as a result of chlorophyll degradation and central magnesium atom substitution.

Photochemistry of porphyrins

The principal difference of magnesium porphyrin complexes from the ferric ones is that the former are active only after excitation by light quanta, being converted into singlet or triplet excited states.

The studies in our laboratory have shown that excited porphyrins and their magnesium and zinc complexes are capable of reversible photochemical reduction or oxidation, that is of accepting or giving up an electron to the partner molecule (see review of ref. I2).

Reversible photoreduction : $P^* + Red \longrightarrow \cdot P^- + \cdot Red^+$

Reversible photooxidation : $P^* + Ox \longrightarrow \cdot P^+ + \cdot Ox^-$

The porphyrins can be reversibly reduced photochemically (I3). In the case of photosynthetic pigments absorbing long-wave light quanta, bacteriochlorophyll b of Rhodopseudomonas viridis, the capability of reversible photooxidation is highly pronounced (I4).

In the ternary system composed of molecules : electron donors (Red), electron acceptors (Ox) and pigment excited molecules (P^*) the photoactivated electron transport from Red molecules to Ox molecules proceeds at the expense of light energy absorbed by pigment molecules.

$$\text{Electron donor} \xrightarrow{e} \text{Excited pigment} \xrightarrow{e} \text{Electron acceptor} \qquad (h\nu)$$

As electron donors dienols, SH-compounds, Ferrous compounds, NADH and NADPH, hydroquinone, etc., can be used. Oxygen, quinones, ferric compounds, NAD and NADP, flavins, etc., can function as electron acceptors.

Thus, it is plausible that photoactivated electron transfer of this type took place in the period of chemical evolution.

III. Photochemical Reactions in Membranes of Probionts

Photochemical activation of biocatalytic systems

Provided that chemically active substances were abundant in the primary soup, redox reactions probably determined the pattern of primary energetic metabolism.

Various inorganic components of the Earth's crust could act as catalysts of these reactions, their catalytic action having been enhanced by complexing with the organic ligands of abiogenic origin, such as simple organic bases or tetrapyrrolic compounds.

Along with components having catalytic properties, there were on the primary Earth substances possessing photosensitizing activity, such as abiogenic tetrapyrrole compounds.

At the first International Symposium on the Origin of Life

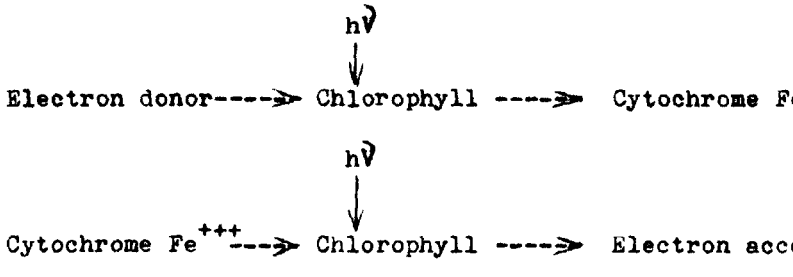
(I5) we suggested that the photochemical activation of catalysts similar to contemporary coenzymes might be an intermediary metabolic step in light energy utilization.

The photochemical activity of flavin coenzymes was already known at that time. Later we studied the photochemical activation of reduced pyridine nucleotides and of their analogues excited by near ultraviolet radiation (365nm) (review I6). Photochemical activation enhanced NADH oxidation by electron acceptor molecules including viologens (and ferredoxin), which have a more negative redox potential than pyridine nucleotides. In the latter case it was possible to store some light energy in the reaction products (I7) :

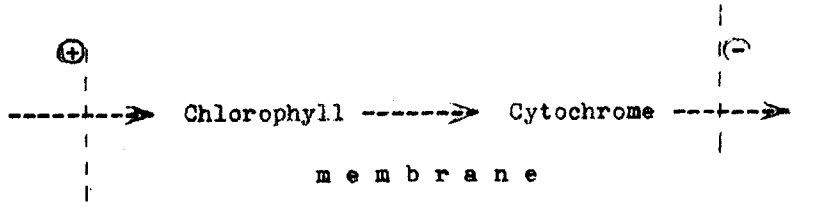
boratory in the simplest heterogenous systems : aqueous solutions of surface active substances-detergents (2I). Chlorophyll and its analogues in aqueous detergent solutions possessed pronounced photochemical activity (22); these pigments in detergent micelles are capable of reversible oxidation and reduction as well as of an effective photosensitization (23).

Thus, in aqueous solutions of triton X-I00, chlorophyll and cytochrome c are solubilized. With red light illumination (when chlorophyll absorbs light) photosensitive cytochrome reduction was observed; in the presence of electron acceptors reduced cytochrome oxidation took place. The reaction was enhanced in the presence of flavins, quinones and other substances, which acted as interme - diate electron carriers (24). In aqueous detergent solutions photosensitized reduction of viologen takes place, too (see rev. I2).

In the following scheme the electron transfer in the detergent micelles is shown :



brane from random to anisotropic arrangement.



Coupling of photochemical and catalytic reactions

It is possible to assume that the primary photocatalytic blocks of chemical and biological evolution comprised a ternary system : electron donor - pigment - electron acceptor. This system works efficiently not only in models but also in biologically organized structures.

The photochemical and catalytic electron transport chains were improved by coupling of the primary photocatalytic blocks in the primary probiont membranes (25). In the process of biological evolution diverse combinations of photocatalytic blocks were realised.

It is possible to trace several types of primitive photocatalytic electron transfer; let us begin with monocyclic electron transfer. The excited pigment molecule reduces the activation energy and the overall reaction is thermodynamically possible ($-\Delta F$); here the photosensitizer acts as a photocatalyst.

$$Red + Ox + (P) \xrightarrow{-\Delta F} Red_{ox} + Ox_{red} + (P)$$

Another type of reaction which is more important, since it uses an inactive hydrogen donor, the water molecule, is the overall process accompanied by an increase in the free energy of the system ($+\Delta F$). This reaction can be simulated in a model system, in chlorophyll solutions; here pyridine nucleotides and other electron acceptors are photoreduced at the expense of ascorbic acid as an electron donor. This case was studied in our laboratory (see rev.12).

$$Ascorbate + NAD + (CHL) \xrightarrow{red\ light} Ascorbate_{ox} + NADH + (CHL)$$

The Hill reaction photosensitized by inorganic semiconductors in a model system also proceeds with a gain of free energy (see

above).

It is possible to assume that a primitive cyclic electron transfer was coupled to phosphorylation. In a cyclic process, Mg or Fe porphyrin may participate; chlorophyll and porphyrins photosensitize effectively oxido-reductive transformations of cytochromes. But the coupling of such cyclic photochemical electron transfer with ATP formation has not yet been achieved in any model system.

It was found by Arnon (26) and K$_a$men (27) that primeval photosynthetic organisms (photosynthetic bacteria) possess the two types of the electron transfer, both noncyclic and cyclic coupled with photophosphorylation. Thus, we may conclude that the primitive "bricks" of electron transfer might play a role in biological evolution.

The use of water as an ultimate electron donor in more perfect photosynthetic organisms required coupling of two photoreactions for electron transport from water to pyridine nucleotides via ferredoxins (25), in other words, the coupling of two photocatalytic "bricks", which are denoted, according to contemporary ideas, as photosystems I and II.

The chemical and biological evolution from simple photocatalytic reactions to the perfectly organized systems of photosynthetic electron transfer required probably more than two billion years.

IV. Evolution of Pigments

The ancestors of contemporary photosynthetic organisms probably possessed small quantities of pigments, directly participating in photochemical electron transfer, since the effective pigment biosynthetic system was not yet developed.

The enzymic catalysts are active in very low concentrations; on the contrary, the quantity of pigment-photosensitizers must be very high to absorb effectively the solar radiation and thus to compete successfully for survival.

The development of metabolism in the course of biological evolution gradually led to the appearance of effective biosynthesis of chlorophylls, phycobilins and carotenoids.

In the course of origination of probionts various metabolic sets of pigment systems were probably formed. It is possible that

primary photosynthetic cells had various pigment combinations : carotenoids, linear tetrapyrroles and cyclic tetrapyrroles.

In the process of development of pigment biosynthesis, leading to the pigment accumulation in cells, the mechanism of energy migration from the bulk of pigments to preexisting active center pigment developed. As we know, in contemporary cells light energy quanta absorbed by the bulk of aggregated pigments efficiently migrate to the minor quantity of pigment, functioning in the active center and excitable by long-wave quanta.

Aggregate magnesium complexes of reduced porphyrins absorb the quanta corresponding to the longest waves and this determined their function as a terminal trap in the excitation energy migration process. On the other hand, phycobilins display absorption of short-wave quanta as well as photochemical stability, which favours their function as intermediates in excitation migration.

Carotenoids possess absorption in short-wave range of visible spectrum, though there are data that their triplet levels are situated lower than in chlorophyll molecules. This property points to the possibility of energy migration on triplet level.

The organisms that survived possessed a combination of pigments effectively absorbing the solar radiation and chanelling excitation energy by migration to long-wave centers. Such organisms are photosynthetic bacteria and blue-green alga.

In anaerobic photosynthetic bacteria dominate the most reduced porphyrin pigments - bacteriochlorophylls. In aerobic photosynthetic organisms, on the other hand, more oxidized chlorophylls *a* and *b* are found. We may propose that the most ancient forms are those which are the most anaerobic. If this is so, we may assume that older types of pigments can be photooxidized rapidly.

If this consideration is correct, the most ancient photosynthetic organisms are those containing bacteriochlorophyll *b* (*Rhodopseudomonas viridis*), then come organisms with bacteriochlorophyll *a* and finally those with bacterioviridin, which resembles chlorophyll *a* in its spectral properties.

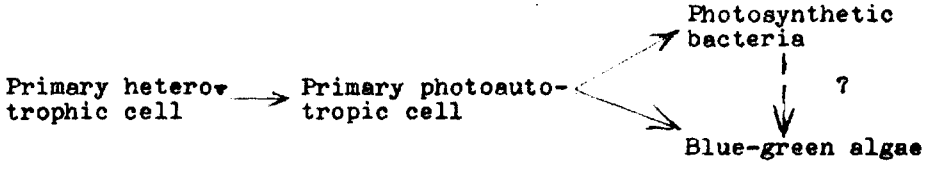
Blue-green algae are usually regarded as the most ancient photosynthetic organisms. In the most ancient Pre-Cambrian rocks, dating 2-3 billions of years, various types of photosynthetic orga-

nisms shielded by silica envelopes were found.

Some types of blue-green algae can hardly bear high partial pressure of oxygen, preferring almost anaerobic environment (28). This phenomenon points to their probable origin from anaerobic ancestors.

However, the following problem is not yet solved; did the blue-green algae develop from photosynthetic bacteria or had both types of cells a common ancestor ?

The last hypothesis on the common primary photoautotroph ancestor of the two types of organisms is adopted by many research workers.



The phylogenesis of higher plants is better understood, being based on the study of contemporary organisms and reliable paleobotanic data. The pigments of higher photosynthetic organisms are rather uniform, including chlorophylls a and b and carotenoids.

The problem of biochemical evolution of present organisms is studied in detail but there are on the Earth no organisms which would correspond to the boundary of chemical and biological evolution.

Some hundred years ago, Charles Darwin in his well known letter to Hooker noted that the primary living matter cannot be found at present, since it would be eaten up or absorbed by more advanced organisms. It is worth while to emphasize that primary organisms appeared in anaerobic conditions and for this reason they would not tolerate the contemporary oxygen atmosphere of the Earth (2).

One of the possible ways to understand ancient types of metabolism is to study photosynthesis of contemporary green cells in anaerobic conditions. H.Gaffron found in 1939 that green unicellular algae treated anaerobically evolve hydrogen. In the hydrogen atmosphere green alga photoreduces carbon dioxide, which is probably an ancient form of metabolism (3). In the case of blue-green alga the

hydrogen evolution was observed during the dark metabolism (29).

V. Conclusion

The intensive development of life on the Earth was possible at the expense of the energy of an external source - the radiant energy of the sun.

The most probable is that the primary utilization of short-wave ultraviolet radiation of the sun was gradually replaced by photosensitization of the energy storing reaction to the long-wave region of the sun radiation.

The principal experimental problem was to accomplish different ways of light quanta energy conversion into potential chemical energy of rather stable compounds, formed photochemically. Such high energy compounds storing energy of light quanta as potential chemical energy could then be easily used in the metabolism of various organisms.

The evolution of the process of light quanta conservation leads to accumulation of stable products of photosynthesis, which are carbon dioxide reduction products and to evolution of molecular oxygen, resulting from the photooxidation of water molecules.

It is probable that on other planets light energy storage may lead to products chemically different from the substances formed during photosynthesis on the Earth.

The results of model experiments described in the present paper demonstrate that there are various feasible ways of light energy conversion at the primary stages of the prebiological evolution.

References

1. Oparin,A.I. 1924. Origin of Life, Izd.Moskovskii rabochii, Moscow.
2. Haldane,J.B.S., 1969. (from Bernal, J.D., Origin of Life, izd. Mir, Moscow.
3. Gaffron,H.,1962. In : Horizons in Biochemistry, Kasha,M. and Pullmann, B., eds., Academic Press, N.York, p. 59.
4. Calvin, M.,1969. Chemical Evolution, Clarendon Press, Oxford.
5. Krasnovsky,A.A., and Brin,G.P., 1962. Dokl.AN SSSR, 147, 654.

6. Krasnovsky,A.A. and Brin,G.P., 1970. Review in : Molecular photonics, izd.Nauka, p.161.

7. Fomin,G.V.,Brin,G.P.,Genkin,M.V., Lubimova,A.K.,Blumenfeld,L.A., and Krasnovsky,A.A., 1973. Dokl.An SSSR, 212, 424.

8. Krasnovsky,A.A. and Brin,G.P., 1973. Dokl. AN SSSR, 213, 207.

9. Hodgson, G.W. and Ponnamperuma,C., 1968. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S., 59, 22.

10. Krasnovsky,A.A. and Umrikhina,A.V., 1972. In: Molecular Evolution: Prebiological and Biological. Rohlfing,D.L. and Oparin, A.I.,eds, Plenum Press, N.York, p.141.

11. Krasnovsky,A.A. and Umrikhina,A.V., 1964. Dokl.An SSSR, 155,691; 202,221.

12. Krasnovsky,A.A.,1972., Biophys.J., 12, 749.

13. Krasnovsky,A.A. and Voinovskaya,K.K., 1954., Dokl.AN SSSR, 96, 1209.

14. Bokuchava,E.M., Drozdova,N.N. and Krasnovsky,A.A., 1974. Biokhimia, 39, 188.

15. Krasnovsky,A.A.,1959. In : Origin of Life on Earth (Oparin,A.I., et al., eds.), Pergamon Press,N.York, pp. 606.

16. Krasnovsky, A.A., and Brin,G.P.,1964. Review in:Problems of Evolution and Technical Biochemistry,Kretovich,V.L.,ed.), izd.Nauka, Moscow, p.221.

17. Krasnovsky,A.A. and Brin,G.P.,1965. Dokl. AN SSSR, 163, 761.

18. Krasnovsky,A.A. and Mikhailova,E.S. Dokl. AN SSSR, 212, 237.(1973)

19. Carlile, M.J.,1970. In : Photobiology of Microorganisms, Wiley-Interscience, p.310.

20. Shuvalov,V.A. and Krasnovsky, A.A.,1971. Molekularnaya biologia, 5, 698.

21. Brin,G.P. and Krasnovsky,A.A., Biokhimia 22, 776.

22. Shaposhnikova,M.G. and Drozdova,N.N., and Krasnovsky,A.A.,1973. Biokhimia 36, 704; 38, 197.

23. Krasnovsky,A.A.,Jr., and Shaposhnikova,M.G.,1974. Molekularnaya biologia 8, 666.

24. Krasnovsky,A.A. and Mikhailova,E.S., Dokl.Nauk AN SSSR, 185,938; 194, 953.

25. Krasnovsky,A.A., 1971. In: Molecular Evolution (Buvet,R. and Ponnamperuma, C.,eds.,Vol.I, p.279, North-Holland, Amsterdam.

26. Arnon, D.I., Proc.Nat.Acad.Sci.US. 68, 2883 (1971).

27. Kamen, M.D.,1963. Primary processess in Photosynthesis ", Acad. Press, N.York.

28. Gusev, M.V., 1962. Dokl. AN SSSR 147, No.4.

29. Oschepkov, V.P., Nikitina, K.A., Gusev, M.V. and Krasnovsky,A.A. Dokl.An SSSR 213, 243.(1973).

CHEMICAL EVOLUTION OF PHOTOSYNTHESIS

A. A. KRASNOVSKY
A. N Bakh Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the U.S.S.R., Moscow, U.S.S.R.

Abstract. The principles of biological evolution of photosynthesis are established, but the ways of chemical evolution are unclear yet. The model systems will help to elucidate the problem. Every type of photosynthesis requires photoreceptor absorbing solar radiation. We studied as photoreceptors inorganic components of Earth crust, some coenzymes and porphyrins of abiogenic and biogenic origin. By the aid of inorganic photosensitizers (TiO_2, ZnO) the models of photosystems I and II were constructed.

Photochemical activation of some coenzymes may serve as an intermediate step from heterotrophic 'dark' to 'light' metabolism. The further evolution led to the separation of catalytic and photosensitizing functions. Porphin, chlorin and bacteriochlorin were formed by abiogenic synthesis. Magnesium complexes of porphyrins are active being excited by light. They are capable to reversible acceptance or donation of an electron to partner molecule. Excited Mg-complexes of porphyrins (P) are capable to transfer an electron from electron-doner (D) to electron-acceptor (A) accompanied by conversion of light quanta energy into potential chemical energy.

The primary electron transfer unit (D–P–A) was incorporated into primary membrane. The transition from random to anisotropic arrangement of (D–P–A) in the membrane was plausible as a step of evolution: charge translocation appeared. (D–P–A) units created in the period of chemical evolution were probably used in the course of biological evolution. The (D–P–A) units were coupled with noncyclic and cyclic electron transfer resulting in ATP formation; coupling of two (D–P–A) units led to H_2O oxidation and NADP reduction in photosynthetic organisms. The improvement of pigments biosynthesis created the phenomenon of excitation energy migration from the bulk of the pigment to (D–P–A) unit, being reactive center. The models described points the plausible steps of chemical evolution; the real sequence of events will be probably disclosed in the studies of precambrian rocks and space exploration.

1. Introduction

The conversion of solar energy by plants underlies the now existing pattern of life on the Earth. Organic compounds synthesized by plants and the oxygen evolved, are used in the metabolism of diverse organisms living on our planet. The oxygen-rich atmosphere of Earth probably originated as a result of plant photosynthesis. Now the question arises: did the origin of life on the Earth also depend on photosyntheses?

Although no decisive experimental data is available, numerous hypotheses as to the evolution of autotrophs have been put forward. Fifty years ago A. I. Oparin suggested that photosynthesis was developed after the primary heterotrophic organisms originated which made use of organic matter of abiogenic origin [1]. J. B. S. Haldane pointed out the possibility of abiogenic formation of organic matter by way of photochemical reactions under the action of ultraviolet radiation on the components of the primary, anaerobic terrestrial atmosphere [2]. The idea of the rather late origin of photosynthesis is shared by H. Gaffron [3] and M. Calvin [4].

We will consider the following problems, making use of the data from model experiments:

- The utilisation of solar energy in the period of chemical evolution;
- The mode of solar energy conversion in the membranes of primary probionts;
- The pathways of solar energy conversion during biological evolution.

Origins of Life 7 (1976) 133–143. *All Rights Reserved*
Copyright © 1976 by D. Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland

2. Solar Radiation and Chemical Evolution

According to contemporary ideas, chemical evolution spans a period of 3–5 b.y. Traces of the evolution of carbonaceous matter can be found in the ancient rocks of our Earth. Data are available on the chemical composition of Precambrian rocks having many organic substances including porphyrins. Due to chemical transformation of simple molecules and the destruction of modern biological structures, the origin of these substances is not always clear. The same considerations can be applied to the analysis of meteorites. With continued progress in space exploration, samples from other planets will become available for direct chemical analysis.

In the laboratory, impressive data were obtained by simulating the reaction in models of the primary reducing atmosphere under the influence of ultraviolet, visible and corpuscular radiation, radioactivity and electric discharges.

Two types of reactions are possible here: direct photochemical reactions leading to primary photodissociation or photoionisation of gaseous components of primary atmosphere as a result of shortwave ultraviolet radiation, and reactions photosensitized to the longer-wave part of solar spectrum where the maximum solar energy is situated.

The first type of reaction was considered in detail in the paper of Prof. C. Ponnamperuma. There has been much success in this field of research, and many laboratories have demonstrated the abiogenic syntheses of many organic substances which are the bricks of primary metabolism.

The photosensitized reactions require appropriate photo-receptors absorbing light in the longer-wave region than do the gaseous components of the primary atmosphere. Inorganic components of the Earth's crust or abiogenically formed colored matters such as porphyrins might serve as photoreceptors. Photosensitized reactions in condensed phases usually involved hydrogen (electron) transfer. The gradual accumulation of potential chemical energy through conversion of solar energy may be carried out by sensitized redox reactions using organic matter of abiogenic origin or inorganic compounds of Earth's crust.

2.1. INORGANIC PHOTOSENSITIZERS

In the literature on chemical evolution, the use of inorganic photoreceptors has not yet been considered. Some inorganic substances that are components of the Earth's crust possess photosensitizing activity, and could play the role of primary photosensitizers. It is surprising that the oxides of titanium, zinc and tungsten possess high photosensitizing activity in redox reactions comparable with the activity of porphyrins and chlorophylls. These compounds are able to sensitize reactions accompanied by light energy storage in terminal stable products [5, 6].

It was shown in our laboratory that titanium, zinc, and tungsten oxides under the action of near ultraviolet radiation (365 nm) are able, in water media, to photosensitize oxygen evolution coupled with exogenous electron acceptor reduction (ferric ions, ferricyanide ions, *p*-benzoquinone were used). The reaction follows the stoichiometry:

$$2\,Fe^{+++} + H_2O \longrightarrow 2\,Fe^{++} + 2\,H^+ + \tfrac{1}{2}\,O_2.$$

TABLE I

Photosensitization of redox reactions by TiO_2, ZnO, and WO_3 (365 nm)

Electron donor	Electron acceptor	Reaction products
H_2O	Fe^{+++}, $Fe(CN)_6^{+++}$	Oxygen, Fe^{++}, $Fe(CN)_6^{++}$
H_2O	*p*-Benzoquinone	Oxygen, hydroquinone
H_2O	Viologens	Reduced viologens
Glycine	Redox-dyes	Reduced dyes
Hydrazine, etc.		Oxidized electron donor

The origin of oxygen from water molecules was recently confirmed experimentally with heavy water labelled with oxygen: $H_2{}^{18}O$ [7]. The quantum yield of the reactions studied (Table I) ran up to 1%. These experiments reproduce the Hill reaction of chloroplasts or the photosystem II of photosyntheses. When oxygen is used as a final electron acceptor it is possible to reproduce the chloroplast Mehler reaction accompanied by hydrogen peroxide formation. Finally, inorganic photocatalysts are able to photosensitize viologen's reduction running up to the redox potential of the hydrogen electrode [8]. Thus the action of photosystem I can also be simulated by using inorganic photocatalysts.

The mechanism of photocatalytic reactions may be the following: The electron transition from the valence band to the conduction band proceeds as a result of light quantum absorption by the crystalline lattice of the photocatalyst-semiconductor. At the phase boundary (photocatalytic particles/aqueous solution) electron donors and acceptors molecules are absorbed on the electron-accepting and electron-donating active centers of the photocatalytic surface. The primary redox reaction is realized by interaction of electron donor with a hole and acceptor with electron. The dismutation of primary radicals on the catalytic surface takes place; in the case of oxygen evolution, recombination of OH radicals leading to oxygen evolution. Clearly, the photosensitizers possess catalytic activity too.

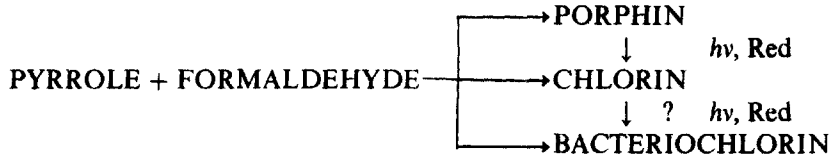
These observations point to a feasible mode of involvement of inorganic photosensitizers in the structure of probionts. Nevertheless, the existing organism does not utilize inorganic sensitizers in its metabolic pathways; those were probably 'blind alleys' in the growth of the evolutionary tree.

In the course of evolution, the most effective catalysts and photosensitizers developed were those in which inorganic ions were bonded to organic ligands, the porphyrin ring being most widespread.

2.2 PORPHYRINS

Rothemund in 1936 described the synthesis of porphin from pyrrole and formaldehyde. This reaction is thermodynamically spontaneous, proceeding slowly at room temperature in the dark and in the presence of some catalysts. The presence of oxidants (oxygen, quinones) enhances the synthesis of porphin since the condensation of pyrrole and formaldehyde proceeds with the elimination of hydrogen. Abiogenic formation of porphyrins in a simulated primary atmosphere was recently observed [9].

In a solution of pyrrole and formaldehyde not only porphin but also more reduced compounds are formed: chlorin and bacteriochlorin [10, 11]. The synthesis and analysis of the most reduced substances requires anaerobiosis since these pigments are spontaneously oxidized in the presence of the atmospheric oxygen. Chlorin may be formed from porphin not only by condensation of pyrrole and formaldehyde, but also via photoreduction of porphin. The following scheme summarizes the processes listed above:



Our studies have shown that interaction between pyrrole and formaldehyde is catalysed by some components of the Earth's crust – silica, titanium dioxide, zinc oxide, and some organic substances among the most active of which is tryptophan [10, 11].

When analyzing ancient rocks and samples from other planets it is necessary to search for the more reduced pigments – chlorins and bacteriochlorins, as well as for porphin. All these compounds are photochemically active; they possess photosensitizing activity and are capable of undergoing reversible photooxidation and photoreduction.

However, in organisms free porphyrins are found mostly as intermediates of biosynthesis; magnesium complexes of porphyrins are among photosynthetic organisms predominant in the photosynthetic process, while iron complexes most often serve as catalysts. Factors influencing the selection of the appropriate central metal atom in the porphyrin ring in the process of evolution is illustrated by the following table (Table II). The compounds of silicon and titanium are practically insoluble in water; this insolubility probably prevented the incorporation of these metals into porphyrin complexes. Complexes of Na, K, and Ca with porphyrins are hydrolyzed in aqueous media. Only complexes of magnesium and iron are sufficiently stable to be perpetuated in the course of evolution. These complexes, have auxiliary coordination vacancies perpendicular to the plane of the porphyrin ring

TABLE II

Element	Percent in Earth's crust	Activity of porphyrin complex	
		Catalysis	Photochemistry
Si	27.6	insoluble in	
Al	8.5	aqueous media	
Fe	5.0	+ +	− −
Ca	3.5		
Na	2.6	easy hydrolysis	
K	2.5		
Mg	2.0	− −	+ +
Ti	0.6	insoluble	

and thus are also capable of binding reacting molecules such as proteins. Vanadyl and nickel porphyrins have been found in petroleum; they are probably formed as a result of chlorophyll degradation and central magnesium atom substitution.

2.3. PHOTOCHEMISTRY OF PORPHYRINS

The principal difference between magnesium porphyrin complexes and ferric ones is that the former are active only after excitation by light quanta which results in their conversion into singlet or triplet excited states.

The studies in our laboratory have shown that excited porphyrins and their magnesium and zinc complexes are capable of undergoing reversible photochemical reduction or oxidation, that is of accepting or donating an electron to the partner molecule (see [12, 13]).

$$\text{Reversible photoreduction: } P^* + \text{Red} \rightleftharpoons {}^{\cdot}P^- + {}^{\cdot}\text{Red}^+.$$

$$\text{Reversible photooxidation: } P^* + \text{Ox} \rightleftharpoons {}^{\cdot}P^+ + {}^{\cdot}\text{Ox}^-.$$

In the case of most long-wave photosynthetic pigments, for example bacteriochlorophyll *b* of *Rhodopseudomonas viridis*, the ability to undergo reversible photooxidation is highly pronounced [14].

In the triple system composed of electron donors (Red), electron acceptors (Ox) and pigment-excited molecules (P^*), the photosensitization of the electron transport form Red molecules to Ox molecules proceeds at the expense of light energy absorbed by pigment molecules.

$$\begin{array}{c} h\nu \\ \downarrow \\ \text{Electron donor} \rightarrow \text{Excited pigment} \rightarrow \text{Electron acceptor.} \end{array}$$

As electron donors it is possible to use dienols, SH-compounds, ferrous compounds, NADH and NADPH, hydroquinone, etc., as electron acceptors, oxygen, quinones, ferric compounds, NAD and NADP, flavines, etc. Thus, it is plausible that this type of photosensitized electron transfer proceeded in the period of chemical evolution.

3. Photochemical Reactions in Membranes of Probionts

3.1 PHOTOCHEMICAL ACTIVATION OF BIOCATALYTIC SYSTEMS

In the case of an abundance of chemically active substances in the primary soup, redox reactions would probably have determined the pattern of primary energetic metabolism. As catalysts of these reactions components of the Earth's crust may have been involved, the catalytic action having been enhanced by complexing with organic ligands of abiogenic origin such as simple organic bases or tetrapyrrolic compounds. Along with components having catalytic properties, there were substances on the primary Earth such as abiogenic tetrapyrrole compounds, possessing photosensitizing activity.

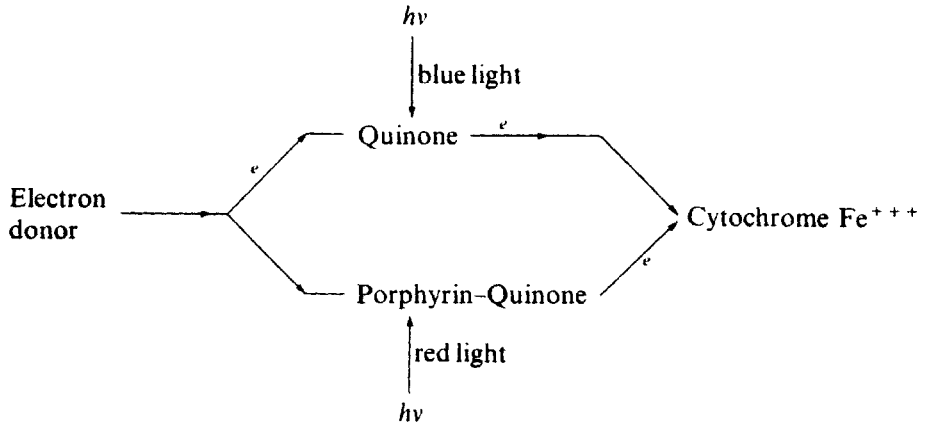
At the first International Symposium on the Origin of Life [15] we suggested that the photochemical activation of catalysts similar to contemporary coenzymes might have been an intermediary metabolic step in light energy utilization. The

photochemical activity of flavin coenzymes was already known at that time. Later we studied the photochemical activation of reduced pyridine nucleotides and analogs by near ultraviolet radiation (365 nm) [16]. Photochemical activation enhanced NADH oxidation by electron acceptor molecules including viologens (and ferredoxin) which have a more negative redox potential than pyridine nucleotides. In the latter case it was possible to store some light energy in the reaction products [17]:

$$NADH^* + \text{Viologen} \rightleftharpoons NAD + \text{reduced Viologen},$$

$$NADH^* + \text{Ferredoxin} \rightleftharpoons NAD + \text{reduced Ferredoxin}.$$

We have recently revealed catalytic action of quinones in cytochrome *c* autoreduction. Blue light absorbed by quinones greatly enhances this reaction; the superposition of catalytic and photosensitizing activity is pronounced in this case [18].



The photochemical activity of cytochromes and other Fe-porphyrins proper is negligible as compared to the activity of magnesium complexes, the latter being able to effect photosensitization of the redox transformations of cytochromes.

The examples of a possible transition from a heterotrophic to an autotrophic mode of metabolism may be found in the extensive literature on the action of light on the metabolism of contemporary heterotrophs, for instance fungi [19]. These chlorophyll-deficient organisms usually contain photochemically active pigments – flavins, quinones and porphyrins – as intermediates in heme biosynthesis.

In our laboratory Zn-porphyrins were found in various types of organisms using phosphorescence action spectra measurements in the cells [20]. Finally, photochemically active reduced NAD and NADP are universal cell components.

We suggested [15] that in the course of evolution photosensitizing and biocatalytic functions became specialized. This development can be seen in a comparison of the properties of iron and magnesium porphyrins. The latter are effective photosensitizers, inactive in the dark and extremely active when excited. On the contrary, the biocatalysts – iron porphyrin complexes – are extremely active in the dark and possess rather low photochemical activity.

The significance of photosensitized substrate activation became more important in the course of exhaustion of active substances in the primary ocean.

It is generally considered that on the primary Earth there was no ozone layer in the upper parts of the atmosphere to absorb the short-wave ultraviolet radiation of the Sun. The water layer also absorbs short-wave ultraviolet, in the case of reactions occurring in the ocean, the primary photochemical reactions required sensitization to the longer wavelengths of the solar spectrum.

3.2. PHOTOCHEMICAL REACTIONS IN MEMBRANES OF PRIMITIVE PROBIONTS

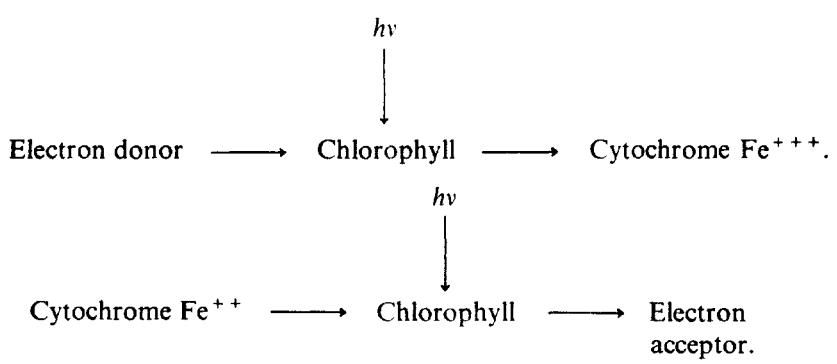
Thus in the course of photochemical evolution homogenous and heterogenous reactions of electron transfer took place. The arrangement of these reactions into more complicated chains might proceed in the membranes of primitive probionts.

More advanced probionts possessed probably lipoproteinic membranes. The ability of porphyrins to incorporate themselves into the membrane required the appearance in their molecule lipophilic tail of phytol or farnesol. The lipophilic tail does not influence the photochemical activity of pigments molecules. It is determined mainly by the porphyrin ring's circularly conjugated system of double bonds.

Photochemical reactions of porphyrins were studied in our laboratory in the simplest heterogenous systems – aqueous solutions of surface active substances – detergents [21]. Chlorophyll and analogs in aqueous detergent solutions possessed pronounced photochemical activity [22]; these pigments are capable in detergent micelles of reversible oxidation and reduction and effective photosensitization [23].

So, in aqueous solutions of triton X-100 chlorophyll and cytochrome *c* are solubilised. By red light illumination (when chlorophyll absorbs light) photosensitized cytochrome reduction was observed; in the presence of electron acceptors reduced cytochrome oxidation proceeded. The reaction was enhanced in the presence of flavins, quinones and other substances which are intermediate electron carriers [24]. In aqueous detergent solutions, photosensitized reduction of viologen takes place, too (see [12]).

Electron transfer in the detergent micelle is shown in the scheme:

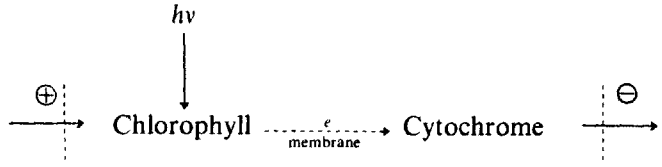


In this case the terminal aminoacid residues of cytochromes molecule are probably used as electron donors.

If simple chains of electron transfer are arranged perpendicular to the plane of membrane the possibility of charge translocation may proceed according to

Mitchell's chemiosmotic theory. Such charge translocation may lead to proton translocation, a prerequisite of adenosine triphosphate synthesis. Thus photochemical mobilization of electron could lead to macroergic bonds formation.

I wish to put forward an idea that an important stage of prebiological evolution is comprised of the transition from a random to anisotropic arrangement of primitive electron transfer chains incorporated into the primary membrane.



3.3 COUPLING OF PHOTOCHEMICAL AND CATALYTIC REACTIONS

Thus it is possible to suppose that a primary photocatalytic block of chemical and biological evolution comprised the ternary system: electron donor-pigment-electron acceptor. This system works efficiently not only in models but also in biologically organized structures. The photochemical and catalytic electron transport chains were improved by diverse coupling of the primary photocatalytic blocks into the primary protobiont membranes [25]. In the processes of biological evolution diverse combinations of photocatalytic blocks were realized.

It is possible to trace several types of primitive photocatalytic electron transfer; we begin with noncyclic electron transfer. The excited pigment molecule reduces the activation energy and the overall reaction is thermodynamically possible ($-\Delta F$); here the photosensitizer acts as a photocatalyst.

$$\text{Red} + \text{Ox} + (\text{P}) \xrightarrow{-\Delta F} \text{Red}_{\text{Ox}} + \text{Ox}_{\text{red}} + (\text{P}).$$

Another type of reaction which is more important for the use of an inactive hydrogen donor, like the water molecule, is the overall process accompanied by the increase of free energy of the system ($+\Delta F$). This case can be reproduced in a model system in solutions of chlorophyll; here pyridine nucleotides and other electron acceptors are photoreduced and ascorbic acid acts as an electron donor. This case was studied in our laboratory (see [12]).

$$\text{Ascorbate} + \text{NAD} + \Delta F \longrightarrow \text{Ascorbate}_{\text{Ox}} + \text{NADH} + \text{Chl}.$$

The modeling of Hill's reaction, photosensitized by inorganic semiconductors, also proceeds with a gain of free energy (see above).

It is possible to presume a primitive cyclic electron transfer coupled with phosphorylation. In the cyclic processes, Mg or Fe porphyrin may participate; chlorophyll and porphyrins effectively photosensitize oxido-reductive transformations of cytochromes. But the coupling of such cyclic photochemical electron transfer with an ATP formation has not yet been achieved in any model systems.

It was found by Arnon [26] and Kamen [27] that ancient photosynthetic organisms (photosynthetic bacteria) possess both types of electron transfer, noncyclic and cyclic coupled with photophosphorylation. So, we may conclude that the primitive 'bricks' of electron transfer may be used in biological evolution.

The use of water as an ultimate electron donor in more perfect photosynthetic organisms required the coupling of two photoreactions for electron transport from water to pyridine nucleotides via ferredoxins [25]; in other words, the coupling of two photocatalytic 'bricks' which are denoted, according to contemporary ideas, as photosystems I and II. The chemical and biological evolution from simple photocatalytic reactions to the perfectly organized systems of photosynthetic electron transfer required probably more than two billion years.

4. Evolution of Pigments

The ancestors of contemporary photosynthetic organisms probably possessed small quantities of pigments directly participating in photochemical electron transfer as the effective pigment biosynthetic system was not yet developed.

As far as the catalysts are concerned, enzymes are active in very low concentrations, but the quantity of pigment-photosensitizer must be very high to absorb the Sun's radiation effectively so as to win in the competition for survival. So the development of metabolism in the course of biological evolution gradually led to the effective biosynthesis of chlorophylls, phycobilins and carotenoids.

In the course of origination of protobionts various metabolic sets of pigment systems were probably formed. It is possible to suggest that primary photosynthetic cells were developed which had various pigment combinations: carotenoids, linear tetrapyrroles and cyclic tetrapyrroles.

During the development of pigment biosynthesis which led to pigments' accumulation in cells, the mechanism of energy migration developed from the bulk of pigments to preexisting active center pigment. We know that in contemporary cells light quanta energy, absorbed by the bulk of aggregated pigments, efficiently migrates to the minor quantity of pigment functioning in the most longwave active center.

When aggregated magnesium complexes of reduced porphyrins possessed the most longwave absorption it determined their function as the terminal trap in the excitation energy migration process. Phycobilins possess more shortwave absorption and photochemical stability which favours their function as intermediates in excitation migration.

Carotenoids absorb light in shortwave range of the visible spectrum though there are data that their triplet levels are situated lower than in chlorophyll molecules. This property points the possibility of energy migration on triplet level.

The organisms survived which become a combination of pigments effectively absorbing the solar radiation and channeling the excitation energy by migration to long-wave active centers. Such organisms became photosynthetic bacteria and blue-green algae.

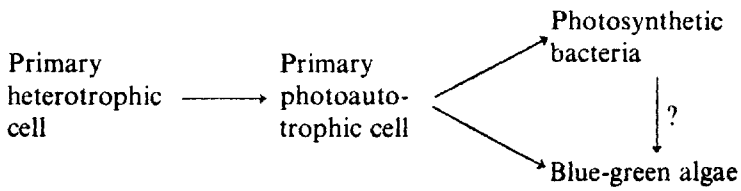
In anaerobic photosynthetic bacteria the most reduced porphyrin pigments dominate – bacteriochlorophylls. In aerobic photosynthetics more oxidized chlorophylls *a* and *b* were accumulated. We may propose that most ancient forms are the most anaerobic. If this was the case, we may consider that more ancient pigments are capable to rapid photoxidation. If this criterion is true, the most ancient photosynthetic organisms contain bacteriochlorophyll *b* (*Rhodopseüdomonas*

viridis), they are followed by organisms having bacteriochlorophyll *a* and then – bacterioviridin which resembles chlorophyll *a* by his spectral properties.

Blue-green algae are usually regarded as the most ancient photosynthetic organisms. In the most ancient precambrian rocks dating approximately 3 billions of years fossil micro-organisms were found.

Some types of blue-green algae hardly bear high partial pressure of oxygen; they prefer environments near to anaerobiosis [28]. This phenomenon points to their probable origin from anaerobic ancestors.

But the problem is not solved yet; does the blue-green algae develop from photosynthetic bacteria or both types of cells had a common ancestor? The last hypothesis that the common primary photoautotroph was an ancestor of both types of organisms, is held by many researchers:



The phylogenesis of higher plants is studied better because it is based on the study of contemporary organisms and reliable paleobotanic data. The pigments of higher photosynthetics are all rather similar; they contain chlorophylls *a* and *b* and carotenoids.

The problem of biochemical evolution of now existing organisms is developed in detail, but we cannot find the organisms on the Earth, in the interim between chemical and biological evolution.

Charles Darwin, in his well known letter to Hooker, a hundred years ago, noted that the primary living matter is impossible to find nowadays as this matter would be eaten out or absorbed by more advanced organisms. It is worth emphasizing that primary organisms appeared in anaerobic conditions and so they could not tolerate the contemporary oxygen atmosphere of the Earth [2].

One of the possible ways to reveal ancient types of metabolism is to study photosynthesis of contemporary green cells in anaerobic conditions. H. Gaffron discovered in 1939 that green unicellular algae evolve hydrogen when treated anaerobically. In the hydrogen atmosphere green algae require the ability to photoreduce carbon dioxide which is probably an ancient form of metabolism [3]. In the case of blue-green algae the hydrogen evolution was observed in the course of dark metabolism [29].

5. Conclusion

The intensive development of the life on the Earth was possible because radiant energy was supplied by a foreign source – the Sun. The most probable primary utilization of shortwave ultraviolet radiation from the Sun was gradually replaced by photosensitization of energy storing reaction to the longwave region of Sun radiation.

The main problem was to develop different ways to convert quanta energy into potential chemical energy of rather stable compounds formed photochemically. Such high energy compounds which store energy from light quanta as potential chemical energy could be easily used in the metabolism of various types of organisms.

The evolution of the process of light quanta conservation lead to accumulation of stable products of photosynthesis: carbon dioxide reduction compounds, and molecular oxygen, a result of photooxidation of water molecules. It is probable that on the other planets light energy storage may lead to the products chemically different from those substances formed during photosynthesis on the Earth.

The data of model experiments described in this paper illustrate the plausible ways of light energy conversion at the primary stages of prebiological evolution.

References

1. Oparin, A. I.: 1924, *Origin of Life*, Izd. Moskovskii rabochii, Moscow.
2. Haldane, J. B. S.; 1969, in J. D. Bernal, *Origin of Life*, Izd. 'Mir', Moscow.
3. Gaffron, H.: 1962, in M. Kasha and B. Pullmann (eds.), *Horizons in Biochemistry*, p. 59, Academic Press, New York.
4. Calvin, M.: 1969, *Chemical Evolution*, Clarendon Press, Oxford.
5. Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P.: 1962, *Dokl. AN SSSR* **147**, 654.
6. Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P.: 1970, *Molecular Photonics*, p. 161, Izd. 'Nauka'.
7. Fomin, G. V., Brin, G. P., Genkin, M. V., Lubimova, A. K., Blumenfeld, L. A., and Krasnovsky, A. A.: 1973, *Dokl. AN SSSR* **212**, 424.
8. Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P.: 1973, *Dokl. AN SSSR* **213**, 207.
9. Hodgson, G. W. and Ponnamperuma, C.: 1968, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **59**, 22.
10. Krasnovsky, A. A. and Umrikhina, A. V.: 1972, in D. L. Rohlfing and A. I. Oparin (eds.), *Molecular Evolution: Prebiological and Biological* p. 141, Plenum Press, New York.
11. Krasnovsky, A. A. and Umrikhina, A. V.: 1964, *Dokl. AN SSSR* **155**, 691.
    Krasnovsky, A. A. and Umrikhina, A. V.: 1972, *Dokl. AN SSSR* **202**, 221.
12. Krasnovsky, A. A.: 1972, *Biophys. J.* **12**, 749.
13. Krasnovsky, A. A. and Voinovskaja, K. K.: 1954, *Dokl. AN SSSR* **96**, 1209.
14. Bokuchava, E. M., Drozdova, N. N., and Krasnovsky, A. A.: 1974, *Biokhimia* **39**, 188.
15. Krasnovsky, A. A.: 1959, in A. I. Oparin *et al.* (eds.), *Origin of Life on Earth*, p. 606, Pergamon Press, New York.
16. Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P.: 1964, in V. L. Kretovich (ed.), *Problems of Evolution and Technical Biochemistry*, p. 221, Izd. 'Nauka', Moscow.
17. Krasnovsky, A. A. and Brin, G. P.: 1965, *Dokl. AN SSSR* **163**, 761.
18. Krasnovsky, A. A. and Mikhailova, E. S.: 1973 *Dokl. AN SSSR* **212**, 237.
19. Carlile, M. J.: 1970, in *Photobiology of Microorganisms*, p. 310, Wiley-Interscience.
20. Shuvalov, V. A. and Krasnovsky, A. A.: 1971, *Molekularnaja Biologia* **5**, 698.
21. Brin, G. P. and Krasnovsky, A. A.: 1957, *Biokhimia* **22**, 776.
22. Shaposhnikova, M. G., Drozdova, N. N., and Krasnovsky, A. A.: 1971, *Biokhimia* **36**, 704.
    Shaposhnikova, M. G., Drondova, N. N., and Krasnovsky, A. A.: 1973, *Biokhimia* **30**, 197.
23. Krasnovsky, A. A., Jr. and Shaposhnikova, M. G.: 1974, *Molekularnaja Biologia* **8**, 666.
24. Krasnovsky, A. A. and Mikhailova, E. S.: 1969, *Dokl. AN SSSR* **185**, 938.
    Krasnovsky, A. A. and Mikhailova, E. S.: 1970, *Dokl. AN SSSR* **194**, 953.
25. Krasnovsky, A. A.: 1971, in R. Buvet and C. Ponnamperuma (eds.), *Molecular Evolution*, Vol. I, p. 279, North-Holland, Amsterdam.
26. Arnon, D. I.: 1971, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 2883.
27. Kamen, M. D.: 1963, *Primary Processes in Photosynthesis*, Academic Press, New York.
28. Gusev, M. V.: 1962, *Dokl. AN SSSR* **147**, No. 4.
29. Oschepkov, V. P., Nikitina, K. A., Gusev, M. V., and Krasnovsky, A. A.: 1973, *Dokl. AN SSSR* **213**, 243.

Доклады Академии наук СССР
1977. Том 232, № 1

УДК 581.174.1

БИОФИЗИКА

Л. М. ВОРОБЬЕВА, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ *

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СТАДИИ ОБРАЗОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ

Необходимость кислорода для накопления хлорофилла при зеленении этиолированных листьев известна давно ([1]). Однако предшественник может превращаться в хлорофилл и в отсутствие кислорода ([2–5]). В. Н. Любименко и Н. Н. Гортикова предположили, что кислород необходим для темнового синтеза хлорофиллогена (протохлорофиллида) ([5]). В данной работе мы попытались выяснить влияние кислорода на промежуточные стадии превращения пигментов и накопление хлорофилла при освещении этиолированных проростков фасоли.

Для исследования спектральных свойств пигментов была применена флуоресцентная методика. Установка для измерения флуоресценции собрана на основе ФЭУ-79 и ФЭУ-22 ([6]). Во время записи спектров флуоресценции было применено термостатирование. Возбуждающий свет (λ = =365 нм, $2{,}6 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) получали с помощью лампы СВД-120А и светофильтров УФС-2, ЗС-3 и СЗС-14. Время записи одного спектра в области 620–800 нм ~2 мин.

Этиолированные листья освещали при 20°, используя для зеленения свет от ламп накаливания с интенсивностью $3 \cdot 10^4$ и $3 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$, а также свет, возбуждающий флуоресценцию. При зеленении листьев под влиянием возбуждающего света в течение всего опыта регистрировали спектры флуоресценции; время, указанное в тексте и на рисунках, относится к моменту записи наивысшей точки максимума.

Во время освещения листья находились во влажной камере. Воздух удаляли откачиванием масляным насосом в течение 15 мин., после чего образец 30 мин. держали в темноте.

Для определения общего количества пигментов (хлорофиллид+хлорофилл) и хлорофиллида навеску листьев после освещения на воздухе или в «вакууме» растирали в жидком азоте, пигменты извлекали безводным ацетоном, охлажденным до −76°

Результаты наших опытов подтверждают выводы, полученные ранее. При освещении этиолированных листьев без кислорода хлорофилл образовывался, но за 10 час. зеленения его количество существенно не менялось, тогда как в опыте на воздухе содержание пигмента за это же время возрастало в 5 раз (рис. 1). При освещении листьев без воздуха заметного накопления протохлорофиллида также не удалось обнаружить. Как было показано ранее ([5]), его синтез без кислорода подавлен, что, по-видимому, и определяет отсутствие накопления хлорофилла при зеленении этиолированных листьев в вакууме.

Для выяснения влияния кислорода на промежуточные стадии биосинтеза хлорофилла мы делили этиолированный лист на две половины по средней жилке и проводили опыты последовательно на воздухе и после его удаления. Результаты таких последовательных опытов изображены на рис. 2.

Освещение этиолированных листьев на воздухе возбуждающим светом показало обычную смену форм пигментов ([7]); об-

* В работе принимала участие С. Ю. Бонапарт.

наруживаемые при этом максимумы были сдвинуты на 1—1,5 нм в коротковолновую сторону по сравнению с соответствующими максимумами в спектрах флуоресценции при —196° ([8], [9]). При освещении этиолированного листа возбуждающим светом обнаруживался максимум флуоресценции от 686 до 690 нм у разных листьев (1,5 мин. действия света), характеризующий, по-видимому, смесь нескольких форм бесфитольных пигментов с максимумами флуоресценции 684, 690 и 695 нм при —196° ([10], [11]) и невысокий максимум в области 630—640 нм, обусловленный непревращенным предшественником. Под возбуждающим светом наблюдалось постепенное перемещение максимума флуоресценции до 693—694 нм (695 нм при —196°) и понижение флуоресценции в области 640 нм. Эти процессы

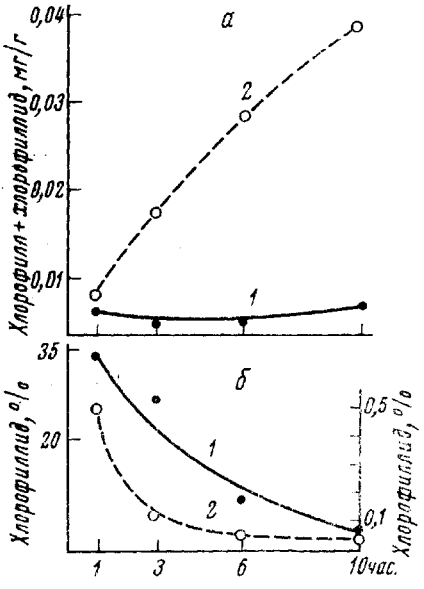


Рис. 1

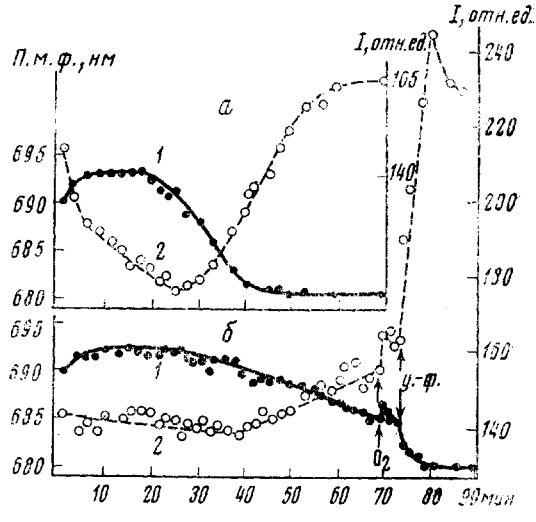


Рис. 2

Рис. 1. Изменение общего количества пигментов (*а*) и содержание хлорофиллида (*б*) при зеленении этиолированных листьев в отсутствие (*1*) и присутствии (*2*) кислорода. Для *б*: *1* — левая ордината, *2* — правая ордината. Освещение: белый свет, $3 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$

Рис. 2. Изменение положения максимума флуоресценции (п.м.ф.), 20° (*1*) и его интенсивности *I* (*2*) при освещении этиолированных листьев светом 365 нм ($2{,}6 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) в присутствии (*а*) и в отсутствие (*б*) кислорода. Стрелка — последующий пуск кислорода и 5-секундное освещение у.-ф. $1{,}3 \cdot 10^7$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$

заканчивались при 20° за 5—10 мин., после чего до 18—20 мин. от начала опыта не наблюдалось существенных спектральных изменений. Начиная с 20—25 мин. зеленения максимум флуоресценции постепенно перемещался в коротковолновую сторону и к 45—70 мин. достигал 680—682 нм, что соответствует по всем общепринятым схемам окончанию превращения бесфитольных пигментов и образованию хлорофилла а. Время перемещения максимума до 680 нм зависело от возраста этиолированных проростков и возрастало по мере их старения.

Одновременно с изменением положения обнаруживалось изменение высоты максимума флуоресценции. На стадии смещения максимума флуоресценции в длинноволновую сторону наблюдалось быстрое падение интенсивности флуоресценции после достижения стационарного положения максимума флуоресценции при 693 нм этот процесс замедлялся. Наблюдаемое падение флуоресценции следует объяснить деструкцией под влиянием возбуждающего света фотолабильных форм бесфитольных пигментов ([12]). Быстрое падение флуоресценции в начале опыта свидетельствует о

том, что особой фоточувствительностью обладает, по-видимому, форма пигмента с флуоресценцией при 684 нм (−196°).

При коротковолновом смещении максимума флуоресценции до 680 нм наблюдалось возрастание его высоты, которое, по-видимому, сопряжено с дезагрегацией пигмента на стадии присоединения фитола.

Без кислорода освещение возбуждающим светом также приводило к образованию максимума флуоресценции ~688—690 нм и к сдвигу до 691,5—693 нм, однако удаление воздуха обусловливало заметное торможение процесса превращения пигментов (рис. 2). Наблюдалось замедление скорости коротковолнового смещения максимума до 680 нм и коррелирующего с ним возрастания интенсивности максимума флуоресценции. Некоторое ускорение этих процессов наблюдалось после 30 мин. освещения, но и после 50 мин. максимум располагался у ~689 нм.

Пуск кислорода приводил к ускорению наблюдаемых превращений. Еще большее ускорение вызывало кратковременное (5 сек.) освещение листа после пуска воздуха у.-ф. светом высокой интенсивности (свет лампы СВД 120А, светофильтр СЗС-14=$1{,}3\cdot10^7$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$). Наблюдалось быстрое смещение максимума флуоресценции до 680 нм и многократное возрастание интенсивности флуоресценции, не имеющее места при прослеживании процесса на воздухе. Это, по-видимому, объясняется тем, что без кислорода в начале опыта отсутствует фотовыцветание пигмента, о чем свидетельствует стабильность высоты максимума флуоресценции на стадии образования длинноволновых форм пигмента. После достижения максимальной величины флуоресценции при 680 нм под влиянием возбуждающего света наблюдалось быстрое ее понижение, что обусловливалось выцветанием пигмента в присутствии кислорода.

Определение содержания хлорофиллида ([13]) по мере зеленения этиолированных листьев показало, что процесс фитолизации, ведущей к образованию хлорофилла а, тормозится в отсутствие кислорода (рис. 1).

Таким образом, удаление кислорода не препятствует световому превращению присутствующего в этиолированных листьях протохлорофиллида и образованию хлорофиллида 695 нм (−196°) в наших условиях опыта. Однако новообразование активного протохлорофиллида и превращение хлорофиллида и хлорофилл а в процессе биосинтеза значительно замедляются при освещении этиолированных листьев без кислорода. Увеличение скорости коротковолнового сдвига после 30 мин. зеленения без воздуха (рис. 2) также можно объяснить появлением на этом этапе зеленения кислорода за счет активации кислородвыделяющей системы.

Известно, что скорость превращения пигментов на первых стадиях освещения этиолированного листа при фотовосстановлении протохлорофиллида до хлорофиллида зависит от интенсивности света. Ф. Ф. Литвину и О. Б. Беляевой удалось обнаружить две фотохимические реакции 655 нм→684 нм и 684 нм→690 нм, из которых на свету низкой интенсивности протекает лишь первая реакция ([11]). Если в основе механизма регуляции следующей стадии биосинтеза пигментов — фитолизации, ведущей к образованию коротковолновой формы хлорофилла а, также лежит фотохимическая реакция, то следовало изучить зависимость процесса от интенсивности света.

Результаты проведенных опытов подтверждают существование такой зависимости. Наиболее отчетливо видно ускоряющее влияние импульса света высокой интенсивности на лист, предварительно освещенный в вакууме, после пуска к нему кислорода (рис. 2).

В темноте превращение длинноволновых форм пигментов заторможено ([10]). Так, в случае освещения этиолированного листа слабым светом ($3\cdot10^4$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) в течение 5—7 мин. и последующего помещения в темноту коротковолновый сдвиг максимума флуоресценции начинал проявляться лишь после 1,5—2 час. пребывания листа в темноте (рис. 3, 4). Наиболее длительное время сдвига максимума флуоресценции

693 нм→680 нм в отсутствие света после кратковременного освещения наблюдалось у листьев «старых» этиолированных проростков, что может свидетельствовать о включении в этот процесс ферментной системы, частично инактивирующейся при старении растения.

Применение в данной работе измерения спектров флуоресценции при комнатной температуре для исследования промежуточных стадий биосинтеза хлорофилла позволило не только изучить последовательность спектральных превращений образующихся пигментов в одном листе (что невозможно при низкотемпературной методике измерения спектров флуо-

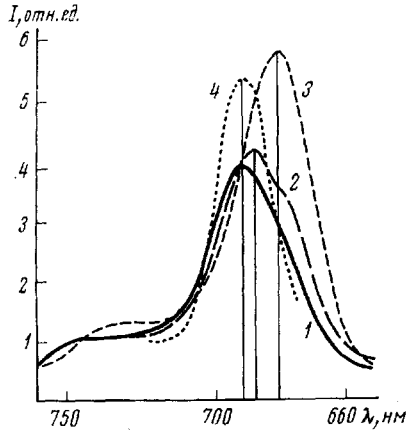


Рис. 3

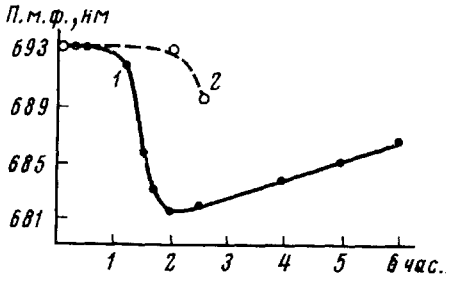


Рис. 4

Рис. 3. Спектры флуоресценции (−196°) при освещении этиолированных листьев светом разной интенсивности (*I*). *1* – 75 мин., белый свет ($3 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$); *2* – 70 мин., белый свет ($3 \cdot 10^5$ эрг·см^2·сек$^{-1}$); *3* – 70 мин., свет 365 нм ($2{,}6 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$); *4* – после 7 мин. белого света ($3 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) и 2 час. темноты (20°)

Рис. 4. Изменение положения максимума флуоресценции (п.м.ф.), 20°, при освещении этиолированных листьев белым светом ($3 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) (*1*) и в темноте после 7 мин. освещения светом такой же интенсивности (*2*)

ресценции), но и исследовать изменение состояния пигмента на разных стадиях зеленения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что превращение промежуточных длинноволновых форм хлорофиллида в коротковолновую форму хлорофилла связано с фотохимическим взаимодействием пигментного комплекса с кислородом.

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

Поступило
21 IX 1976

ЛИТЕРАТУРА

[1] *К. А. Тимирязев*, Из области физиол. растений, М., 1888, стр. 267. [2] *Б. Л. Исаченко*, Изв. СПб. бот. сада, т. 9, 5, 107 (1909). [3] *J. I. Liro*, Ann. Acad. Sci., Fenicae, Ser. A., 1 (1908). [4] *W. Sharfnagel*, Planta, v. 13, 716 (1931). [5] *В. Н. Любименко, Н. Н. Гортикова*, Эксп. бот., в. 2, 113 (1936). [6] *Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский*, Биофизика, т. 6, 392 (1961). [7] *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский*, Биофизика, т. 13, 456 (1968). [8] *Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский*, ДАН, т. 117, 106 (1957). [9] *Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский*, ДАН, т. 20, 764 (1958). [10] *Ф. Ф. Литвин, О. Б. Беляева*, Биохимия, т. 33, 928 (1968). [11] *Ф. Ф. Литвин, Е. И. Ефимцев и др.*, Физиол. раст., т. 23, 17 (1976). [12] *Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский*, Биофизика, т. 14, 245 (1969). [13] *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский*, Физиол. раст., т. 13, 929 (1966).

Доклады Академии наук СССР
1977. Том 236, № 5

УДК 581-174-1

БИОФИЗИКА

Л. М. ВОРОБЬЕВА, академик А. А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАТИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ПИГМЕНТА ПРИ ОСВЕЩЕНИИ ЛИСТЬЕВ

Пигменты на первых стадиях зеленения этиолированных проростков способны к быстрому фотоокислению в присутствии кислорода [1]. Однако при длительном освещении этиолированных листьев без воздуха не удается наблюдать накопления хлорофилла [2, 3] и заторможена стадия присоединения фитола к хлорофиллиду [3]. Эти наблюдения требовали изучения фотохимического взаимодействия пигментного комплекса с кислородом на разных стадиях зеленения этиолированных листьев.

В наших опытах освещение этиолированных листьев при 20° светом λ=365 нм, возбуждающим флуоресценцию (лампа СВД 120А со светофильтрами УФС-2, ЗС-3, СЗС-14; $2{,}5 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$), или лампой накаливания ($3 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$) приводило к появлению максимума флуоресценции (м.ф.) при 20° 693—494 нм (хлорофиллид), далее к смещению м.ф. до 680—682 нм (хлорофилл а), после чего происходило накопление хлорофилла, ведущее к перемещению м.ф. в длинноволновую сторону [3, 4]. Листья на разных стадиях зеленения освещали при 20° светом высокой интенсивности (с.в.и.), в процессе освещения регистрировали спектры и кинетику изменения интенсивности флуоресценции (и.ф.) при 20°, в параллельном опыте записывали спектры флуоресценции при —196°. После записи исходного спектра флуоресценции или и.ф., не изменяя положения, лист освещали с.в.и. (свет лампы накаливания $5 \cdot 10^6$ эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$, или лампы СВД 120А со светофильтром СЗС-14 10^7 эрг·см$^{-2}$·сек$^{-1}$).

Освещение листа на стадии МФ 693—694 нм в течение 1—30 сек. в присутствии воздуха приводило к возрастанию и.ф. в 2—2,5 раза от исходной величины (рис. 1), после чего наблюдалось понижение и.ф. ниже исходного значения (15—40 сек). Повторное освещение с.в.и. также приводило к возрастанию и.ф., но его амплитуда постепенно уменьшалась до исчезновения эффекта, однако после 1—1,5 мин. выдерживания листа под возбуждающим светом или в темноте происходило возрастание и.ф. под влиянием с.в.и.

Время насыщения эффекта составляло 4—5 сек. По мере дальнейшего увеличения времени освещения с.в.и. наблюдалось возрастание необратимого уменьшения и.ф. после выключения с.в.и., по-видимому, связанное с выцветанием фотолабильных форм пигмента. На рис. 2 схематически изображена зависимость величины возрастания и.ф. (*а—в—ж*) и выцветания пигмента (линия *а—з*) от времени действия с.в.и. на этиолированный лист, освещенный 1 мин. возбуждающим светом (м.ф. 694 нм при 20°). Для каждого интервала освещения использован новый лист.

В период коротковолнового смещения м.ф. при фитолизации хлорофиллида возрастание и.ф. под влиянием с.в.и. постепенно уменьшалось, и у листьев с м.ф. 680 нм эффект отсутствовал. Освещение с.в.и. более 15 сек. в этом случае приводило к обратимому понижению и.ф.

Возрастание и.ф. наблюдалось при действии на зеленеющие листья с.в.и. при 0—5°. Величина возрастания и время насыщения эффекта существенно не отличались от наблюдаемых при 20°, однако понижение и.ф. после выключения с.в.и. было замедленно, достигая 4—5 мин. после 5 сек. действия с.в.и., и укорачивалось по мере увеличения интервалов

освещения. Кроме того, максимальное возрастание и.ф. при 0° наблюдалось при освещении листа от 5—7 до 45—60 сек., в то время как при 20° возрастание и.ф. в зависимости от длительности с.в.и. имело максимум при 4—5 сек.

Измерение спектров флуоресценции листьев при 0—5° показало, что освещение с.в.и. сопровождается не только возрастанием, но и коротковолновым смещением (до 5 нм) м.ф., полностью обратимым после выключения с.в.и. (рис. 3). Эффект обнаруживался при действии у.-ф., белого,

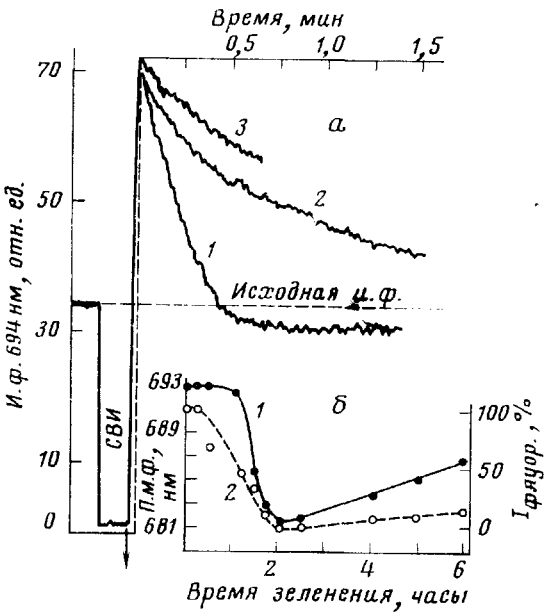


Рис. 1

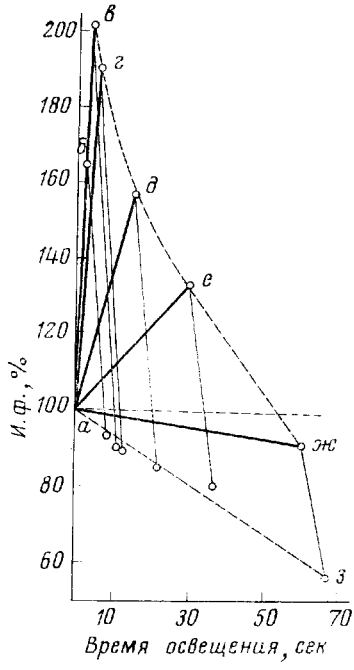


Рис. 2

Рис. 1. Изменения и.ф. при освещении зеленеющих этиолированных листьев фасоли светом высокой интенсивности. *а* — действие с.в.и. на этиолированный лист на начальной стадии зеленения (м.ф. 694 нм): *1* — 5 сек. освещения, 20°; *2* — 30 сек. освещения, 5°; *3* — 10 сек. освещения, 5°. Стрелка — выключение с.в.и. *б* — действие с.в.и. на этиолированные листья на разных стадиях зеленения: *1* — положение максимума флуоресценции (п.м.ф.) при 20°; *2* — изменение и.ф. под влиянием 5 сек. освещения с.в.и. при 20°

Рис. 2. Зависимость изменений и.ф. в максимуме у зеленеющих листьев фасоли при 20° от интервалов освещения с.в.и. *а* — и.ф. до освещения с.в.и. Освещение с.в.и. 2 сек. (*б*), 4 сек. (*в*), 5 сек. (*г*), 15 сек. (*д*), 30 сек. (*е*), 60 сек. (*ж*). Линия *а* – *з* – и.ф. спустя 1,5 мин. после выключения с.в.и.

красного (светофильтр КС-11) и синего (светофильтр СЗС-22) света. Свет с $\lambda > 700$ нм не оказывал действия. Обратимый коротковолновый сдвиг м.ф., как и увеличение и.ф. под влиянием с.в.и., можно было наблюдать несколько раз повторно на одном листе. Коротковолновое смещение м.ф. после воздействия с.в.и. при 0° обнаруживалось также в спектрах флуоресценции, измеренных при —196°.

Затемнение листьев на 5—10 мин. после нескольких минут зеленения не приводило к существенному изменению эффекта под влиянием с.в.и.

Для изучения участия кислорода в наблюдаемом явлении мы прикрепляли этиолированный лист к влажной фильтровальной бумаге, помещали в вакуумную трубку и в темноте удаляли воздух 20—30 мин. масляным вакуумным насосом. Как было показано ранее ([3]), освещение этиолированных листьев в «вакууме» приводит к превращению темновых предшественников и образованию длинноволновых форм хлорофиллида.

Однако последующее освещение листьев с.в.и. без воздуха не приводило к обратимым изменениям и.ф. и положения м.ф., описанным выше. Пуск воздуха приводил к их появлению. Таким образом, описанные выше явления нельзя объяснить локальным нагреванием, которое не могло бы измениться в отсутствие кислорода.

Сдвиг м.ф. под влиянием с.в.и. уменьшался в процессе фитолизации. В листьях с м.ф. 680 нм он отсутствовал. При торможении фитолизации и сопряженной с нею дезагрегации пигмента помещением этиолированного

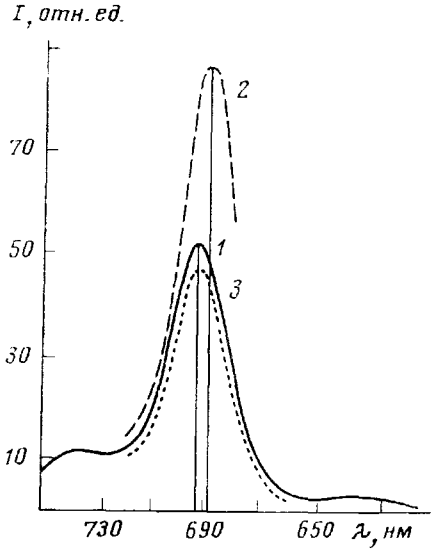


Рис. 3

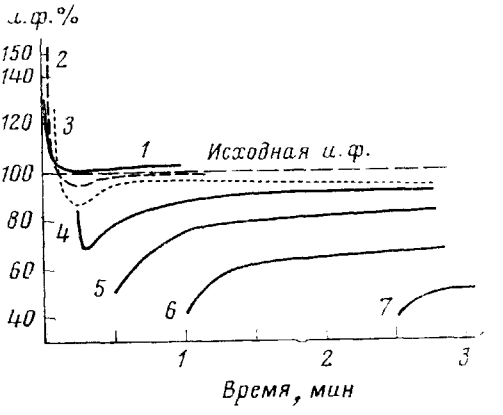


Рис. 4

Рис. 3. Влияние с.в.и. на спектры флуоресценции этиолированного листа фасоли на начальной стадии зеленения, измеренные при 5°. *1* — этиолированный лист, освещенный 5 мин. лампой накаливания при 20°; *2* — он же после 1 мин. освещения с.в.и. при 5°; *3* — после 5 мин. под возбуждающим светом при 5°

Рис. 4. Кинетика изменения и.ф. зеленого листа гороха при 20° после освещения возрастающими интервалами с.в.и. *1* — 1 сек., *2* — 2 сек., *3* — 5 сек., *4* — 15 сек., *5* — 30 сек., *6* — 1 мин., *7* — 2,5 мин. освещения с.в.и.

листа в темноту после нескольких минут зеленения ([3], [4]) эффект под действием с.в.и. можно было наблюдать после 2 час. пребывания листа в темноте.

После 2,5—3 час. зеленения этиолированных листьев, приводившего к сдвигу м.ф. (20°) до 685 нм и формированию длинноволновых форм хлорофилла ([5]), вновь обнаруживалось возрастание и.ф. под действием с.в.и. В работах, посвященных исследованию индукционных изменений и.ф., возрастание и.ф. под влиянием света также начинало проявляться лишь после 3 час. зеленения ([6]). В наших опытах величина эффекта постепенно возрастала по мере накопления хлорофилла и формирования фотосинтетического аппарата. К 6 час. зеленения возрастание и.ф. достигало 10—15% от исходной и.ф. (до освещения с.в.и.). Время насыщения эффекта укорачивалось до 2 сек. Возрастание и.ф. было бóльшим, когда перед действием с.в.и. лист затемняли.

Освещение в присутствии воздуха зеленых листьев ряда растений возрастающими интервалами с.в.и. после окончания индукционных явлений и выхода и.ф. на стационарный уровень также сопровождалось возрастанием и.ф. в 1,5—2 раза. Время насыщения эффекта у зеленых листьев составляло 2 сек. После выключения с.в.и. наблюдалось быстрое падение и.ф. под лучом возбуждающего света или в темноте, после которого снова происходило возрастание и.ф., величина которого зависела от продолжительности действия с.в.и. При коротких экспозициях возрастание в тем-

ноте приводило к увеличению и.ф. до или выше исходного уровня. По мере увеличения интервалов освещения возрастала величина падения и.ф. после выключения с.в.и. и уменьшалась обратимость процесса (рис. 4).

Возрастание и.ф. у зеленых листьев наблюдалось под действием белого, красного и у.-ф. света. Непременными условиями эффекта являлись присутствие кислорода и превышение интенсивности света, используемого в качестве с.в.и., по сравнению со светом, возбуждающим флуоресценцию. Так, эффект возможно было наблюдать при освещении у.-ф. светом, интенсивность которого лишь вдвое превышала интенсивность возбуждающего света того же спектрального состава (λ 365 и 404 нм).

Измерение спектров флуоресценции при −196° показало, что 2 сек. освещения зеленого листа с.в.и. приводит к относительному возрастанию м.ф. 686 и 695 нм, обратимому после выключения с.в.и., в то время как более продолжительное действие с.в.и. обусловливало большее уменьшение м.ф. 686 и 695 нм по сравнению с м.ф. 736 нм.

Опыты показали, что при действии света на листья, обладающие длинноволновыми формами пигмента, наблюдается обратимое увеличение и.ф., сопровождающееся обратимым возрастанием коротковолновых м.ф. Это явление наблюдалось лишь в присутствии кислорода воздуха, отсутствовало при освещении листьев в «вакууме» и появлялось при пуске воздуха. Поэтому можно полагать, что изменения состояния пигмента, приводящие к возрастанию и.ф. при комнатной температуре, могут быть объяснены превращениями агрегированных форм хлорофилла, входящих в пигментный комплекс хлоропластов, а именно их обратимым фотохимическим взаимодействием с кислородом, сопровождающимся обратимой дезагрегацией пигмента. Ранее было показано, что обратимое фотоокисление хлорофилла кислородом в модельной системе также сопровождается дезагрегацией ([7]).

Особенно большая амплитуда спектральных изменений имеет место на ранних стадиях биосинтеза хлорофилла, когда бóльшая часть молекул пигмента, по-видимому, способна к обратимой реакции с кислородом, сопровождающейся дезагрегацией. Последняя, вероятно, облегчает атакуемость хлорофиллида ферментом, присоединяющим фитол ([3]).

В зеленых листьях формы хлорофилла различаются по способу упаковки молекул в агрегированных структурах и, по-видимому, связями с окружающими молекулами, что может определить различную способность реагировать с кислородом под действием света. Тот факт, что у зеленых листьев только короткие экспозиции с.в.и. обусловливают возрастание и.ф., может свидетельствовать о том, что в них лишь небольшая часть длинноволнового хлорофилла находится в состоянии, способном к этой реакции.

Промежуточная форма хлорофилла «680 нм» и общая масса пигмента в зеленом листе при освещении в присутствии кислорода претерпевает превращения, характеризующиеся обратимым уменьшением и.ф. Для их обнаружения требуется более длительное освещение с.в.и. и они не сопровождаются обратимой дезагрегацией, но, как было показано ранее ([8]), могут приводить к необратимой дезагрегации длинноволновых форм хлорофилла.

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

Поступило
24 VI 1977

ЛИТЕРАТУРА

[1] *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский,* Биофизика, т. 13, 456 (1968). [2] *В. Н. Любименко, Н. Н. Гортикова,* Эксп. бот., в. 2, 113 (1936). [3] *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский,* ДАН, т. 232, 225 (1977). [4] *Ф. Ф. Литвин, О. Б. Беляева,* Биохимия, т. 33, 928 (1968). [5] *Ф. Ф. Литвин,* Биохимия и биофизика фотосинтеза, М., «Наука», 1965, стр. 96. [6] *J. C. Goedheer,* Biochim. et biophys. acta, v. 51, 494 (1961). [7] *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский,* ДАН, т. 205, 233 (1972). [8] *Л. М. Воробьева, А. А. Красновский,* Физиол. раст., т. 22, 16 (1975).

Доклады Академии наук СССР
1977. Том 235, № 6

УДК 577.3+541.14+547.9.794 *БИОФИЗИКА*

Н. Н. ДРОЗДОВА, Б. А. КУЗНЕЦОВ, Н. М. МЕСТЕЧКИНА,
Г. П. ШУМАКОВИЧ, Е. М. ПУШКИНА, академик А. А. КРАСНОВСКИЙ

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b И ЕГО ФЕОФИТИНА

Известно, что первичный фотохимический акт бактериального фотосинтеза заключается в передаче электрона от молекул бактериохлорофилла реакционного центра к первичному акцептору электрона, при этом бактериохлорофилл претерпевает обратимое одноэлектронное окисление. Способность бактериофеофитина к обратимому фотовосстановлению, обнаруженная в модельных системах ([1,2]), была подтверждена при изучении фотопревращений пигментов реакционных центров пурпурных бактерий ([3–6]). Для исследования возможности переноса электрона между молекулами бактериохлорофилла и бактериофеофитина необходимо знать окислительно-восстановительные (о.-в.) потенциалы пар бактериохлорофилл и его катион-радикал (Бхл/Бхл$^+$), бактериохлорофилл и его анион-радикал (Бхл/Бхл$^-$), а также о.-в. потенциалы соответствующих пар бактериофеофитина. Величины о.-в. потенциалов бактериохлорофилла a и его феофитина известны ([7–9]).

Настоящая работа посвящена определению о.-в. потенциалов указанных выше пар бактерихлорофилла b и его феофитина с применением осциллографической ([10]) и переменно-токовой ([11]) полярографии. Для измерения использовали осциллографический полярограф ЦЛА-03 и переменно-токовый полярограф ППТ-1. Измерения проводились в широком диапазоне потенциалов (от +0,8 в до −0,8 в относительно нормального водородного электрода), поэтому в работе использовали ртутный и платиновый электроды. Электрохимическая ячейка, кроме рабочего электрода, содержала вспомогательный электрод (серебряная пластинка 4 см^2) и в качестве электрода сравнения — каломельный электрод, соединенный через мостик, заполненый электролитом того же состава, что и ячейка. Для обратимого процесса разность потенциалов между положением катодного и анодного пиков равна $0{,}58/n$, для процессов с небольшой степенью необратимости о.-в. потенциал определяли по средней точке между потенциалами катодного и анодного пиков вольт-амперной кривой, получаемой при треугольной развертке. Обратимость процесса в переменно-токовой полярографии контролировалась по совпадению потенциалов пиков активной и реактивной составляющей и их абсолютных величин. Число электронов, участвующих в переносе, определялось по ширине пика на полувысоте. На рисунках и в табл. 1 даны значения потенциалов по отношению к н.в.э.

В работе использовали диметилформамид (ДМВ), ацетонитрил и спирто-водную смесь (8:2) pH 8,2. ДМФ был высушен над молекулярным ситом 5 Å и перегнан при P=1 мм рт.ст. Очистка ацетонитрила проводилась по методике ([12]). Спирт нагревался в течение часа с цинковой пылью, с обратным холодильником, а затем перегонялся. Электролит — 0,2 M $LiClO_4$ или $NaClO_4$. Соли перекристаллизованы и высушены в вакууме. Бактериохлорофиллы a и b были выделены из Rhodospirillum rubrum и Rhodopseudomonas viridis соответственно. Бактериофеофитины a и b получены встряхиванием эфирных растворов соответствующих бактериохлорофиллов с 5% HCl, последующим промыванием водой и хроматографией на сахарозе. Стабильность пигментов во время полярографических измерений проверялась сравнением спектров поглощения до и после опыта.

В катодной области потенциалов измерения проводились на стационарном (р.с.э.) или капающем ртутном (р.к.э.) электроде. Характеристика р.к.э.: m=0,813 мг/сек, t=5,6 сек., площадь р.с.э. $1{,}8 \cdot 10^{-2}$ см^2. При работе с платиновым электродом в каждом опыте регенерация поверхности проводилась отжигом в окислительной зоне пламени горелки в течение 2—3 мин.

Бактериофеофитины a и b дают хорошо выраженные пики на переменно-токовых полярограммах как в спирто-водных растворах, так и в ДМФ (рис. 1). Активные и реактивные составляющие этих полярограмм

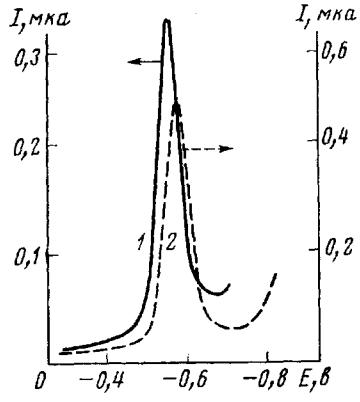


Рис. 1

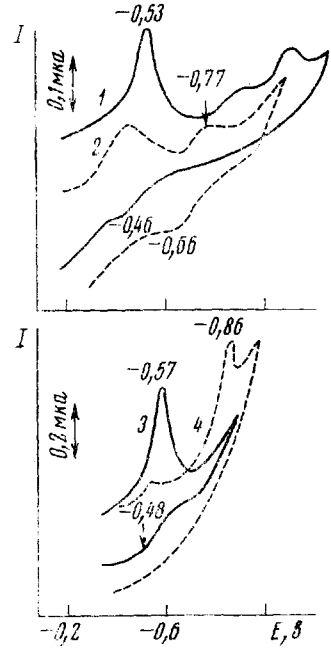


Рис. 2

Рис. 1. Переменно-токовые таст-полярограммы – активная составляющая бактериофеофитина a (*1*) и бактериофеофитина b (*2*) на р.к.э. в 0,2 *М* растворе $LiClO_4$ в спирто-водной смеси (8 : 2). Концентрация пигмента 10^{-2} *М*. Время задержки в таст-режиме 4 сек.

Рис. 2. Осциллографические полярограммы на р.к.э. при треугольной форме поляризующего напряжения бактериофеофитина a (*1*) и бактериохлорофилла a (*2*), бактериофеофитина b (*3*) и бактериохлорофилла b (*4*) в 0,2 *М* растворе $LiClO_4$ в ДМФ. Концентрация пигмента 10^{-5} *М*. Скорость развертки 1 в/сек, начальное напряжение −0,40 в, время задержки 2 сек.

совпадают по потенциалам: ширина пика на полувысоте составляет 90—100 мв, что свидетельствует о том, что процесс одноэлектронный и практически обратим, так как одноэлектронному переходу соответствует ширина 88 мв ([11]). Потенциалы пиков, полученные этим методом, должны совпадать с о.-в. потенциалами, и они равны для бактериофеофитина a — 550 мв, а для бактериофеофитина b — 580 мв. Бактериохлорофиллы a и b дают практически необратимые пики в переменно-токовой полярографии с рабочей частотой 85 гц.

Осциллографические полярограммы бактериохлорофиллов a и b и их феофитинов, снятые в ячейке с р.к.э. в растворе ДМФ, представлены на рис. 2. В этом растворителе бактериофеофитины a и b и их анион-радикалы соответственно обратимо восстанавливаются и окисляются. Из вольт-амперных кривых бактериохлорофиллов видно, что перенос одного электрона соответствует катодному пику −770 мв для бактериохлорофилла a и −860 мв для бактериохлорофилла b и что пик бактериохлорофилла a в этих условиях обратим. Бактериохлорофилл b дает пик на катодной ветви вольт-амперной кривой, а на анодной пик плохо выражен или практически отсутствует. Вольт-амперные кривые бактериохлорофиллов более

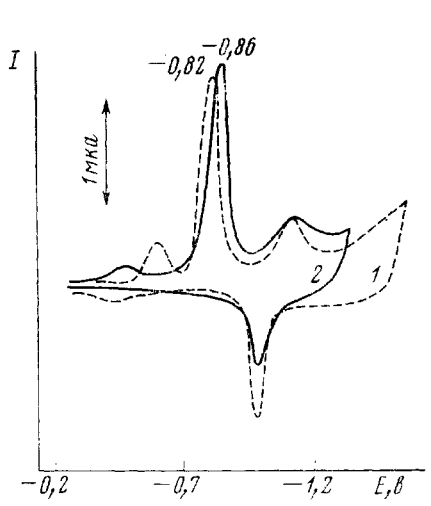


Рис. 3

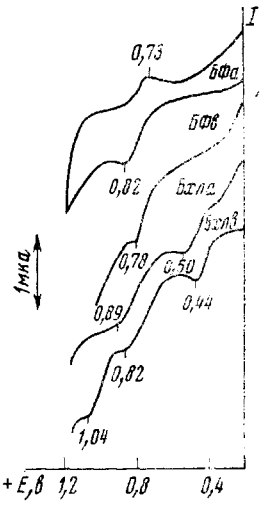


Рис. 4

Рис. 3. Осциллографические полярограммы при треугольной катодно-анодной развертке напряжения бактериохлорофилла а (*1*) и бактериохлорофилла b (*2*). Полярограммы получены после накопления пигмента на р.с.э. и переноса в водный буфер pH 9,3. Скорость развертки 1 в/сек, начальное напряжение −0,20 в.

Рис. 4. Осциллографические полярограммы при анодно-катодной поляризации бактериофеофитина а и при анодной поляризации бактериохлорофиллов а и b и бактериофеофитина b на платиновом электроде в ацетонитриле. Концентрация пигмента $5 \cdot 10^{-5}$ *М*. Скорость развертки 1 в/сек, начальное напряжение +0,20 в

сложные, чем у феофитинов, они содержат пики небольших примесей феофитинов, очевидно получающихся в интерфазе на электроде, а при достаточно больших потенциалах наблюдаются пики двузарядного аниона. Значения о.-в. потенциалов, полученные нами, для бактериофеофитина а совпадают с литературными ([9]), а для бактериохлорофилла а мы получили более положительную величину.

На рис. 3 приведены осциллографические полярограммы бактериохлорофиллов, полученные необычным путем: сначала проводилась адсорбция пигмента из спирто-водного раствора на р.с.э. Затем электрод отмывался в водном аммиачном буфере 0,1 *М*, pH 9,3, и переносился в деаэрированную ячейку с тем же буфером, после чего производилось измерение потенциала. Бактериохлорофиллы а и b дают в этих условиях только катодные пики, постепенно уменьшающиеся при каждом последующем сканировании. Аналогичные опыты были поставлены с бактериофеофитинами, дающими в этих условиях хорошо выраженные обратимые пики, которые остаются после многократного сканирования.

В анодной области потенциалов исследование проводилось в растворах ацетонитрила и ДМФ на платиновом электроде. На рис. 4 приведены полярограммы при анодно-катодной поляризации бактериофеофитина а и анодные вольт-амперные кривые бактериохлорофиллов а и b и бактериофеотина b. Бактериохлорофилл а и его феофитин при треугольной развертке дают четкие анодные и катодные пики обратимых процессов окисления и восстановления катион-радикалов. Бактериохлорофилл b и его феофитин дают четкую анодную волну, катодная волна может быть проявлена лишь при повышенной разрешающей способности прибора в дифференциальном режиме. Уменьшение катодного пика после анодной поляризации, по-видимому, определяется неустойчивостью катион-радикалов бактериохлорофилла b и его феофитина. Аналогичные измерения были проведены в ДМФ. В этом растворителе получены более положительные величины для окисления пигментов. Катодные пики после анодной поляризации были выявлены также на дифференциальном режиме полярографа, а потенциалы окисления бактериофеофитинов оказались за пределами

Таблица 1

Потенциалы (мв) катодных ($E_к$) и анодных ($E_а$) пиков осциллографических полярограмм в окислительной и восстановительной областях и рассчитанные о.-в. потенциалы (E_0) бактериохлорофиллов a и b и их феофитинов

Растворитель и фон	Бхл a			Бф a			Бхл b			Бф b		
	$E_к$	$E_а$	E_0	$E_к$	$E_а$	E_0	$E_к$	$E_а$	E_0	$E_к$	$E_а$	E_0
Анодная область, Pt-электрод												
Ацетонитрил, 0,2 *M* $NaClO_4$	+400	+500	+450	+730	+820	+780	—	+440	~+400	+720	+780	+750
ДМФ, 0,2*M* $LiClO_4$	+520	+620	+570	—	—	—	—	+580	~+500	—	—	—
Катодная область, Hg-электрод												
ДМФ, 0,2*M* $LiClO_4$ Спирт: H_2O, 0,2*M* $LiClO_4$.	—770	—660	—720	—530	—460	—500	—860	—	~—790	—570	—480	—530
Перенос в водный буфер pH 7	—760	—	—	—370	—300	—340	—770	—	—	—410	—340	—370

возможности измерения. Растворитель оказывает влияние на величину о.-в. потенциала, что определяется, по-видимому, изменением энергии сольватации получающихся заряженных частиц.

Бактериохлорофиллы легко окисляются с образованием хлорофиллоподобного продукта, и, чтобы убедится в правильности отнесения полярографических пиков, снимали полярограммы полученных нами окисленных продуктов в области +0,8 b на платиновом электроде и в области —0,8 b на р.к.э. Пики, отнесенные к одноэлектронному переносу и образованию катион- и анион-радикалов бактериохлорофиллов, отсутствуют у их окисленных продуктов.

Интересно отметить, что определенная нами величина потенциала, при которой происходит образование катион-радикала бактериохлорофилла b в растворе ДМФ (+500 мв), совпадает с данными, полученными при окислении пигмента реакционного центра Rhodopseudomonas viridis ([5], [6]), в то время как потенциал восстановления бактериофеофитина b в растворе ДМФ (—530 мв) занимает среднее положение между величинами, полученными в работах ([5]) (—620 мв) и ([6]) (—400 мв).

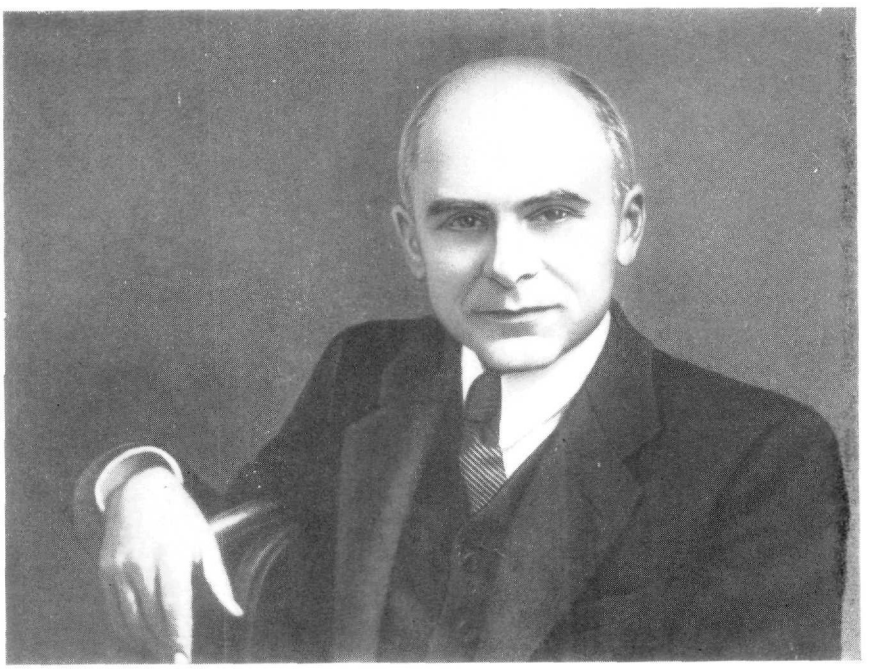
Из изложенного следует, что бактериофеофитины имеют более положительные значения о.-в. потенциалов по сравнению с соответствующими бактериохлорофиллами, т. е. $E_{0\ БФ/БФ^+} > E_{0\ Бхл/Бхл^+}$ и $E_{0\ БФ/БФ^-} < E_{0\ Бхл/Бхл^-}$, что подтверждает возможность бактериофеофитинов быть акцепторами электрона от бактериохлорофиллов. О.-в. потенциалы бактериохлорофилла b смещены в отрицательную область по сравнению с бактериохлорофиллом a. По-видимому, это связано с использованием кванта света меньшей энергии (E_{985} 1,26 э.в.) при фотосинтезе Rhodopseudomonas viridis, которые содержат самый длинноволновый из известных фотосинтетических пигментов.

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

Поступило
13 V 1977

ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский, К. К. Войновская*, ДАН, т. 81, 879 (1951). [2] *Е. В. Пакшина, А. А. Красновский*, Биофизика, т. 19, 238 (1974). [3] *В. А. Шувалов, В. В. Климов и др.*, ДАН, т. 227, 984 (1976). [4] *V. A. Shuvalov, V. V. Klimov*, Biochim. et biophys. acta, v. 440, 587 (1976). [5] *В. В. Климов, В. А. Шувалов и др.*, Биохимия, т. 42, 519 (1977). [6] *R. C. Prince, J. S. Leigh, P. L. Dutton*, Biochim. et biophys. acta, v. 440, 622 (1976). [7] *J. C. Goldheer, G. H. Horreus de Haas, P. Schuller*, ibid. v. 28, 278 (1958). [8] *В. М. Кутюрин, И. Ю. Артамкина, И. Н. Анисимова*, ДАН, т. 180, 1002 (1968). [9] *J. Fajer, D. C. Brune et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 72, 4956 (1975). [10] *Я. Гейровский, Я. Кута*, Основы полярографии, М., 1960, стр. 470. [11] *С. В. Цфасман*, Электронные полярографы, Металлургиздат, 1960, стр. 107. [12] *F. O'Donnett, J. T. Ayres, Ch. K. Mann*, Anal. Chem., v. 37, 1161 (1965).



А. Н. Теренин (1896—1967).
Фотография 50-х годов

АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ ТЕРЕНИН
(к 80-летию со дня рождения)

Вся жизнь Александра Николаевича Теренина была отдана науке. Свое первое исследование по спектроскопии А. Н. Теренин осуществил, будучи учеником калужского реального училища, а в конце 1966 г., будучи уже тяжело больным, он закончил свою монографию «Фотоника красителей», ставшую лучшим памятником его жизни в науке.

Поражает широта научных интересов А. Н. Теренина. Он был блестящим физиком-спектроскопистом и выдающимся физикохимиком, родоначальником советской школы фотохимии. Еще в сороковых годах А. Н. Теренин предвидел внедрение идей и методов физики в биологию. Первым из советских физикохимиков он распространил свои исследования на область биологии.

Круг главных научных интересов А. Н. Теренина за почти 50 лет активной работы связан с проблемой взаимодействия кванта света и молекулы. Начиная с ранних работ А. Н. Теренин использует поглощение кванта света не только как средство анализа энергетических уровней атомов и молекул, но и как средство активного воздействия на молекулу, приводящего в конечном счете к разнообразным фотохимическим превращениям. Отсюда тесная связь спектроскопии и фотохимии, характерная для научной школы А. Н. Теренина.

Формирование научной индивидуальности А. Н. Теренина происходило в эпоху бурного развития знаний в области электронной структуры атомов и молекул. Нильс Бор выдвинул свои квантовые постулаты о строении атома в 1913 г.; последующее десятилетие было годами энергичной разработки строения электронных оболочек атомов и молекул с позиций теории Бора, работы которого были изданы на русском языке отдельной книгой в переводе С. И. Вавилова в 1923 г.

Интерес А. Н. Теренина к проблеме взаимодействия кванта света с атомом и молекулой возник уже в школьные годы. Этот интерес был закреплен в Центральной научно-технической лаборатории Военного ведомства, передового института того времени, где А. Н. Теренин провел годы военной службы (1917—1918 гг.). Первая научная работа А. Н. Теренина, проведенная там, была

посвящена расшифровке состава германского люминофора, которым покрывали мушку винтовки. Эта задача была успешно решена с помощью эмиссионного спектрального анализа и послужила основой первой научной публикации А. Н. Теренина, посвященной фотометрированию светящихся составов. Не здесь ли истоки интересов А. Н. Теренина к люминесценции полупроводников и электронным процессам, в них происходящим?

После демобилизации А. Н. Теренин поступает на физическое отделение Петроградского университета и уже на втором курсе начинает исследовательскую работу под руководством Д. С. Рождественского.

В первой научной работе, выполненной в университете («Нормальная орбита электрона в атоме ртути»), проявляются особенности научного дарования А. Н. Теренина: умение простыми и изящными экспериментальными средствами добиваться исчерпывающего решения вопроса. Когда возникла необходимость вести спектральные измерения в области около 1 микрона, что потребовало сенсибилизации фотопластинки к этой области спектра, А. Н. Теренин разработал метод сенсибилизации эффекта Гершеля красителями, блестяще решив поставленную научную задачу.

По окончании университета в 1922 г. А. Н. Теренин работает на кафедре оптики физического факультета университета, выбрав для самостоятельной работы исследование спектральных уровней — «термов» атомов металлов (1922—1925 гг.).

Исследования люминесценции паров солей под действием искрового ультрафиолета (1925—1932 гг.) приводят его к открытию оптической диссоциации молекул с образованием возбужденных атомов и радикалов, идентифицированных по спектру собственного испускания. Этот цикл исследований изложен в монографии «Фотохимия паров солей». Позже А. Н. Теренин распространил метод люминесцентного фотораспада на изучение более сложных органических молекул в газовой фазе и в адсорбированном состоянии.

В 1932 г. А. Н. Теренин избирается членом-корреспондентом Академии наук СССР и организует в Ленинградском университете лабораторию оптики поверхностных явлений, преобразованную впоследствии в лабораторию фотокатализа. После этого интересы А. Н. Теренина сосредоточиваются на оптике и фотохимии адсорбированных молекул, что является важным для теории гетерогенного катализа: он все глубже входит в круг решений химических проблем — изучает адсорбированные молекулы методами инфракрасной спектроскопии, тушение люминесценции твердых тел адсорбированными молекулами, «вылет» адсорбированных молекул «в объем» после возбуждения квантом света. Одновременно создается новое направление по изучению фотоионизации и распада газовых молекул методом масс-спектрометрии. Это годы интенсивной работы и все возрастающего потока научных публикаций.

В 1939 г. А. Н. Теренин избирается действительным членом Академии наук СССР по Отделению химических наук. В предвоенные годы научные интересы А. Н. Теренина расширяются в область изучения обмена колебательной энергии между возбужденными и невозбужденными молекулами; проводятся первые работы по изучению инфракрасных спектров молекул при высоких давлениях.

Наблюдения фосфоресценции и фотохимии органических молекул, в том числе органических красителей, приводят его к сформулированной в 1943 г. гипотезе о бирадикальном (триплетном) состоянии метастабильных молекул, обладающих повышенной химической реакционной способностью.

Представление о фотохимической активности триплетных и синглетных возбужденных состояний органических молекул и последовательная трактовка первичного фотоакта в конденсированной фазе, связанного с миграцией возбуждения и переносом электрона, позволили А. Н. Теренину объединить и систематизировать громадный экспериментальный материал по фотохимии органических соединений в книге «Фотохимия красителей и родственных органических соединений», вышедшей в 1947 г.

Дальнейшее исследование метастабильных молекул приводит А. Н. Теренина к открытию переноса энергии между молекулами по триплетным уровням. Этот тип элементарного процесса приобретает все большее значение в фотохимии органических молекул.

В своей речи «Свет и химия» на общем собрании Академии наук СССР в 1943 г. А. Н. Теренин сформулировал дальнейшие задачи развития фотохимии, обратив особое внимание на необходимость развития работ по биохимии и фотосинтезу.

В 1945 г. в Москве, в Институте биохимии им. А. Н. Баха, А. Н. Терениным организована лаборатория фотобиохимии, задачей которой являлось изучение первичных фотохимических процессов фотосинтеза — преимущественно вопросов фотохимии хлорофилла и его аналогов. Эта лаборатория стала центром подготовки советских фотобиологов.

Проблема первичных фотореакций в органических соединениях в конденсированных средах тесно связана с фотоэлектрическими процессами в этих соединениях. Еще с довоенных лет А. Н. Теренин уделял большое внимание развитию фотоэлектроники органических красителей, изучению фотопроводимости пленок органических соединений, внешнего фотоэффекта и эффекта Беккереля на фазовых границах твердая пленка—раствор. В лаборатории А. Н. Теренина было установлено наличие электронной и дырочной проводимости ряда органических соединений, в том числе у хлорофилла и его аналогов, обнаружено и изучено явление оптической сенсибилизации фотоэффекта неорганических полупроводников при их окрашивании красителями. Эти работы получили продолжение при изучении фотоэлектрических свойств органических полупроводников.

А. Н. Теренин уделял большое внимание изучению короткоживущих фотопродуктов в конденсированной фазе с использованием методов скоростной импульсной спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса.

Напряженную исследовательскую работу А. Н. Теренин все годы совмещал с большой педагогической работой. С 1932 г. он профессор Ленинградского университета и автор курса «Спектроскопия молекул». В последние годы жизни он руководил кафедрой физики ЛГУ. Им воспитана целая плеяда ученых, успешно работающих в области спектроскопии, фотохимии и физической химии.

А. Н. Теренин был выдающимся ученым-организатором. В течение 10 лет он осуществлял научное руководство Государственным оптическим институтом. Деятельность А. Н. Теренина имела большое значение для развития оптической промышленности Советского Союза. Под его руководством создавались советские спектральные приборы. Своими трудами А. Н. Теренин внес большой вклад в оборону страны в годы Великой Отечественной войны. А. Н. Теренин вел широкую научно-общественную деятельность. Он был председателем Научного совета по проблеме «Фотосинтез» АН СССР, координирующего научную деятельность в этом направлении в Советском Союзе.

Выдающиеся заслуги А. Н. Теренина в области развития фотохимии и фотофизики получали неоднократное признание в нашей стране и за ее пределами: в 1945 г. ему была присуждена Государственная премия 1-й степени по химии, в 1954 г. за работы по люминесценции — золотая медаль имени С. И. Вавилова по физике, в 1959 г. за работы в области молекулярной спектроскопии — золотая медаль имени итальянского фотохимика Чиамичиана; за работы по межмолекулярному переносу энергии на Международном конгрессе по фотобиологии в Лондоне в 1964 г. А. Н. Теренину была вручена золотая медаль имени Финзена.

А. Н. Теренин был членом редколлегий ряда советских и международных журналов, состоял почетным членом Французского общества физической химии и Английского химического общества. Он достойно представлял СССР в ряде международных научных организаций.

Советское правительство высоко оценило выдающиеся научные заслуги А. Н. Теренина, наградив его четырьмя орденами Ленина, орденом Трудового Красного Знамени, орденом Красной Звезды и медалями. В 1966 г. ему было присвоено высокое звание Героя Социалистического Труда.

А. Н. Теренин был глубоко принципиальным и доброжелательным человеком, требовательным к себе, отзывчивым и внимательным к окружающим; его жизнь будет служить примером ученикам и последователям.

А. А. Красновский

Доклады Академии наук СССР
1977. Том 235, № 1

УДК 541.144.7:547.963.4

БИОХИМИЯ

Академик А. А. КРАСНОВСКИЙ, М. И. БЫСТРОВА,
А. В. УМРИХИНА

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИОФЕОФИТИНА

Согласно современным представлениям, в состав антенны и реакционных центров фотосинтеза входят агрегированные формы хлорофиллов, молекулярная организация которых еще не выяснена. В нашей лаборатории изучаются спектральные эффекты агрегации хлорофилла и его аналогов с тем, чтобы понять молекулярные механизмы самосборки агрегированных структур ([1]). Изучение свойств бактериофеофитина представляет интерес в связи с обнаружением этого пигмента в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий и его возможным участием в реакциях переноса электрона ([2–4]).

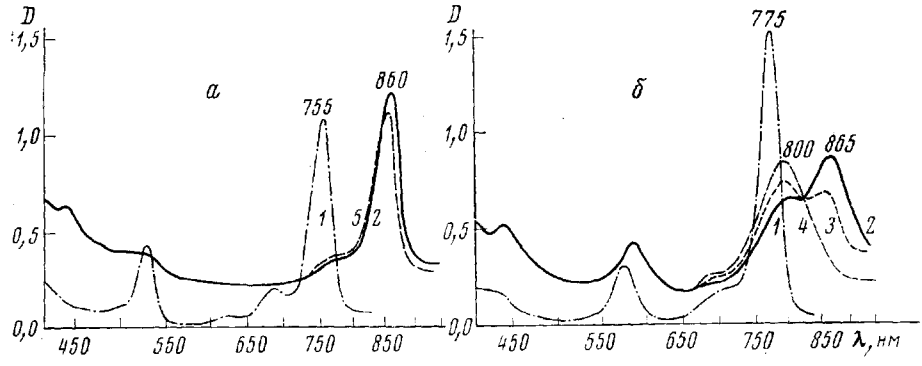


Рис. 1. Спектры поглощения бактериофеофитина (*а*) и бактериохлорофилла (*б*). *1* — раствор в серном эфире; *2* — твердая пленка при 20°; *3* — то же при 30°; *4* — то же при 40°; *5* — то же при 90°

В данной работе мы изучали агрегацию бактериофеофитина в твердых пленках по спектрам поглощения в видимой и инфракрасной области и с помощью спектроскопии э.п.р.; результаты сопоставлены со свойствами агрегированных форм бактериохлорофилла.

Бактериофеофитин получали из бактериохлорофилла путем обработки эфирного раствора пигмента 2*N* HCl, промывания водой и высушивания сернокислым натрием. Твердые пленки получали (в трубках Тунберга или ампулах) испарением эфирных растворов пигментов с последующим откачиванием на форвакуумном насосе РВН-20. Для получения образца обычно расходовали 1 мл раствора (концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ *M*) при измерении поглощения и 3 мл — в опытах по измерению спектров э.п.р. Спектры поглощения измеряли на модифицированном регистрирующем спектрофотометре СФ-14 в диапазоне 450—950 нм, и-к. спектры — на приборе UR-20, спектры э.п.р.— на радиоспектрометре типа РЭ-1301.

Эфирный раствор бактериофеофитина имеет главный максимум поглощения при 755 нм. В пленке доминирует максимум 860 нм, принадлежащий агрегированной форме. Этот максимум близок к поглощению бактериохлорофилла (865 нм) в фотосинтезирующих бактериях и твердых пленках (рис. 1). Однако у бактериофеофитина указанный максимум по-

глощения заметно уже, чем у бактериохлорофилла, и не имеет соизмеримых с ним сопутствующих компонентов, что может свидетельствовать об однородности агрегированной структуры безмагниевого пигмента.

Агрегированная «форма 860» бактериофеофитина термостабильна, сохраняется при нагревании до 90°, в отличие от формы бактериохлорофилла 865 нм, которая разрушается уже при 30—35° (рис. 1).

Инфракрасные спектры пленок бактериофеофитина (форма 860 нм) в карбонильной области сходны со спектрами растворов пигмента в сер-

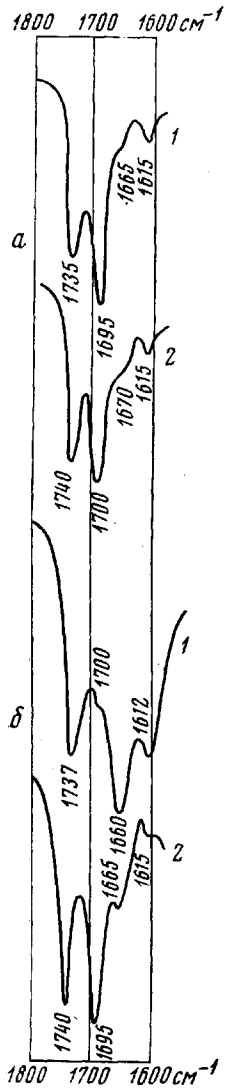


Рис. 2

Рис. 2. И.-к. спектры бактериофеофитина (*а*) и бактериохлорофилла (*б*). *1* — твердая пленка; *2* — раствор в серном эфире (10^{-2} *М*)

Рис. 3. Спектры э.п.р. полученных из эфирных растворов твердых пленок бактериофеофитина (*а*) в вакууме и бактериохлорофилла (*б*) в присутствии воздуха: *Т* — в темноте; *С* — при освещении в течение 5 мин. светом ксеноновой лампы ДКСШ-200 через светофильтр КС-19

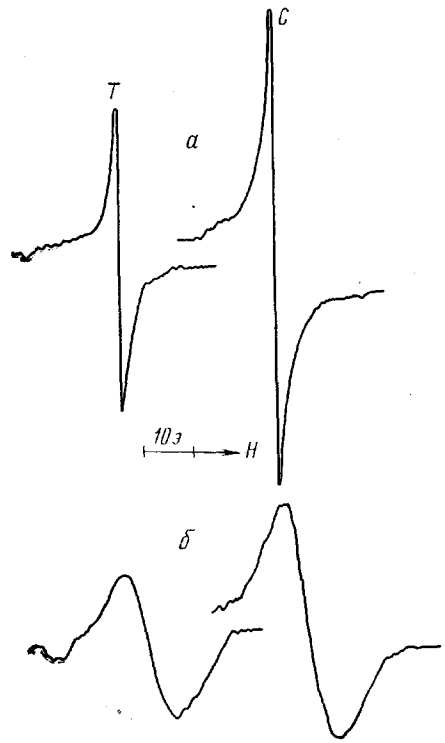


Рис. 3

ном эфире и других полярных растворителях (рис. 2). В спектрах пленок и растворов доминирует максимум около 1700 $см^{-1}$, проявляющийся за счет колебаний свободных кетогрупп циклопентаноновых колец молекул ([5], [6]). Максимум 1735 $см^{-1}$ (карбонилы сложноэфирных групп у C_7 и C_{10}) почти не различается у растворов и пленок пигмента и соизмерим с поглощением свободных кетогрупп. Поглощение ацетильных групп в обоих случаях также одинаково и проявляется в виде небольшого максимума около 1670 $см^{-1}$. Таким образом, колебания карбонильных групп моле-

кул в твердых пленках бактериофеофитина не испытывают возмущений по сравнению с растворами. Отсюда следует, что при образовании «формы 860» бактериофеофитина указанные группы не участвуют в межмолекулярном взаимодействии. Это отличает бактериофеофитин от бактериохлорофилла, у которого самосборка «формы 865» сопряжена с образованием межмолекулярных связей с участием кето- и ацетильных групп, вступающих во взаимодействие с центральными атомами магния, что приводит к характерным изменениям в карбонильной области спектров пленок по сравнению с растворами в полярных растворителях ([7, 14]). В пленках бактериохлорофилла, где не удается наблюдать поглощение свободных кетогрупп, доминируют максимумы 1660—1650 $см^{-1}$ и 1615—1610 $см^{-1}$, которые обязаны межмолекулярным связям кето-C=O...Mg и ацетил-C=O...Mg соответственно ([7]).

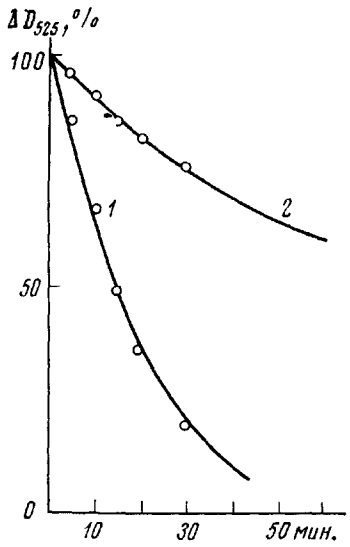


Рис. 4. Кинетика фотосенсибилизированного восстановления метилового красного (10^{-5} *M*) аскорбиновой кислотой (10^{-2} *M*) в водно-метаноловом растворе в вакууме при монохроматическом освещении (860 нм). *1* — для бактериофеофитина 860 нм; *2* — для бактериохлорофилла 865 нм

Способность бактериофеофитина к образованию высокоупорядоченных агрегированных структур удается наблюдать и с помощью метода э.п.р. Существенно, что твердые пленки пигмента обнаруживают в темноте интенсивный узкий сигнал э.п.р. с g=2,0027, близкий к g-фактору свободного электрона. Ширина сигнала колебалась в пределах 1,8—2,6 э. Примесь бактериохлорофилла или продукта окисленного бактериофеофитина приводит к исчезновению сигнала э.п.р., что, по-видимому, связано с нарушением структуры агрегированного пигмента.

Ранее узкий сигнал э.п.р. с шириной 1—7 э наблюдали только у препаратов кристаллического хлорофилла с максимумом поглощения 745 нм ([8-10]). Безмагниевые производные хлорофилла, а также препараты других пигментов давали широкие сигналы э.п.р. (10—14 э), характерные для аморфных образцов пигментов ([11]).

Узкий сигнал э.п.р. (рис. 3) в пленках бактериофеофитина, получаемых из раствора в серном эфире, мы наблюдали сразу же после приготовления образцов в вакууме (около 10^{-3} мм рт. ст.). Этот сигнал в темноте регистрировали в интервале температур от —150 до 30° без заметного изменения интенсивности. Освещение пленок бактериофеофитина красным светом приводит к заметному возрастанию интенсивности сигнала э.п.р., ширина которого при этом не изменяется.

Светоиндуцируемый сигнал э.п.р. пленок бактериофеофитина обнаруживает характерную температурную зависимость. С повышением температуры от —150° его интенсивность увеличивается, достигая максимальной величины при 20°. После действия света сигнал медленно (десятки минут) падает до исходного уровня. Однако, если температуру образца после освещения повысить на 10—20°, сигнал мгновенно уменьшается до темнового уровня. Различное поведение темнового и светового сигналов э.п.р. бактериофеофитина в зависимости от температуры может свидетельствовать о различном происхождении обоих видов парамагнетизма. Возможно, что при формировании агрегированной структуры неспаренные электроны возникают при перераспределении электронной плотности в молекулах бактериофеофитина. Светоиндуцируемый сигнал э.п.р. может появляться при переносе электрона между соседними молекулами пигмента; при этом одна молекула играет роль донора, другая —

акцептора электрона; следы кислорода могут также играть роль акцептора электрона.

Пленки бактериохлорофилла, получаемые испарением эфирных растворов, в вакууме не обнаруживали сигнала э.п.р. После пуска воздуха и действия красного света появлялся широкий сигнал э.п.р. (ΔH=12—13 э) с g=2,00. Широкий сигнал э.п.р. наблюдался в вакууме у пленок бактериохлорофилла, получаемых из метаноловых растворов и из растворов в серном эфире в присутствии хинона. При освещении интенсивность сигнала увеличивалась (рис. 3). Тот факт, что широкий сигнал э.п.р. в пленках бактериохлорофилла наблюдается только в присутствии акцептора электрона — кислорода или хинона, показывает, что этот сигнал возникает в результате элементарного окисления пигмента.

Таким образом, узкий светочувствительный сигнал э.п.р. характерен для пленок бактериофеофитина, содержащих агрегированную форму 860 нм. Узость линии сигнала определяется делокализацией неспаренного электрона в агрегированной структуре пигмента. Если число молекул N в такой структуре, объединенных неспаренным спином, рассчитать по уравнению ([12]): $\Delta H_N = H_M/\sqrt{N}$, где ΔH_M — ширина линии сигнала мономера, равная 14 э ([13]), то получается величина около 50.

Агрегированная форма бактериофеофитина 860 нм формируется и в водно-метаноловых средах с соотношением метанола и воды 2 : 3. Эта форма обладает фотосенсибилизирующим действием в реакции фотовосстановления метилового красного аскорбиновой кислотой. Существенно, что фотоактивность бактериофеофитина 860 нм в несколько раз превышает активность бактериохлорофилла 865 нм (рис. 4). Это может быть связано с большей склонностью агрегированной формы безмагниевого пигмента к элементарному восстановлению, что способствует реализации «восстановительного» механизма сенсибилизированной реакции.

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что безмагниевое производное бактериохлорофилла обнаруживает способность к образованию путем самосборки высокоупорядоченных агрегированных структур, которые обладают фотохимической активностью. Взаимодействие молекул в таких структурах, обусловливающее далекое длинноволновое поглощение, происходит без участия карбонильных групп и обеспечивается взаимодействием π-электронных систем молекул бактериофеофитина. Это дает основание полагать, что межмолекулярное взаимодействие с участием кетогрупп, наблюдаемое у магниевых комплексов, не является универсальным способом агрегации фотосинтетических пигментов.

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

Поступило
8 IV 1977

ЛИТЕРАТУРА

[1] *А. А. Красновский,* Преобразование энергии света при фотосинтезе. Баховские чтения, т. 29, М., «Наука», 1974, стр. 64. [2] *S. C. Straley, W. W. Parson et al.,* Biochim. et biophys. acta, v. 305, 597 (1973). [3] *W. W. Parson, R. G. Cogdell,* Biochim. et biophys. acta, v. 416, 105 (1975). [4] *В. А. Шувалов, В. В. Климов и др.,* ДАН, т. 227, 984 (1976). [5] *A. S. Holt, E. E. Jacobs,* Plant Physiol., v. 30, 553 (1955). [6] *J. J. Katz, G. L. Closs et al.,* J. Am. Chem. Soc., v. 85, 3801 (1963). [7] *А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева,* ДАН, т. 204, 1473 (1972). [8] *S. S. Brody, G. Nevell, T. Castner,* J. Phys. Chem., v. 64, 554 (1960). [9] *В. Е. Холмогоров, А. Н. Теренин,* ДАН, т. 137, 199 (1961). [10] *А. Н. Теренин, В. Е. Холмогоров,* В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, М., «Наука», 1965, стр. 5. [11] *А. В. Умрихина, И. Н. Голубев и др.,* Биофизика, т. 9, 423 (1964). [12] *J. R. Norris, R. A. Uphaus et al.,* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 68, 625 (1971). [13] *А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко и др.,* ДАН, т. 221, 974 (1975). [14] *М. И. Быстрова, М. П. Мальгошева, А. А. Красновский,* Молек. биол., т. 10, 193 (1976).

ФОТОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. В. УМРИХИНА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ХЛОРОФИЛЛА

При фотосинтезе растений происходит преобразование энергии света, поглощаемого хлорофиллом, в потенциальную химическую энергию. Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в синглетное возбужденное состояние, а затем в долгоживущее (триплетное) возбужденное состояние. Возбужденные молекулы хлорофилла участвуют в переносе электрона (от молекулы-донора к молекуле-акцептору), при котором происходит первичное преобразование энергии света [1]. Перенос одного электрона, идущий с участием молекулы возбужденного пигмента и молекулы-партнера, должен вести к первичному образованию ион-радикалов.

Изучение образования свободных радикалов при фотохимических реакциях хлорофилла вне клетки растения, в модельных системах, является одним из путей, ведущих к выяснению механизма первичного преобразования энергии света при фотосинтезе. Эта проблема рассматривается в данном обзоре; наибольшее внимание уделяется результатам, полученным методом ЭПР.

Триплетные состояния хлорофилла

Более 30 лет назад А. Н. Теренин обосновал предположение о том, что метастабильное возбужденное состояние органических молекул является триплетным [2, 3]. А. Н. Теренин указал на особую роль триплетных возбужденных состояний в фотохимии вследствие их большой длительности жизни и повышенной химической активности, указал на возможность участия триплетных возбужденных состояний хлорофилла в процессе фотосинтеза [4].

По-видимому, первым сообщением об участии триплетного возбужденного состояния в фотохимических реакциях хлорофилла была наша работа по фотовосстановлению этого пигмента [5]. Мы обратили внимание на то, что хлорофилл, эффективно реагируя с аскорбиновой кислотой, не испытывает тушения флуоресценции этим соединением; отсюда следовало, что в реакции уча-

ствует метастабильное (триплетное) возбужденное состояние хлорофилла.

Для обнаружения триплетного состояния хлорофилла применялись следующие методы: заселение триплетных уровней световой вспышкой большой интенсивности с последующим измерением $T—T^*$-переходов с помощью импульсной спектроскопии; изучение длительного послесвечения — фосфоресценции (переход $T—S$) и замедленной флуоресценции (переход $T—S^*—S$), а также сенсибилизованного переноса энергии возбуждения к молекуле-акцептору; измерение магнитной восприимчивости и электронного парамагнитного резонанса; изучение триплетных состояний по их химическим свойствам — присоединению кислорода, взаимодействию с донорами и акцепторами электрона и т. д.

Применению импульсной спектроскопии посвящены обзорные работы [6—8]. В настоящем обзоре мы остановимся на обнаружении триплетных состояний хлорофилла методами ЭПР и фосфоресценции и химическом превращении триплетных состояний при их взаимодействии с донорами и акцепторами электрона.

Измерения методом ЭПР. Молекула в триплетном состоянии имеет два неспаренных электрона (является бирадикалом), вследствие чего обладает парамагнетизмом [9, 10].

Парамагнитные свойства триплетных состояний порфиринов детально исследовались в лаборатории Л. П. Каюшина [9, 11—15]. Изучено температурное тушение триплетного состояния порфиринов, влияние кислорода и растворителей.

Триплетные состояния порфина, гемато- и протопорфирина зарегистрированы при освещении замороженных (—196°) растворов этих пигментов в этаноле и пиридине [16]. Сигнал ЭПР триплетного состояния хлорофилла *b* [17] обнаружен при —196° при освещении спиртовых растворов и представлял собой слегка асимметричный синглет с полушириной 14 Э. Для хлорофилла *a* выход триплетного состояния был меньше, чем у хлорофилла *b*, соответственно длительности жизни фосфоресценции; при увеличении концентрации хлорофилла выше 10^{-3} М наблюдалось падение амплитуды сигнала ЭПР из-за концентрационного тушения триплетного состояния [18]. Отсутствие сигнала ЭПР триплетного поглощения в твердых пленках хлорофилла также, по-видимому, обусловлено эффектом концентрационного тушения. Недавно описан сигнал ЭПР триплетного состояния бактериохлорофилла в растворе [19].

К сожалению, в литературе отсутствуют данные по измерению спектра возбуждения триплетного состояния, которые должны подтвердить, что наблюдаемые спектры ЭПР действительно являются следствием возбуждения хлорофилла.

Несмотря на относительную легкость обнаружения триплетного состояния в модельных системах, зарегистрировать триплетные состояния пигментов в фотосинтезирующих организмах оказалось более трудной задачей. В ненарушенных клетках сигналы

ЭПР триплетного состояния не наблюдались, их можно измерить лишь при добавлении дезагрегирующих агентов, например 10%-го пиридина [18]. Витт и др. [20] наблюдали триплетное состояние хлорофилла в далеких от нативности препаратах фотосинтезирующих организмов.

В последние годы возрос интерес к выяснению роли триплетного состояния хлорофилла и бактериохлорофилла в фотосинтезе.

Даттон и др. [21, 22] обнаружили сигнал ЭПР триплетного состояния бактериохлорофилла в препаратах хроматофоров из Chromatium D. при температуре жидкого гелия и возбуждении лазером в условиях, когда не происходило образования катион-радикала $П^+$ 870: акцептор электрона был полностью восстановлен добавлением дитионита натрия. Оказалось, что квантовый выход образования триплетов близок по величине к квантовому выходу окисления бактериохлорофилла. В другой работе сообщается о фотоиндуцированных сигналах ЭПР триплетного состояния в препаратах фотосистемы I (см. [23]) из хлоропластов шпината. Триплетные состояния в клетках Rhodospirillum rubrum и хлоропластах шпината наблюдали Катц с сотрудниками [19]. Они определили константы расщепления в нулевом поле и сравнили их с соответствующими константами изолированных пигментов: бактериохлорофилла в растворе и хлорофилла *a* и *b* в мономерной и агрегированной форме. На основании различия в величинах констант расщепления в нулевом поле in vivo и in vitro высказывается предположение, что перенос электрона при фотосинтезе осуществляется с участием димера пигмента, включающего молекулу воды.

Фосфоресценция. Фосфоресценция порфиринов исследовалась во многих работах [8, 24]. Однако о фосфоресценции хлорофиллов долгое время не удавалось получить достаточно надежную информацию.

В работе Кальвина и Дорафа [25] фосфоресценция хлорофилла *b* при 860 нм наблюдалась в замороженных растворах (—196°). Время жизни фосфоресценции оказалось равным $3 \cdot 10^{-2}$ с, что на порядок больше времени жизни триплетов хлорофилла *b*, измеренного впоследствии с помощью флеш-фотолиза [26]. Эти данные были проверены в работе Беккера и Каша [27], которые зарегистрировали фосфоресценцию хлорофилла *b* при 865 нм.

Синх и Беккер [28] сообщили, что фосфоресценция в области длиннее 800 нм наблюдается либо в полярных растворителях, либо в неполярных, но в присутствии полярных примесей (воды). Они зарегистрировали максимумы фосфоресценции хлорофилла *b* при 875 и 915 нм и хлорофилла *a* при 885 и 925 нм и получили аномально высокий квантовый выход фосфоресценции, равный 10^{-2}, что примерно на три порядка выше значения, полученного в более поздних работах других авторов. Складывается впечатление, что Синх и Беккер в действительности наблюдали длинноволновый «хвост» флуоресценции хлорофилла.

Фернандес и Беккер [29] подробно исследовали спектрально-люминесцентные свойства хлорофиллов *a* и *b* в неполярном 3-метилпентане. Им удалось показать, что при —196° эти растворы излучают люминесценцию при 733 (хлорофилл *b*) и 755 нм (хлорофилл *a*). Оценка времени жизни, сделанная ими с помощью фосфороскопа, дала значение больше $5 \cdot 10^{-4}$ с. Авторы предположили, что свечение является $n \rightarrow \pi$-фосфоресценцией пигментов, а описанная ранее длинноволновая фосфоресценция принадлежит $\pi \rightarrow \pi$-электронному переходу.

Фотоэлектрические измерения фосфоресценции хлорофилла были проведены в лаборатории Теренина [30], и был обнаружен максимум фосфоресценции хлорофилла *b* 890 нм при —196°. Гуринович [8] с помощью импульсной установки измерил времена жизни фосфоресценции хлорофилла и феофитина *a*. Они оказались равными примерно 1.5 мс. Квантовый выход фосфоресценции при —183° составлял, по их оценке, 10^{-3}. Однако нужны были доказательства тому, что описанное выше свечение действительно принадлежит хлорофиллу, а не примесям или продуктам деградации.

Систематическое изучение фосфоресценции хлорофилла и его аналогов проводилось в последнее время в ряде работ [31—36]. Была измерена фосфоресценция протохлорофилла, хлорофиллов *a* и *b*, хлоробиум-хлорофиллов «660» и «650» (бактериовиридина) и их феофитинов в различных растворителях, полимерных пленках, а также живых организмах. Показано, что квантовый выход фосфоресценции для всех пигментов составляет около 10^{-5}, время жизни близко к времени жизни T—T-поглощения, измеренному методом флеш-фотолиза другими авторами [26].

Сравнение спектров возбуждения фосфоресценции пигментов в замороженных растворах (—196°), спектров излучения и спектров поглощения позволило установить, что в неполярных растворителях разбавленные растворы магнийсодержащих пигментов (10^{-6} М) излучают два основных типа фосфоресценции, которые наблюдались во всех использованных растворителях: длинноволновая люминесценция преобладает в пиридине, а коротковолновая — в диэтиловом эфире. Наиболее вероятно, что длинноволновое свечение принадлежит дисольватам по магнию, а более короткое — моносольватам [34]. В согласии с этим, безмагниевые феофитины образовывали в таких системах только один тип фосфоресцирующих сольватов, близкий по спектральным свойствам к моносольватам магниевых комплексов (см. таблицу).

В неполярных растворителях, обладающих слабой сольватирующей способностью по отношению к молекулам пигментов, удалось зарегистрировать фосфоресценцию агрегированных форм. Время жизни фосфоресценции агрегатов оказалось меньше, чем у мономеров.

Максимумы излучения были смещены в длинноволновую сторону (см. таблицу).

Параметры фосфоресценции хлорофилла и его аналогов в растворах и пленках при — 196° [35]

Пигмент	Диэтиловый эфир (монсольваты) *)			Пиридин (дисольваты) *)			Агрегаты		
	максимальное возбуждение, нм	максимальное излучение, нм	τ, мс	максимальное возбуждение, нм	максимальное излучение, нм	τ, мс	максимальное возбуждение, нм	максимальное излучение, нм	τ, мс
Хлорофилл *a*	658	930	2.4	672	985	1.8	690—720	970—1000	1—1.2
Феофитин *a*	664	930	1.2	665	940	1.1	—	—	—
Хлорофилл *b*	644	890	4.3	657	930	3.1	—	940—1000	—
Протохлорофилл	622	845	11.5	636	920	4.5	633	890—930	4.2
Протофеофитин	564, 587	796, 897	9.1	569, 592	798, 905	10	—	—	—
Хлоробиум-хлорофилл «660»	658	960	1.5	—	—	—	700—745	1050	0.7—0.9

*) Термины «моносольват» и «дисольват» относятся к магнийсодержащим пигментам. Моносольваты доминируют в диэтиловом эфире, дисольваты — в системах с пиридином, агрегаты — в неполярных растворителях и пленках.

Обнаружена фосфоресценция при —196° и в фотосинтезирующих организмах, этиолированных и зеленеющих листьях фасоли и хлоропластах [35].

Наряду с фосфоресценцией в живых организмах в этих работах была обнаружена замедленная флуоресценция также при —196° [35]. Вероятно, она обусловлена рекомбинационным процессом — $T-T$-аннигиляцией или рекомбинацией первично образованных ион-радикалов. Сопоставление спектров возбуждения отдельных полос фосфоресценции со спектрами поглощения листьев и хлоропластов позволило установить, что к фосфоресценции в листьях способны все формы протохлорофилла, коротковолновые формы хлорофиллида и хлорофилл *a* [35, 36].

К сожалению, до сих пор при изучении триплетных состояний пигментов не выполнены эксперименты по корреляции результатов, полученных методами радиоспектроскопии, фосфоресценции и флеш-фотолиза.

Не подлежит сомнению возможность образования триплетных состояний хлорофилла и их участие в фотохимических превращениях пигментов в растворе, что показано главным образом в опытах с флеш-фотолизом. На очереди решение вопроса об участии триплетных состояний в первичных процессах фотосинтеза. Действительно, миграция энергии возбуждения к актив-

ному центру может вести к его переходу в триплетное возбужденное состояние, взаимодействующее с компонентами цепи переноса электрона.

Радикальные формы хлорофилла

Обнаружение нестабильного фотоиндуцированного сигнала ЭПР в интактных фотосинтезирующих организмах (растениях и бактериях), препаратах хлоропластов, хроматофоров и активных центров поставило вопрос о выяснении природы этого сигнала и его связи с процессом фотосинтеза [37, 38]. Этот сигнал с $g=2.0025$ и $\Delta H=7.5$ Э (для растений) и $\Delta H=9.5$ Э (для бактерий) представляет собой одиночную линию гауссовой формы и не имеет сверхтонкой структуры. Связь сигнала с фотовозбуждением хлорофилла и реакциями, идущими с его участием, несомненна. Поэтому для выяснения природы этого сигнала проводятся исследования не только с целыми фотосинтезирующими организмами и их фрагментами, но также и модельными системами, включающими хлорофилл. К таким системам относятся агрегированные формы хлорофилла (кристаллы, пленки, растворы), системы пигмент+донор электрона и пигмент+акцептор электрона и др.

ЭПР агрегированного хлорофилла. В препаратах твердого хлорофилла и концентрированных растворах хлорофилла в алифатических растворителях наблюдаются сигналы ЭПР, характер которых определяется состоянием хлорофилла в агрегате.

Сигналы ЭПР в кристаллических образцах и растворах хлорофилла наблюдали Броди с сотрудниками [39], Теренин и Холмогоров, установившие необходимость воды и кислорода для проявления парамагнитных свойств пигментов в агрегированном состоянии [40].

Растворы хлорофилла в алифатических растворителях, тщательно освобожденные от воды и кислорода, не дают сигналов ЭПР ни в темноте, ни на свету [41]. В сухих образцах аморфного пигмента на воздухе в темноте, как правило, наблюдаются сигналы ЭПР, которые характеризуются довольно широкой линией (10—12 Э) и $g=2.004$ [39]. Освещение практически не действует на эти сигналы [42]. Тщательное удаление кислорода приводит к снижению уровня темнового сигнала, хотя и не полному [43]. Природа возникновения темнового сигнала неясна, но можно предположить образование стабильных парамагнитных состояний, возникающих за счет взаимодействия молекул пигментов с кислородом (или каким-либо другим акцептором электрона) в процессе получения образцов (возможно, под действием дневного освещения).

В образцах хлорофилла с разным типом кристаллической упаковки при действии красного света в присутствии кислорода по-

является узкий сигнал ЭПР, медленно исчезающий после выключения света [39, 40]. Ширина этого сигнала колеблется от 7 до 1 Э, g=2.0025. Как показали Теренин и Холмогоров [40, 43—45], а затем и другие авторы [46—49], условием возникновения узкого светоиндуцированного сигнала ЭПР является наличие кристаллической структуры пигмента, которая возникает при взаимодействии молекул пигмента с молекулами воды, и обязательное присутствие акцептора кислорода. Кристаллическая структура пигмента создается при сорбции паров воды аморфными препаратами пигмента или при взаимодействии хлорофилла, находящегося в алифатических углеводородных растворителях, с водой; при этом возможно образование коллоидных частиц вида $(Хл \cdot H_2O)_n$ [51]. Разная ширина линии, наблюдаемая авторами для узкого светоиндуцированного сигнала (от 1 до 7 Э), связана с типом упаковки молекул в препаратах хлорофилла. Кристаллические образцы, характеризующиеся сильным красным сдвигом (до 740 нм) в видимом спектре поглощения, дают на свету наиболее узкую линию ЭПР. В таких образцах узкая линия ЭПР (ΔH=1 Э) возникает в присутствии акцепторов электрона: кислорода [48], а также хинона или фторанила [52] — уже в темновых условиях и длительное время сохраняется в темноте. В противоположность данным Теренина и Холмогорова [43], а также Шермана и Фужимори [48], Катц с сотрудниками [51] наблюдали в отсутствие кислорода узкий светоиндуцируемый сигнал ЭПР в растворах хлорофилла в гексадекане, содержащих воду. Обращает на себя внимание узость линии ЭПР, возникающей в хлорофилл-водных агрегатах. Катц [53] и другие авторы объясняют это делокализацией неспаренного спина по нескольким молекулам хлорофилла в агрегате. По расчетам [53], для того чтобы ширина линии ЭПР соответствовала ширине светоиндуцированного сигнала in vivo (7 Э у зеленых растений и 9 Э у бактерий), неспаренный электрон должен быть делокализован между двумя молекулами хлорофилла.

Рассмотрение вышеприведенных работ показывает, что возникновение сигналов ЭПР в агрегированных формах хлорофилла и других пигментах происходит при взаимодействии молекул пигмента с акцепторами электрона подобно химическому и фотохимическому пути образования радикальных форм пигмента. Специфика образования парамагнитных форм хлорофилла в агрегатах заключается в обязательном наличии кристаллической структуры, необходимой для проявления донорно-акцепторных свойств пигмента в твердом состоянии.

Катион- и анион-радикалы хлорофилла при химическом и электрохимическом окислении—восстановлении. Одним из методов выяснения природы узкого светоиндуцируемого сигнала ЭПР in vivo является химическая и электрохимическая генерация окисленных или восстановленных форм порфиринов и хлорофилла [54]. Наиболее распространены представления, что первичным актом фотосинтеза является окисление хлорофилла и

бактериохлорофилла в активном центре. Поэтому изучалось главным образом окисление пигментов.

Одноэлектронное окисление [55] Mg, Zn, Cu, Pd, Pb, Fe (III) — металлокомплексов октаэтилпорфирина в присутствии таких окислителей, как I_2, $Fe(ClO_4)_3$, *N*-бромсукцинимид в метаноле, приводило к характерным изменениям спектра поглощения. Продукт реакции с измененным спектром поглощения двигался при электрофорезе к катоду, что указывало на катионную природу этого продукта. Измерения ЭПР показали, что окисленные Mg- и Zn-комплексы порфирина дают синглетную линию гауссовой формы шириной около 4 Э и $g=2.0025\pm0.0002$. Полученные данные были интерпретированы как образование при окислении π-катион-радикала порфирина.

В другой работе [56] при электрохимическом окислении Mg-октаэтилпорфирина в CH_2Cl_2 были получены сходные результаты (синглетный сигнал с $g=2.0028$ и шириной 2.5 Э). При окислении магниевых и цинковых комплексов тетрафенилпорфина получены катион-радикалы, которые давали частично разрешенный девятилинейчатый спектр ЭПР, обусловленный взаимодействием неспаренного электрона с атомами азота и протонами пиррольных ядер молекулы.

Хорошо разрешенные сверхтонкие структуры сигнала ЭПР наблюдаются при одноэлектронном окислении Zn-тетрафенилбактериохлорина в CH_2Cl_2 (как нормального, так и дейтерированного [57]) и свободного основания тетрафенилбактериохлорина.

К настоящему времени получены π-катион-радикалы не только синтетических порфиринов, но также этилхлорофиллида *а* [56], хлорофилла *а* [58], бактериохлорофилла [55, 57, 59, 60], метилфеофорбида *а* и феофитина, бактериофеофитина [57]. Во всех случаях независимо от способа получения π-катион-радикала наблюдался синглетный спектр ЭПР поглощения гауссовой формы с $\Delta H=9$ Э для хлорофилла *а* и феофитина, 13 Э для бактериохлорофилла и 14.5 Э для бактериофеофитина. О взаимодействии неспаренного электрона с протонами свидетельствует сужение линии в катион-радикалах дейтерированных порфиринов, хлорофилла и бактериохлорофилла [58, 59] приблизительно в 2.4 раза. Использование дейтерированных растворителей не приводило к сужению линии ЭПР.

Сравнение данных ЭПР по π-катион-радикалам хлорофилла и бактериохлорофилла с параметрами сигналов ЭПР in vivo свидетельствует об их сходстве. Величины *g*-факторов практически идентичны и равны 2.0025 ± 0.0002, вид сигнала одинаков, тогда как ширина линий несколько различалась: in vivo — 7 и 8 Э, а in vitro — 9 и 13 Э соответственно для хлорофилла и бактериохлорофилла. Такое сужение линий ЭПР может объясняться различным состоянием хлорофиллов in vivo и in vitro.

В последнее время обсуждается вопрос об участии бактериофеофитина в первичном акте фотосинтеза [57]. Данные по элек-

трохимическому окислению феофитина и бактериофеофитина в сочетании с измерениями ЭПР свидетельствуют о том, что их окисление протекает при более высоком потенциале (0.86 и 0.80 В соответственно) по сравнению с окислением хлорофилла (0.52 В) и бактериохлорофилла (0.40 В).

Идентификация анион-радикальных продуктов химического превращения порфиринов также существенна для понимания природы сигналов ЭПР, наблюдаемых в фотосинтезирующих клетках. Обратимое фотовосстановление порфиринов было обнаружено в нашей лаборатории [50]. В 1964 г. мы получили анионные формы гематопорфирина и хлорофилла при взаимодействии этих пигментов с амальгамой цинка [61]; продукты реакции (отделенные в вакуумных условиях от амальгамы) обладали характерным спектром поглощения и инициировали полимеризацию мономера, что указывало на свободно-радикальную природу образующихся продуктов.

Получены анионные формы цинковых комплексов тетрафенилпорфина и этиопорфирина при восстановлении их металлическим натрием [62]. Продукты восстановления имели спектры ЭПР со сверхтонкой структурой, которая лучше разрешалась по мере протекания восстановления. Авторы объясняют наблюдаемую структуру спектра ЭПР взаимодействием неспаренного электрона с протонами и атомами азота пиррольных ядер и обсуждают вопрос о принадлежности сигналов ЭПР моно-, ди-(флоринам) или трианионам порфиринов.

В работах Маслова, Холмогорова, Сидорова и др. [63—65] проведено исследование моно- и дианионов ряда металлопорфиринов и безметальных порфиринов. Метод ЭПР был применен для обнаружения фотогенерированных анион-радикалов Zn-тетрафенилпорфина и нейтрального тетрафенилпорфина [66]. Химическое восстановление порфиринов наблюдали и другие авторы [67]. Спектры ЭПР анион-радикалов бактериохлорофилла приведены в ряде работ [68, 69].

Следует отметить, что для анион-радикалов порфиринов получено несколько типов спектров ЭПР, что, вероятно, объясняется образованием в разных условиях эксперимента разных продуктов реакции, не отличающихся по уровню окисления (восстановления). Эти продукты могут различаться местом и степенью локализации неспаренного электрона. Чем уже наблюдаемый сигнал, тем больше степень делокализации неспаренного электрона.

Фотохимическая генерация анион- и катион-радикалов хлорофилла. Наибольшее число исследований посвящено обнаружению радикальных продуктов, возникающих при фотохимическом взаимодействии пигментов с донорами и акцепторами электронов. Однако долгое время не удавалось отчетливо наблюдать образование радикальных форм пигментов в реакциях фотовосстановления—фотоокисления, и только в последние несколько лет усилиями ряда лабораторий были измерены спектры ЭПР анион-

и катион-радикалов хлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина.

Фотовосстановление. Обратимые окислительно-восстановительные превращения хлорофилла и его аналогов были обнаружены в нашей лаборатории на примере фотовосстановления пигментов [70], и была предложена схема реакции, включающая первичное образование свободных радикалов пигмента и донора электрона:

$$Хл^T + Д \rightleftarrows Хл^- + Д^+,$$

где $Хл^T$ — молекула хлорофилла в триплетном состоянии; Д — донор электрона.

Для обнаружения радикальных продуктов реакции нами был вначале применен метод инициирования цепной полимеризации мономеров [71]. Показано, что конечные продукты реакции (красная восстановленная форма и окисленный донор) не инициировали полимеризацию мономеров и, следовательно, не являлись свободными радикалами. Позднее это было подтверждено методом ЭПР [72]. Образование полимера происходило только в ходе освещения растворов. Наиболее активная полимеризация наблюдалась с аскорбиновой и диоксималеиновой кислотами, цистеином и соединениями двухвалентного железа. Сравнительное исследование различных пигментов показало [73], что наибольший выход полимера был с протохлорофиллом; в присутствии других пигментов (хлорофилла, бактериохлорофилла, феофитина, гемато- и протопорфирина) наблюдалась менее активная полимеризация. Сделан вывод, что степень полимеризации зависит от реакционной способности восстановленных форм пигментов. Сочетание разных вариантов опытов позволило прийти к заключению, что при взаимодействии пигмента с донором электрона образуются как радикалы пигмента, так и радикалы донора электрона. Радикал пигмента обладает большей реакционной способностью и ответствен за инициирование полимеризации мономера. Это видно, например, в опыте с соединениями двухвалентного железа в качестве донора электрона, которые не дают свободных радикалов при фотореакции с пигментом (образуются ионы трехвалентного железа).

В дальнейшем для обнаружения радикальных продуктов в реакции фотовосстановления пигментов был применен метод ЭПР. При освещении пиридиновых растворов хлорофилла и его аналогов с аскорбиновой кислотой возникал сигнал ЭПР, представляющий собой дублет с расщеплением $\Delta H = 1.8$ Э и $g = 2.004$ (рис. 1), сигнал принадлежал полуокисленной форме аскорбиновой кислоты — монодегидроаскорбиновой кислоте [74]. В этой работе нам не удалось обнаружить радикалов, принадлежащих восстановленной форме пигмента.

Фужимори и Тавла [75] при фотовосстановлении хлорофилла, феофитина и бактериохлорофилла гидрохиноном в метаноле

наблюдали только пятикомпонентный сигнал семихинона и также не обнаружили радикала восстановленной формы пигмента. Сходные результаты получены Толлиным и сотрудниками при фотовосстановлении хлорофилла и феофитина гидрохиноном; эти авторы исследовали реакцию до температуры —100°, однако и в таком широком интервале температур им не удалось зарегистрировать анион-радикал хлорофилла, они наблюдали только радикал семихинона [76—80]. Поэтому продолжались поиски систем и условий регистрации радикалов пигмента методом ЭПР при их фотовосстановлении.

Нами было показано[81], что при освещении видимым светом замороженных до —196° растворов порфина, гемато- и прото-

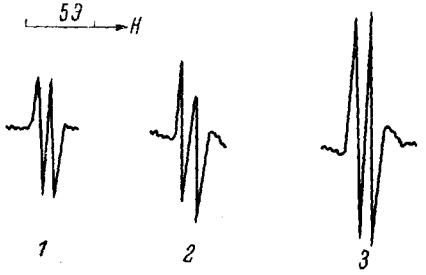


Рис. 1. Спектры ЭПР монодегидроаскорбиновой кислоты (ΔH=1.8 Э, g=2.00), образующейся при фотовосстановлении бактериохлорофилла (*1*), хлорофилла (*2*) и гематопорфирина (*3*) [74].

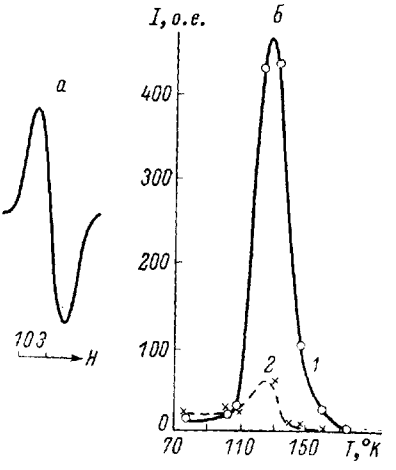


Рис. 2. Сигнал ЭПР спиртового раствора порфирина при —170 ÷ ÷—100°, освещенного видимым светом ($\lambda \geqslant 400$ нм) при —196° (*а*), и изменение амплитуды (*б*) этого сигнала при размораживании в вакууме (*1*) и в присутствии воздуха (*2*) [81].

порфирина, хлорофилла *a* и *b* в этаноле или пиридине образуются свободные радикалы, имеющие синглетный спектр ЭПР с g=2.00 и ΔH=9—13 Э для разных пигментов. При размораживании образцов, освещенных при —196°, амплитуда сигнала ЭПР резко возрастала и при температуре таяния растворителя (—120÷—130°) достигала максимума, после чего при дальнейшем нагревании резко падала до нуля (рис. 2). Такое увеличение количества парамагнитных центров при размораживании образцов, по-видимому, объясняется распадом комплекса с переносом заряда на свободные радикалы [81]:

$$\text{Х}\dot{\text{л}}\text{Д} + h\nu \rightleftarrows \text{Х}\dot{\text{л}}^{-}\dot{\text{Д}}^{+} \longrightarrow \text{Х}\dot{\text{л}}^{-} + \dot{\text{Д}}^{+},$$

где Д — электронодонорный растворитель.

Сопоставление данных ЭПР и изменений в электронном спектре поглощения позволяет предположить, что возникновение синглет-

ного сигнала обусловлено образованием ион-радикала пигмента в результате переноса электрона в комплексе пигмент—растворитель. Хотя присутствие экзогенного донора электрона (например, аскорбиновой кислоты) не изменяло хода реакции, наблюдаемые спектральные изменения при —196° свидетельствовали о восстановительном характере взаимодействия пигмента с растворителем, играющим роль донора электрона.

Для обнаружения радикальных продуктов взаимодействия хлорофилла с восстановителями образцы, содержащие хлорофилл и донор электрона (аскорбиновая кислота в пиперидине или фенил-

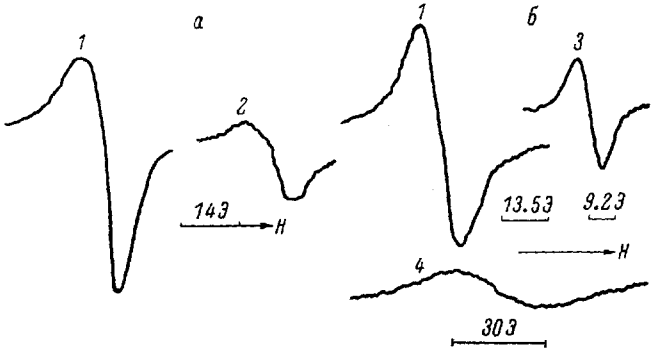


Рис. 3. Спектры ЭПР растворов хлорофилла *а*, освещенных при комнатной температуре и фиксированных жидким азотом: с аскорбиновой кислотой в пиперидине (*а*) и с фенилгидразином в этаноле (*б*) [82].

1 — исходный спектр; *2* — после нагревания до —70°; *3* — в отсутствие донора; *4* — в отсутствие хлорофилла *а*.

гидразин в этаноле), освещали при комнатной температуре и во время освещения фиксировали жидким азотом [82, 83]. Если образцы замораживали через 2—5 с после прекращения освещения, не удавалось регистрировать сигналов ЭПР, что свидетельствовало о нестабильности продуктов фотореакции. Если фиксирование образцов жидким азотом осуществляли в процессе освещения, то наблюдали спектры ЭПР, имеющие вид синглетной линии с ΔH=14 Э и g=2.00, которые долгое время сохранялись после прекращения освещения и медленно исчезали при размораживании образцов (рис. 3). Мы высказали предположение, что наблюдаемые при быстром замораживании синглетные сигналы ЭПР обусловлены образованием восстановленной радикальной формы хлорофилла ($Хл^-$).

В работе Бобровского и Холмогорова [84] использован аналогичный прием — фиксирование продуктов реакции, проводимой при комнатной температуре, жидким азотом. При фотовосстановлении хлорофилла они получили синглетный сигнал с ΔH=10—11 Э, который они также приписали анион-радикалу пигмента. Эти

авторы получили моноанионы и других пигментов: феофитина, Mg-фталоцианина, Mg- и Zn-этиопорфирина [85—87].

Синглетные спектры ЭПР наблюдали Мозерел и Феер при фотовосстановлении уропорфирина III такими восстановителями, как этилендиаминтетрауксусная кислота, никотинамидадениннуклеотид и др. в воде и 50%-м водном глицерине при комнатной температуре [88]. Сигнал с $\Delta H=5.4$ Э и $g=2.0021$ не зависел от природы донора и среды. На основании этого был сделан вывод о том, что наблюдаемый сигнал принадлежит анион-радикальной восстановленной форме пигмента.

В работе Евстигнеева с сотрудниками [89] при фотовосстановлении хлорофилла и феофитина в диэтиламине (и с добавлением трифениламина) получены два типа синглетных сигналов, которые, по данным авторов, принадлежат анион-радикалу или его протонированной форме, которая образуется в присутствии протонодонорных добавок. Анион-радикалы бактериохлорофилла *b* и бактериофеофитина *b* наблюдались теми же авторами [90] при фотовосстановлении указанных пигментов фенилгидразином в триэтиламине; при этом спектры ЭПР представляли синглетные линии со слабо разрешенной сверхтонкой структурой и $\Delta H=10$—12 Э.

Анион-радикальные формы хлорофилла *a* и феофитина *a* и дейтерированных производных этих пигментов получены при фотовосстановлении в вакууме фенилгидразином и диметилформамиде и пиридине при —70° [91]. При сходстве *g*-факторов ($g=2.0028$) ширина линии дейтерированных производных была в 2 раза у́же нормальных. Замена протонов на дейтерий в молекуле, имеющий неспаренный электрон, позволила выяснить способ локализации этого электрона в молекуле. Авторы рассчитали, что у анион-радикала неспаренный электрон локализован ближе к центру молекулы по сравнению с локализацией спина у катион-радикала [91].

Недавно мы зарегистрировали синглетный сигнал ЭПР восстановленного аскорбиновой кислотой протохлорофилла в пиперидине при —30° в вакууме (рис. 4). Ширина линии ($\Delta H=7$—8 Э) была сходна с шириной линии у порфиринов и у́же ширины линии анион-радикалов хлорофилла и бактериохлорофилла. В контрольных опытах с аскорбиновой кислотой при этой температуре отсутствовал сигнал монодегидроаскорбиновой кислоты (дублет с $\Delta H=1.8$ Э), который появлялся при более высокой температуре.

Таким образом, фотохимически полученные анион-радикалы пигментов характеризуются во всех случаях синглетным спектром ЭПР с $g=2.0021$—2.0028 и шириной линии от 5 до 14 Э в ряду от порфиринов до бактериохлорофилла. Фотохимическое взаимодействие пигмента и донора электрона сопровождается возникновением наряду с анион-радикалом также радикалов окисленного донора электрона [74, 76, 92]. Однако обычно можно наблюдать только один тип радикалов. Это, видимо, объясняется

разной длительностью жизни образующихся радикалов. При высоких температурах, когда идет накопление радикалов окисленного донора, происходит превращение анион-радикалов пигмента в валентнонасыщенные продукты восстановления, например красную восстановленную форму. В тех случаях, когда восстановление пигмента не доходит до стадии стабильных восстановленных форм, анион-радикалы пигмента можно видеть и при комнатной температуре [88]. При низкой температуре накапливаются анион-радикалы пигмента, так как рекомбинация радикалов окислен-

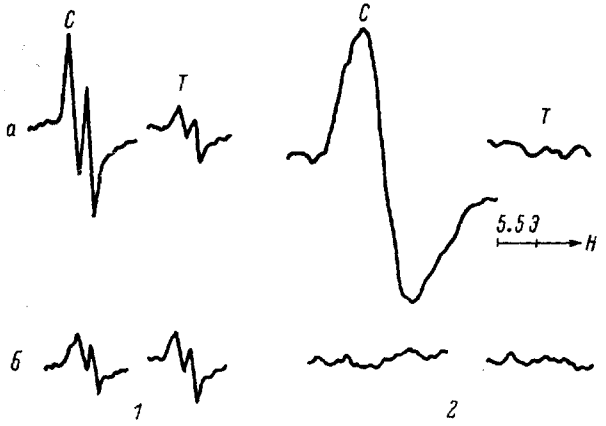


Рис. 4. Спектры ЭПР в пиперидине.

а — при фотовосстановлении протохлорофилла аскорбиновой кислотой; *б* — при фотовосстановлении аскорбиновой кислоты. *1* — 0°, *2* — —30°. *С* — свет; *Т* — темнота.

ного донора идет быстрее обратной реакции с радикалами пигмента и собственной рекомбинации пигментных радикалов. Хотя общепринято, что первичный акт фотосинтеза связан с окислением хлорофиллов в активном центре, в последнее время стали появляться работы, указывающие также на возможное участие анион-радикалов пигментов в первичных процессах фотосинтеза [93].

Фотоокисление. Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла было обнаружено в нашей лаборатории в 1951 г. [94]. В последующих работах [95—97] были изучены первичные продукты обратимого фотоокисления хлорофилла, бактериохлорофилла и бактериовиридина хинонами, измерены их электронные спектры поглощения, характеризующиеся максимумом поглощения в синей области спектра. Обратимое фотоокисление представляет собой процесс светоиндуцированного переноса электрона от возбужденной молекулы пигмента к молекуле акцептора, сопряженный с образованием свободных радикалов:

$$Хл + А \overset{h\nu}{\rightleftarrows} \dot{Х}л^{+} + \dot{А}^{-},$$

где Хл — молекула хлорофилла в синглетном или триплетном возбужденном состоянии; А — молекула акцептора.

Образование радикалов восстановленного акцептора в реакции хлорофилла и феофитина с *n*-бензохиноном исследовали методом ЭПР Толлин с сотрудниками [98—100]; сигнал ЭПР семихинона, имеющий пятикомпонентный спектр, наблюдался только на свету и исчезал в темноте; никаких спектральных изменений и сигналов ЭПР пигмента не было обнаружено в области температур $-100 \div -10°$. Неудачи в наблюдении сигналов ЭПР окисленного пигмента побудили Толлина с сотрудниками предложить механизм реакции, в котором пигмент играл роль фотосенсибилизатора при переносе электрона от растворителя к хинону: $Хл^T + ROH + Q \rightarrow Хл + R\dot{O}H^+ + \dot{Q}^-$, где $Хл^T$ — молекула хлорофилла в триплетном возбужденном состоянии; ROH — молекула растворителя (спирта); Q — *n*-бензохинон. Позднее Толлин с сотрудниками [80, 101] обнаружили синглетный сигнал, который приписали катион-радикальным формам хлорофилла и бактериохлорофилла.

Бобровский и Холмогоров наблюдали синглетный сигнал катион-радикальной формы хлорофилла при окислении этого пигмента тетранитрометаном в серном эфире при —196° [102].

При исследовании зависимости сигнала ЭПР при фотоокислении хлорофилла хиноном от кислотности среды Евстигнеев и соавторы [103] получили спектр, в котором наряду с радикалом семихинона присутствовал сигнал, имеющий синглетный спектр поглощения шириной 7—8 Э и с *g*-фактором, близким к *g*-фактору свободного электрона, и, как полагают авторы, принадлежащий окисленной радикальной форме пигмента. В другой работе [104] эти авторы наблюдали более отчетливый синглетный сигнал ЭПР при —15° при окислении хлорофилла *м*-динитробензолом.

Мы исследовали образование радикалов при окислении бактериохлорофилла *n*-бензохиноном, так как из работ нашей лаборатории [97] было известно, что наиболее стабильная окисленная форма у бактериохлорофилла. Оказалось, что при действии красного света на растворы бактериохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле виден только синглетный сигнал с $\Delta H = 13$ Э и $g = 2.0025$ [92] в широком диапазоне температур от —160 до —10°, который длительное время сохраняется в темноте после выключения света. При этом мы не наблюдали пятикомпонентного сигнала ЭПР семихинона. Однако действие возбуждающего света (белого или желтого) на растворы одного *n*-бензохинона при —70° и выше приводило к возникновению сигнала семихинона (рис. 5, *а*). Сравнение результатов опытов по действию света на растворы бактериохлорофилла и *n*-бензохинона и на растворы одного *n*-бензохинона позволили предположить, что синглетный сигнал ЭПР принадлежит окисленной катион-радикальной форме пигмента.

Чтобы доказать это предположение, мы исследовали свойства фотоиндуцированного красным светом синглетного сигнала в системе бактериохлорофилл—*n*-бензохинон в сравнении со свойствами сигнала семихинона, фотоиндуцируемого белым светом [105].

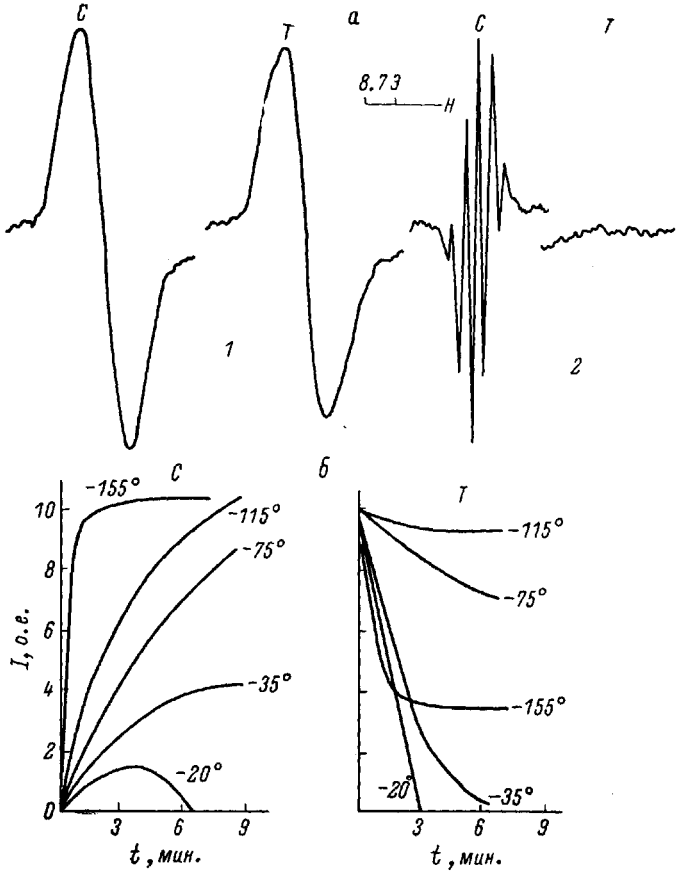


Рис. 5. Спектры ЭПР, наблюдаемые при действии красного света (светофильтр КС-19) на растворы бактериохлорофилла *а* и *n*-бензохинона (*1*) и при действии желтого света (светофильтр ЖС-17) на растворы *n*-бензохинона (*2*) в этаноле при —70° (*а*), и изменение амплитуды синглетного сигнала ЭПР (ΔH=13 Э) в зависимости от температуры (*б*) [105].

С — свет; *Т* — темнота.

Оба сигнала наблюдались в диапазоне температур —160÷—10°, однако изменение температуры по-разному влияло на их параметры. Так, ширина и форма линии синглетного сигнала практически не изменялась. В противоположность этому спектр семихинона до —70° представлял собой пятикомпонентный сигнал, по мере понижения температуры структура его сглаживалась,

и при температуре ниже —100° сигнал семихинона приобретал форму синглетной линии с шириной 7—10 Э.

Существенным различием обоих сигналов оказалась длительность жизни. Синглетный сигнал в системе бактериохлорофилл + + *n*-бензохинон сохраняется в темноте после выключения света; при температуре ниже —70° его можно наблюдать в темноте в течение нескольких часов (рис. 6, *б*). Сигнал семихинона, напротив, сразу же исчезал после выключения света, и только при температуре, когда сигнал семихинона приобретает форму синглетной линии, длительность жизни этого радикала увеличивалась и его

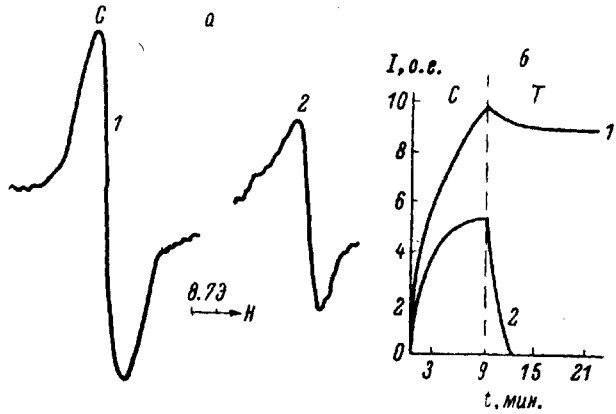


Рис. 6. Спектры ЭПР (*а*) и изменение амплитуды сигнала ЭПР (*б*) растворов бактериохлорофилла *а* и *n*-бензохинона (*1*) и *n*-бензохинона (*2*) в этаноле. —120° [105].

С — свет; *Т* — темнота. Условия освещения см. на рис. 5.

можно было видеть после выключения света. Сравнение скорости исчезновения сигналов ЭПР при —120° показало (рис. 6), что синглетный сигнал в системе бактериохлорофилл—*n*-бензохинон исчезает значительно медленнее сигнала семихинона.

Таким образом, при взаимодействии бактериохлорофилла с акцептором электрона образуются оба типа радикалов. Длительность жизни их различна, благодаря чему стационарная концентрация радикала пигмента обычно больше концентрации семихинона. Поэтому в суммарном спектре ЭПР мы видим только сигнал радикала пигмента.

Бобровский и Холмогоров [106] получили катион-радикальную форму пигмента при фотоокислении фторанилом и тетранитрометаном в серном эфире. При этом наряду с синглетной линией (ΔH=13 Э и g=2.0025) они наблюдали радикальные формы фторанила и радикал $NO_2^{\cdot}$, образующийся при разложении радикала тетранитрометана.

Синглетные спектры ЭПР с g=2.0026 и ΔH=8.3 и ΔH=13 Э для катион-радикалов хлорофилла и бактериохлорофилла соот-

ветственно, образующиеся в реакции с хиноном и дурохиноном, приведены в работе Евстигнеева с соавторами [107].

Мы продолжили наши исследования на примере другого бактериального пигмента — бактериохлорофилла *b*, выделенного из фотосинтезирующей бактерии Rhodopseudomonas viridis [108]. Фотохимические свойства этого пигмента были ранее исследованы в нашей лаборатории [109, 110], и показано, что он значительно легче окисляется по сравнению с бактериохлорофиллом *a* и продукты его окисления менее стабильны. При измерении спектров ЭПР растворов бактериохлорофилла *b* и *n*-бензохинона в этаноле, так же как и в опытах с бактериохлорофиллом *a*, регистрируется синглетный сигнал с $g=2.0025$ и $\Delta H=14$ Э при температуре $-160 \div 0°$ [108], однако скорость исчезновения синглетного сигнала для бактериохлорофилла была больше. Быстрое начальное падение амплитуды синглетного сигнала в темноте, как и для бактериохлорофилла *a*, вероятно, обусловлено рекомбинацией радикалов семихинона, также образующихся в этой системе (рис. 7). Полученные данные подтверждают то, что оба бактериохлорофилла, несмотря на сходство, характеризуются разной способностью к окислению и разной устойчивостью окисленных радикальных форм.

Фотоокисление бактериохлорофилла *b* *n*-бензохиноном было исследовано в работе Кима и др. [90]. Результаты этих авторов отличались от наших, так как они наблюдали синглетный сигнал ЭПР при температуре ниже —70°; при этом ширина линии, равная 8.4 Э, не соответствовала полученной нами для бактериохлорофилла *b* (14 Э) и данным других авторов [60]. Данные Кима и др. [90], по-видимому, относятся не к бактериохлорофиллу *b*, а к стабильному хлорофиллоподобному продукту, который легко образуется при окислении бактериохлорофиллов. Действительно, в опытах этих авторов в электронном спектре поглощения бактериохлорофилла *b* наблюдается максимум при 680 нм; их результаты соответствуют нашим данным по измерению ЭПР при фотоокислении стабильного хлорофиллоподобного продукта окисления бактериохлорофилла *b* [108].

Фотохимическое образование синглетного сигнала ЭПР при окислении бактериохлорофиллов *a* и *b* *n*-бензохиноном исследовано нами также в микрогетерогенных условиях, а именно в водных растворах детергента тритон-Х100, где пигмент находился в мицелле детергента, а *n*-бензохинон — в водной фазе (pH 5.2 и 6.8) при температуре от —160 до —50° [111]. Действие белого света на растворы *n*-бензохинона при pH 5.2 не приводило к фотоиндуцированному возникновению радикалов семихинона, тогда как выход синглетного сигнала при pH 5.2 в системе бактериохлорофилл—*n*-бензохинон был выше, чем при pH 6.8. Эти результаты также свидетельствуют о принадлежности синглетного сигнала ЭПР катион-радикальной форме пигмента. Можно думать, что элементарный механизм взаимодействия бактериохлорофилла

и *n*-бензохинона в мицелле детергента такой же, как и в растворе, и специфика среды сказывается лишь на скорости протекания процесса.

Костиков [91], изучая фотоперенос электрона в растворах хлорофилла и цитохрома (в присутствии акцептора электрона — хинона), в качестве среды использовал водные буферные растворы с детергентом тритон-Х100 и подтвердил применимость мицеллярных сред для исследования фотореакций пигментов.

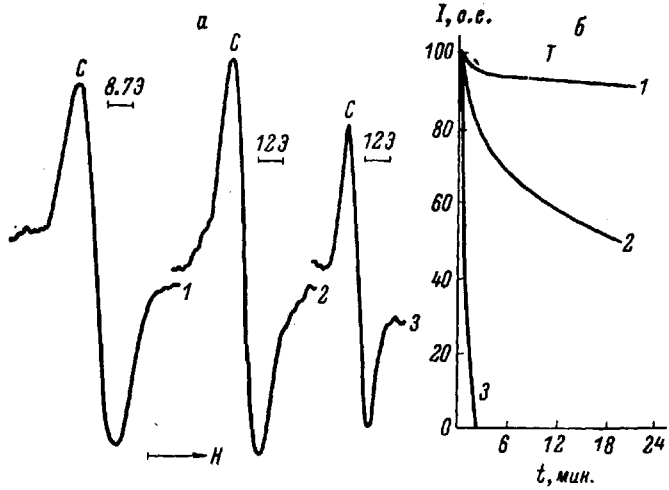


Рис. 7. Спектры ЭПР (*а*) и изменение амплитуды сигнала ЭПР (*б*) растворов бактериохлорофилла *а* и *n*-бензохинона (ΔH=13 Э) (*1*), бактериохлорофилла *b* и *n*-бензохинона (ΔH=13—14 Э) (*2*), *n*-бензохинона (ΔH=7—9 Э) (*3*) в этаноле. —120° [108].

С — свет; *Т* — темнота. Условия освещения см. на рис. 5.

В наших работах [92, 105, 108, 111] показано, что бактериохлорофиллы характеризуются устойчивостью катион-радикальных форм (по сравнению с радикалами семихинона), что позволяет изучать их свойства в широком интервале температур. Катион-радикалы хлорофилла менее стабильны. Для их обнаружения необходимо либо применение низких температур [102, 112], либо подкисление раствора, способствующее более быстрой рекомбинации радикалов семихинона, либо выбор условий опыта, приводящих к уходу радикалов акцептора электрона и стабилизации катион-радикала хлорофилла [103, 104, 107, 113, 114]. Таким образом, в случае хлорофилла не удалось наблюдать катион-радикальную форму, устойчивую в широком диапазоне температур. Это, по-видимому, связано с тем, что переход от структуры хлорина к структуре бактериохлорина существенно меняет окислительно-восстановительные свойства молекулы, что в свою очередь сказывается на свойствах продуктов окисления.

Мы исследовали фотохимическое окисление *n*-бензохиноном стабильного хлорофиллоподобного продукта окисления бактериохлорофиллов *a* и *b* с максимумом поглощения при 680 нм [108]. Как и следовало ожидать, освещение растворов продукта П680 с *n*-бензохиноном не приводило к возникновению синглетного сигнала ЭПР, характерного для первичных продуктов окисления бактериохлорофиллов, а при температуре —90° и выше наблюдали сигнал семихинона.

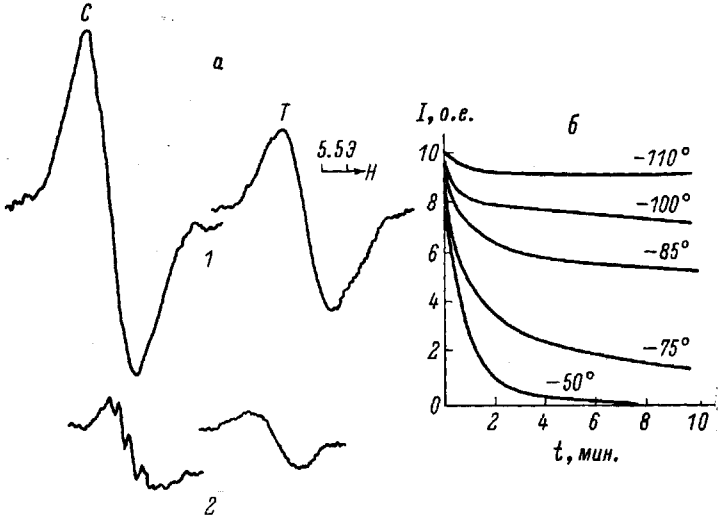


Рис. 8. Спектры ЭПР растворов бактериовиридина и *n*-бензохинона в этаноле при освещении (*C*) красным светом (светофильтр КС-11) и в темноте (*T*) (*1* — —110°, *2* — —80°) (*а*) и изменение амплитуды светоиндуцированного при —110° сигнала ЭПР в темноте в зависимости от температуры (*б*).

Свойства продуктов окисления пигмента, имеющего структуру хлорина, но отличающегося от хлорофилла большей склонностью к окислению, были изучены нами на примере еще одного бактериального пигмента — бактериовиридина. В опытах с бактериовиридином синглетный сигнал ЭПР (длительное время переживающий период освещения) можно было наблюдать при окислении этого пигмента *n*-бензохиноном при температуре от —150 до —90° (рис. 8, *а*). Повышение температуры до —80° приводило к тому, что на свету регистрировали наложение двух сигналов — синглетного и пятикомпонентного сигнала семихинона. При выключении света сигнал семихинона исчезал, и в суммарном спектре был виден лишь небольшой синглетный сигнал катион-радикала бактериовиридина. Мы показали, что нестабильность продукта окисления бактериовиридина связана не с быстро идущей обратной реакцией, а с тем, что в отличие от бактериохлорофиллов катион-радикальная форма пигментов хлоринового типа с большей скоростью претер-

певает дальнейшие превращения, возможно, включающие и световую стадию. Для проверки этого предположения синглетный сигнал бактериовиридина генерировали на свету при —110° и выдерживали в темноте в течение времени, достаточном для рекомбинации радикалов семихинона. После этого медленно повышали температуру и записывали спектр синглетного сигнала ЭПР. Оказалось, что синглетный сигнал можно было зарегистрировать до температуры —20°. Если температуру образца быстро повысить до определенного значения, то можно проследить кинетику исчезновения при разных температурах синглетного сигнала бактериовиридина, фотоиндуцированного при —110° (рис. 8, *б*). Из этих опытов следует, что при отсутствии условий, способствующих дальнейшим превращениям катион-радикальной формы бактериовиридина (свет, другие радикальные продукты фотореакции), эта форма окисленного бактериовиридина довольно устойчива. Мы нашли, что исчезновение синглетных сигналов ЭПР в темноте вполне сопоставимо для окисленных форм всех изученных нами бактериальных пигментов: бактериохлорофиллов *a* и *b* и бактериовиридина.

Результаты исследования бактериальных пигментов показали, что при их взаимодействии с акцепторами электрона (*n*-бензохиноном) образуются катион-радикальные окисленные формы, дающие синглетный спектр ЭПР с шириной $\Delta H = 10$, 13 и 14 Э для бактериовиридина, бактериохлорофилла *a* и бактериохлорофилла *b* соответственно и *g*-фактором, близким к *g*-фактору свободного электрона.

Доминирующий при данной температуре стационарный вид сигнала является сложной функцией скоростей ряда процессов: прямой фотореакции, обратной реакции (которая может ускоряться светом), протонирования и депротонирования одноэлектронных форм, диспропорционирования того или иного типа радикалов, их реакции с растворителем и кислородом и т. д.

Заключение

В настоящее время усилиями ряда лабораторий получены химическими, электрохимическими и фотохимическими методами анион- и катион-радикальные формы практически всех известных пигментов: порфиринов, хлорофиллов и бактериохлорофиллов. Спектры ЭПР как анион-, так и катион-радикалов обычно характеризуются синглетной линией. Наиболее узкие линии 3—7 Э наблюдаются у радикальных форм порфиринов, 8—11 Э — у хлорофиллов и 12—14 Э — у бактериохлорофиллов. Во всех случаях *g*-факторы были сходны и близки к *g*-фактору свободного электрона ($g = 2.002$). Это свидетельствует о делокализации неспаренного электрона по конъюгированной системе двойных связей молекулы пигмента и подтверждает сделанное в наших первых рабо-

тах предположение [70] о делокализации неспаренного электрона в продуктах окислительно-восстановительного фотопревращения пигмента.

Совпадение параметров синглетной линии радикальных форм окисленного и восстановленного пигмента с параметрами для узкого светоиндуцируемого сигнала ЭПР in vivo указывает на их близкое сходство. При совпадении g-факторов и формы сигнала отмечается небольшое расхождение в ширине линии.

Результаты изучения катион- и анион-радикальных форм пигментов, полученных в модельных системах, широко используются для трактовки сигналов ЭПР, наблюдаемых в фотосинтезирующих организмах.

Сходство параметров спектров ЭПР анион- и катион-радикалов не позволяет дать однозначный ответ о принадлежности синглетного сигнала ЭПР in vivo окисленной или восстановленной форме пигмента. Однако многочисленные данные о поведении синглетного сигнала in vivo в зависимости от окислительно-восстановительных условий свидетельствуют о том, что в первичном фотопроцессе хлорофилл фотосистемы I и бактериохлорофилл в активном центре подвергаются обратимому окислению с образованием катион-радикала: $П^+$ 700 и $П^+$ 870 (см. обзоры [37, 38, 115, 116]). Данные о природе первичного фотопроцесса в фотосистеме II менее определенны [116].

Обращает на себя внимание то, что ширина линии ЭПР в растворах хлорофилла и бактериохлорофилла обычно на 2—3 Э шире, чем ширина индуцированного светом синглетного сигнала в фотосинтезирующих клетках. По-видимому, это обусловлено большей делокализацией неспаренного электрона у радикальных форм пигментов in vivo, связанной, вероятно, с агрегацией молекул пигмента в активном центре.

Литература

1. Красновский А. А., Баховские чтения, т. 29, М., 1974, с. 1—64.
2. Теренин А. Н., ЖФХ, 1944, т. 18, № 1, с. 1—12.
3. Теренин А. Н., Избранные труды, т. 2, Л., 1974, с. 32—113.
4. Теренин А. Н., Избранные труды, т. 2, Л., 1974, с. 360—374.
5. Красновский А. А., ДАН СССР, 1948, т. 60, № 3, с. 421—424.
6. Шахвердов П. А., в кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.—Л., 1966, с. 283—296.
7. Карякин А. В., Чибисов А. К., в кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.—Л., 1966, с. 296—313.
8. Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н., в кн.: Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск, 1968, с. 336—380.
9. Каюшин Л. П., Грибова З. П., Азизова О. А. Электронный парамагнитный резонанс фотопроцессов биологических соединений. М., 1973. 425 с., с. 7—101.
10. Мак-Глинн С., Т. Адзуми, М. Киносита. Молекулярная спектроскопия триплетного состояния. М., 1972. 448 с.

11. Грибова З. П., Евстигнеева Р. П., Миронов А. Ф., Каюшин Л. П., Лузгина В. Н., Пискунов А. К., Биофизика, 1963, т. 8, № 5, с. 550—556.
12. Сибельдина Л. А., Грибова З. П., Каюшин Л. П., Маринов Б. С., ДАН СССР, 1968, т. 181, № 2, с. 482—486.
13. Грибова З. П., Каюшин Л. П., Сибельдина Л. А., ДАН СССР, 1968, т. 181, № 5, с. 1266—1269.
14. Сибельдина Л. А., Грибова З. П., Каюшин Л. П., Биофизика, 1970, т. 15, № 5, с. 816—822.
15. Костиков А. П., Грибова З. П., Каюшин Л. П., ДАН СССР, 1970, т. 193, № 2, с. 469—472.
16. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., ДАН СССР, 1965, т. 163, № 2, с. 491—494.
17. Рихирева Г. Т., Грибова З. П., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., ДАН СССР, 1964, т. 159, № 1, с. 196—197.
18. Рихирева Г. Т., Сибельдина Л. А., Грибова З. П., Маринов Б. С., Каюшин Л. П., Красновский А. А., ДАН СССР, 1968, т. 181, № 6, с. 1485—1488.
19. Uphaus R. A., Norris J. R., Katz J. J., Biochem. Biophys. Res. Communs, 1974, vol. 61, N 3, p. 1057—1063.
20. Moraw R., Witt H., Z. phys. Chem., 1961, Bd 29, N 1, S. 25—42.
21. Dutton P. L., Leigh J. S., Seibert M., Biochem. Biophys. Res. Communs, 1972, vol. 46, N 2, p. 406—413.
22. Wraight C. A., Leigh J. S., Dutton P. L., Clayton R., Biochim. Biophys. Acta, 1974, vol. 333, N 3, p. 401—408.
23. Leigh J. S., Dutton P. L., Biochim. Biophys. Acta, 1974, vol. 357, N 1, p. 67—77.
24. Соловьев К. Н., Градюшко А. Т., Цвирко М. П., Изв. АН СССР. Сер. физ., 1975, т. 39, № 8, с. 1826—1833.
25. Calvin M., Dorough G. D., J. Amer. Chem. Soc., 1948, vol. 70, N 2, p. 699—706.
26. Chibisov A. K., Photochem. a. Photobiol., 1969, vol. 10, N 5, p. 331—347.
27. Becker R. S., Kasha M., J. Amer. Chem. Soc., 1955, vol. 77, N 13, p. 3669—3670.
28. Singh J. S., Becker R. S., J. Amer. Chem. Soc., 1960, vol. 82, N 7, p. 2083—2084.
29. Fernandez J., Becker R. S., J. Chem. Phys., 1959, vol. 31, N 2, p. 467—472.
30. Теренин А. Н., в кн.: Проблемы фотосинтеза. М., 1959, с. 9—25.
31. Красновский А. А. мл., Шувалов В. А., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., ДАН СССР, 1971, т. 199, № 5, с. 1181—1184.
32. Красновский А. А. мл., Романюк В. А., Литвин Ф. Ф., ДАН СССР, 1973, т. 209, № 4, с. 965—968.
33. Красновский А. А. мл., Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф., ДАН СССР, 1974, с. 216, № 6, с. 1406—1409.
34. Красновский А. А. мл., Литвин Ф. Ф., Изв. АН СССР. Сер. физ., 1975, т. 39, № 9, с. 1968—1971.
35. Красновский А. А. мл., Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф., ДАН СССР, 1975, т. 225, № 1, с. 207—210.
36. Красновский А. А. мл., Лебедев Н. Н., Тез. докл. XII Междунар. ботан. конгр., Л., 1975, т. 2, с. 427.
37. Weawer E. C., Ann. Rev. Plant Physiol., 1968, vol. 19, p. 283—294.
38. Parson W. W., Cogdell R. J., Biochim. Biophys. Acta, 1975, vol. 416, N 1, p. 105—149.
39. Brody S. S., Nevell G., Castner T., J. Phys. Chem., 1960, vol. 64, N 5, p. 554—557.
40. Холмогоров В. Е., Теренин А. Н., ДАН СССР, 1961, т. 137, № 1, с. 199—203.

41. Katz J. J., Ballschmiter R., Garcia-Morin M., Strain H. H., Uphaus R. A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, vol. 60, N 1, p. 100—107.
42. Умрихина А. В., Голубев И. Н., Каюшин Л. П., Красновский А. А., Биофизика, 1964, т. 9, № 4, с. 423—427.
43. Теренин А. Н., Холмогоров В. Е., в кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза. М., 1965, с. 5—25.
44. Холмогоров В. Е., Теренин А. Н., ДАН СССР, 1962, т. 146, № 3, с. 652—656.
45. Холмогоров В. Е., Сидоров А. Н., Теренин А. Н., ДАН СССР, 1962, т. 147, № 4, с. 954—957.
46. Anderson A. F. H., Calvin M., Nature, 1962, vol. 194, N 4825, p. 285—286.
47. Anderson A. F. H., Calvin M., Nature, 1963, vol. 199, N 4890, p. 241—243.
48. Sherman G., Fujimori E., Nature, 1968, vol. 219, N 5152, p. 375—378.
49. Смаллер Б., в кн.: Свободные радикалы в биологических системах. М., 1963, с. 365—374.
50. Красновский А. А., Войновская К. К., ДАН СССР, 1954, т. 96, № 6, с. 1209—1212.
51. Norris J. R., Uphaus R. A., Crespi H. L., Katz J. J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, vol. 68, N 3, p. 625—628.
52. Холмогоров В. Е., ДАН СССР, 1971, т. 200, № 2, с. 402—405.
53. Katz J. J., Norris J. R., Current Topics in Bioenergetics, 1973, vol. 5, N 1, p. 41—75.
54. Stauienda A., Z. phys. Chem. (Leipzig), 1965, Bd 229, N 3, S. 257—272.
55. Fuhrhop J. H., Mauzerall D., J. Amer. Chem. Soc., 1969, vol. 91, N 15, p. 4174—4181.
56. Felton R. H., Dolphin D., Borg D. C., Fajer J., J. Amer. Chem. Soc., 1969, vol. 91, N 1, p. 196—198.
57. Fajer J., Borg D. C., Forman A., Felton R. H., Dolphin D., Vegh H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, vol. 71, N 3, p. 994—998.
58. Borg D. C., Fajer J., Felton R. H., Dolphin D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, vol. 67, N 2, p. 813—820.
59. McElroy J. D., Feher G., Mauzerall D. C., Biochim. Biophys. Acta, 1969, vol. 172, N 1, p. 180—183.
60. McElroy J., Feher G., Mauzerall D. C., Biochim. Biophys. Acta, 1972, vol. 267, N 2, p. 363—374.
61. Умрихина А. В., Красновский А. А., ДАН СССР, 1964, т. 155, № 4, с. 904—907.
62. Hush N. S., Rowlands J. R., J. Amer. Chem. Soc., 1967, vol. 89, N 12, p. 2976—2979.
63. Маслов В. Г., Сидоров А. Н., Холмогоров В. Е., в кн.: Молекулярная фотоника. Л., 1970, с. 208—221.
64. Синяков Г. Н., Гуринович Г. П., Маслов В. Г., Сидоров А. Н., Журн. прикл. спектр., 1971, т. 14, № 5, с. 849—854.
65. Сидоров А. Н., Маслов В. Г., Журн. теор. и экспер. химии, 1972, т. 8, № 10, с. 828—831.
66. Холмогоров В. Е., Маслов В. Г., Опт. и спектр., 1971, т. 31, № 2, с. 195—199.
67. Синяков Г. Н., Позняк А. Л., Гуринович Г. П., Журн. прикл. спектр., 1972, т. 16, № 4, с. 732—735.
68. Fajer J., Borg D. C., Forman A., Dolphin D., Felton R. H., J. Amer. Chem. Soc., 1973, vol. 95, N 8, p. 2739—2741.
69. Katz J. J., Acton J. F., J. Amer. Chem. Soc., 1973, vol. 95, N 8, p. 2738—2739.
70. Красновский А. А., Усп. химии, 1960, т. 29, № 6, с. 736—759.

71. Красновский А. А., Умрихина А. В., ДАН СССР, 1955, т. 104, № 6, с. 882—885.
72. Linschitz H., Weissman S. I., Arch. Biochem. Biophys., 1957, vol. 67, N 2, p. 491—492.
73. Красновский А. А., Умрихина А. В., Биофизика, 1958, т. 3, № 5, с. 547—557.
74. Бубнов Н. Н., Красновский А. А., Умрихина А. В., Цепалов В. Ф., Шляпинтох В. Я., ДАН СССР, 1960, т. 5, № 2, с. 121—126.
75. Fujimori E., Tavla M., Nature, 1965, vol. 208, N 5005, p. 78—79.
76. Banerjee A., Tollin G., Photochem. a. Photobiol., 1966, vol. 5, N 4, p. 315—322.
77. White R. A., Tollin G., J. Amer. Chem. Soc., 1967, vol. 89, N 5, p. 1253—1257.
78. Cho D., Tollin G., Photochem. a. Photobiol., 1968, vol. 8, N 4, p. 317—329.
79. White R. A., Tollin G., Photochem. a. Photobiol., 1971, vol. 14, N 1, p. 15—42.
80. Harbour J. R., Tollin G., Photochem. a. Photobiol., 1974, vol. 19, N 1, p. 69—74.
81. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., ДАН СССР, 1965, т. 163, № 2, с. 491—494.
82. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., Биофизика, 1966, т. 11, № 5, с. 796—804.
83. Рихирева Г. Т., Умрихина А. В., Каюшин Л. П., Красновский А. А., в кн.: Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия. М., 1967, с. 113—118.
84. Холмогоров В. Е., Бобровский А. П., в кн.: Проблемы биофотохимии. М., 1973, с. 92—103.
85. Бобровский А. П., Маслов В. Г., Сидоров А. Н., Холмогоров В. Е., ДАН СССР, 1970, т. 195, № 2, с. 384—387.
86. Бобровский А. П., Холмогоров В. Е., ЖФХ, 1973, т. 47, № 7, с. 1740—1743.
87. Бобровский А. П., Холмогоров В. Е., Биофизика, 1974, т. 19, № 4, с. 50—55.
88. Mauzerall D., Feher G., Biochim. Biophys. Acta, 1964, vol. 79, N 2, p. 430—432.
89. Возняк В. М., Ким В. А., Евстигнеев В. Б., в кн.: Итоги исследования механизма фотосинтеза. Пущино, 1974, с. 33—36.
90. Ким В. А., Возняк В. М., Евстигнеев В. Б., Биофизика, 1975, т. 20, № 2, с. 208—213.
91. Костиков А. П. Исследование фотореакций хлорофилла в растворах методом ЭПР. Автореф. канд. дисс. Пущино, 1974. 32 с.
92. Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Красновский А. А., Биофизика, 1973, т. 19, № 3, с. 565—568.
93. Shuvalov V. A., Klimov V. V., Biochim. Biophys. Acta, 1976, vol. 440, № 3, p. 587—599.
94. Красновский А. А., Войновская К. К., ДАН СССР, 1951, т. 81, № 5, с. 879—882.
95. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., ДАН СССР, 1963, т. 150, № 6, с. 1378—1381.
96. Красновский А. А., Дроздова Н. Н., ДАН СССР, 1964, т. 158, № 3, с. 730—733.
97. Дроздова Н. Н., Красновский А. А., Биохимия, 1965, т. 30, № 3, с. 605—618.
98. Tollin G., Green G., Biochim. Biophys. Acta, 1962, vol. 60, N 3, p. 524—538.

99. Tollin G., Green G., Biochim. Biophys. Acta, 1963, vol. 66, N 3, p. 303—318.
100. Tollin G., Chatterjee K. K., Green G., Photochem. a. Photobiol., 1965, vol. 4, N 3, p. 593—601.
101. Harbour J. R., Tollin G., Photochem. a. Photobiol., 1974, vol. 19, N 2, p. 163—167.
102. Бобровский А. П., Холмогоров В. Е., Опт. и спектр., 1971, т. 30, № 1, с. 32—38.
103. Евстигнеев В. Б., Садовникова Н. А., Костиков А. П., Грибова З. П., Каюшин Л. П., Биофизика, 1971, т. 16, № 3, с. 431—436.
104. Евстигнеев В. Б., Садовникова Н. А., Костиков А. П., Каюшин Л. П., ДАН СССР, 1972, т. 203, № 6, с. 1343—1346.
105. Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Бегичев В. Н., Красновский А. А., ДАН СССР, 1975, т. 221, № 4, с. 974—977.
106. Бобровский А. П., Холмогоров В. Е., Журн. прикл. спектр., 1973, т. 18, № 4, с. 706—713.
107. Ким В. А., Возняк В. М., Евстигнеев В. Б., Биофизика, 1974, т. 19, № 6, с. 992—996.
108. Красновский А. А., Пушкина Е. М., Дроздова Н. Н., Бубличенко Н. В., Умрихина А. В., ДАН СССР, 1975, т. 221, № 6, с. 1457—1460.
109. Красновский А. А., Бокучава Е. М., Дроздова Н. Н., ДАН СССР, 1973, т. 211, № 4, с. 981—984.
110. Бокучава Е. М., Дроздова Н. Н., Красновский А. А., ДАН СССР, 1974, т. 39, № 1, с. 188—196.
111. Дроздова Н. Н., Умрихина А. В., Пушкина Е. М., Красновский А. А., ДАН СССР, 1975, т. 225, № 5, с. 1198—1201.
112. Бобровский А. П., Холмогоров В. Е., ДАН СССР, 1973, т. 208, № 6, с. 1472—1476.
113. Костиков А. П., Садовникова Н. А., Евстигнеев В. Б., Каюшин Л. П., Биофизика, 1974, т. 19, № 2, с. 244—248.
114. Возняк В. М., Ким В. А., Евстигнеев В. Б., Биофизика, 1975, т. 20, № 3, с. 406—410.
115. Блюменфельд Л. А., Гольдфельд М. Г., Цапин А. И. Парамагнитные центры и заряды в световой стадии бактериального фотосинтеза и в первой фотореакции высших растений. Черноголовка, 1975.
116. Блюменфельд Л. А., Гольдфельд М. Г., Цапин А. И. Парамагнитные центры и заряды во второй фотореакции и в электронном транспорте между фотосистемами высших растений. Черноголовка, 1975.

УДК 577.3

СВЕТОЗАВИСИМОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ ВОДОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ И ХРОМАТОФОРАХ: ДЕЙСТВИЕ НАГРЕВАНИЯ, РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ДЕТЕРГЕНТОВ

Е. В. ПАКШИНА, М. Г. ШАПОШНИКОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Проводилось сравнительное изучение влияния нагревания, органических растворителей, детергентов на светозависимое поглощение ионов водорода в хлоропластах и хроматофорах и связанное с этим фотофосфорилирование. Показано, что мембранная структура хроматофоров гораздо устойчивее, чем у тилакоидов хлоропластов. Обнаружено явление активации функции ΔpH в хроматофорах в присутствии небольших концентраций диэтилового эфира и детергентов. Влияние перечисленных воздействий следует связать в большей степени с изменением физико-химических свойств мембран, чем с непосредственным повреждением цепи фотосинтетического переноса электрона.

Способность изолированных хлоропластов и хроматофоров поглощать ионы водорода из среды при освещении отражает работу цепи переноса электрона и в значительной мере связана с интактностью мембран фотосинтезирующих структур [1, 2]. Влияние различных воздействий на эту функцию дает возможность судить не только о степени повреждения электронтранспортной цепи и об изменении состояния пигмент-белок-липидного комплекса, но и о сохранении естественной организации мембран. Кроме того, проблема реконструирования фотосинтезирующей системы из ее компонентов предполагает знание путей воздействия дезинтегрирующих агентов на функции мембран.

В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния нагревания, органических растворителей, детергентов на светозависимое поглощение ионов водорода в хлоропластах и хроматофорах и связанное с этим фотофосфорилирование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хлоропласты выделяли из 2-недельных проростков гороха сорта Победитель в среде, содержащей 0,4 М сахарозу, 0,01 М NaCl, бычий альбумин (0,4 мг/мл), 0,005 М трис, pH 8,3 [3]. Используемые хлоропласты по классификации Холла [4] соответствуют классу С. Хроматофоры выделяли из клеток пурпурных фотосинтезирующих бактерий трехсуточной культуры *Rhodospirillum rubrum*, выращенной анаэробно на среде, описанной в работе [5]. Клетки бактерий, суспендированные в 0,05 М трисе, pH 8,0, разрушали на дезинтеграторе УЗДН-1 (15 кГц, 0,4 А, 2 раза по 5 с), а затем центрифугировали при 11 000 *g* с последующим осаждением хроматофоров из супернатанта при 144 000 *g*. Препараты хранили при температуре жидкого азота (—196°) в присутствии 10%-глицерина [6].

Светоиндуцированные изменения pH измеряли стеклянным электродом [3, 7] с помощью pH-метра ЛПМ-60 М, сигнал регистрировался на самописце типа КСП-4. Образцы освещали 1—2 мин на воздухе при температуре 20° лампой накаливания 750 Вт через красные светофильтры, пропускающие свет в главной полосе поглощения пигментов (КС-13 в опытах с хлоропластами и КС-19 — с хроматофорами), инфракрасную часть спектра устраняли фильтром СЗС-14; интенсивность света $\geqslant 10^6$ эрг/см^2·с).

Для измерений обратимого поглощения ионов водорода (обозначаемого в работе как Δ pH) хлоропласты или хроматофоры суспендировали в 0,035 М NaCl, исходное

значение pH 6,0—6,5. Фотофосфорилирование определяли по необратимому изменению pH в ходе реакции. Хлоропласты суспендировали в среде, содержащей 0,004 M KH_2PO_4, 0,004 M $MgCl_2$, 0,028 M NaCl, 0,004 M ADP, $4 \cdot 10^{-5}$ M феназинметосульфат (ФМС), 0,005 M трис, pH 8,3. Концентрация хлорофилла или бактериохлорофилла в измеряемых образцах варьировала от 20 до 200 мкг/мл.

Обычно наблюдаемые величины обратимых изменений pH в хлоропластах и хроматофорах и необратимого изменения pH в хлоропластах при фотофосфорилировании представлены на рис. 1. В условиях, когда фосфорилирования нет (рис. 1, *Б*) и наблюдаются светоиндуцированные обратимые изменения pH, начальный наклон кривой изменения pH при включении света характеризует скорость вхождения ионов водорода в мембрану; дальнейшее отклонение от прямолинейности отражает соотношение скоростей выше названной прямой реакции и обратной реакции (выход ионов

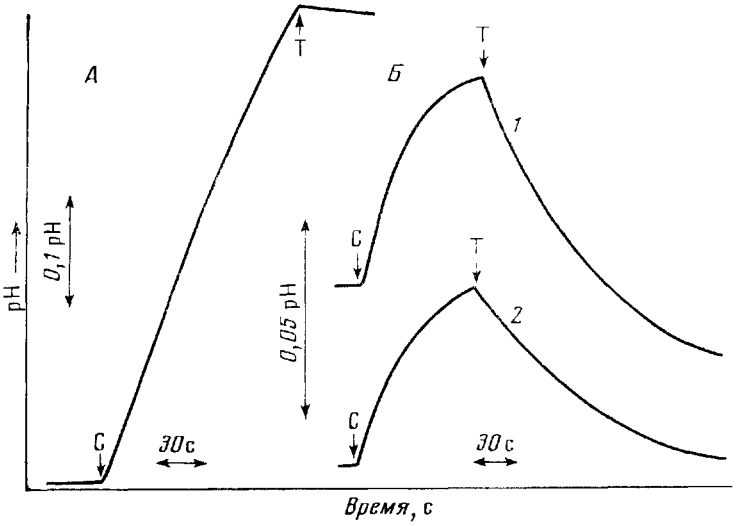


Рис. 1. Изменения pH при фотофосфорилировании в хлоропластах (*А*) (концентрация хлорофилла 13 мкг/мл) и при светоиндуцированном поглощении ионов водорода в отсутствие АТР-образующей системы (*Б*)

1 — в хлоропластах (концентрация хлорофилла 50 мкг/мл); *2* — в хроматофорах (концентрация бактериохлорофилла 150 мкг/мл); С — освещение, Т — темнота

водорода из мембраны). Стационарный уровень, устанавливающийся при освещении, характеризует равновесие между скоростью вхождения и скоростью выхода ионов водорода, а снижение кривой после выключения света — скорость выхода ионов водорода из мембраны. При измерении Δ pH образцы освещали до достижения устойчивого равновесия между скоростью поглощения ионов водорода из среды и их выхода из внутритилакоидного пространства. Величину изменения pH за время освещения без воздействий использовали в качестве контроля (обычно эта величина составляла 0,05—0,2 ед. pH в зависимости от количества хлоропластов или хроматофоров); изменения pH после воздействий выражали в процентах от контроля. В связи с необратимостью процесса фотофосфорилирования скорость последнего однозначно характеризуется наклоном кривой изменения pH; необратимое изменение pH за определенный промежуток времени на прямолинейном участке подъема кривой являлось в наших экспериментах мерой фотофосфорилирования. Изменение этой величины при воздействиях также выражали в процентах от контроля. В условиях, когда есть фотофосфорилирование, стационарный уровень H^+-градиента понижается в связи с использованием ионов водорода на синтез АТР [8], и нам казалось возможным сравнивать изменения скорости фотофосфорилирования с изменением стационарного уровня обратимого изменения pH под влиянием ряда факторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние концентрации пигментов и интенсивности света на ΔpH. Величина Δ pH в суспензиях хлоропластов и хроматофоров линейно зависит от содержания хлорофилла или бактериохлорофилла в образцах от 20 до 200 мкг/мл; при увеличении концентрации пигментов выше 200 мкг/мл наблюдается отклонение от линейности.

Зависимость величины Δ pH от интенсивности возбуждающего света, измеренной с использованием нейтральных светофильтров, близка к линейной в пределах до $5 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с для хлоропластов и до 10^5 эрг/см^2·с для хроматофоров, при дальнейшем увеличении интенсивности света до $5 \cdot 10^6$ эрг/см^2·с наблюдается световое насыщение функции. В опытах использовали интенсивность света выше порога насыщения. По мере возрастания интенсивности света увеличивается амплитуда сигнала, а также скорость его образования и затухания.

Влияние кофакторов на ΔpH. Известно, что целый ряд веществ служит кофакторами фотофосфорилирования в хлоропластах. Использование этих веществ существенно как для выбора оптимальных условий

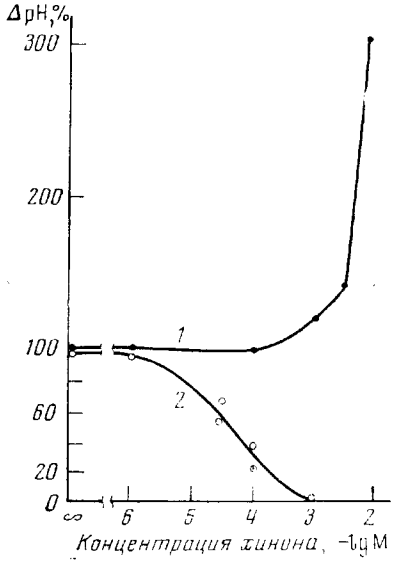


Рис. 2. Влияние *n*-бензохинона на Δ pH
1 — в хлоропластах, *2* — в хроматофорах

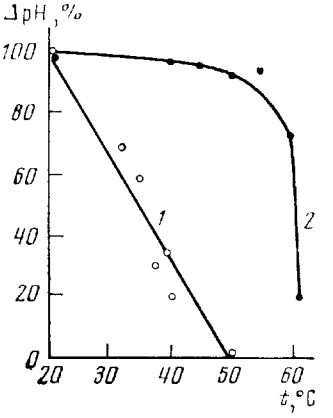


Рис. 3. Влияние нагревания на Δ pH
1 — в хлоропластах, *2* — в хроматофорах

измерения Δ pH, так и для изучения взаимосвязи функций фотофосфорилирования и Δ pH. Нами исследовалось действие рибофлавина, менадиона, метилвиологена, ФМС и *n*-бензохинона в пределах концентраций 10^{-7}—10^{-3} М. В хлоропластах рибофлавин, менадион и метилвиологен практически не влияли на величину сигнала, а ФСМ оказывал стимулирующее действие, достигая оптимума при концентрациях 10^{-6}—10^{-4} М. Добавление ФМС в хроматофоры не оказывало существенного влияния на величину Δ pH, что согласуется с представлениями о существовании циклической цепи переноса электрона в хроматофорах, функционирование которой не требует добавления экзогенных кофакторов. Сравнение действия *n*-бензохинона на Δ pH в хлоропластах и хроматофорах (рис. 2) показало, что в хлоропластах при концентрации хинона от $5 \cdot 10^{-4}$ до 10^{-2} М наблюдается активация функции, тогда как в хроматофорах при тех же концентрациях хинона происходит ингибирование поглощения ионов водорода. Хинон относится к классу неионных липидорастворимых акцепторов электрона [9] и потому хорошо встраивается в мембраны хлоропластов и хроматофоров. Включаясь в цепь переноса электронов в хлоропластах как конечный акцептор фотосистемы II и блокируя фотосистему I, он, возможно, активирует работу пластохинонового пула путем быстрого окисления восстановленных продуктов хинона (семи- или гидрохинона) акцепторами электрона фотосистемы II. Отсутствие подобных соединений в хроматофорах приводит к накоплению продуктов восста-

новления хинона, что вызывает нарушение электронного потока и транслокации ионов водорода.

Влияние нагревания. Суспензии хлоропластов или хроматофоров нагревали 5 мин при заданной температуре; затем измеряли ΔpH и фотофосфорилирование при 20°. Результаты опытов представлены на рис. 3. Обращает на себя внимание бо́льшая термоустойчивость хроматофоров. Если при нагревании хлоропластов в области от 30 до 50° происходит монотонное падение функции до полного ее ингибирования при 50°, то в случае хроматофоров повреждение функции при 50° не превышает 10%.

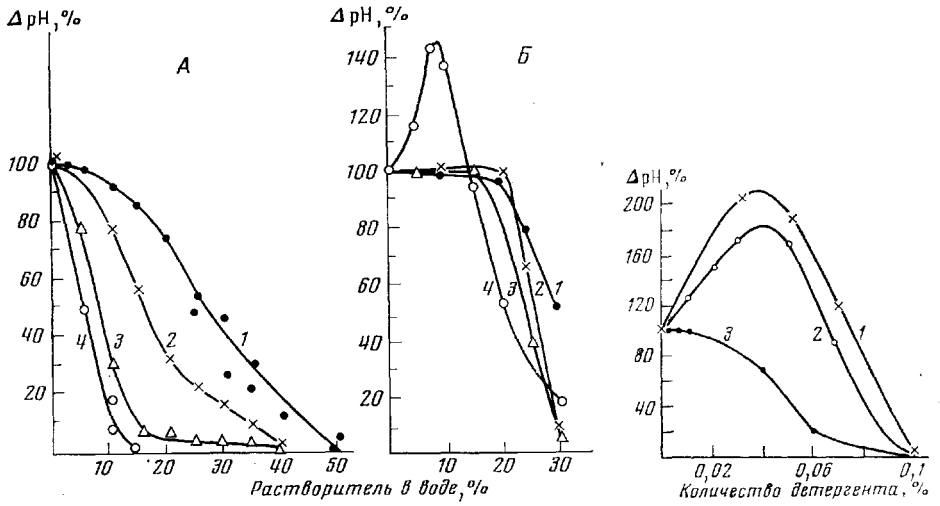


Рис. 4 Рис. 5

Рис. 4. Влияние растворителей на Δ pH в хлоропластах (*А*) и хроматофорах (*Б*) *1* — диметилсульфоксид, *2* — метиловый спирт, *3* — этиловый спирт, *4* — диэтиловый эфир

Рис. 5. Влияние детергентов на Δ pH в хроматофорах *1* — тритон X-100, *2* — CTAB, *3* — DS-Na

Резкое ингибирование поглощения ионов водорода в хроматофорах наступало при 60°. Различие в ходе кривых термоинактивации хлоропластов и хроматофоров свидетельствует не только о большей термолабильности первых, но также указывает на то, что причины повреждения в сравниваемых структурах могут быть различными. Существует мнение, что наиболее термолабильным звеном хлоропластов является участок цепи переноса электронов от воды к фотосистеме II [10]. В хроматофорах вследствие более простой структурной организации мембран и цепи переноса электрона температурная дезорганизация может проявляться в меньшем числе потенциально лабильных звеньев и термоинактивация Δ pH, очевидно, связана с нарушением физико-химических свойств мембран при нагревании.

Действие органических растворителей. На рис. 4, *А* представлено ингибирующее влияние ряда растворителей на Δ pH в хлоропластах. Наименьшее подавление исследуемой функции наблюдалось с диметилсульфоксидом, наибольшее — с диэтиловым эфиром. Хроматофоры оказались более устойчивыми к действию растворителей (рис. 4, *Б*). Так, диэтиловый эфир в концентрации 8% (предельная растворимость в воде), снижая Δ pH и фотофосфорилирование в хлоропластах, не оказывал действия на Δ pH в хроматофорах; более того, мы обнаружили увеличение Δ pH в хроматофорах в присутствии эфира. Что касается действия на хроматофоры других растворителей, то все они практически не влияли на функцию Δ pH в интервале до 20%; при дальнейшем

увеличении концентрации растворителя происходило резкое ингибирование функции.

Действие детергентов. В связи с широким использованием детергентов для выделения фотохимически активных фрагментов хлоропластов и хроматофоров представляет интерес изучение действия этих веществ на функции фотосинтетического аппарата. Неионогенный детергент тритон X-100 уже при концентрации 0,005% ингибировал обратимые изменения pH в хлоропластах на 80% и полностью подавлял функцию при концентрации 0,01%. Аналогичное действие на Δ pH оказывали ионогенные детергенты: анионоактивный — додецилсульфат натрия (DS-Na) и катионоактивный — цетилтриметиламмоний бромид (CTAB). Изучение действия различных детергентов на Δ pH в хроматофорах выявило их значительно бóльшую устойчивость по сравнению с хлоропластами (рис. 5). Ингибирование функции наступало лишь при концентрации детергентов 0,1%, что на порядок превышает ингибирующее действие этих детергентов в хлоропластах. Следует обратить внимание на явление активирования функции Δ pH в хроматофорах под влиянием тритона X-100 и CTAB с оптимумом действия детергентов при концентрации около 0,03%.

Влияние инактивирующих агентов на ΔpH хлоропластов в присутствии диурона. Предполагается, что наиболее уязвимым звеном электронтранспортной цепи хлоропластов при действии на них инактивирующих агентов является участок, связанный с фотосистемой II. Обнаруженная нами бóльшая устойчивость хроматофоров могла бы быть объяснена отсутствием у них кислородвыделяющей системы. Добавляя диурон (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), который является ингибитором электронного транспорта на уровне первичного акцептора электронов фотосистемы II, мы надеялись отделить участок электронтранспортной цепи хлоропластов, сходный с системой переноса электронов в хроматофорах. В этом случае в качестве доноров электрона использовали систему дихлорфенолиндофенол-аскорбат натрия или ФМС-аскорбат натрия. Однако нагревание хлоропластов от 20 до 50° в присутствии диурона снижало Δ pH в той же степени, как и без диурона. При действии тритона X-100 на хлоропласты с диуроном и без него степень ингибирования Δ pH в обоих случаях также была одинаковой. Подобное сходство в ответе на повреждающие воздействия всей электронтранспортной цепи хлоропластов и ее участка, соответствующего фотосистеме I, позволяет предполагать, что различия в устойчивости хлоропластов и хроматофоров вряд ли связаны с повреждением фотосистем, а скорее обусловлены дезорганизацией белок-липидного комплекса мембран.

Сопоставление воздействий на ΔpH и фотофосфорилирование в хлоропластах. Кривая термоинактивации фотофосфорилирования в хлоропластах при нагревании их в течение 5 мин при заданной температуре и последующем измерении функции при 20° полностью соответствует кривой термоинактивации Δ pH в хлоропластах (рис. 3). Диэтиловый эфир и этанол также ингибируют в равной степени эти две функции. В присутствии 30% диметилсульфоксида фотофосфорилирование ингибируется полностью, тогда как около 40% функции Δ pH еще сохраняется. При действии детергентов более устойчивым оказалось фотофосфорилирование. Несмотря на некоторые различия в действии инактивирующих агентов на Δ pH и фотофосфорилирование, концентрации, при которых наблюдается полное ингибирование функций, совпадают.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование воздействий, нарушающих молекулярную организацию фотосинтетических мембран, можно рассматривать как один из подходов к выявлению функциональной зависимости между фотофосфорилиро-

ванием, фотоиндуцированным поглощением ионов водорода и транспортом электронов. Особенно близка эта связь для двух первых процессов — ингибирование их оказалось сходным при термоинактивации и близко совпадающим при инактивации растворителями и детергентами.

Сопоставление функционирования электронтранспортной цепи и структурной организации хлоропластов и хроматофоров представляет интерес в плане изучения более просто организованного, эволюционно более древнего аппарата фотосинтезирующих бактерий. В изолированных хроматофорах, так же как в хлоропластах, удается наблюдать светозависимое увеличение pH среды, что свидетельствует об одинаковой направленности движения ионов водорода при функционировании электронтранспортной цепи этих структур. При этом функция Δ pH обнаруживает одинаковую зависимость от содержания хлоропластов, хроматофоров и от интенсивности света. Сравнительное изучение влияния нагревания, органических растворителей и детергентов на эту функцию выявило бо́льшую устойчивость мембранной структуры хроматофоров ко всем испытанным воздействиям по сравнению с тилакоидами хлоропластов. Более того, в присутствии небольших концентраций детергентов или эфира в хроматофорах наблюдается активация Δ pH. Активации этой функции в хлоропластах нам обнаружить не удалось, хотя известны данные по активации реакции Хилла диэтиловым эфиром или тритоном X-100 [11—13]. Это связано, очевидно, с большей повреждаемостью растворителями и детергентами функции Δ pH по сравнению с реакцией Хилла в хлоропластах. Обнаруженная нами устойчивость хроматофоров позволяет изучать явление активации фракции ΔpH, связанное, по-видимому, со структурными переходами в мембранах, происходящими до достижения того порога концентрационного воздействия детергента или растворителя, когда функция необратимо нарушается.

Наиболее изученным является действие детергентов на мембранные структуры фотосинтезирующих организмов. При низкой концентрации детергенты адсорбируются на мембране и проникают внутрь, нарушая естественную ориентацию липидных слоев, что ведет к изменению проницаемости мембран и осмотического равновесия [14]. При более высокой концентрации детергенты встраиваются в пигмент-фосфолипидные слои, вызывая солюбилизацию мембраны. Органические растворители оказывают более мягкое ингибирующее действие на Δ pH и фотофосфорилирование по сравнению с детергентами. Механизм действия органических растворителей на фотосинтетические структуры еще недостаточно изучен. Однако можно предполагать, что и растворители действуют на липидные компоненты мембраны. В пользу этого свидетельствует тот факт, что в хлоропластах, потерявших способность осуществлять фотосинтетический транспорт электронов после обработки органическими растворителями, восстанавливается активность обеих фотосистем после добавки галактолипидов [15]. Что же касается влияния нагревания, то и в этом случае, очевидно, выходит из строя наиболее термолабильное звено, по-видимому, также связанное с липидами мембран. Сравнение наших данных по инактивации Δ pH и фотофосфорилирования с результатами по ингибированию реакции Хилла [11—13] показывает, что влияние перечисленных воздействий следует связать в большей степени с физико-химическими свойствами мембран, чем с непосредственным повреждением цепи переноса электрона. Однако для выяснения механизма активирующего и ингибирующего действия растворителей и детергентов требуются дополнительные исследования.

В заключение следует отметить, что световые изменения pH могут быть использованы в качестве практического критерия функционирования мембранной системы структур фотосинтезирующих организмов и их фотобиохимической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Neumann J., Jagendorf A. T. (1964) Arch. Biochem. and Biophys. 107, 109—119.
2. Von Stedingk L. V. (1967) Arch. Biochem. and Biophys. 120, 537—541.
3. Зеленский М. И., Сахарова О. В. (1973) в сб. Методы комплексного изучения фотосинтеза, вып. 2, стр. 182—217, Л.
4. Hall D. O. (1972) Nature New. Biol. 235, 125—126.
5. Кондратьева Е. Н. (1963) Фотосинтезирующие бактерии, Изд-во АН СССР, М.
6. Бекина Р. М., Красновский А. А. (1968) Биохимия 33, 178—181.
7. Nishimura M., Ito T., Chance B. (1962) Biochim. et biophys. acta, 59, 177—182.
8. Dilley R. A., Shavit N. (1967) Biochim. et biophys. acta, 162, 86—96.
9. Saha S., Onitrakul R., Izawa S., Good N. E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3204—3209.
10. Yamashita T., Butler W. L. (1968) Plant Physiol. 43, 2037—2041.
11. Красновский А. А., Брин Г. П. (1968) Докл. АН СССР, 179, 726—729.
12. Брин Г. П., Красновский А. А., Комарова Л. Ф. (1971) Докл. АН СССР 197, 713—716.
13. Чан Ван Ни, Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А. (1977) Биохимия 42, № 7.
14. Helenius A., Simons K. (1975) Biochim. et biophys. acta 415 29—79.
15. Krupa Z., Baszynski T. (1975) Biochim. et biophys. acta, 408, 26—34.

Поступила в редакцию
18.II.1977

LIGHT-DEPENDENT UPTAKE OF HYDROGEN IONS IN CHLOROPLASTS AND CHROMATOPHORES: EFFECTS OF HEATING, SOLVENTS AND DETERGENTS

E. V. PAKSHINA, M. G. SHAPOSHNIKOVA and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effects of heating, organic solvents and detergents on the light-dependent hydrogen ion uptake in chloroplasts and chromatophores and the coupled photophosphorylation were compared. It was shown that the membrane structure of the chromatophores is much more stable than that of the chloroplast thylacoids. The activation of the pH function in the chromatophores in the presence of low concentrations of diethyl ether and detergents was noted. The effects observed may be due to the changes in the physico-chemical properties of the membranes rather than to the direct effect on the photosynthetic electron transfer chain.

Доклады Академии наук СССР
1977. Том 237, № 1

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

М. Г. РАХИМБЕРДИЕВА, Н. В. КАРАПЕТЯН,
академик А. А. КРАСНОВСКИЙ

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ ИНДУКЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗЕЛЕНЕЮЩИХ ЛИСТЬЕВ ФАСОЛИ

Исследования последних лет позволили показать, что сложная кинетика переменной флуоресценции зеленых растений и изолированных хлоропластов при 20° отражает функционирование фотосистемы 2 и опосредованно — всей цепи переноса электрона ([1], [2]). Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлоропластов при −196° не обнаруживают переходной кинетики и мало обратимы ([3], [4]); так как в этих условиях перенос электрона к вторичным акцепторам блокирован, то эти изменения выхода флуоресценции обусловлены функционированием только реакционных центров фотосистемы 2. На это же указывает тот факт, что переменная флуоресценция хлоропластов при −196° исчезает при подавлении активности реакционных центров фотосистемы 2 ([5], [6]). Низкотемпературная переменная флуоресценция хлоропластов обусловлена усилением испускания хлорофиллов при 685 и 695 нм ([7]). Таким образом, переменная флуоресценция хлоропластов при −196° может служить тестом на функциональную активность реакционных центров фотосистемы 2.

При исследовании биосинтеза фотосинтетического аппарата возникает вопрос о начале функционирования фотосистем и его связи с состоянием пигментного аппарата. В отличие от фотосистемы 1, вопрос о механизме биосинтеза фотосистемы 2 мало исследован. Ранние работы указывали на то, что активность фотосистемы 2 обнаруживается через 2,5—3 часа зеленения этиолированных листьев ([8], [9]). Однако затем было показано ([10]), что эта активность у зеленеющих листьев может быть найдена гораздо раньше (после освещения этиолированных листьев 1 мсек. импульсами с темновыми интервалами в несколько минут, суммарная длительность освещения около 0,5 сек.). Оказалось, что длительное освещение этиолированных листьев необходимо для синтеза переносчиков электрона между реакционным центром фотосистемы 2 и местом разложения воды ([10]).

Так как низкотемпературная индукция флуоресценции отражает функционирование реакционных центров фотосистемы 2, мы использовали этот тест для исследования начала появления функциональной активности этих реакционных центров и связи их формирования с появлением определенной формы хлорофилла в процессе зеленения этиолированных листьев.

Объектом исследования служили этиолированные 8—10-дневные проростки фасоли, зеленевшие в режиме постоянного (люминесцентные лампы, 4000 лк) или импульсного освещения (вспышки длительностью 1,5 мсек. через 12 мин.). Спектры низкотемпературной флуоресценции листьев измеряли с помощью спектрофлуориметра MPF-4 фирмы «Хитачи». Активность фотосистемы 2 зеленеющих листьев контролировали по скорости выделения кислорода полярографически и по величине переменной флуоресценции при 20° ([9]). Индукцию флуоресценции ($\lambda > 660$ нм) зеленеющих листьев при 20° и при −196° измеряли с помощью сконструированного нами двухлучевого флуориметра ([11]).

Показано, что листья, зеленевшие в режиме импульсного освещения, после 100—300 вспышек характеризуются значительной переменной флуоресценцией при −196°, составляющей 40—50% от постоянной флуоресцен-

ции (рис. 1*А*, *1*). В соответствии с данными ([12], [13]), такие листья не были способны к выделению кислорода и индукции флуоресценции при 20°, но обнаруживали эту способность после 5—10-минутного освещения постоянным светом (рис. 1*Б*). Величина низкотемпературной переменной флуоресценции практически одинакова до и после дополнительного освещения этих листьев постоянным светом (рис. 1*А*).

Следовательно, наши данные подтверждают предположение, сделанное ранее на основании косвенных данных ([10], [14]), что у листьев, зеленевших при импульсном освещении, реакционный центр фотосистемы 2 уже сформирован, а дополнительное освещение постоянным светом необходимо лишь для активации переноса электронов к реакционному центру. Отметим, что у таких листьев при 20° наблюдается сначала падение выхода флуоресценции (рис. 1*Б*, *2*) и лишь затем развивается индукция флуоресценции, приближающаяся по кинетике к индукции зеленого листа.

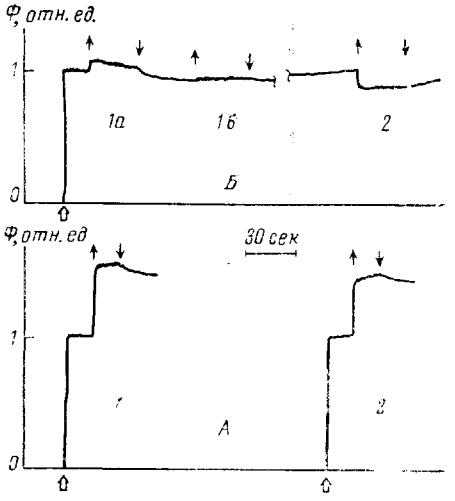


Рис. 1. Кинетика переменной флуоресценции этиолированных листьев фасоли, зеленевших в режиме импульсного освещения при —196° (*А*) и при 20° (*Б*): *1* — освещение действующим светом (*а* — 1-е освещение, *б* — 2-е — 4-е освещения); *2* — после 5 мин. освещения действующим светом и 5 мин. темноты. Здесь и на рис. 2: стрелка вверх — включение, стрелка вниз — выключение действующего света, светлая стрелка — включение возбуждающего света

Последовательность появления переходной кинетики в индукции флуоресценции при 20° сходна у листьев, зеленевших в режиме импульсного освещения с последующей кратковременной подсветкой постоянным светом, и листьев, зеленевших в режиме только постоянного освещения. В обоих случаях при включении действующего света первоначальное падение выхода флуоресценции (рис. 2, *2*) сменяется подъемом флуоресценции и появлением сложной переходной кинетики (рис. 2, *3*).

Существенно, что у листьев, зеленевших как в импульсном режиме, так и при освещении постоянным светом, низкотемпературная переменная флуоресценция обнаруживается раньше индукции при 20° (и раньше других проявлений активности фотосистемы 2). Это явление указывает на то, что независимо от режима освещения реакционный центр фотосистемы 2 формируется раньше, чем его окружение в цепи переноса электрона.

Для решения вопроса о том, с какими формами хлорофилла связано появление реакционного центра фотосистемы 2, мы параллельно измеряли спектры флуоресценции при —196° и возникновение низкотемпературной переменной флуоресценции у листьев проростков, выращенных в режиме постоянного или импульсного освещения. Спектры флуоресценции листьев регистрировали через 60 мин. после последней вспышки, чтобы весь хлорофиллид, характеризующийся максимумом флуоресценции при 690 нм, полностью превратился в хлорофилл и не вносил вклада в исследуемый спектр.

Переменная флуоресценция при —196°, составляющая 10% от исходного уровня, обнаруживается через 1,5—2 часа освещения этиолированных листьев постоянным светом (4000 лк). В низкотемпературном спектре

флуоресценции таких листьев (рис. 3*а*, *2*) четко проявляется полоса при 684 нм, характерная для первой формы хлорофилла после этерификации хлорофиллида ([15]). Через 4 часа зеленения при постоянном освещении в спектре флуоресценции отмечаются максимум при 685 нм и «плечи» при 692 и 710—715 нм (рис. 3*б*, *3*). К этому моменту листья уже способны выделять кислород и обнаруживают переменную флуоресценцию при 20°, низкотемпературная переменная флуоресценция у них достигает 20—25%.

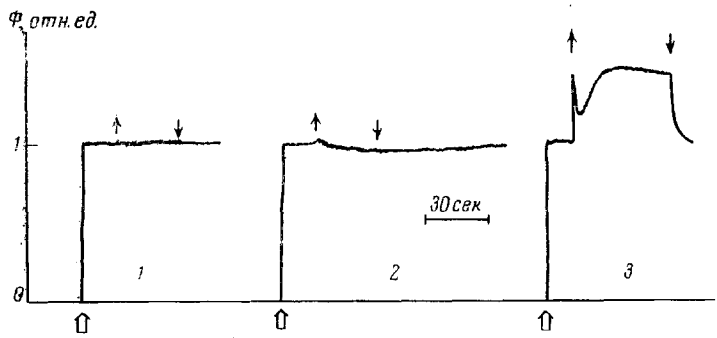


Рис. 2. Кинетика переменной флуоресценции этиолированных листьев фасоли, зеленевших при освещении постоянным светом, через 30 мин. (*1*), 1,5 часа (*2*) и 4,5 часа (*3*) освещения

У растений, выращенных в режиме импульсного освещения, в зависимости от количества импульсов в спектре флуоресценции могут наблюдаться полосы, характерные для всех форм хлорофилла. Обычно в опытах используют листья, освещавшиеся 100—300 импульсами, кратковременная

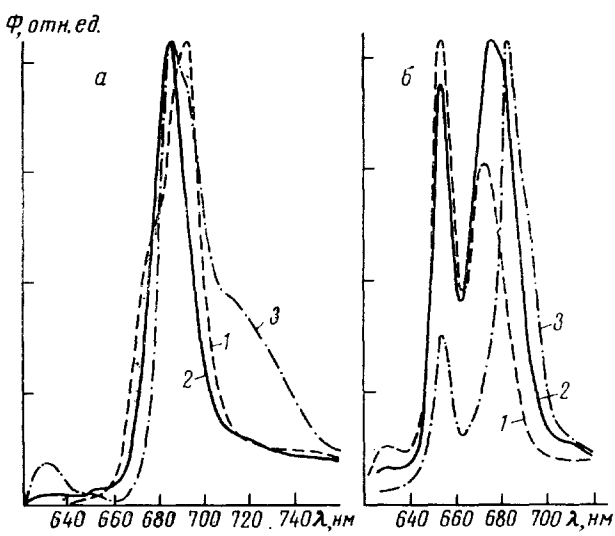


Рис. 3. Спектры низкотемпературной флуоресценции этиолированных листьев фасоли, зеленевших в режиме постоянного освещения (*а*) или освещения импульсным светом (*б*). *а*: *1* — 30 мин., *2* — 1,5 часа, *3* — 4,5 часа освещения; *б*: *1* — 5 вспышек, *2* — 15 вспышек, *3* — 100 вспышек. Возбуждающий свет 435 нм, ширина щели анализирующего монохроматора 2 нм. Спектры не исправлены на спектральную чувствительность установки

подсветка которых постоянным светом ведет к появлению активности фотосистемы 2 (выделение кислорода, индукция флуоресценции при 20° и др.). В спектре флуоресценции таких листьев обнаруживаются максимум при 685 нм и «плечи» при 695 и 710 нм (рис. 3*б*, *3*). Однако, как мы отмечали выше, переменная флуоресценция при —196° этих листьев уже составляет около 50% от постоянной, тогда как 10% переменная флуоресценция обнаруживается после 15—20 импульсов. В этот момент в спектре низкотемпературной флуоресценции на фоне ранее появившегося максимума при 678 нм обнаруживается «плечо» при 684 нм (рис. 3*б*, *2*).

У листьев, зеленевших как при импульсном, так и при постоянном освещении, обнаружение низкотемпературной переменной флуоресценции

коррелирует с появлением в спектре низкотемпературной флуоресценции полосы при 684 нм. Так как переменная флуоресценция хлоропластов обусловлена усилением испускания хлорофиллов антенны в результате перехода реакционных центров фотосистемы 2 в закрытое состояние ([6]), испускание при 684 нм может быть приписано форме хлорофилла, ближайшей к реакционному центру этой фотосистемы. Появление низкотемпературной переменной флуоресценции указывает на то, что реакционный центр фотосистемы 2 формируется, по-видимому, из этой формы хлорофилла, либо он уже сформировался ранее, а образование формы хлорофилла с испусканием при 684 нм обусловило энергетическое взаимодействие центра с хлорофиллом-светосборщиком. Не исключено, что на этой же стадии зеленения образуются реакционные центры фотосистемы 1, однако выяснение этого вопроса требует дальнейших исследований.

Интересно отметить, что в спектре низкотемпературной флуоресценции образцов, способных к индукции флуоресценции при 20° (этиолированные листья после 4 час. освещения) или потенциально к ней способных (листья после освещения 100—300 импульсами), всегда обнаруживаются полосы флуоресценции как при 684, так и при 695 нм, что указывает на необходимость для нормального функционирования фотосистемы 2 формы хлорофилла, флуоресцирующей при 695 нм.

Таким образом, переменная флуоресценция при —196° обнаруживается одновременно с появлением полосы флуоресценции при 684 нм, что указывает на то, что реакционные центры фотосистемы 2 образуются одновременно с появлением первой (в основном пути биосинтеза) формы хлорофилла и, возможно, непосредственно из этой формы. То обстоятельство, что переменная флуоресценция при —196° обнаруживается раньше, чем индукция флуоресценции при 20° и выделение кислорода, позволяет заключить, что реакционные центры фотосистемы 2 появляются раньше, чем формируется вся цепь переноса электрона.

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

Поступило
20 VII 1977

ЛИТЕРАТУРА

[1] *L. N. M. Duysens, H. E. Sweers,* In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo, 1963, p. 353. [2] *Н. В. Карапетян, В. В. Климов и др.*, Физиол. раст., т. 18, 507 (1971). [3] *N. Murata, S. Itoh, M. Okada,* Biochim. et biophys. acta, v. 325, 463 (1973). [4] *W. L. Butler, J. W. M. Visser, H. L. Simons,* Biochim. et biophys. acta, v. 325, 539 (1973). [5] *B. Kok, E. B. Gassner, H. Y. Rurainski,* Photochem. Photobiol., v. 4, 215 (1965). [6] *М. Г. Панова, В. А. Синещеков, Н. В. Карапетян.* Молек. биол., т. 10, 1175 (1976). [7] *В. В. Шубин, В. А. Синещеков, Ф. Ф. Литвин,* Биофизика, т. 21, 760 (1976). [8] *W. L. Butler,* Biochim. et biophys. acta, v. 102, 1 (1965). [9] *В. В. Климов, Ф. Ланг и др.*, Физиол. раст., т. 19, 151 (1972). [10] *R. Remy,* Photochem. Photobiol., v. 18, 223 (1973). [11] *Н. В. Карапетян, В. В. Климов,* Физиол. раст., т. 18, 223 (1971). [12] *R. J. Strasser, C. Sironval,* FEBS Letters, v. 28, 55 (1972). [13] *J. M. Michel, C. Sironval,* FEBS Letters, v. 27, 231 (1972). [14] *T. Ichikava, Y. Inoue, K. Shibata,* Biochim. et biophys. acta, v. 403, 228 (1975). [15] *F. F. Litvin, O. B. Belyaeva,* Photosynthetica, v. 5, 200 (1971).

БИОФИЗИКА

Том XXII, вып. 5 1977

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ ФОТООКИСЛЕНИИ БАКТЕРИОВИРИДИНА В МОНОМЕРНОМ И АГРЕГИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

А. В. УМРИХИНА, М. И. БЫСТРОВА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО, И. Н. МАЛЬГОШЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Методом ЭПР исследовали фотоокисление бактериовиридина в полярных и неполярных органических растворителях, содержащих мономерные и агрегированные формы пигмента. Показано светоиндуцированное образование свободных радикалов при фотоокислении бактериовиридина кислородом, сходных по параметрам сигнала ЭПР (величине g-фактора и ширине линии) с катион-радикалами, возникающими при фотоокислении пигмента *n*-бензохиноном, и в то же время отличающихся от них по кинетике и температурной зависимости. Наибольший выход радикальных продуктов в присутствии кислорода наблюдается в неполярных растворителях, где бактериовиридин образует агрегированные формы с максимумами поглощения 680 и 720 нм. Изучение кинетики фотообразования радикалов в интервале температур $+20 \div -110°$ позволило выявить разные стадии, соответствующие окислению длинноволновой и коротковолновой форм бактериовиридина, причем фотоокисление длинноволновой агрегированной формы является первой стадией фотопроцесса. Сделано заключение о том, что агрегация способствует стабилизации первичных обратимых продуктов фотоокисления бактериовиридина, имеющих природу свободных радикалов.

Бактериовиридин — пигмент зеленых серных фотосинтезирующих бактерий — сходен по своей структуре с хлорофиллом. Однако наличие фарнезола вместо фитола, отсутствие винильной и карбометоксильной групп, наличие CH_3-группы в одном из метиновых мостиков и другие структурные особенности [1] изменяют свойства бактериовиридина по сравнению с хлорофиллом и по некоторым свойствам (например, фотоокислению и способности к агрегации) сближают его с бактериохлорофиллом пурпурных бактерий.

Бактериовиридин в фотосинтезирующих клетках обладает характерной полосой поглощения в области 730—750 нм [2], тогда как в органических полярных растворителях он имеет максимум около 660 нм. В водных коллоидных растворах и твердых пленках бактериовиридин образует агрегированные формы с максимумами 720—750 нм, близкие по спектрам поглощения и люминесценции к формам интактных зеленых серных бактерий [3—8]. Агрегация бактериовиридина наблюдалась также в неполярных растворителях, таких как толуол [9] и четыреххлористый углерод [10], где пигмент имеет два максимума при 680 и 720 нм, приписываемые соответственно димерам и олигомерам по аналогии с хлорофиллом [11]. Таким образом, длинноволновый сдвиг в спектре поглощения бактериовиридина в клетках по сравнению с растворами свидетельствует о том, что в нативных клетках бактериовиридин находится в агрегированном состоянии.

В полярных растворителях мономерный пигмент с максимумом поглощения при 665 нм подвергается быстрому фотоокислению в присутствии кислорода воздуха [12]. При этом наблюдается образование фото-

продуктов, имеющих поглощение в дальней красной области при 760—770 и 850—880 нм. Агрегация бактериовиридина в водных коллоидных растворах и твердых пленках увеличивает устойчивость пигмента к фотоокислению, при этом в первую очередь окисляется агрегированная форма пигмента с более длинноволновым максимумом поглощения при 720 нм [13]. Не ясно, идет ли этот процесс путем промежуточной дезагрегации или окислению подвергается непосредственно агрегированная форма 720 нм. Обнаруженная фотохемилюминесценция бактериовиридина в присутствии кислорода свидетельствует об образовании лабильных продуктов фотоокисления [14]. Однако механизм окисления бактериовиридина кислородом воздуха систематически не исследовался. При изучении обратимого фотоокисления этого пигмента хинонами было показано, что этот процесс протекает через образование катион-радикальной формы пигмента [15].

В связи с изложенным выше следовало получить данные о первичных этапах фотоокисления бактериовиридина в разных состояниях — мономерном и агрегированном — и в первую очередь об образовании свободных радикалов в этом процессе.

Бактериовиридин был выделен из культуры бактерий Chlorobium lamicula по принятому в лаборатории методу [10]. Растворители — CCl_4, толуол, серный эфир, пиридин, этанол — тщательно очищали перед использованием и перегоняли. Измерения спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре типа РЭ-1301 в стеклянных ампулах диаметром 3—4 мм. Ампулы освещали фокусированным светом ксеноновой лампы ДКСШ-200 через красный светофильтр непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра.

Исследование действия света на растворы бактериовиридина в CCl_4, толуоле, серном эфире, этаноле, пиридине показало, что во всех исследованных растворителях наблюдается возникновение сигнала ЭПР, имеющего вид синглетной линии шириной около 9 Э и $g=2{,}00$. Сигнал ЭПР на свету возникал только в присутствии в системе кислорода воздуха и полностью отсутствовал в вакуумных условиях, это свидетельствовало об окислительном характере фотопроцесса. Других сигналов ЭПР в этих условиях обнаружено не было.

На рис. 1 приведены общий вид спектра и скорость накопления синглетного сигнала ЭПР на свету и исчезновения его в темноте в разных растворителях при —20°. Из этих данных следует, что окисление бактериовиридина кислородом воздуха во всех растворителях протекает через стадию образования свободного радикала. Наибольший выход свободных радикалов наблюдается в четыреххлористом углероде и толуоле, где пигмент находится в агрегированном состоянии.

Мы исследовали температурную зависимость образования свободного радикала бактериовиридина на свету и исчезновения его в темноте в двух разных растворителях — четыреххлористом углероде и серном эфире, где пигмент находится соответственно в агрегированном и мономерном состояниях. На рис. 2, *а* видно, что наибольшее количество свободных радикалов (порядка 10^{14}—10^{15} парамагнитных частиц) в CCl_4 образуется при —20°. Ниже температуры замерзания растворителя (—23°) реакция фотоокисления резко замедляется, а затем практически останавливается, видимо, из-за замедления и прекращения диффузии кислорода в среде. В серном эфире (рис. 2, *б*) максимальное количество свободных радикалов, хотя и меньшее по сравнению с растворами в CCl_4, образуется при —50° (температура замерзания серного эфира —117°), что также, по-видимому, обусловлено уменьшением диффузии кислорода с увеличением вязкости среды при понижении температуры. После выключения света сигнал ЭПР при температуре ниже нуля длительное время сохраняется в темноте. При положительных температурах и после размораживания образцов до комнатной температуры наблю-

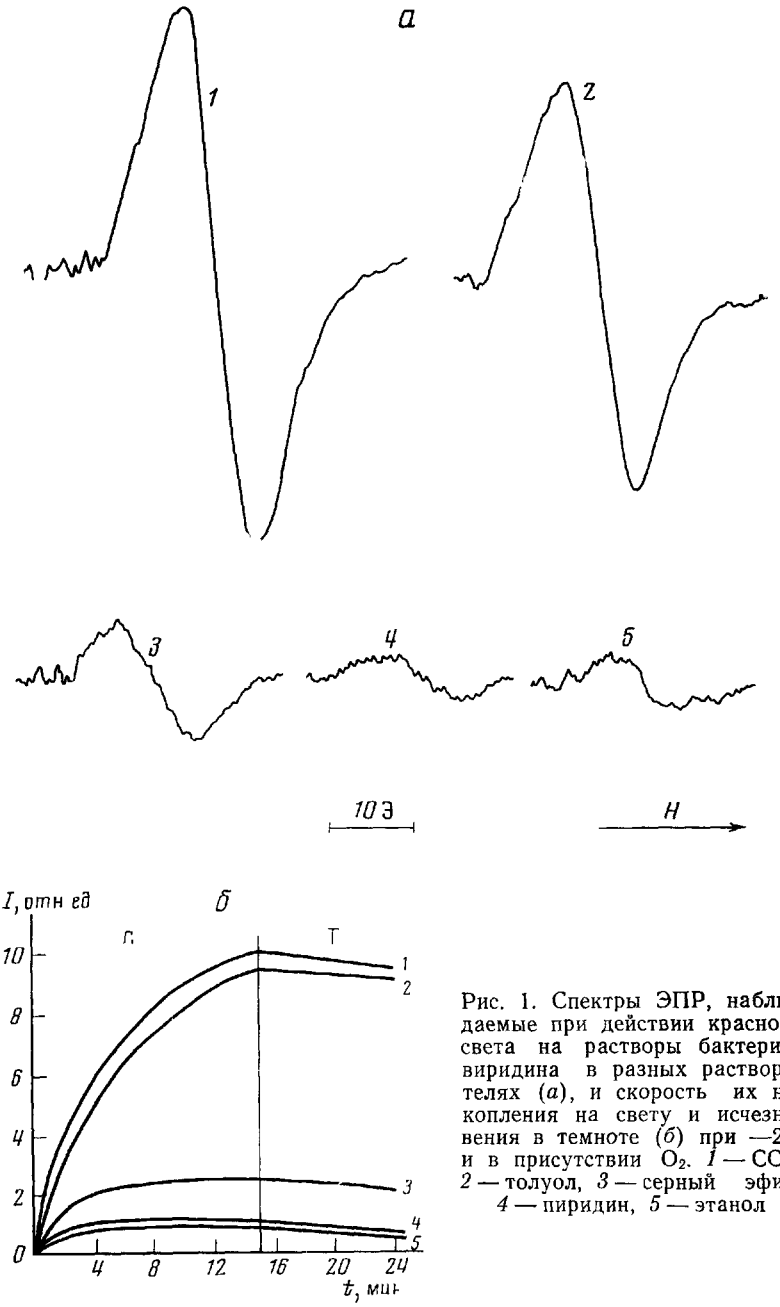


Рис. 1. Спектры ЭПР, наблюдаемые при действии красного света на растворы бактериовиридина в разных растворителях (*а*), и скорость их накопления на свету и исчезновения в темноте (*б*) при —20° и в присутствии O_2. *1* — CCl_4, *2* — толуол, *3* — серный эфир, *4* — пиридин, *5* — этанол

дается медленное уменьшение количества свободных радикалов. Конечные продукты окисления бактериовиридина непарамагнитны. Из электронных спектров поглощения бактериовиридина, измеренных до и после фотореакции, следует, что при освещении наблюдается необратимое уменьшение поглощения в исходных максимумах пигмента. В растворах CCl_4 в первую очередь «выцветает» максимум при 720 нм в соответствии с ранее полученными данными [13].

Следует отметить, что при температуре —20° для CCl_4 и —50° для серного эфира процент деструктивно разрушенного пигмента ниже, чем при более высоких температурах, тогда как количество свободных радикалов максимально при —20 и —50° для CCl_4 и серного эфира соответ-

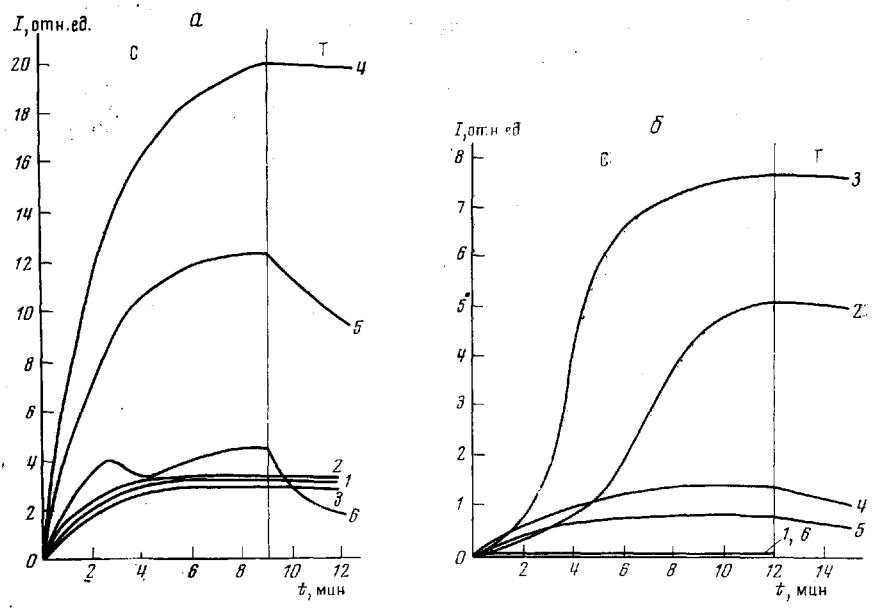


Рис. 2. Зависимость интенсивности синглетного сигнала ЭПР на свету и в темноте от температуры: *а* — CCl_4, *б* — серный эфир; *1* — —100°, *2* — —75, *3* — —50, *4* — —20, *5* — 0, *6* — +20°

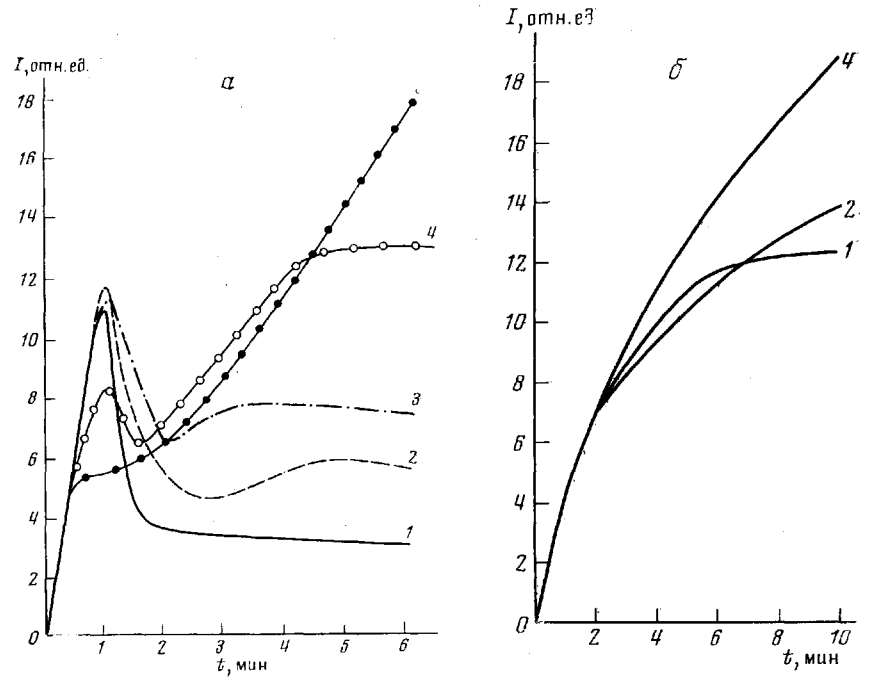


Рис. 3. Зависимость интенсивности синглетного сигнала ЭПР на свету от концентрации бактериовиридина в CCl_4: *а* — +20°, *б* — —20°; *1* — $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ М, *2* — 10^{-3} М, *3* — $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ М, *4* — 10^{-2} М, *5* — $0{,}2 \cdot 10^{-2}$ М

ственно. Из этих данных можно предположить, что стадия образования радикала обратима — свободнорадикальный продукт может либо регенерировать до исходного состояния, либо претерпевать дальнейшие превращения с образованием необратимых продуктов окисления.

Наличие нескольких одновременно идущих фотореакций в процессе фотоокисления бактериовиридина видно при измерении зависимости выхода свободных радикалов от концентрации пигмента в CCl_4 при +20 и —20° (рис. 3). Как видно из рис. 3, *а*, при +20° и концентрации пигмента $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ и 10^{-3} М на свету образуется в первые минуты освещения значительное количество свободных радикалов, которое при дальнейшем освещении резко уменьшается до определенного уровня, после

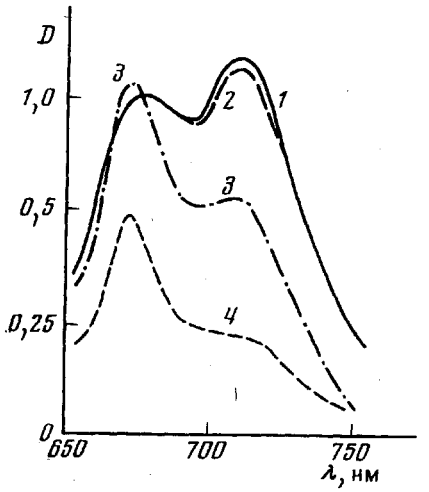


Рис. 4. Изменение электронного спектра бактериовиридина в присутствии кислорода и при —70° под действием красного света. *1* — исходный спектр, *2* — 5 мин освещения, *3* — 15 мин освещения, *4* — 30 мин освещения

чего остается без изменения (кривые *1* и *2*). С увеличением концентрации пигмента (выше 10^{-3} М) количество свободных радикалов после частичного уменьшения вновь начинает расти, достигая стационарного значения (кривые *3*—*5*). При —20° кинетика накопления свободных радикалов при всех используемых концентрациях пигмента от 10^{-4} до 10^{-2} М примерно одинакова. Возможно, что окисление бактериовиридина в CCl_4, где пигмент находится в агрегированном состоянии, при низкой температуре приводит к образованию одного радикального продукта, тогда как при +20° образуется по крайней мере два радикальных продукта. Эти радикалы могут соответствовать или продуктам последовательного превращения пигмента или последовательному окислению двух агрегированных форм с максимумами поглощения 680 и 720 нм. Форма 720 нм при этом подвергается окислению в первую очередь, что следует из наших измерений электронных спектров в ходе фотореакции (рис. 4) и соответствует ранее полученным данным [13]. Вид спектра ЭПР и его параметры (ширина линии, равная около 9 Э и $g=2{,}00$), однако, не изменяются в ходе фотореакции, свидетельствуя о том, что радикальные продукты окисления бактериовиридина кислородом воздуха сходны по своей структуре.

Природа наблюдаемого радикала не ясна. Из результатов опытов следует, что он образуется только в присутствии кислорода. Это может быть радикал типа ($Бв^{+\cdot} \cdot O_2^{-\cdot}$) или π-катион-радикал, возникающий в результате полного отрыва электрона от молекулы бактериовиридина ($Бв^{+\cdot}$), где Бв — молекула бактериовиридина.

Полученные результаты были сопоставлены с одноэлектронным обратимым фотохимическим окислением бактериовиридина *n*-бензохиноном. Освещение красным светом растворов бактериовиридина и *n*-бензохинона в этаноле в вакууме при температуре —150÷—90° приводило к возникновению синглетного сигнала ЭПР с $\Delta H=10{,}5$—11 Э и $g=2{,}00$,

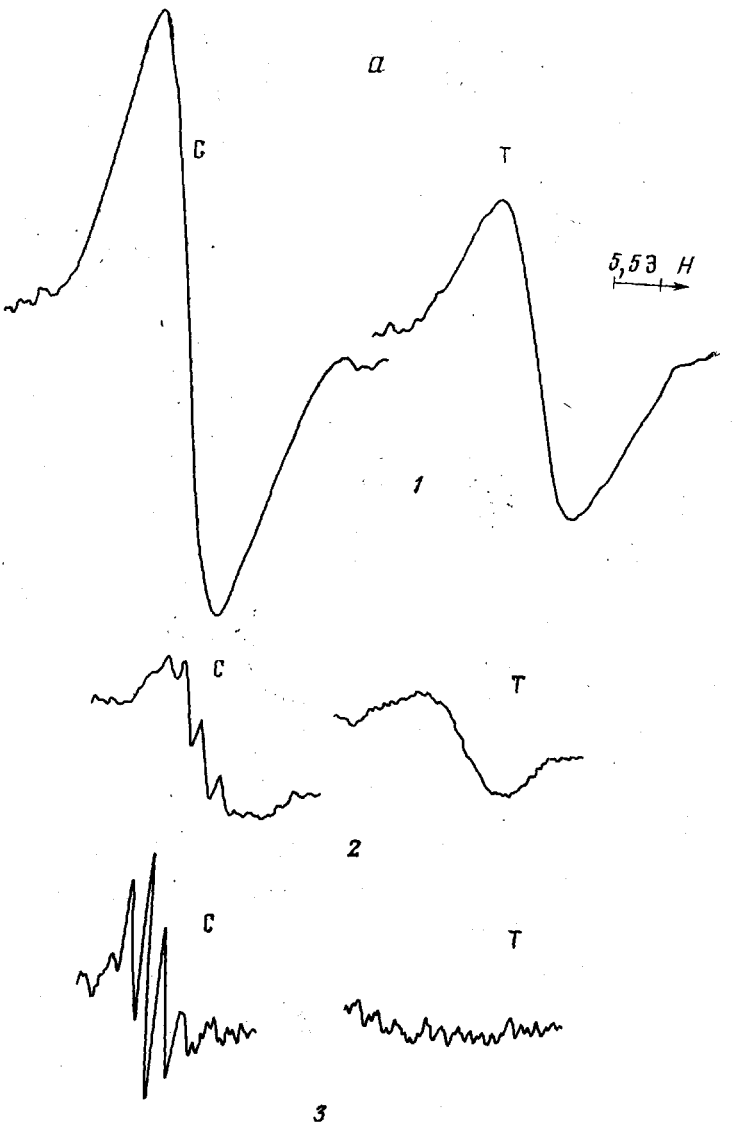
который после выключения света приблизительно за 2 мин уменьшался по амплитуде, а остающийся сигнал длительное время сохранялся в темноте (рис. 5, *а*). Время уменьшения и стабилизации этого сигнала соответствовало времени исчезновения сигнала ЭПР семихинона, возникающего при освещении белым светом раствора *п*-бензохинона в этаноле в том же интервале температур. Стабилизированный в темноте синглетный сигнал ЭПР шириной 10,5—11 Э принадлежит в соответствии с полученными нами ранее данными [16—18] π-катион-радикалу бактериовиридина. Стабилизацию катион-радикалов бактериовиридина в темноте при температуре ниже —90° следует объяснить тем, что скорость рекомбинации и диспропорционирования радикалов бактериовиридина в этих условиях меньше скорости диспропорционирования анион-радикалов *п*-бензохинона, также образующихся в реакции бактериовиридина с *п*-бензохиноном. Это дает возможность наблюдать π-катион-радикал бактериовиридина и изучать его свойства.

В случае освещения растворов бактериовиридина с *п*-бензохиноном в этаноле при —80° регистрировали небольшой сигнал ЭПР, представляющий собой наложение двух линий: синглетной линии катион-радикала бактериовиридина и пятикомпонентной линии анион-радикала *п*-бензохинона (см. рис. 5). При выключении света сигнал ЭПР семихинона исчезал из суммарного спектра и остающийся сигнал был представлен синглетным сигналом катион-радикала пигмента.

Освещение образцов при более высоких температурах приводило к возникновению только пятикомпонентного сигнала анион-радикала *п*-бензохинона, который исчезал после выключения света. Синглетный сигнал катион-радикала бактериовиридина в этих условиях не наблюдался. Мы предположили, что нестабильность продукта окисления бактериовиридина при высоких температурах связана с тем, что в этих условиях радикал окисленного пигмента претерпевает дальнейшие фотохимические превращения, приводящие к образованию непарамагнитных продуктов реакции.

Для проверки этого предположения синглетный сигнал бактериовиридина генерировали на свету при —110° и выдерживали в темноте в течение времени, достаточного для рекомбинации радикалов семихинона. После этого медленно повышали температуру и записывали спектры синглетного сигнала ЭПР. Оказалось, что в отсутствие других радикальных продуктов реакции (например, анион-радикалов окислителя) и темновых условиях синглетный сигнал катион-радикала бактериовиридина можно было регистрировать до температуры —20°. Если температуру образца быстро повысить до определенного значения, то можно проследить кинетику исчезновения при разных температурах синглетного сигнала бактериовиридина, фотоиндуцированного при —110° (рис. 5, *б*). Из этих данных следует, что при отсутствии условий, способствующих дальнейшим превращениям катион-радикальной формы бактериовиридина (свет, другие радикальные продукты реакции), эта форма довольно устойчива и ее можно наблюдать до —20°.

Сравнение результатов по измерению сигналов ЭПР при окислении бактериовиридина кислородом воздуха и *п*-бензохиноном показывает, что в обоих случаях образуются радикальные формы пигмента, характеризующиеся синглетными линиями ЭПР со сходными параметрами. Однако некоторая разница в ширине линий (около 9 Э при окислении кислородом воздуха и 10,5—11 Э — *п*-бензохиноном), различная зависимость интенсивности сигналов от температуры при накоплении их на свету и исчезновении в темноте позволяют предположить, что окисление бактериовиридина *п*-бензохиноном и кислородом приводит к образованию разных радикальных продуктов. В системе с *п*-бензохиноном — это π-катион-радикал бактериовиридина. Кроме катион-радикала пигмента в этой системе образуется также анион-радикал *п*-бензохинона.



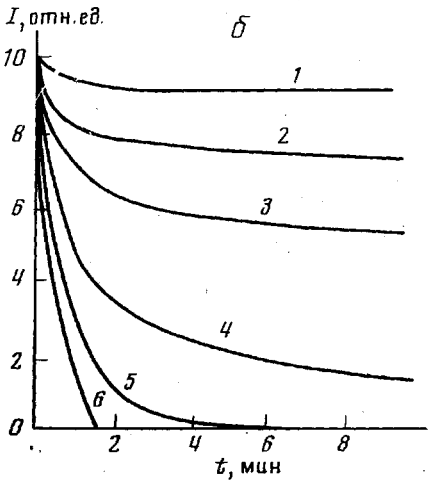


Рис. 5. Спектры ЭПР растворов бактериовиридина и *n*-бензохинона в этаноле (*а*) при освещении красным светом (С) и в темноте (Т); *1* — —100°, *2* — —80, *3* — —50° (в вакууме). Изменение в темноте амплитуды светоиндуцированного при —110° сигнала ЭПР в зависимости от температуры (*б*); *1* — —110°, *2* — —100, *3* — —85, *4* — —75, *5* — —50, *6* — —20°

Радикалы, образующиеся при окислении бактериовиридина кислородом, отличаются по своим свойствам от π-катион-радикалов пигмента. При положительной температуре наблюдаются две стадии окисления, что свидетельствует об образовании нескольких продуктов окисления бактериовиридина. Однако, судя по форме и ширине линии, эти продукты сходны. Ими могут быть радикалы последовательно окисляющихся двух разных агрегированных форм бактериовиридина — 720 и 680 нм, так как из измерений электронных спектров следует, что форма 720 нм выцветает в первую очередь (см. выше). Образования каких-либо других радикалов при окислении бактериовиридина кислородом мы не наблюдали.

Существенно то, что выход свободных радикалов при окислении бактериовиридина в агрегированном состоянии значительно больше, чем в мономерном, хотя скорость выцветания пигмента в мономерном состоянии превышает скорость его выцветания в агрегированном. Это означает, что в агрегированных формах пигмента стабилизируется первичная обратимая стадия окисления (свободный радикал). В мономерном состоянии радикал окисленного кислородом воздуха пигмента, напротив, быстро претерпевает дальнейшие световые превращения, ведущие к более глубокому окислению пигмента и в конечном итоге к его деструктивному разрушению. Стационарная концентрация свободных радикалов при таком ходе реакции должна быть низкой.

Таким образом, бактериовиридин как в агрегированном, так и мономерном состоянии способен к фотохимическому окислению различными акцепторами электрона, приводящему к образованию первичного окисленного радикального продукта реакции. При этом агрегация пигмента способствует стабилизации первичных обратимых продуктов фотоокисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Holt A. S., Hughes D. W., Kende H. J., Purdie I. W.* Plant. Cell. Physiol., *4*, 49, 1963.
2. *Larsen H.* Kgl. norske vid. selskabs. skr., *26*, 1, 1954.
3. *Красновский А. А., Пакшина Е. В.*, Докл. АН СССР, *127*, 913, 1959.
4. *Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Федорович И. Б.*, Докл. АН СССР, *134*, 1232, 1960.
5. *Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй Цюнь*, Докл. АН СССР, *143*, 456, 1962.
6. *Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Гуляев Б. А.*, Докл. АН СССР, *152*, 1231, 1963.
7. *Литвин Ф. Ф.*, В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза. «Наука», М., стр. 96, 1965.
8. *Быстрова М. И., Красновский А. А.*, Молек. биол., *1*, 362, 1967.
9. *Евстигнеев В. Б., Бекасова О. Д.*, Изв. АН СССР, сер. физ., *29*, 1399, 1965.
10. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н.*, Докл. АН СССР, *189*, 885, 1969.
11. *Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф.*, Биофизика, *12*, 845, 1967.
12. *Красновский А. А., Пакшина Е. В., Сапожникова И. М.*, Докл. АН СССР, *172*, 727, 1967.
13. *Быстрова М. И., Красновский А. А.*, Молек. биол., *5*, 291, 1971.
14. *Красновский А. А. мл., Литвин Ф. Ф.*, Молек. биол., *3*, 282, 1969.
15. *Ким В. А., Елфимов Е. И., Возняк В. М., Евстигнеев В. Б.*, Биофизика, *21*, 50, 1976.
16. *Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Красновский А. А.*, Биофизика, *18*, 565, 1973.
17. *Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Бегичев В. Н., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *221*, 974, 1975.
18. *Красновский А. А., Пушкина Е. М., Дроздова Н. Н., Бубличенко Н. В., Умрихина А. В.*, Докл. АН СССР, *221*, 1457, 1975.

Поступила в редакцию
14.IX.1976

FREE RADICAL FORMATION DURING PHOTOOXIDATION OF BACTERIOVIRIDIN IN MONOMERIC AND AGGREGATED STATE

A. V. UMRIKHINA, M. I. BISTROVA, N. V. BUBLICHENKO, I. N. MALGOSHEVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

ESR study of photooxidation of bacterioviridin in polar and non-polar organic solvents containing monomeric and aggregated forms of the pigment was carried out. Light-induced formation of free radicals was shown to proceed during photooxidation of bacterioviridin with oxygen. These free radicals were similar by the ESR-signal parameters (G-factor value and the line width) to the cation-radicals initiated during photooxidation of the pigment with *p*-benzoquinone and at the same time differing in kinetics and temperature relationship. A small yield of radical products in the presence of oxygen is observed in non-polar solvents where bacterioviridin forms the aggregated forms with the absorption maxima of 680 and 720 nm. The study of the kinetics of photoformation of radicals within the temperature range +20——110° allowed to reveal different stages corresponding to the oxidation of the long wave and short wave forms of bacterioviridin, photooxidation of the long wave aggregated form being the first stage of photoprocess. It is concluded that aggregations contributs to the stabilization of the primary reversible products of bacterioviridin photooxidation having the nature of free radicals.

БИОФИЗИКА

Том XXII, вып. 6 1977

МИЛЛИСЕКУНДНОЕ ПОСЛЕСВЕЧЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ. АКТИВАЦИЯ И ПОДАВЛЕНИЕ

ЧАН ВАН НИ, В. В. НИКАНДРОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследовано влияние диэтилового эфира, детергента тритон Х-100, глицерина, сахарозы и предварительного нагревания на миллисекундное послесвечение (мсП) хлоропластов. Эфир и тритон Х-100 в концентрациях, активирующих транспорт электронов, подавляет мсП, действуя подобно разобщителям фотофосфорилирования. Предварительное нагревание до 40—42° С, глицерин и сахароза активируют как транспорт электронов, так и мсП хлоропластов. Предполагается, что активация транспорта электронов при этих воздействиях происходит не в результате разобщения фотофосфорилирования, а в результате изменения конформации мембран хлоропластов.

Ранее была обнаружена активация транспорта электронов в хлоропластах при действии детергентов, растворителей, глицерина и при предварительном нагревании [1—3]. В работе [2] действие детергентов объясняли разобщением фотофосфорилирования [2]. Мы нашли, что диэтиловый эфир и детергент тритон Х-100 активируют реакцию Хилла путем разобщения в месте фотофосфорилирования, связанном с фотосистемой 1 [3].

С целью выяснения природы активирующего действия предварительного нагревания, глицерина и сахарозы на транспорт электронов мы исследовали влияние этих воздействий на мсП.

Этот компонент послесвечения возникает при обратных реакциях в фотосистеме 2. На корреляцию между активностью фотосистемы 2 и интенсивностью послесвечения указывают следующие факты: отсутствие мсП у мутантов водорослей, лишенных фотосистемы 2 [4, 5], совпадение спектра возбуждения послесвечения со спектром поглощения фотосистемы 2 [6], соответствие квантового выхода послесвечения выделению кислорода при импульсном освещении [7]. Для появления мсП нужна некоторая энергия активации. Существует мнение, что энергизация мембран (установление электрохимического градиента протонов) при фотосинтетическом переносе электронов приводит к активации послесвечения. Так, разобщители фотофосфорилирования [8] или добавление АДФ+$Ф_н$ [9] подавляют мсП, тогда как создание диффузионного потенциала на мембранах хлоропластов с помощью солей повышает интенсивность послесвечения [10—12]. Приложение внешнего переменного напряжения на суспензию хлоропластов вызывает осцилляцию послесвечения [13].

Таким образом, интенсивность мсП хлоропластов определяется скоростью транспорта электронов через фотосистему 2 и степенью энергизации мембран хлоропластов.

Методы и объекты исследования

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков гороха (сорт «Победитель») по методу работы [14]. Средой выделения служила сахароза 0,5 М, NaCl 0,035 М, $MgCl_2$ $2 \cdot 10^{-3}$ М, фосфатный буфер 0,05 М

pH 7. Полученные хлоропласты соответствовали классу «С» по классификации Хола. Перед опытом хлоропласты помещали в среду выделения без сахарозы (шок), а для определения pH хлоропласты отмывали средой выделения без сахарозы и фосфатного буфера. Концентрацию хлорофилла определяли спектрофотометрически по Арнону. Поглощение кислорода измеряли амперометрическим методом с использованием платинового электрода, покрытого тефлоновой пленкой. Чувствительность электрода определяли для сред с различной вязкостью. Фотоиндуциро-

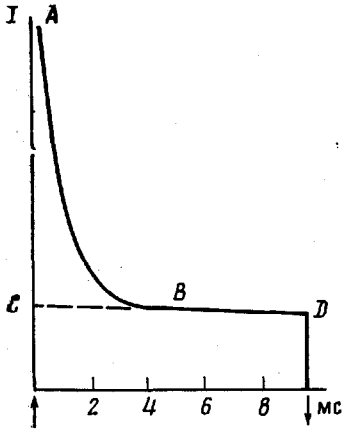


Рис. 1

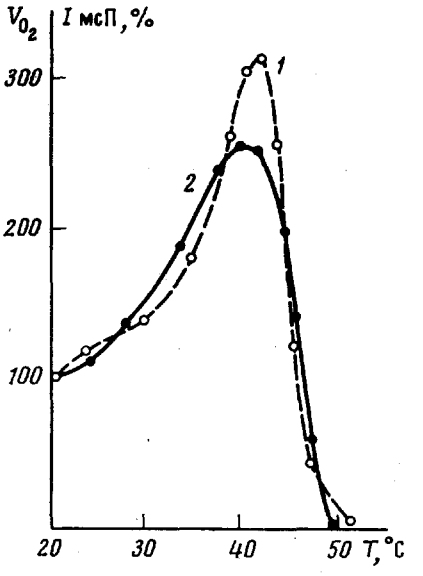


Рис. 2

Рис. 1. Схематическое изображение осциллограммы послесвечения хлоропластов

Рис. 2. Влияние нагревания хлоропластов на скорость реакции Хилла (*1*) и на интенсивность мсП (*2*)

ванное изменение pH суспензии хлоропластов определяли с помощью стеклянного электрода, сигнал регистрировали самописцем полярографа LP-7. Буферную емкость реакционной среды определяли титрованием HCl. Суспензию хлоропластов при определении выделения кислорода и изменения pH перемешивали магнитной мешалкой и поддерживали постоянную температуру ультратермостатом. Интенсивность возбуждающего послесвечение света и при определении фотохимической активности хлоропластов была $4 \cdot 10^5$ эрг/(см^2·с) ($800_{нм} > \lambda > 650$ нм). Послесвечение регистрировали при помощи фосфороскопа, описанного ранее [15]: время освещения 0,7 мс, время измерения 10 мс. Время от момента окончания освещения до момента, когда открывался фотоумножитель, $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ с. Сигнал от фотоумножителя регистрировали на осциллографе С1-19Б.

Как было показано [16], при измерении послесвечения на фосфороскопе происходит суммирование медленных компонентов послесвечения. В результате на осциллографе наблюдаются две части сигнала: быстрый компонент и сумма медленных (рис. 1). В настоящей работе интенсивность послесвечения в миллисекундном интервале определяли путем измерения площади между кривыми *AB* и *CB* (*CB* — экстраполяция *BD*).

Результаты исследования

Действие предварительного нагревания хлоропластов. Хлоропласты инкубировали 5 мин при разных температурах, затем быстро охлаждали до 20° С и измеряли интенсивность мсП (см. рис. 2). Надо отметить, что повышение температуры приводит к уменьшению суммы медленных компонентов послесвечения. Для сравнения на рис. 2 представлена зависимость скорости реакции Хилла с феррицианидом от температуры нагревания. Видно, что скорость реакции Хилла и интенсивность мсП имеют сходную зависимость от нагревания и достигают максимума при тех же температурах (40—42°).

Предполагалось [17], что изменение скорости реакции Хилла при нагревании связано с конформационными изменениями хлоропластов, поэтому следовало исследовать действие веществ, влияющих на конформацию мембран.

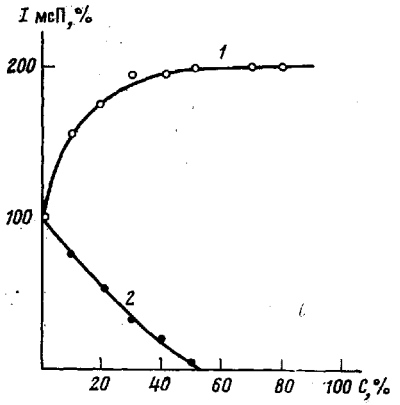


Рис. 3

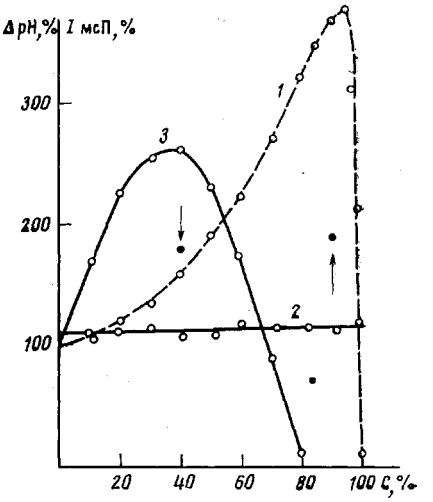


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость интенсивности мсП хлоропластов от концентрации сахарозы (*1*) и полиэтиленгликоля 3000 (*2*)

Рис. 4. Зависимость интенсивности мсП хлоропластов от концентрации глицерина (*1*); обратимость этой реакции при разбавлении до 10% глицерина (*2*). Зависимость уровня фотоиндуцированного изменения pH от концентрации глицерина (*3*); обратимость этой реакции показана стрелками для 40 и 90% при разбавлении до 10% глицерина

Влияние сахарозы. Имеются указания на то, что сахароза активирует реакцию Хилла вследствие изменения конформации мембран [18]. Результаты опытов по влиянию сахарозы на мсП показаны на рис. 3, на котором видно, что при повышении концентрации сахарозы до 30% интенсивность мсП повышается, а при дальнейшем увеличении концентрации остается неизменной. В отличие от эффекта предварительного нагревания сахароза активирует как мсП, так и сумму замедленных компонентов послесвечения.

Действие глицерина. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено активирующее действие глицерина на реакцию Хилла [1]. Мы исследовали влияние глицерина на мсП хлоропластов. Хлоропласты инкубировали с разными концентрациями глицерина 10 мин при комнатной температуре в темноте и затем измеряли интенсивность мсП. Предварительные опыты показали, что в присутствии глицерина происходит повышение интенсивности мсП и уменьшение суммы медленных компо-

нентов. Интенсивность быстрого компонента мсП достигает максимума при 95% глицерина (рис. 4). Существенно, что действие глицерина обратимо. Если после инкубации хлоропластов с разными концентрациями глицерина в течение 10 мин суспензию разбавить так, чтобы содержание в ней глицерина достигало 10%, то интенсивность свечения станет такой же, как была при инкубации хлоропластов с 10% глицерина (рис. 4).

При высоких концентрациях глицерина увеличивается вязкость раствора. Однако активация послесвечения не определяется вязкостью. При концентрации сахарозы выше 30% интенсивность свечения не менялась

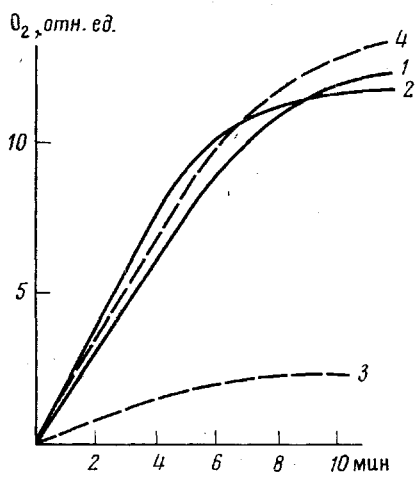


Рис. 5

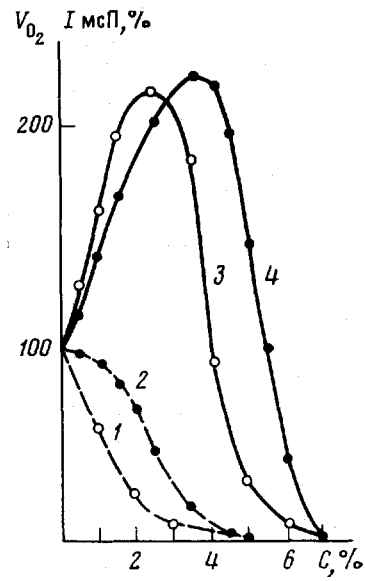


Рис. 6

Рис. 5. Кинетика выделения кислорода хлоропластами (70 мкг хлорофилла в 1 мл) с 50% глицерина (*1, 2*) и без глицерина (*3, 4*) в присутствии кремниймолибдата ($5 \cdot 10^{-4}$ М) и диурона (10^{-5} М), которые добавлены за 10 мин до освещения (*1, 3*) или на свету (*2, 4*)

Рис. 6. Зависимость интенсивности мсП хлоропластов (*1, 2*) и реакции Хилла (с феррицианидом 10^{-4} М) (*3, 4*) от концентрации диэтилового эфира в присутствии 50% глицерина (*2, 4*) и без него (*1, 3*)

Рис. 7. Зависимость интенсивности мсП хлоропластов (*1, 2*) и реакции Хилла (с феррицианидом 10^{-4} М) (*3, 4*) от концентрации тритона X-100 в присутствии 50% глицерина (*2, 4*) и без него (*1, 3*)

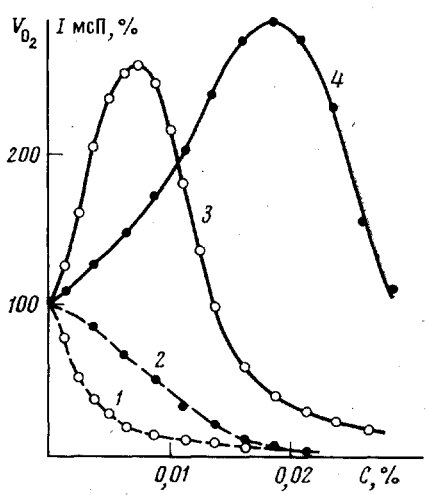


Рис. 7

(рис. 3), в то время, как известно, что вязкость сильно увеличивалась; полиэтиленгликоль в концентрации от 0 до 50 вес.% монотонно уменьшает мсП. Это приводит к мысли о том, что глицерин влияет на мсП, воздействуя на структуру мембран.

Ранее было показано, что реакция Хилла с кремниймолибдатом как акцептором электрона чувствительна к изменению конформации ме-

мбран хлоропластов; при добавлении кремниймолибдата при освещении скорость реакции Хилла значительно выше, чем при добавлении этого акцептора в темноте [19, 20]. Мы исследовали влияние глицерина на реакцию Хилла с кремниймолибдатом и показали, что при 50%-ной концентрации глицерина скорость реакции Хилла значительно увеличивается и не зависит от введения кремниймолибдата на свету или в темноте (рис. 5). Это явление можно объяснить тем, что глицерин уже в темноте вызывает конформационные изменения мембран хлоропластов, вероятно, сходные с фотоиндуцированными изменениями мембран.

На способность глицерина обратимо изменять структуру мембран указывают опыты по фотоиндуцированному изменению pH суспензии хлоропластов. Хлоропласты инкубировали с разными концентрациями глицерина 10 мин, после чего определяли фотоиндуцированное изменение pH (см. рис. 4). После инкубации хлоропластов с 40 и 90% глицерина суспензию разбавляли до 10%-ного содержания глицерина и наблюдали эффект обратимого действия глицерина на ΔpH. Глицерин, так же как предварительное нагревание, наряду с увеличением мсП снижает интенсивность суммы медленных компонентов.

Влияние диэтилового эфира и тритона X-100. Ранее было показано, что обработка хлоропластов эфиром и тритоном X-100 приводит к значительной активации транспорта электронов [3]. Мы исследовали влияние эфира и тритона на послесвечение. Хлоропласты инкубировали с растворителем или детергентом в течение 5 мин и затем определяли интенсивность мсП. На рис. 6 показано, что при увеличении концентрации эфира интенсивность послесвечения понижается, в то время как скорость реакции Хилла повышается и достигает максимума при 2,5%-ной концентрации эфира. При добавлении глицерина до 50%-ной концентрации в суспензии степень инактивации послесвечения уменьшается, а максимум активации реакции Хилла смещается в сторону бóльших концентраций растворителя.

Аналогичные результаты получены в опытах с тритоном X-100 (см. рис. 7).

Обсуждение результатов

Возможными причинами активации транспорта электронов в хлоропластах при действии исследованных выше факторов могут быть разобщение фотофосфорилирования и конформационные изменения мембран хлоропластов, не приводящие к разобщению. Возможным подходом к исследованию вопроса о природе активирующего действия является выяснение корреляции между мсП и транспортом электронов под влиянием исследованных воздействий. Ранее было показано, что разобщители фотофосфорилирования (метиламин, грамицидин, дезаспидин, карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон [8]) активируют реакцию Хилла и снижают интенсивность мсП, подавляя энергизацию мембран. Диэтиловый эфир и тритон X-100 также активируют реакцию Хилла и подавляют мсП (рис. 6, 7), что подтверждает заключение о разобщающем действии этих реагентов, сделанное в предыдущих работах [2, 3].

В отличие от действия растворителей и детергентов предварительное нагревание хлоропластов до 40—42° С, активирующее реакцию Хилла, активирует также послесвечение. Таким образом, в этом случае разобщение не является причиной активации транспорта электронов. Следует отметить, что активирование мсП водорослей при 37—38° С было описано ранее [21]. Однако в отличие от наших опытов, в которых послесвечение определяли при 20° после предварительного нагревания, в цитируемой работе послесвечение измеряли при разных температурах.

По-видимому, причиной активации транспорта электронов и послесвечения после предварительного нагревания являются конформационные изменения мембран хлоропластов. На возможность активации мсП при

изменении конформации мембран также указывают результаты опытов с сахарозой, которая вызывает конформационные изменения мембран хлоропластов, приводящие к активации транспорта электронов [18]. В наших опытах сахароза также активирует мсП хлоропластов (рис. 3). Мы нашли, что глицерин сильно активирует послесвечение. При всех исследованных концентрациях наблюдается эффект обратимости его действия на фотоиндуцированное изменение pH и послесвечение (рис. 4), что говорит о действии глицерина на структуру хлоропластов. На это указывают результаты опытов по действию глицерина на реакцию Хилла с кремниймолибдатом как акцептором электрона (рис. 5).

Таким образом мы приходим к выводу, что активация транспорта электронов после предварительного нагревания, при введении глицерина и сахарозы, вероятно, связана с конформационными изменениями мембран хлоропластов под влиянием этих воздействий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Брин Г. П.,* Докл. АН СССР, *179*, 726, 1968.
2. *Neumann J., Jagendorf A.,* Biochim. Biophys. Acta, *109*, 382, 1965.
3. *Чан Ван Ни, Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.,* Биохимия, *42*, 1298, 1977.
4. *Bertsch W., Azzi J., Davidson J. B.,* Biochim. Biophys. Acta, *143*, 129, 1967.
5. *Haug A., Jagnet D. D., Beall H. C.,* Biochim. Biophys. Acta, *283*, 92, 1972.
6. *Ruby R. H.,* Photochem. Photobiol., *13*, 97, 1971.
7. *Zankel K. L.,* Biochim. Biophys. Acta, *245*, 373, 1971.
8. *Mayner B. C.,* Photochem. Photobiol., *6*, 189, 1967.
9. *Vambutas V., Bertsch W.,* Biochim. Biophys. Acta, *376*, 169, 1975.
10. *Croft A. R. ,Wraight C. A., Fleischman D. E.,* FEBS Letters, *15*, 89, 1971.
11. *Barber J., Varley W. J.,* J. Exp. Bot., *23*, 216, 1972.
12. *Mayne B. C.,* Photochem. Photobiol., *6*, 189, 1967.
13. *Arnold W., Azzi J.,* Photochem. Photobiol., *14*, 233, 1971.
14. *Walker D. A.,* Method. Enzymol., *23*, 211, 1971.
15. *Шувалов В. А., Красновский А. А.,* Мол. биол., *5*, 698, 1971.
16. *Mar T., Brebner J., Roy G.,* Biochim. Biophys. Acta, *376*, 345, 1975.
17. *Nolan W. G., Smillie R. M.,* Biochim. Biophys. Acta, *440*, 461, 1976.
18. *Shavit N., Avron M.,* Biochim. Biophys. Acta, *131*, 516, 1967.
19. *Zilinskas Barbara A., Govingjee,* Biochim. Biophys. Acta, *387*, 306, 1975.
20. *Гольдфельд М. Г., Микоян В. Д., Цапин А. И.,* Докл. АН СССР, *229*, 1251, 1976.
21. *Bonaventura C., Kindergan M.,* Biochim. Biophys. Acta, *234*, 249, 1971.

Поступила в редакцию
22.VI.1977

DELAYED LUMINESCENCE IN MILLISECOND TIME RANGE OF CHLOROPLASTS, ACTIVATION AND INHIBITION

CHAN VAN NI, V. V. NIKANDROV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Effect of diethyl ether, detergent triton X-100, glycerine, sucrose and preliminary heating on delayed luminescence (DL) of chloroplasts has been studied. Ether and triton X-100 in concentrations activating electron transport inhibit DL acting similarly to photophosphorylation uncouplers. Preliminary heating to 42—42° C, glycerine and sucrose activate both the electron transport and DL of chloroplasts. Activation of electron transport under these agents is suggested to result not from photophosphorylation uncoupling, but from the changes in the conformation of chloroplast membranes.

УДК 547.979

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФОТОВЫДЕЛЕНИЯ И ФОТОПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ: АКТИВАЦИЯ И ИНГИБИРОВАНИЕ

ЧАН ВАН НИ, В. В. НИКАНДРОВ, Г. П. БРИН и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Световое выделение и поглощение кислорода хлоропластами гороха активируются при определенной концентрации растворителей (диэтиловый эфир, метиловый спирт, диметилсульфоксид) и детергента тритон Х-100. При более высоких концентрациях этих веществ наблюдается ингибирование обеих реакций. Разобщители (метиламин и карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон) активируют оба фотопроцесса. Исследованные воздействия влияют сходным образом на процессы фотопоглощения и фотовыделения кислорода, которые лимитируются общим звеном, связанным с местом фотофосфорилирования в фотосистеме I. Сопоставление влияния воздействий на функции хлоропластов и фотосистему I приводит к предположению, что ингибирование связано с нарушением работы фотосистемы II, а активирование вызвано преимущественно воздействием на фотосистему I.

Как известно, конечными акцепторами в цепи фотосинтетического переноса электрона являются ферредоксин и NADP; однако кислород также может быть акцептором электрона, включаясь в различные участки цепи. Вероятно, нарушение интактной цепи фотосинтетического переноса электрона путем различных воздействий может влиять на способ и место включения кислорода в работу цепи. Такого рода исследование было проведено в нашей лаборатории [1] при изучении выделения кислорода хлоропластами при реакции Хилла.

Целью настоящей работы было выяснение взаимосвязи поглощения и выделения кислорода хлоропластами путем изучения влияния различных воздействий: нагревания, детергентов, органических растворителей и разобщителей фотофосфорилирования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков гороха сорта Победитель по методу [2] в среде следующего состава: сахароза 0,5 М, хлористый натрий 0,035 М, хлористый магний 0,002 М, фосфатный буфер 0,05 М pH 7,3. Полученные хлоропласты соответствовали типу *C* по классификации Холла [3]. Перед опытом хлоропласты разбавляли дистиллированной водой (что приводило к осмотическому шоку) до нужной концентрации хлорофилла, количество которого определяли по методу Арнона.

Кислород определяли амперометрическим методом с использованием платинового электрода, покрытого тефлоновой пленкой. Суспензию хлоропластов во время опытов перемешивали магнитной мешалкой и обычно освещали конденсированным светом 600—800 нм киноламы 300 Вт, $5 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с. При снятии световых кривых поглощения и выделения кислорода интенсивность света меняли нейтральными фильтрами.

Выделение кислорода при реакции Хилла измеряли с акцепторами электрона феррицианидом ($5 \cdot 10^{-4}$ М) и *п*-бензохиноном ($1{,}5 \cdot 10^{-3}$ М). Эндогенное поглощение кислорода обычно измеряли в присутствии азида натрия (10^{-4} М) для ингибирования каталазы. Активность фотосистемы I определяли по поглощению кислорода в суспензии хлоропластов, содержащей аскорбат натрия (10^{-2} М), дихлорфенолиндофенол ($6 \cdot 10^{-5}$ М), метилвиологен (10^{-4} М) и 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевину (диу-

рон) (10^{-5} М). Для поглощения кислорода фотосистемой I мы применяем термин «экзогенное поглощение кислорода». Время инкубации суспензии хлоропластов с растворителями и детергентами 10 мин при 4° в темноте. В опытах по влиянию нагревания суспензию хлоропластов выдерживали 5 мин при заданной температуре в темноте и затем проводили измерения при 20°.

Перекись водорода, образовавшуюся при поглощении кислорода, определяли методом измерения хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы [4].

Предварительные опыты показали, что перекись водорода, образующаяся при освещении суспензии хлоропластов на воздухе, быстро разлагается после освещения, что указывает на значительную активность каталазы. При добавлении ингибитора каталазы — азида натрия (10^{-4} М) количество перекиси водорода в суспензии хлоропластов не уменьшается со временем в темноте. Опыты показали, что добавление азида натрия к суспензии до освещения приводит к накоплению большего количества перекиси водорода, чем в случае добавления ингибитора после освещения.

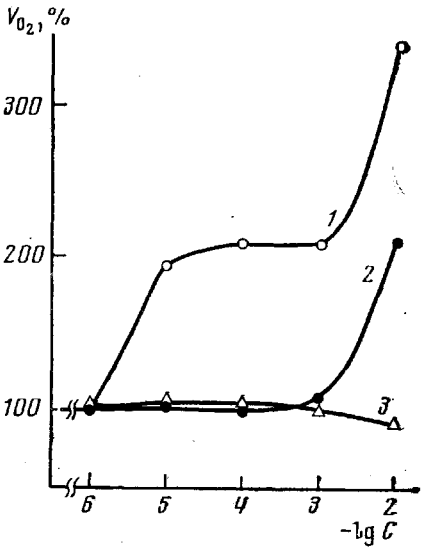


Рис. 1. Влияние концентрации азида натрия на эндогенное поглощение кислорода (*1*), реакцию Хилла с феррицианидом (*2*) и реакцию Хилла с *n*-бензохиноном (*3*)

Следовало определить, какая концентрация азида натрия ингибирует каталазу, но еще не влияет на реакцию Хилла. Результаты опытов показывают (рис. 1), что уже 10^{-5} и 10^{-6} М азид натрия ингибирует каталазу (что приводит к увеличению измеряемого поглощения кислорода); при концентрации азида больше чем 10^{-5} М (до 10^{-3} М) поглощение кислорода достигает постоянного уровня, что указывает на полное ингибирование каталазы в этих условиях. Азид натрия не влияет на скорость реакции Хилла (с феррицианидом и хиноном) в концентрации от 10^{-5} до 10^{-3} М, а выше этой величины скорость реакции Хилла с феррицианидом и эндогенное поглощение кислорода резко увеличиваются, при этом до 10^{-2} М азид натрия не влияет на скорость реакции Хилла с хиноном. В дальнейшем для ингибирования каталазы мы использовали 10^{-4} М азид натрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Световые кривые выделения и поглощения кислорода. Была изучена зависимость выделения и поглощения кислорода от интенсивности света. Из рис. 2 видно, что реакция Хилла с феррицианидом и эндогенное поглощение кислорода насыщаются при той же интенсивности света (около $5 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с), тогда как реакция Хилла с хиноном насыщается при более высокой интенсивности (10^6 эрг/см^2·с).

Феррицианид и хинон могут восстанавливаться в цепи переноса электрона как после фотосистемы I, так и после фотосистемы II. Однако, учитывая растворимость хинона в липидах, можно предполагать, что хинон в основном восстанавливается после фотосистемы II, а феррицианид после фотосистемы I. На этом основании можно объяснить различие световых кривых реакции Хилла с феррицианидом и хиноном. Сходство световых кривых реакции Хилла с феррицианидом и эндогенного поглощения кислорода позволяет предположить, что кислород поглощается в основном после фотосистемы I.

Влияние нагревания. Мы изучили влияние предварительного нагревания суспензии хлоропластов на реакцию Хилла, эндогенное поглощение кислорода и образование перекиси водорода. Из рис. 3 видно, что реакция Хилла с хиноном активируется при 30—35°, что согласуется с данными работы [1]. Эндогенное поглощение кислорода и образование перекиси водорода активируются при 40—42°, что совпадает с максимумом активации реакции Хилла с феррицианидом. Дальнейшее повышение температуры приводит к резкому падению скоростей этих реакций.

Было изучено влияние предварительного нагревания на соотношение между образованием перекиси водорода и поглощением кислорода хлоропластами. После предварительного нагревания суспензию хлоропластов освещали 5 мин; в одной и той же пробе измеряли эндогенное поглощение кислорода в присутствии азида натрия и образование перекиси водорода. Из табл. 1 видно, что в хлоропластах, прогретых до 46°

Таблица 1

Влияние предварительного нагревания хлоропластов на эндогенное поглощение кислорода и образование перекиси водорода в присутствии 10^{-4} М азида натрия (в мкмоль кислорода или перекиси водорода на мг хлорофилла в ч)

°С	Поглощение O_2	Образование H_2O_2	°С	Поглощение O_2	Образование H_2O_2
20	9,3	13,0	46	5,2	0,3
35	13,9	27,0	20*	3,2	0,4
41	18,6	28,0			

* Хлоропласты перед опытом обработаны 0,8 М трис-буфером pH 8,5.

или отмытых 0,8 М трис-буфером pH 8,5, количество образовавшейся перекиси водорода значительно меньше, чем количество поглощенного кислорода. Это явление можно объяснить тем, что при поглощении кислорода кроме перекиси водорода может образовываться вода или могут окисляться присутствующие органические соединения.

Результаты опытов показывают, что выделение кислорода, образование перекиси водорода и поглощение кислорода, вероятно, определяются общим этапом в процессе переноса электрона, который однотипно отвечает на температурные воздействия (рис. 3).

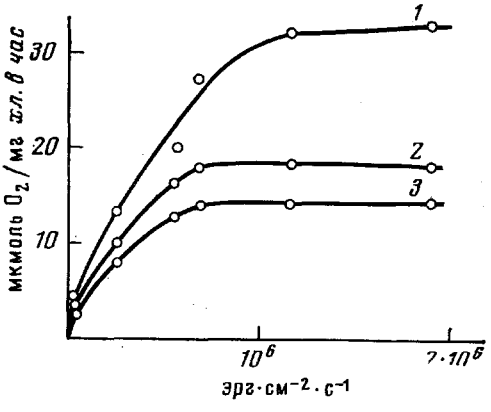


Рис. 2

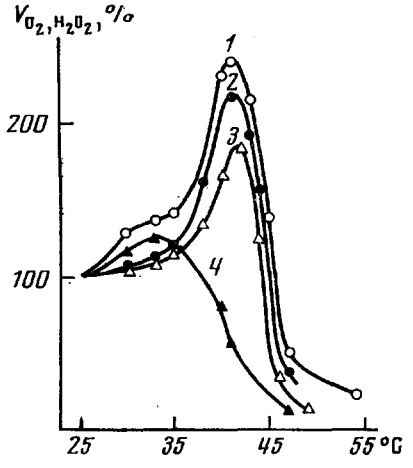


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость от интенсивности света реакции Хилла с *n*-бензохиноном (*1*), с феррицианидом (*2*) и эндогенного поглощения кислорода (*3*)

Рис. 3. Влияние предварительного нагревания хлоропластов на реакцию Хилла с феррицианидом (*1*), образование перекиси водорода (*2*), эндогенное поглощение кислорода (*3*) и реакцию Хилла с *n*-бензохиноном (*4*)

Влияние детергента тритона Х-100. Было исследовано влияние разных концентраций детергента на скорость поглощения и выделения кислорода (рис. 4). При 0,007% тритона наблюдается сильная активация реакции Хилла, что согласуется с известными данными [5]. Существенно, что эндогенное поглощение кислорода имеет максимум активации

при той же концентрации детергента. Дальнейшее увеличение концентрации детергента приводит к ингибированию обеих функций.

Влияние органических растворителей. При действии органических растворителей также наблюдается последовательное активирование и ингибирование обеих функций.

Метиловый спирт в количестве 10% увеличивает скорость реакции Хилла на 20—30%, а эндогенное поглощение кислорода на 10—15% (рис. 5). Более высокие концентрации приводят к подавлению поглощения и выделения кислорода.

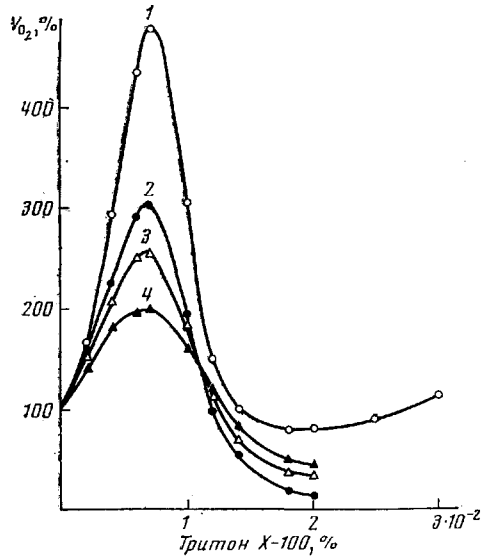


Рис. 4

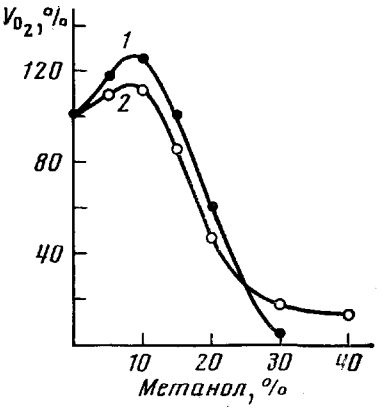


Рис. 5

Рис. 4. Влияние тритона X-100 на активность фотосистемы I (*1*), реакцию Хилла с феррицианидом (*2*), с хиноном (*3*) и эндогенное поглощение кислорода (*4*)

Рис. 5. Влияние метилового спирта на реакцию Хилла с феррицианидом (*1*) и эндогенное поглощение кислорода (*2*)

Диметилсульфоксид (ДМС), добавленный к хлоропластам в количестве 30—40%, активирует реакцию Хилла на 20—30%, а поглощение кислорода на 20—25% (рис. 6). Дальнейшее увеличение количества ДМС приводит к подавлению этих процессов.

Диэтиловый эфир 1—2%-ный активирует реакцию Хилла с феррицианидом и *n*-бензохиноном примерно в 2 раза, а эндогенное поглощение кислорода в 1,5 раза (рис. 7). Дальнейшее увеличение концентрации эфира приводит к ингибированию реакций. Следует отметить, что образование перекиси водорода активируется при добавлении 2% эфира в 1,5 раза и ингибируется при увеличении его концентрации.

Ранее было показано, что при удалении эфира реакция Хилла в хлоропластах, ингибированных эфиром, восстанавливается [1]. Существенно было изучить возможность обратимого ингибирования и активирования обеих функций после удаления растворителя.

Хлоропласты обрабатывали следующим образом: в контрольных опытах хлоропласты инкубировали 10 мин без эфира, затем 3 мин откачивали форвакуумным насосом; в опыте прямого действия (введение эфира) хлоропласты 3 мин откачивали, а затем 10 мин инкубировали с 2% эфира (активация) и с 4% эфира (ингибирование); обратимость действия растворителя проверялась на хлоропластах, которые инкубировали 10 мин с эфиром и 3 мин откачивали.

Результаты опытов показаны в табл. 2, из которой видно, что поглощение кислорода почти полностью обратимо после удаления эфира.

Влияние воздействий на работу фотосистемы I. Чтобы выяснить участие фотосистемы I в изученных процессах, мы исследовали влияние разных воздействий на хлоропласты в условиях ингибирования фотосистемы II диуроном (10^{-5} М), который ингибирует реакцию Хилла и

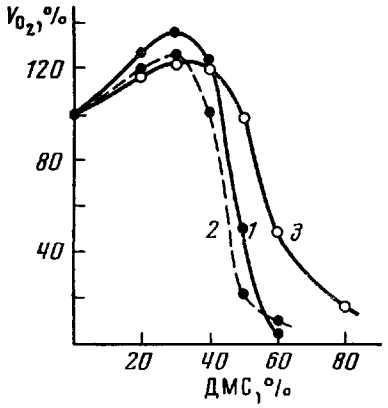


Рис. 6

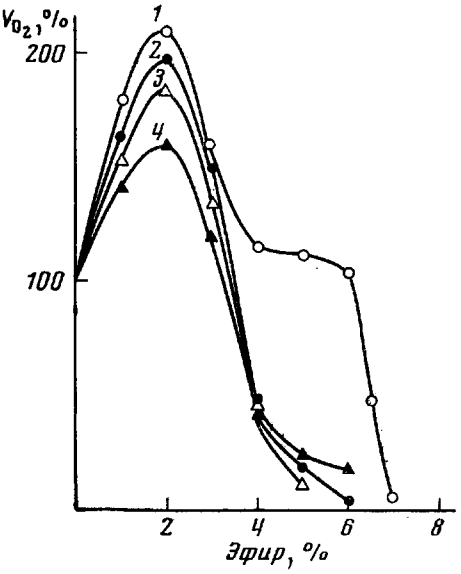


Рис. 7

Рис. 6. Влияние ДМС на реакцию Хилла с феррицианидом (*1*), и с *n*-бензохиноном (*2*) и эндогенное поглощение кислорода (*3*)

Рис. 7. Влияние диэтилового эфира на экзогенное поглощение кислорода (*1*), на реакцию Хилла с феррицианидом (*2*), с *n*-бензохиноном (*3*) и эндогенное поглощение кислорода (*4*)

почти полностью подавляет эндогенное поглощение кислорода. Небольшое остаточное поглощение кислорода, по-видимому, определяется работой фотосистемы I.

Диэтиловый эфир в количестве 2% активирует поглощение кислорода фотосистемой I в 2 раза (рис. 7). Дальнейшее увеличение концентрации эфира снижает скорость поглощения кислорода; полное ингибирование наблюдается при 7% эфира.

Таблица 2

Обратимость ингибирования и активирования фотопоглощения кислорода хлоропластами и фотосистемой I (диурон, восстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол), в мкмоль O_2/мг хлорофилла в ч

Вариант опыта	Хлоропласты		Фотосистема I, 2 % эфира
	4 % эфира	2 % эфира	
Контроль	9,6	9,9	102
Введение эфира	4,1	15,3	156
После откачивания	9,2	9,3	98

Таким образом, как для эндогенного поглощения кислорода и реакции Хилла, поглощение кислорода фотосистемой I максимально активируется при 2% эфира. При дальнейшем увеличении концентрации

эфира экзогенное поглощение кислорода более стабильно, чем эндогенное поглощение и реакция Хилла. После удаления эфира в вакууме наблюдается обратимость активации (табл. 2).

Тритон Х-100 активирует поглощение кислорода фотосистемой I при концентрации 0,007%, при увеличении концентрации тритона активирование исчезает, и дальнейшее увеличение его концентрации опять вызывает увеличение поглощения кислорода (рис. 4).

Таким образом, в области концентраций тритона 0,007% для реакции Хилла, эндогенного поглощения кислорода и поглощения кислорода фотосистемой I наблюдается максимальная активация. Это дает основание предполагать, что активация реакции Хилла и эндогенного поглощения кислорода происходит в пределах фотосистемы I.

Так как наблюдаемые эффекты могли быть связаны с разобщением фотофосфорилирования, мы изучили действие обычно применяемых разобщителей.

Действие разобщителей фотофосфорилирования. Известно, что многие разобщители фотофосфорилирования активируют реакцию Хилла [6]. Поглощение кислорода хлоропластами и водорослями также активируется разобщителями: КФФ (карбонилцианид-4-трифторметоксифенилгидразон) и хлористым аммонием [7, 8].

В настоящей работе мы провели сравнительное исследование действия часто применяемых разобщителей фотофосфорилирования КХФ (карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон) и метиламина на реакцию Хилла и поглощение кислорода хлоропластами. Разобщители применялись в концентрациях, при которых их действие максимально. Результаты опытов представлены в табл. 3, откуда видно, что примененные разобщители сильно активируют реакцию Хилла и поглощение кислорода хлоропластами.

Таблица 3

Влияние разобщителей на реакцию Хилла с феррицианидом, эндогенное и экзогенное поглощение кислорода
В % к контрольному опыту без разобщителей

Разобщители	Реакция Хилла	Поглощение O_2	
		эндогенное	экзогенное
КХФ, $2 \cdot 10^{-6}$ М	708	435	507
Метиламин, $2 \cdot 10^{-2}$М	680	205	512

Таблица 4

Совместное действие тритона или эфира и разобщителей на реакцию Хилла с феррицианидом
Выделение кислорода в % от контрольного опыта без реагентов

Воздействия	Без разобщителя	КХФ	Метиламин
Контроль	100	686	705
0,007% тритона	543	325	602
2% эфира	170	520	490

Активацию процессов выделения и поглощения кислорода у хлоропластов мы наблюдали также при действии тритона Х-100 и диэтилового эфира. Можно предположить, что детергенты и органические растворители в определенных концентрациях обладают разобщающим действием.

Чтобы выяснить природу активирующего действия детергентов и растворителей на реакции хлоропластов, мы исследовали их действие

совместно с разобщителями фотофосфорилирования. Для этого хлоропласты вначале инкубировали 5 мин с эфиром или тритоном, а затем 5 мин с разобщителем. Из табл. 4 видно, что при совместном действии тритона Х-100 и разобщителей степень активации выделения кислорода при реакции Хилла меньше, чем при действии одних разобщителей. Это можно объяснить тем, что действие детергента не только разобщает транспорт электрона, но и ингибирует выделение кислорода, что отчетливо наблюдается при больших концентрациях детергента.

У хлоропластов в присутствии разобщителей можно наблюдать ингибирующее действие детергента: в отсутствии разобщителя этот эффект перекрыт эффектом активации. Аналогичное действие на хлоропласты оказывает эфир в присутствии разобщителей (табл. 4).

Таблица 5

Совместное действие тритона или эфира и разобщителей на эндогенное поглощение кислорода

Поглощение O_2 в % от контрольного опыта без воздействия

Воздействия	Без разобщителя	КХФ	Метиламин
Контроль	100	446	262
0,007% тритона	263	345	257
2% эфира	170	558	260

Совместное действие тритона Х-100 или эфира (табл. 5) и разобщителей на эндогенное поглощение кислорода отличается от их действия на реакцию Хилла. У разобщенных хлоропластов тритон вызывает меньшее ингибирование эндогенного поглощения кислорода, чем выделения кислорода при реакции Хилла, эфир увеличивает скорость поглощения кислорода, тогда как выделение кислорода ингибируется (табл. 4). Такие различия связаны, по-видимому, с тем, что имеется несколько путей поглощения кислорода хлоропластами, соотношение которых может изменяться в зависимости от примененных воздействий.

Для фотосистемы I, которая более стабильна и у которой места донирования и акцептирования электронов установлены, можно получить более определенную информацию о природе действия детергентов и растворителей. Из табл. 6 видно, что тритон незначительно увеличива-

Таблица 6

Совместное действие тритона или эфира и разобщителей на экзогенное поглощение кислорода

Поглощение кислорода в % к контрольному опыту без воздействия

Воздействия	Без разобщителя	КХФ	Метиламин
Контроль	100	509	496
0,007% тритона	478	525	519
2% эфира	220	512	500

ет, а эфир не влияет на скорость экзогенного поглощения кислорода у полностью разобщенных хлоропластов. В этом случае можно было ожидать суммирования действия детергента или растворителя и разобщителя, если бы при активации детергент и растворитель не оказывали разобщающего действия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из приведенных опытов видно, что все примененные воздействия сходным образом влияют на процессы поглощения и выделения кислорода. Эти процессы активируются при одних и тех же концентрациях детергента и растворителя. Реакция Хилла с феррицианидом, эндогенное поглощение кислорода и образование перекиси водорода максимально активируются после нагревания хлоропластов до 40—42° или при действии на них разобщителей фотофосфорилирования.

Все это приводит к мысли, что реакция Хилла и эндогенное поглощение кислорода лимитируются некоторыми общими этапами, воздействуя на которые, можно увеличить скорость нециклического переноса электрона. В работах [9, 10] было показано, что эндогенное поглощение кислорода связано с участием двух фотосистем, предполагалось, что процесс лимитируется фотосистемой I. В согласии с этим в наших опытах наблюдалось совпадение световых кривых и максимумов активации после нагревания (40—42°) для реакции Хилла (с феррицианидом), эндогенного поглощения кислорода и образования перекиси водорода (рис. 2 и 3). Было показано [11, 12], что разобщители фотофосфорилирования активируют транспорт электрона в хлоропластах, действуя на место фотофосфорилирования, связанное с фотосистемой I, и не влияют на перенос электрона, связанный только с фотосистемой II.

В наших опытах максимальная активация реакции Хилла и эндогенного поглощения кислорода наблюдается при тех же концентрациях детергента и растворителя, при которых максимально активируется фотосистема I (экзогенное поглощение кислорода). Тритон X-100 (0,007%) и диэтиловый эфир (2%) активируют все изученные нами реакции в хлоропластах, как и обычные разобщители фотофосфорилирования.

На этом основании активацию электронного транспорта в хлоропластах детергентами и растворителями можно объяснить их разобщающим действием на место фотофосфорилирования, связанное с фотосистемой I.

Однако кроме разобщающего действия детергенты и растворители уже при малых концентрациях ингибируют процесс переноса электрона, что видно из опытов совместного действия разобщителей с детергентом или растворителем на реакцию Хилла (табл. 4); когда транспорт электронов максимально активирован разобщителями, тритон и эфир ингибируют процесс.

Ингибирование переноса электрона в хлоропластах особенно явно проявляется при больших концентрациях детергента и растворителя. Мы предполагаем, что в изученном интервале концентраций детергент и растворитель ингибируют фотосистему II, поскольку даже при высокой концентрации этих соединений (тритон до 0,03%, а эфир до 6%) транспорт электронов в фотосистеме I практически не изменяется (рис. 4 и 7).

Наряду со сходством влияния примененных воздействий на реакцию Хилла и эндогенное поглощение кислорода наблюдаются также существенные различия: при высокой концентрации детергента и растворителя после нагревания (или в хлоропластах, отмытых 0,8 М трисбуфером) реакции Хилла подавляется, тогда как поглощение кислорода частично сохраняется. При этом диурон ингибирует поглощение кислорода, что может быть связано с участием эндогенных доноров, которые отдают электроны фотосистеме II.

У разобщенных хлоропластов тритон и эфир значительно уменьшают скорость выделения кислорода, тогда как поглощение кислорода при действии детергента изменяется незначительно, а при действии эфира даже увеличивается. Такие отличия между реакцией Хилла и эндогенным поглощением кислорода могут быть связаны с тем, что помимо

главного места включения кислорода в фотосинтетическую цепь (после фотосистемы I) имеются дополнительные места поглощения кислорода, а, кроме того, в процессе поглощения кислорода могут участвовать эндогенные доноры электрона.

Сопоставление влияния воздействий на функции хлоропластов и фотосистему I приводит к предположению, что ингибирование связано с нарушением работы фотосистемы II, а активирование вызвано преимущественно воздействием на фотосистему I.

Дальнейшие исследования должны показать локализацию воздействий в системе фотосинтетического переноса электрона, расположенной в мембранных структурах хлоропластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Брин Г. П. (1968) Докл. АН СССР 179, 726—729.
2. Walker D. A. (1971) Methodes Enzymology 23, 211—220.
3. Hall D. O. (1972) Nature New Biology 235, 125—126.
4. Cormier M. I., Richard P. M. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4706—4714.
5. Neumann J., Jagendorf A. (1965) Biochim. et biophys. acta 109, 382—389.
6. Izawa S., Good N. E. (1972) Methodes Enzymology 24, 355—377.
7. Radmer R. J., Kok B. (1976) Plant Physiol. 58, 336—340.
8. Ridley S. M., Leech R. (1970) Arch. Biochem. and Biophys. 139, 351—360.
9. Nam Hai Chua (1971) Biochim. et biophys. acta 245, 277—287.
10. Egneus H. (1975) Plant. Physiol. 33, 203—213.
11. Gould J. M., Izawa S. (1973) Biochim. et biophys. acta 314, 211—223.
12. Gould J. M., Izawa S. (1975) Biochim. et biophys. acta 387, 135—148.

Поступила в редакцию
8.XII.1976

LIGHT-INDUCED PRODUCTION AND CONSUMPTION OF OXYGEN BY CHLOROPLASTS: ACTIVATION AND INHIBITION

CHAN VAN NHI, V. V. NIKANDROV, G. P. BRIN and A. A. KRASNOVSKIJ

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Light-induced production and consumption of oxygen by pea chloroplasts are activated at certain concentrations of the solvents (diethyl ester, methyl alcohol, dimethylsulfoxide) and detergent Triton X-100. At higher concentrations of the compounds studied both reactions are inhibited. The uncouplers (methylamine and carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone) activate these processes. The agents studied have a similar effect on the processes of light-induced production and consumption of oxygen, which are limited by a common link bound to the phosphorylation site in photosystem I. The effects observed suggest that the inhibition may be due to inhibition of photosystem II, whereas the activation may be largely due to an action on photosystem I.

REDUCTION OF PHEOPHYTIN IN THE PRIMARY LIGHT REACTION OF PHOTOSYSTEM II

V. V. KLIMOV, A. V. KLEVANIK and V. A. SHUVALOV
Institute of Photosynthesis, USSR Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

and

A. A. KRASNOVSKY
A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow, USSR

Received 6 June 1977
Revised version received 5 August 1977

1. Introduction

The photochemical reduction of pheophytin and bacteriopheophytin has been shown in vitro [1–3]. In reaction centers of photosynthetic bacteria bacteriopheophytin *a* [4–9] and bacteriopheophytin *b* [10, 11] act as an intermediary electron carrier between bacteriochlorophyll dimer and the 'primary' electron acceptor, a complex of ubiquinone and Fe. When the ubiquinone is in the reduced form the photoaccumulation of reduced bacteriopheophytin can be observed [5–11]. In various species of green plants 1.5–2.3 molecules of pheophytin have been found per 100 molecules of chlorophyll [12]. In photosystem II of green plants the photoreduction of the primary electron acceptor, Q (plastoquinone), is accompanied by a blue shift of absorption bands at 545 nm and 685 nm [13,14] which can belong to a bound or aggregated form of pheophytin in reaction centers of photosystem II [14]. The photoreduction of pheophytin may be observed in photosystem II preparations from pea chloroplasts at 20°C [15]. In this work a reversible reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosystem II in pea subchloroplast particles at redox potentials (E_h) from −50 mV to −550 mV (when Q is in the reduced form) is demonstrated. This photoreaction is observed at −170°C as well as at 20°C and is accompanied by a 2–3 fold decrease in the chlorophyll fluorescence yield.

2. Materials and methods

The 'heavy' chloroplast fragments, enriched in photosystem II, were isolated when treating pea chloroplasts with digitonin (0.4%) and Triton X-100 (0.1%) followed by fractional centrifugation [16]. The fraction precipitated for 45 min at 20 000 × *g* and designated as 'DT-20 fragments' [16] was used. The chlorophyll–protein complexes of photosystems I and II and the 'accessory' complex were prepared using the chromatography on DEAE-cellulose of pea chloroplasts treated with 3% Triton X-100 [17]. The absorbance changes (ΔA) and the changes in the chlorophyll fluorescence yield (ΔF), induced by continuous actinic light, were measured with the phosphoroscopic technique described earlier [7,15]. The measurements were made in a 10 mm cuvette, in which the E_h value of the medium was registered under anaerobic conditions [6,7].

3. Results

In the DT-20 fragments at the medium E_h of +400 mV the actinic light induces a reversible increase, related to the photoreduction of Q [18], in the chlorophyll fluorescence yield (fig.1). Under these conditions the light-induced ΔA observed (fig.1) are similar to the positive ΔF in their kinetics, according to

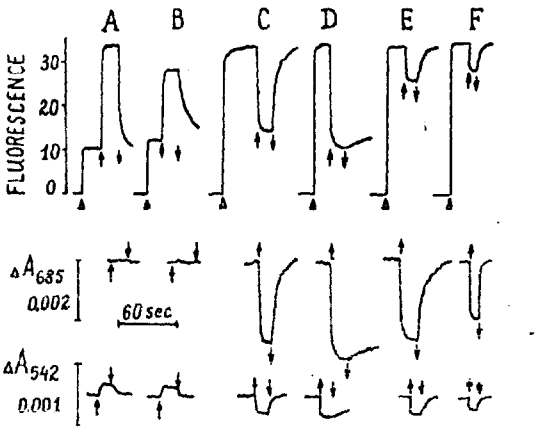


Fig.1. Kinetics of the light-induced fluorescence changes (ΔF) and of the absorbance changes (ΔA) at 685 nm and 542 nm of pea photosystem II preparations. (A–D) DT-20 fragments suspended in 20 mM Tris buffer, pH 8.5 (a chlorophyll concentration 20 μg/ml), at 20°C. (A) Without additions. (B) In the presence of 5 μM ferricyanide and 1 μM DCMU at E_h +400 ∓ 10 mV. (C,D) In the presence of 1 μM indigodisulfonate, 0.5 μM methylviologen and 0.2–2.0 mg/ml dithionite: (C) at E_h −200 ∓ 30 mV, (D) at E_h −400 ∓ 20 mV. (E) The chlorophyll–protein complex of photosystem II suspended in the same buffer (a chlorophyll concentration 7 μg/ml) in the presence of 1 μM methylviologen and 2.0 mg/ml dithionite at E_h −490 ∓ 10 mV at 20°C. (F) The film, obtained by drying the suspension of DT-20 fragments in the presence of 0.5 mg/ml dithionite and 1 μM DCMU under anaerobic conditions (absorbance of the film at 680 nm was 1.6), the measurements were carried out at −170°C. (Δ) Monochromatic light (480 nm, a half bandwidth of 10 nm, intensity of 7 ergs·cm^{-2}·s^{-1}), exciting the chlorophyll fluorescence (λ > 660 nm), on. (↑) Actinic light (λ > 620 nm, 1.9·10^5 ergs·cm^{-2}·s^{-1}), on; (↓) actinic light, off.

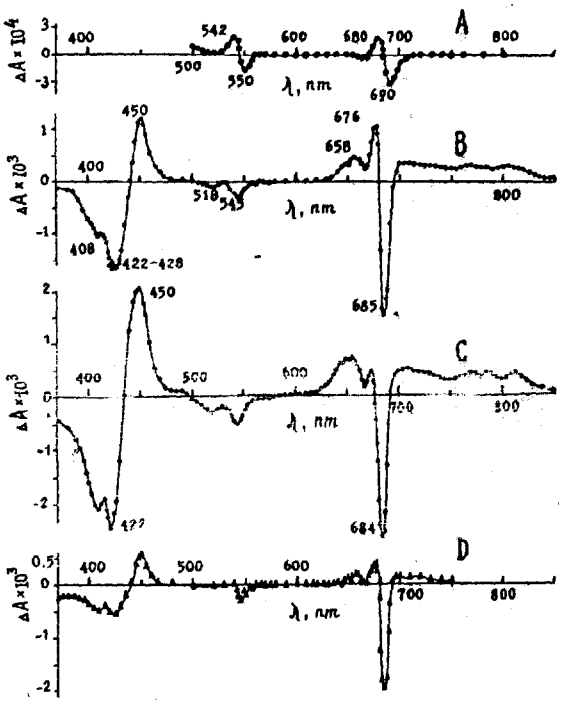


Fig.2. Difference absorption spectra ('light-minus dark') of pea photosystem II preparations. (A,B) Suspension of DT-20 fragments (a chlorophyll concentration 20 μg/ml) at E_h +400 mV (A) and at E_h −200 mV (B). (C) Suspension of the chlorophyll–protein complex of photosystem II (a chlorophyll concentration 7 μg/ml) at E_h −490 mV at 20°C. The additions as in fig.1. (D) The film, obtained by drying the suspension of DT-20 fragments in the presence of 0.5 mg/ml dithionite and 1 μM DCMU under anaerobic conditions (absorbance of the film at 680 nm was 1.6), the measurements were carried out at −170°C. To avoid ΔA related to the *P*-700 photooxidation the spectrum of fig.2A was measured in the presence of weak far-red background light (λ > 710 nm) [13,14] which oxidized *P*-700 and did not induce ΔA related to the Q photoreduction.

experiments with higher concentrations of fragments. The spectrum of these ΔA is characterized by negative bands at 550 nm and 690 nm and by two positive bands at 542 nm and 680 nm (fig.2A). It corresponds to the blue shift of absorption bands at 545 nm and 685 nm, which accompanies the photoreduction of Q [13,14].

At the E_h below −50 mV the chemical reduction of Q [18,19] is accompanied by the increase in the chlorophyll fluorescence yield up to its maximum level (fig.1). The actinic light induces a reversible decrease in the fluorescence almost to the level of 'dark' fluorescence registered at E_h +400 mV (fig.1). (The effect of the irreversible light-induced decrease in the chlorophyll fluorescence yield in both the pea chloroplasts and digitonin fragments of chloroplasts under reductive conditions has been described in detail earlier [19].) Under these conditions no ΔA, related to the photoreduction of Q, are observed but new reversible light-induced ΔA, which are similar in their kinetics to the negative ΔF, are detected (fig.1). The spectrum of these ΔA at the E_h of −200 mV is characterized by bleaching of the absorption bands at 545 nm and 685 nm as well as at 408 nm, 422–428 nm and 518 nm and by the development of a band at

676 nm and of broad bands at 450 nm, 658 nm and with $\lambda > 695$ nm (fig.2B). The dark decay of the light-induced ΔF and ΔA at 685 nm and 542 nm is slowed down when E_h is lowered from −200 mV to −400 mV (fig.1). This indicates the reductive nature of the photoprocess. At the E_h below −450 mV these spectral changes in DT-20 fragments were largely irreversible in the dark. However, in the chlorophyll–protein complex of photosystem II the light-induced ΔA, accompanied by the decrease in the fluorescence yield, were reversible in the dark up to E_h −550 mV. The spectrum of these ΔA at E_h −490 mV (fig.2C) is similar to the difference absorption spectrum of DT-20 fragments at E_h −200 mV (fig.2B). The value of the light-induced ΔA (per mg chlorophyll) in the complex of photosystem II is three times higher than that in DT-20 fragments (figs 1 and 2). In the 'accessory' complex and in the complex of photosystem I the photoreaction described was not observed. This can show its relation to photosystem II.

In DT-20 fragments the initial rate of the light-induced decrease in the chlorophyll fluorescence yield at E_h −450 mV ($(\Delta F_i/\Delta_t)_{-450}$) and that of the light-induced increase in the fluorescence yield, following the Q photoreduction, at E_h +300 mV ($(\Delta F_i/\Delta_t)_{+300}$) were just the same when the intensity of actinic light used at E_h −450 mV (I_{-450}) was 500 times higher than that used at E_h +300 mV (I_{+300}). When the rate of direct photoreaction is higher than that of dark reactions (that was observed in our experiments) $\Delta F_i/\Delta t$ is directly proportional to $\varphi . I . \Delta F_{max}$. Since the values of the maximum ΔF (ΔF_{max}) at E_h −450 mV and at E_h +300 mV are nearly the same (fig.1), the ratio of quantum yields of the photoreactions at −450 mV and at +300 mV ($\varphi_{-450}/\psi_{+300}$), when $(\Delta F_i/\Delta t)_{-450} = (\Delta F_i/\Delta t)_{+300}$, is reversely proportional to the ratio I_{-450}/I_{+300}, i.e. $\varphi_{-450}/\varphi_{+300} \approx 1/500$. Thus, if $\varphi_{+300} \approx 1$ [13] then $\varphi_{-450} \approx 0.002$.

The light-induced ΔA and ΔF of DT-20 fragments at the E_h below −50 mV were observed also in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU). In 80% glycerol they were registered at −80°C as well as at 20°C. In the film obtained by drying the suspension of DT-20 fragments in the presence of dithionite and DCMU this photoreaction is also observed at −170°C (figs 1F and 2D) as well as at 20°C. The difference absorption spectrum (light minus dark) of this film at −170°C resembles that of the suspension of DT-20 fragments at 20°C (figs 2B and 2D) but the ΔA values of the film in the region 400–500 nm are relatively smaller (probably, due to more light scattering).

4. Discussion

The light-induced bleaching of the absorption bands near 420 nm and 680 nm and the appearance of bands near 450 nm, 660 nm and with $\lambda > 695$ nm at low redox potentials (fig.2) show that the photoreduction of either chlorophyll or pheophytin occurs in photosystem II preparations [20-23]. The bleaching of two small bands at 518 nm and 545 nm (fig.2) strongly indicates the photoreduction of pheophytin [20]. The development of the broad band near 450 nm (fig.2) is characteristic of the radical anion of pheophytin *a* [2]. In ether solution the absorption bands of pheophytin *a* are at 408 nm, 505 nm, 534 nm and 667 nm [20]. The shift of these bands in vivo to 422 nm, 518 nm, 545 nm and 685 nm, respectively, can be interpreted as an enviromental shift. However, the development of the narrow band at 676 nm can show that the pheophytin photoreduction results both in the blue shift of the chlorophyll absorption band at 680 nm and in the bleaching of the pheophytin band at 670 nm. Such an interpretation is similar to that suggested for the photoreduction of bacteriopheophytin in *Chromatium minutissimum* [5–7] and *Chr. vinosum* [8,9].

Pheophytin is probably reduced in the primary light reaction of photosystem II rather than in a photoreaction of antenna pigments, since this completely reversible photoprocess occurs at −170°C and is accompanied by a 2–3-fold decrease in the chlorophyll fluorescence yield of photosystem II when only approx. 0.1% of all the pigment molecules bleach. However, one cannot exclude completely the possibility that pheophytin, which can appear during the isolation of the chloroplast particles and which is not related directly to reaction centers of photosystem II, is also reduced under illumination at 20°C. This question is under study now.

The pheophytin photoreduction in photosystem II is similar to the earlier described [5–9] photoaccumulation of radical anion of bacteriopheophytin (Bph^-) in *Chromatium*. (This photoaccumulation

is a result of a fast (~ 1 μs) reaction of ferrocytochrome with a biradical of the reaction center, [P-890$^+$ Bph$^-$] [6,8,9].) Really, both the photoreactions occur only when the 'primary' electron acceptor (ubiquinone or plastoquinone) is in the reduced form. Both the photoreactions are accompanied by the decrease in the chlorophyll fluorescence yield and are observed at low temperatures but they have a low quantum yield. From this comparison, one can assume that the photoreduction of pheophytin (Ph) in photosystem II is also a result of electron transfer from a secondary electron donor of photosystem II to the biradical [P-680$^+$ Ph$^-$] which is formed in the primary photoact of photosystem II preceding the reduction of Q. (Here, P-680 is the primary electron donor of photosystem II [13,14, 21,22]. Then by analogy with the photoreaction in *Chromatium* [6,7], the fluorescence increase under the reduction of Q can be interpreted as the appearance of short-lived luminescence which is a result of the P-680 excitation in the charge recombination in the biradical [P-680$^+$ Ph$^-$]. The decrease in the luminescence, when pheophytin is photoreduced, can be due to the photoaccumulation of the inactive state of the reaction center, [P-680 Ph$^-$].

We wish to note that the formation of pheophytin during the procedure of photosystem II preparations should be studied to reveal the possible pheophytin photoreduction outside the reaction centers.

Acknowledgements

We are very grateful to N. I. Shutilova and Dr I. N. Krakhmaleva for their help during this study.

References

[1] Krasnovsky, A. A. and Voinovskaya, K. K. (1951) Dokl. Acad. Nauk 81, 879–882.
[2] Evstigneev, V. B. and Gavrilova, V. A. (1954) Dokl. Acad. Nauk 96, 1201–1204.
[3] Pakshina, E. V. and Krasnovsky, A. A. (1974) Biophysica 19, 238–242.
[4] Rockley, M. G., Windzor, M. W., Cogdell, R. J. and Parson, W. W. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2251–2255.
[5] Shuvalov, V. A., Klimov, V. V., Krakhmaleva, I. N., Moscalenko, A. A. and Krasnovsky, A. A. (1976) Dokl. Acad. Nauk 227, 984–987.
[6] Shuvalov, V. A. and Klimov, V. V. (1976) Biochim. Biophys. Acta 440, 587–599.
[7] Klimov, V. V., Shuvalov, V. A., Krakhmaleva, I. N., Karapetyan, N. V. and Krasnovsky, A. A. (1976) Biochimia 41, 1435–1441.
[8] Tiede, D. M., Prince, R. C. and Dutton, P. L. (1976) Biochim. Biophys. Acta 449, 447–467.
[9] Van Grondelle, R., Romijn, I. C. and Holmes, N. G. (1976) FEBS Lett. 72, 187–191.
[10] Shuvalov, V. A., Krakhmaleva, I. N. and Klimov, V. V. (1976) Biochim. Biophys. Acta 449, 597–601.
[11] Klimov, V. V., Shuvalov, V. A., Krakhmaleva, I. N., Klevanik, A. V. and Krasnovsky, A. A. (1977) Biochimia 42, 519–530.
[12] Krasnovsky, A. A. and Shaposhnikova, M. G. (1970) Physiol. Rastenij 17, 436–439.
[13] Van Gorkom, H. J., Tamminga, J. J. and Haveman, J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 347, 417–438.
[14] Van Gorkom, H. J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 347, 439–442.
[15] Klevanik, A. V., Klimov, V. V., Shuvalov, V. A. and Krasnovsky, A. A. (1977) Dokl. Acad. Nauk in press.
[16] Shutilova, N. I., Klimov, V. V., Shuvalov, V. A. and Kutjurin, V. M. (1975) Biophysica 20, 844–847.
[17] Shutilova, N. I. and Kutjurin, V. M. (1975) Biophysica 20, 246–249.
[18] Duysens, L. M. N. and Sweers, H. E. (1963) in: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria (Miyachi, S. ed) pp. 353–372, Univ. Tokyo Press, Tokyo.
[19] Karapetyan, N. V. and Klimov, V. V. (1973) Physiol. Rastenij 20, 545–553.
[20] Goedheer, J. C. (1966) in: The Chlorophylls (Vernon, L. P. and Seeley, G. R. eds) pp. 143–184, Academic Press, New York, London.
[21] Gläser, M., Wolf, Ch., Buchwald, H.-E. and Witt, H. T. (1974) FEBS Lett. 42, 81–85.
[22] Lozier, R. H. and Butler, W. L. (1974) Biochem. Biophys. Acta 333, 465–480.

Photosynthetic Organelles
Special Issue of Plant & Cell Physiol.: 219–227 (1977)

Photoproduction of hydrogen in photosynthetic systems

A. A. Krasnovsky

A. N. Bakh Institute of Biochemistry of the USSR Academy of Sciences, Moscow, USSR

(Received September 20, 1976)

Hydrogen photoevolution by *Chlorella* was studied with gas chromatography; Gaffron's results were confirmed on the involvement of carbon cycles in the process. To simulate the photochemical stage of the reaction, the following model systems were proposed.

$NADH_2$ excited in the main absorption band (365 nm) can reduce viologens and ferredoxin; in the presence of hydrogenase, hydrogen gas is evolved. The reaction is sensitized to visible light by porphyrins.

In aqueous solutions of chlorophyll dissolved by detergents + electron donor ($NADH_2$, cyteine, etc.) + bacterial hydrogenase, hydrogen gas is evolved under red light. The reaction efficiency is comparable with that of chloroplast suspensions. Methylviologen enhances hydrogen photoproduction.

Inorganic photocatalysts (TiO_2, ZnO) can photoreduce viologens and produce hydrogen in the similar systems under ultraviolet light (365 nm).

The mechanism of the reactions studied is considered.

Jour 13-17

Photoevolution of hydrogen by green algae

In 1942 Gaffron and Rubin discovered that illumination of unicellular algae in anaerobic conditions may lead to the formation of hydrogen gas (*13*, see review *12*). In 1949 Gest and Kamen (*14*) found that photosynthesizing bacteria were capable of photochemical evolution of hydrogen. In this case, however, hydrogen is donated not by water but by various organic and inorganic substances used in the bacterial metabolism. The extensive literature dealing with the production of hydrogen by bacteria and algae has been surveyed in recent reviews by Kondratieva and Gogotov (*17*) and Oshchepkov and Krasnovsky (*30*).

The evolution of hydrogen by unicellular algae has been studied in our laboratory (*28*). For this purpose, a device was constructed using a gas chromatograph and a monochromator (*29*); a cuvette with a magnetic stirrer containing 1 ml of *Chlorella* suspension was connected to a gas chromatograph. Illumination of the algal suspension in air resulted in oxygen evolution. After bubbling of argon, hydrogen evolution occurred without any adaptation period.

In accord with Gaffron, addition of glucose or other exogenous hydrogen donors sharply increased the production of hydrogen. Carbon dioxide was released simultaneously, and oxygen and hydrogen were evolved alternatively. Under steady-state conditions, no simultaneous stoichiometric release of oxygen and hydrogen was usually observed. However, Efimtzev, Boichenko and Litvin (*10*), who used a sensitive amperometric method, recently recorded simultaneous evolution of

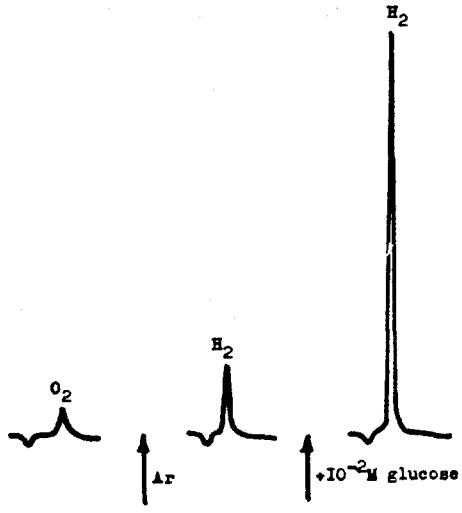


Fig. 1

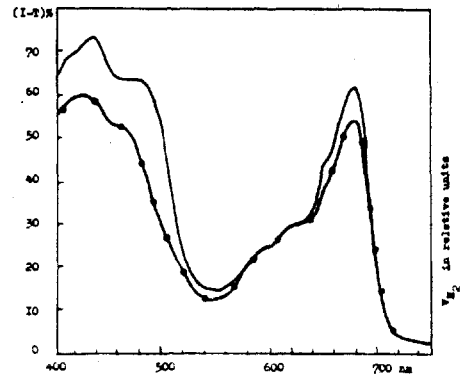


Fig. 2

Fig. 1. *An example of a gas chromatograph record of oxygen and hydrogen upon illumination of* Chlorella pyrenoidosa. Ar: bubbling of argon. Light intensity: 2.4×10^4 erg·cm^{-2}·sec^{-1} (*28*).
Fig. 2. *Action spectrum of hydrogen photoproduction by* Chlorella (-○-) *as compared to the absorption spectrum* (——) (*28*).

hydrogen and oxygen in many photosynthesizing organisms during the induction period. Evolution of hydrogen by *Chlorella* was measured as a function of wavelength of incident light (*28*). The action spectrum of hydrogen evolved proved to be close to that of oxygen evolution. Some differences were noticed in the far-red region where hydrogen was evolved more effectively. These measurements have shown that no more than five quanta of red light are required to release one mole of hydrogen upon illumination of a *Chlorella* suspension. As 8–10 quanta are required to evolve one mole of oxygen during photosynthesis, the above data indicate that the photoevolution of hydrogen is more effective from the energetic point of view. However, the results of the above measurements should not be overestimated, since hydrogen is evolved as a result of photometabolism of the organic substances stored in the cell during ordinary photosynthesis. It is well known that this process may occur in general by way of enzymatic reactions without any light energy. Thus, a "dark" evolution of hydrogen is observable in *Chlorella* and, especially, in blue-green algae (*31*). In the case of the latter organisms, heterocysts can probably function by releasing hydrogen while normal cells can affect photosynthesis by giving off oxygen (*4*).

Significantly, oxygen inhibits the photoevolution of hydrogen either by interacting with reduced products or by inhibiting the enzyme hydrogenase. The mechanism of hydrogen photoevolution could be visualized simply by a scheme in which oxygen is given off at one "end" of the photosynthetic electron transport chain while hydrogen is released at the other "end." Such a simple scheme, however, is not consistent with experimental evidence.

That the hydrogen evolution is invariably accompanied by a release of carbon dioxide was already demonstrated in Gaffron's experiments. In the case of mutants deficient in photosystem II (*5*), hydrogen was effectively evolved. Thus, no rigid

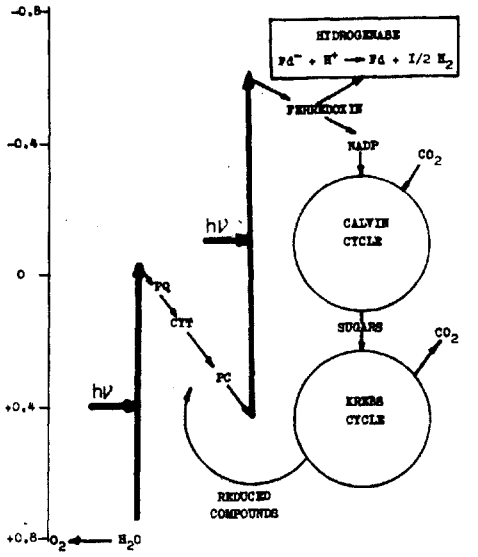


Fig. 3. *A hypothetic diagram of metabolic pathways of hydrogen evolution (modified Gaffron's scheme).*

connection exists between photolysis of water (in photosystem II) and evolution of hydrogen. This is consistent with the action of diuron which at a concentration of 10^{-6} M suppresses the release of oxygen without affecting that of hydrogen. It follows that the photoproduction of hydrogen is closely linked with the carbon metabolism of the cell (*12*, *13*). Hydrogen is evolved by way of a number of enzymatic and photochemical intermediate reactions with participation of reduced compounds formed during the operation of carbon cycles of photosynthesis and respiration. However, in the overall process, the evolved molecular hydrogen is derived from water molecules since no other hydrogen source is present in the system. Most likely, in the course of carbon cycles of photosynthesis and respiration, active hydrogen donors are formed which enter photosystem I of the electron transport chain. Reduced pyridine nucleotides are formed in the Krebs cycle. These compounds may enter a locus of photosystem I where chlorophyll sensitizes electron transport to ferredoxin. That such a mechanism is possible is indicated by model experiments described below.

The question arises as to whether photolysis of water can occur without the participation of carbon cycles. To answer this, the reactions must be done with isolated structures such as chloroplast lamella where the photosynthetic electron transport chain is localized.

Chloroplasts: Reduction of viologens and hydrogen evolution

The redox potential of methylviologen, $E_0' = -0.455$ v, is close to that of ferredoxin which is the final electron acceptor of photosystem I, and is higher than the E_0' of the hydrogen electrode (−0.42 v). The reduced viologen is easily oxidized by oxygen to form hydrogen peroxide. To observe the accumulation of reduced viologens by chloroplasts, either oxygen production must be inactivated

(i.e., photosystem II), for example by heating, or an oxygen-consuming system must be introduced into the chloroplast suspension.

Arnon (*1*) reported photoreduction of methylviologen by chloroplasts in the presence of cysteine and dichlorphenolindophenol, which acted as electron donors. Kok and his co-workers (*16*) observed photoreduction of viologens by chloroplasts in the presence of glucose and glucose oxidase. Zweig and Avron (*34*) and Black (*6*) described the reduction of various viologens by chloroplasts in the presence of ethanol and catalase.

We have studied photoreduction of methylviologen by chloroplasts using hydrazine as the hydrogen donor in the course of progressive disruption of chloroplast structure by organic solvents (*8*). This reaction proceeded most actively at pH close to 8.5. With 10% of solvent, the process was activated, and with 50% completely inhibited. With 70–80% of solvent, chlorophyll was extracted and active photoreduction of viologen was resumed. Illumination of chloroplasts in the presence of oxygen led to oxygen reduction with formation of hydrogen peroxide. Addition of methylviologen resulted in a multifold increase of the amount of peroxide formed. Viologen competes with oxygen for electrons of photosystem I and the cation radical of methylviologen that is formed is reversibly oxidized by oxygen to form hydrogen peroxide (*33*). Photoreduction of viologens by chloroplasts indicates that the system has reached the hydrogen electrode potential which is a precondition for release of molecular hydrogen if the system includes a catalyst (hydrogenase) promoting the reaction $2H^+ + 2e \rightarrow H_2$.

Boichenko reported (*7*) that isolated chloroplasts of higher plants were capable of releasing hydrogen in the presence of glucose. In Arnon's experiments (*1*) photorelease of hydrogen by chloroplasts was observed in the presence of bacterial hydrogenase and cysteine as electron donor. ATP formation accompanied hydrogen production.

Benemann et al. (*3*) have described photoproduction of hydrogen in a similar system (but without cysteine) consisting of isolated chloroplasts, ferredoxin and hydrogenase isolated from a *Clostridium pasteurianum* culture. They believed that the reaction is accompanied by oxygen production which, however, they were unable to measure. Oxygen is presumed to be used to oxidize exogenous electron donors such as glucose. However, as in Arnon's experiments, endogenous electron donors other than water may have been used. Hall and co-workers (*32*) recently described a prolonged hydrogen evolution in similar systems and concluded that H_2O was the source of electrons. Ben-Amotz and Gibbs (*2*) revealed hydrogen

Table 1 *Hydrogen evolution in red and white light by bean leaves chloroplasts*

System	Hydrogen, μl/min	
	Red light, 600–750 nm	White light, 400–700 nm
Without $NADH_2$	0.000	0.000
$NADH_2$	0.007	0.015
$NADH_2 + MV^{2+}$	0.072	0.150

Chlorophyll concentration, 0.05 mg/ml; $NADH_2$ concentration, 10^{-3} M; methylviologen concentration 10^{-3} M. Light intensities: 7×10^5 (red light) and 10^6 (white light) erg·cm^{-2}·sec^{-1}.

evolution in cell-free preparations from algae mixed with hydrogenase and dithioerithrol as electron donor.

In our laboratory photoproduction of hydrogen by chloroplasts was observed in the presence of hydrogenase isolated by Gogotov et al. from photosynthesizing bacteria (*15*), with $NADH_2$ acting as the electron donor (*26*).

Chlorophyll solutions: Photoreduction of viologen and photoevolution of hydrogen

Studies carried out in our laboratory many years ago revealed that during the photoreduction of chlorophyll, an intermediate is formed with an E_0' close to that of the hydrogen electrode. In 1949, we revealed the possibility of chlorophyll-sensitized reduction of NAD (*19*). In a reaction of this type, chlorophyll acts as a light-excited electron carrier from electron-donating molecules to electron acceptors (see review *18*). More recently, we have investigated the photosensitized reduction of methylviologen under the action of red light absorbed by chlorophyll in the presence of a number of electron donors. The reactions were done in organic solvents and aqueous solutions of detergents where chlorophyll and other reaction components were dissolved (*9*, *18*, *20*). The most efficient photoreduction of methylviologen under anaerobic conditions was observed when phenylhydrazine, cysteine and $NADH_2$ were used as electron donors; thiourea was inactive under these conditions. Efficient photosensitized reduction of methylviologen in the presence of thiourea did, however, occur in experiments without preliminary evacuation of air (*27*). The mechanism of this reaction was as follows. As a result of photosensitized oxidation of thiourea by oxygen, active long-lived reductants were formed which were capable of reducing methylviologen. The anaerobiosis which had developed due to photosensitized reduction of oxygen, prevented reoxidation of reduced viologen. In pyridine solution, the "red" photoreduced form of chlorophyll is capable of a dark reaction with viologen. In this medium, a possible mechanism of the reaction consists of photoreduction of chlorophyll by electron donor followed by a reaction between the reduced chlorophyll and viologen. On the other hand, observations of fluorescence quenching by chlorophyll and its analogs by methylviologen point to a possible primary photooxidation of the sensitizing pigment (*25*). Thus, photoreduction of methylviologen in a chlorophyll solution can be achieved at the expense of the light absorbed by chlorophyll. To have molecular hydrogen released in the reactions described above, a catalyst of the reaction $2H^+ + 2e \rightarrow H_2$ should be introduced into the system. Indeed, addition of bacterial hydrogenase to an aqueous solution of Triton X-100 containing chlorophyll and cysteine (or $NADH_2$) did result in release of molecular hydrogen upon

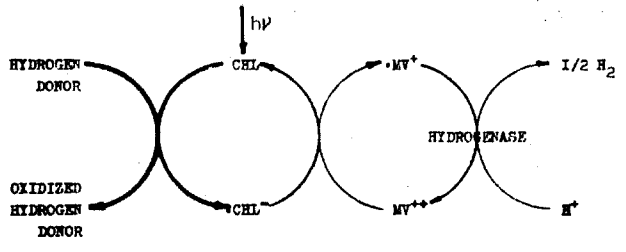


Fig. 4. *Scheme of chlorophyll photosensitized hydrogen evolution.*

Table 2 *Chlorophyll-sensitized photoevolution of hydrogen in aqueous solution of Triton X-100 upon illumination with red and white light*

System	Hydrogen, μl/min	
	Red light, 600–750 nm	White light, 400–700 nm
$NADH_2$	0.070	0.100
$NADH_2+MV^{2+}$	0.150	0.260
Cysteine	0.006	0.010
Cysteine$+MV^{2+}$	0.125	0.200

Hydrogenase was added in each system. $NADH_2$, cysteine and methylviologen concentrations, 1.4×10^{-3} M. Light intensities: 5×10^5 (red light) and 10^6 (white light) erg·cm^{-2}·sec^{-1}.

illumination (*26*). Addition of methylviologen considerably activated the reaction, as in the case of chloroplasts.

Photoactivation of reduced pyridine nucleotides: Reduction of viologen and hydrogen evolution

In the reactions described above, light-excited chlorophyll reacts with non-excited $NADH_2$. However, absorbing a light quantum in their own absorption region (at 340 nm), $NADH_2$ and $NADPH_2$ are activated and their redox potential becomes more positive than the E_0' of the hydrogen electrode. Thus excited $NADH_2$ can reduce methylviologen and ferredoxin (*23*). The activation of $NADH_2$ by light has been investigated in a series of studies undertaken in our laboratory. Just as in the above-mentioned reactions, introduction of hydrogenase led to release of hydrogen (*26*) upon illumination of aqueous solutions of $NADH_2$ with ultraviolet light at 365 nm.

Table 3 *Hydrogen evolution upon illumination of aqueous solution of pyridine nucleotide*

System	Hydrogen, μl/min
$NADH_2$	0.120
$NADH_2+MV^{2+}$	0.400

Hydrogenase was added in each system. $NADH_2$ and methylviologen concentrations, 1.4×10^{-3} M. Light intensity: 2×10^5 erg·cm^{-2}·sec^{-1} at 365 nm.

Table 4 *Evolution of hydrogen upon illumination of aqueous suspension of inorganic photocatalysts*

System	Hydrogen, μl/min
Titanium dioxide	0.009
Titanium dioxide$+MV^{2+}$	0.094
Zinc oxide	0.002
Zinc oxide$+MV^{2+}$	0.005

Hydrogenase was added in each system. Methylviologen concentration, 10^{-3} M. Light intensity: 2×10^5 erg·cm^{-2}·sec^{-1} at 365 nm. Illumination time 1 min.

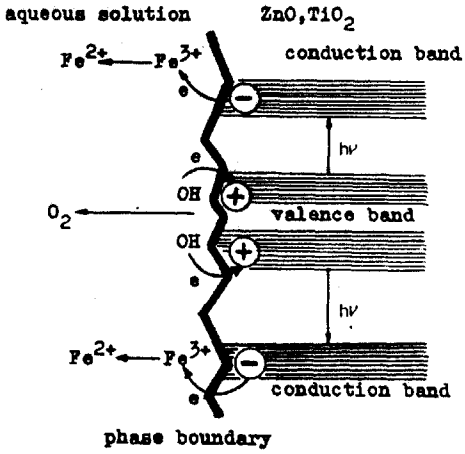


Fig. 5

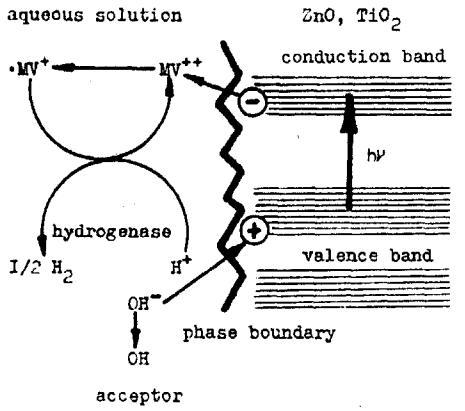


Fig. 6

Fig. 5. *Scheme of oxygen photoevolution with inorganic photocatalysts.*
Fig. 6. *Scheme of hydrogen evolution with inorganic photocatalysts.*

Use of inorganic photocatalysts for viologen reduction and hydrogen evolution

Inorganic photocatalysts (electronic semiconductors) such as titanium dioxide and zinc oxide, can act as photosensitizers upon excitation in the ultraviolet region of the spectrum. Using them, we were able to simulate the Hill reaction occurring in chloroplasts. When an aqueous suspension of titanium or zinc oxides containing oxidants (ferric compounds or quinones) was illuminated with UV light (365 nm), oxygen was evolved (*21*). The use of water labeled with a heavy oxygen ^{18}O, showed that the oxygen evolved was derived from water molecules (*11*). Experiments performed in anaerobic conditions revealed that zinc and titanium oxides photosensitized viologen photoreduction (*22*). The next step was to introduce hydrogenase in the system in order to produce molecular hydrogen evolution. Indeed, in the presence of methylviologen and preparations of bacterial hydrogenase, molecular hydrogen was released in aqueous suspensions of titanium and zinc oxides upon illumination with ultraviolet light (*24*). Hydrogen probably originated from water molecules but experimental verification of this is necessary.

These model experiments can help in understanding the mechanism of hydrogen and oxygen photoevolution and may serve as a prototype of systems using solar energy for photolysis of water.

References

(*1*) Arnon, D. I., A. Mitsui and A. Paneque: Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation. *Science* 134: 1425 (1961).

(*2*) Ben-Amotz, A. and M. Gibbs: H_2 metabolism in photosynthetic organisms. Light-dependent H_2 evolution by preparation from *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* and spinach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 355–359 (1975).

(*3*) Benemann, J. R., J. A. Berenson, N. O. Kaplan and M. D. Kamen: Hydrogen evolution by chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 70: 2317–2320 (1973).

(4) Benemann, J. R. and N. M. Weare: Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science* 184: 174–175 (1974).
(5) Bishop, N. I. and H. Gaffron: On the interrelation of the mechanisms for oxygen and hydrogen evolution in adapted algae. In *Photosynthetic Mechanisms in Green Plants*. Edited by B. Kok and A. T. Jagendorf, p. 441, Natl. Acad. Sci., Natl. Res. Counc., Washington D. C., 1963.
(6) Black Jr., C. C.: Chloroplast reactions with dipyridyl salts. *Biochim. Biophys. Acta* 120: 332–340 (1966).
(7) Boichenko, E. A.: Reduction of carbon dioxide by the aid of chloroplasts hydrogenase. *Dokl. AN SSSR* 64: 545–548 (1949).
(8) Brin, G. P. and A. A. Krasnovsky: Photoreduction of methylviologen photosensitized by chlorophyll and chloroplasts: Hydrazine as electron donor. ibid. 204: 1253–1256 (1972).
(9) Brin, G. P., A. N. Luganskaya and A. A. Krasnovsky: Chlorophyll photosensitized reduction of viologens: Cysteine and thiourea as electron donors. ibid. 174: 221–224 (1967).
(10) Efimtsev, E. I., E. A. Boichenko and F. F. Litvin: Photoinduced hydrogen production by bacteria, algae and higher plants. ibid. 220: 986–989 (1975).
(11) Fomin, G. V., G. P. Brin, M. V. Genkin, A. K. Liubimova, L. A. Blumenfeld and A. A. Krasnovsky: Mass-spectrometric study of water photodecomposition in the system inorganic photosensitizer-electron acceptor. ibid. 212: 424–427 (1973).
(12) Gaffron, H.: *Horizons of Bioenergetics*. Academic Press, Inc., New York, 1972.
(13) Gaffron, H. and J. Rubin: Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen. Physiol.* 26: 219–240 (1942).
(14) Gest, G. and M. Kamen: Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrium*. *Science* 109: 558–559 (1949).
(15) Gogotov, I. N., N. A. Zorin and L. V. Bogorov: Hydrogen metabolism and ability for nitrogen fixation in *Thiocapsa roseopersicina*. *Mikrobiologiya* 43: 5–10 (1974).
(16) Kok, B., H. Rurainski and O. Owens: The reducing power generated in photoact 1 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 109: 347–356 (1965).
(17) Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov: Microorganisms—hydrogen producers. *Izvestiya AN SSSR, Ser. Biol.* No. 1: 69–86 (1976)
(18) Krasnovsky, A. A.: *Transformation of light energy in photosynthesis*. Nauka Publishing House, Moscow, 1974.
(19) Krasnovsky, A. A. and G. P. Brin: Hydrogen transfer from ascorbic acid to pyridine nucleotides under action of light absorbed by chlorophyll. *Dokl. AN SSSR* 67: 325–328 (1949).
(20) Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin: The use of viologens as electron acceptors in the photochemical reactions of chlorophyll. ibid. 163: 761–764 (1965).
(21) Krasnovsky, A. A. and G. P. Brin: Inorganic models of Hill reaction. ibid. 147: 656–659 (1962); Photosensitized oxygen evolution in aqueous solutions of oxidants. In *Molecular Photonics*. p. 161, Nauka Publishing House, Leningrad, 1970.
(22) Krasnovsky, A. A. and G. P. Brin: Photoreduction of viologens sensitized by inorganic semiconductors. *Dokl. AN SSSR* 213: 1431–1434 (1973).
(23) Krasnovsky, A. A., G. P. Brin and V. V. Nikandrov: Excitation by light of reduced pyridine nucleotides: Electron transfer to ferredoxin and methylviologen. ibid. 220: 1214–1217 (1975).
(24) Krasnovsky, A. A., G. P. Brin and V. V. Nikandrov: Photoreduction of oxygen and photoevolution of hydrogen on inorganic photocatalysts. ibid. 229: 990–993 (1976).
(25) Krasnovsky, A. A. and N. N. Drozdova: The quenching of fluorescence of chlorophyll and analogs by methylviologen. ibid. 167: 928–930 (1966).
(26) Krasnovsky, A. A., V. V. Nikandrov, G. P. Brin, I. N. Gogotov and V. P. Ochshepkov: Photoproduction of hydrogen in the solutions of chlorophyll, $NADH_2$ and chloroplasts. ibid. 225: 711–713 (1975).
(27) Luganskaya, A. N. and A. A. Krasnovsky: Study of the mechanism of chlorophyll-photosensitized redox reaction in the presence of oxygen. *Molekuliarnaya Biologiya* 4: 848–859 (1970).
(28) Oshchepkov, V. P. and A. A. Krasnovsky: A study on hydrogen evolution during the illumination of the algae. *Fiziol. Rastenii* 19: 1090–1097 (1972); Photoproduction of molecular hydrogen by *Chlorella*: Action spectrum. ibid. 21: 462–467 (1974).

(*29*) Oshchepkov, V. P. and A. A. Krasnovsky: Gas chromatographic measurement of gas metabolism of photosynthetic organisms. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* 10: 760–764 (1974).

(*30*) Oshchepkov, V. P. and A. A. Krasnovsky: Photoproduction of molecular hydrogen by green algae. *Izvestiya AN SSSR, Ser. Biol.* No. 1: 87–100 (1976).

(*31*) Oshchepkov, V. P., K. A. Nikitina, M. V. Gusev and A. A. Krasnovsky: Hydrogen evolution by blue-green algae. *Dokl. AN SSSR* 213: 739–742 (1973).

(*32*) Rao, K. K., L. Rosa and D. O. Hall: Prolonged production of hydrogen gas by a chloroplast biocatalytic system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68: 21–28 (1976).

(*33*) Shuvalov, V. A. and A. A. Krasnovsky: Study of oxygen photoreduction in chloroplasts by the method of luminol and chlorophyll chemiluminescence. *Biokhimiya* 40: 358–366 (1975).

(*34*) Zweig, G. and M. Avron: On the oxidation-reduction potential of the photoproduced reductant of isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19: 397–400 (1965).

studia biophysica, Berlin, Band 65, 1977, Heft 2, S. 81 - 89
Printed in the German Democratic Republic

PHOSPHORESCENCE AND DELAYED FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL AND ITS PRECURSORS IN SOLUTIONS, LEAVES AND CHLOROPLASTS AT 77°K

A.A.KRASNOVSKY, jr., N.N. LEBEDEV, F.F. LITVIN

Moscow State University, Department of Biology, Chair of Physico-Chemical Biology

Phosphorescence of chlorophyll a, its precursors and analogues produced by deactivation of pigment triplet state was observed in solutions, etiolated and greening bean leaves and isolated chloroplasts at 77°K. Together with the phosphorescence a recombination delayed fluorescence appeared. Analysis of excitation and emission spectra and lifetimes revealed the afterglow of different pigment forms. In solutions the phosphorescence of Mg-monosolvates, Mg-disolvates and aggregates was observed. In etiolated and greening leaves the afterglow of protochlorophyll(ide), chlorophyllide and chlorophyll a was recorded. The development of the photosynthetic apparatus led to the quenching of chlorophyll triplet luminescence. In adult chloroplasts chlorophyll phosphorescence was detected after the destroying of native structures or in the presence of the reducing agent dithionite. The same phosphorescence was observed in subchloroplast fragments enriched in photosystems 1 and 2.

Introduction

A number of publications deals with the experimental investigations of chlorophyll triplet states in native photosynthetic structures. To detect the formation of triplets, flash spectroscopy, ESR and the delayed fluorescence technique were used, the most convincing evidence being produced by the recent low-temperature ESR measurements /9,12/. We studied the problem with the aid of phosphorescence known to accompany intramolecular triplet-singlet transitions. As a method for investigating triplets, phosphorescence has some essential advantages: it characterizes directly

the energy of triplet states and makes it possible to readily identify active species (from the analysis of emission and excitation spectra and decay kinetics). However, low intensity of chlorophyll phosphorescence hampered its thorough investigation. The main body of information was obtained by Calvin's and Becker's groups with the use of the photographic technique /1,2,11/. The sensitivity of this technique was not sufficient for detailed study of the luminescence; the authors managed to estimate roughly the lifetimes and emission spectra of frozen solutions of chlorophylls a and b.

We succeeded in constructing the sensitive photoelectric apparatuses for phosphorescence measurements. They consisted of mechanical phosphoroscopes, grating monochromators, powerful light sources and allowed us to measure the emission and excitation spectra and life-time (τ) of afterglow with the quantum yield $> 10^{-6}$ and $\tau > 10^{-4}$ sec /5,6/. With the aid of this equipment a systematic study of the phosphorescence of pigments in solutions and organisms was conducted. Some aspects of this study have already been published /4-8/. In this paper the main results are briefly summarized.

Results

Solutions of pigments. The phosphorescence of several chlorophylls and pheophytins was observed in solutions at 77°K. The quantum yield of the emission was near 10^{-5} for all the pigments. The afterglow characteristics depended greatly on the nature of solvents and on the presence of a magnesium atom in a pigment molecule. In polar solvents, Mg-containing pigments emitted two main types of phosphorescence which differed in the decay and spectral parameters. Usually the combination of these types of emission was observed, but the short wavelength phosphorescence

prevailed in diethyl ether, and the long wavelength one - in pyridine (Table 1). On the basis of the analysis of absorption, excitation and emission spectra short wavelength emission can be ascribed to the Mg-monosolvates, long wavelength one - to the Mg-disolvates of pigments (see also ref. 6). In agreement with this interpretation, dilute solutions of pheophytins exhibited only one type of phosphorescence in the same media (Table 1). In non-polar solvents the phosphorescence of pigment aggregates was revealed. Aggregation led to the long-wave shift of the emission maxima and to the decrease of triplet life-times (Table 1). We failed to observe the π-n phosphorescence reported by Fernandez and Becker /2/ (for details see ref. 6). But a new type of afterglow was found at 77°K. Its emission spectra coincided with that of prompt fluorescence of solutions and appeared in dilute solutions of pigments (10^{-6}M) in polar media. The intensity of this delayed fluorescence was proportional to the square of illumination intensity. These facts suggest that the light is produced by a biphotonic process possibly by radical recombination or triplet-triplet annihilation. Delayed fluorescence of this type has also been observed in living organisms (see below).

Isolated bean leaves emitted afterglow (77°K) with four main bands indicated in the Table 2 (Fig. 1). The band near 660 nm is close to that of protochlorophyll(ide) prompt fluorescence (655 nm). The other three (870, 920, 970 nm) lay in the region of protochlorophyll phosphorescence (compare with Table 1). The excitation spectra of this phosphorescence exhibited maxima at 630 and 650 nm similar to the absorption bands of protochlorophyll(ide) in leaves (Fig. 1). These data make it possible to propose that the phosphorescence is associated with the three native forms of the precursor /3/: 870 nm band - to the P628, 920 - to P637,

TAB.1 Parameters of Phosphorescence of Chlorophyll and its analogues in solutions at 77°K.

Pigment	Solvent	Excitation maxima, nm	Emission maxima, nm	msec
Chlorophyll a	Diethyl ether	658	930	2,4
	Pyridine	672	985	1,8
	Petroleum ether (aggregates)	690-720	970-1000	1,2
Pheophytin a	Diethyl ether	664	930	1,2
	Pyridine	665	940	1,1
Chlorophyll b	Diethyl ether	644	890	4,3
	Pyridine	657	930	3,1
	Petroleum ether (aggregates)	-	940-1000	-
Protochlorophyll	Diethyl ether	622	845	11,5
	Pyridine	636	920	4,5
	Petroleum ether (aggregates)	630-635	890-930	4,5
Protopheophytin	Diethyl ether	564,587	796,897	9,1
	Pyridine	569,592	798,905	10
Chlorobium-chlorophyll "660"	Diethyl ether	658	960	1,5
Chlorobium-chlorophyll "650"	-"-	649	920	2,1

Errors of determination of emission and excitation maxima and lifetimes were ± 5 nm, ± 2 nm and ± 15% respectively.

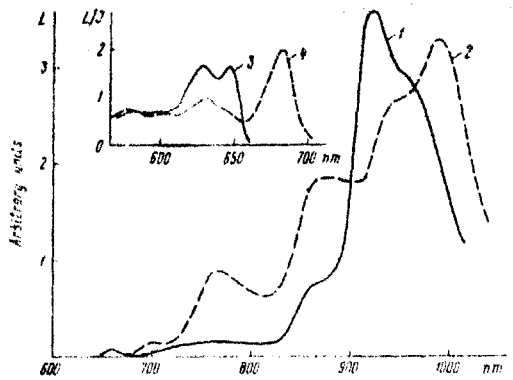


FIG. 1 Afterglow emission and excitation spectra of etiolated bean leaves (1,3) and after 5 min of greening (2,4) at 77°K. L - afterglow intensity; I - intensity of exciting light. Slit width of monochromator corresponded to 12 and 5 nm for measurements of emission and excitation spectra, respectively. Emission spectra are corrected for the spectral sensitivity of the apparatus.

970 - to P650. In normal etiolated leaves delayed fluorescence, as was pointed out above, belonged mainly to P650, but after heating ($\geq$ 60°C) or incubation with δ-aminolevulinic acid shorter-wavelength delayed fluorescence was observed (Table 2).

Greening bean leaves. After several minutes of greening (2.000 lx, 20°C), the intensity of protochlorophyll(ide) afterglow decreased by about 20-30 times (but it did not disappear, see maxima at 930 and 870 nm or curve 2 in Fig. 1). New band at 700 and 1.000 nm appeared in the emission spectra (Fig. 1). The first one coincides with that of chlorophyllide prompt fluorescence (695 nm) and can be interpreted as delayed fluorescence of this pigment. In the excitation spectrum of the second band a chlorophyllide maximum at 680 nm was observed. Thus this band corresponds probably to the phosphorescence of the pigment (Table 2).

Apart from the chlorophyllide and protochlorophyllide luminescence described above, an additional 760 nm emission band was detected (Fig. 1, 2). The nature of this band is not clear now, it might well be porphyrin phosphorescence /10/.

Chlorophyll a accumulated after an hour of greening also exhibited phosphorescence, a maximum of emission being at 960 nm and that of excitation at 668 nm, $\tau \approx 2$ msec (Table 2, Fig. 2). Delayed fluorescence of this pigment was observed at 684 nm and coincided with the main band of prompt fluorescence in leaves. With further greening the chlorophyll afterglow decreased gradually, its spectrum and lifetime remaining practically unaltered. We failed to observe it after 15 hours of greening and also in adult leaves.

Chloroplasts and their fragments. The second-class chloroplasts emitted weak infrared afterglow at 77°K. None of the substances affecting electron transport (dichlorophenyl dimethylurea, ferrycyanide, ascorbate or KCN) influenced the signal. It increased considerably, however, when agents destroying native structures (heating above 50°C, organic solvents, detergents, urea) were used. A reducing agent (dithionite) also stimulated the phosphorescence (Fig. 2).

In all cases the 960 and 670 bands dominated in the emission and excitation spectra, respectively, the lifetime being approximately 2 msec.

Phosphorescence with the maximum at 960 nm was observed in chloroplast fragments enriched in photosystem 1 or 2. It was also stimulated by dithionite and the agents indicated above.

Discussion

The data presented suggest that chlorophyll, its analogs and precursors are capable to populate triplet states and to produce

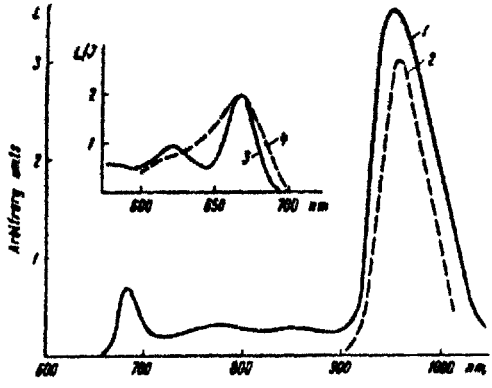


FIG.2 Afterglow emission and excitation spectra of bean leaves after 60 min of greening (1,3) and of adult chloroplasts after addition of 100 mM dithionite (2,4) at 77°K.

phosphorescence after aggregation or when incorporated into native membrane structures. But after the formation of the photosynthetic apparatus the quenching of triplet luminescence was observed. This may be due to either the participation of triplets in primary photochemistry or to the competitive migration of triplet energy to the quenchers with subsequent dissipation. Carotenoids and long-wave aggregates of chlorophyll are likely to be such quenchers. If the first hypothesis is true the intensity of phosphorescence ought to depend on the presence of substances which interfered with the primary photoact in the reaction centers. In the second case the afterglow is to arise after destruction of native pigment-lipoproteinic complexes only. Our data on the action of the destroying agents are consistent with both of the above hypothesis. The stimulation effect on dithionite seems to support the first one. But it is not excluded either that dithionite is capable to damage partially

TAB.2 Characteristics of phosphorescence and delayed fluorescence pigments in etiolated and greening leaves at 77°K

Pigment	Phosphorescence[I]			Delayed fluorescence		Prompt fluorescence, nm
	excitation max, nm	emission max, nm	τ, msec	max, nm	τ, msec	
Protochlorophyll(ide)	627	870	6,2	635-645[II]	1,7	635
-"-	630,647	920,970	2,5-3,3	660	1	655
Chlorophyllide	678	1000	1,5	700	1	696
Chlorophyll a	668	960	1,7	684	1,6	684

[I] The intensity of the phosphorescence depends linearly on illumination intensity (I), the delayed fluorescence is proportional to I^2.

[II] This short-wave delayed fluorescence was observed after heating above 60°C or incubation of seedlings with δ-aminolevulinic acid.

chloroplast structures. Thus further evidence is necessary to solve the problem. In conclusion, it should be noted that the spectral and decay characteristics of chlorophyll phosphorescence were similar on greening leaves and in chloroplasts after different treatments. This fact suggests that the same form of pigment (probably, pigment monomers or short-wave aggregates) was always responsible for light emission.

References

/1/ Calvin, M. and Dorough, G.D. J.Am.Chem.Soc. 70 (1948), 696.
/2/ Fernandez, J. and Becker, R.S. J.Chem.Phys. 31, (1959), 467.
/3/ Kahn A., Boardman, N.K. and Thorne, S.W. J.Mol.Biol. 48, (1970), 85.

/4/ Krasnovsky, A.A., Jr., Shuvalov, V.A., Litvin, F.F. and Krasnovsky, A.A. Dokl.Akad.Nauk USSR, 199, (1971), 1181.
/5/ Krasnovsky, A.A., Jr., Romaniuk, V.A. and Litvin, F.F. Dokl. Akad.Nauk USSR, 209, (1973), 965.
/6/ Krasnovsky, A.A., Jr., Lebedev, N.N. and Litvin, F.F. Dokl. Akad.Nauk USSR, 216, (1974), 1406.
/7/ Krasnovsky, A.A., Jr., Lebedev, N.N. and Litvin, F.F. Dokl. Akad.Nauk USSR, 225, (1975), 207.
/8/ Krasnovsky, A.A., Jr. and Litvin, F.F. Izv.Akad.Nauk USSR, ser.fiz., 39, (1975), 1968.
/9/ Leigh, J.S., Jr. and Dutton, R.L. Biochim.Biophys.Acta, 357, (1974), 67.
/10/ Shuvalov, V.A. and Krasnovsky, A.A. Molek.Biol.USSR, 5, (1971), 698.
/11/ Singh, J.S. and Becker, R.S. J.Am.Chem.Soc., 82, (1960), 2083.
/12/ Uphaus, R.A., Norris, J.R. and Katz, J.J. Biochim.Biophys. Res.Comm., 61, (1974), 1057.

Зарегистрирована фосфоресценция различных форм хлорофилла a, его аналогов и предшественников в растворах, этиолированных и зеленеющих листьях, хлоропластах и их фрагментах, обогащенных фотосистемами 1 или 2 при 77°K. Одновременно с фосфоресценцией обнаруживается рекомбинационная замедленная флуоресценция пигментов. Формирование фотосинтетического аппарата при зеленении приводило к тушению фосфоресценции и замедленной флуоресценции. В сформированных хлоропластах фосфоресценция наблюдалась после нарушения нативных структур нагреванием, мочевиной, детергентами, органическими растворителями или в присутствии восстановителя-дитионита.

This paper was performed within the framework of the CMEA-Research Programme in Biophysics

Eingegangen am 30. 6. 1976, in endgültiger Form am 2. 3. 1977

Dr. A.A. KRASNOVSKY Jr., Moscow State University, Department of Biology, Chair of Biophysics, Moscow 117234, USSR

„studia biophysica" mainly publishes papers on problems of the biophysics of molecular, cellular and more complex processes or structures. The theoretical or experimental results described are meant to supply a novel contribution to the understanding of biological problems from biophysical aspects. Communications on methods or equipments should be sent in only along with research results as mentioned above.

Original papers (up to 20 pages), short communications (up to 4 pages) or letters to the editors (up to 2 pages), the results of which have not yet been and will not be sent in for publication in any form, may be sent to the local members of the Editors' Board or to the Editors' Office in two German, English, French or Russian copies.

Surveys will be published on agreement with the Editors.

The manuscripts are photographically reduced and offset-printed. They appear in the form received, i. e. the authors should closely follow the typing instructions (see third page of cover) when typing a manuscript.

The author will receive 50 off-prints free of charge as a recompense for his paper. Due to the irregular mode of publications, manuscripts will appear, as a rule, within eight weeks after acception.

Congress proceedings are published in separate volumes as required.

Conditions of delivery:

in the GDR, orders may be sent to Postzeitungsvertrieb (GDR postal delivery), to booksellers or to Akademie-Verlag, DDR – 108 Berlin, Leipziger Straße 3 – 4

in other socialist countries, to booksellers of foreign-language literature or to the national postal delivery

В Советском Союзе можно подписаться на журнал через «Союзпечать» Индекс №: 33419

in the FRG and West-Berlin, to booksellers or the deliverers KUNST UND WISSEN, Erich Bieber, D – 7 Stuttgart 1, Wilhelmstraße 4 – 6

in Austria, to Globus-Buchvertrieb, A – 1201 Wien, Höchstädtplatz 3

in other countries, to Internationaler Zeitschriftenhandel, to Buchexport, Volkseigener Außenhandelsbetrieb der Deutschen Demokratischen Republik, DDR – 701 Leipzig, P. O. B. 160 or to Akademie-Verlag, DDR – 108 Berlin, Leipziger Straße 3 – 4

„studia biophysica" – journal

Edited for the Society of Physical and Mathematical Biology of the GDR and the Coordination Centre of the CMEA Programme in Biophysics by
Dr. G. Wangermann and Prof. Dr. L. P. Kayushin.

Publishers: Akademie-Verlag, DDR – 108 Berlin, Leipziger Straße 3 – 4.
telephone: 2 20 04 41, telex: 11 4420, Postal-cheque account: Berlin 350 21.
Bank: Staatsbank der DDR, Berlin, account No. 6836 – 26 – 20712.

Editor-in-chief: Dr. Adalbert Rakow

Address of Editorial Staff: DDR – 1054 Berlin, Alte Schönhauser Straße 33/34.
telephone: 2 82 68 49.

Published as licence no. 1564 of the Public Relations Office with the Chairman of the Council of Ministers of the German Democratic Republic.

Producers: Druckkombinat Berlin

Mode of publication: The journal „studia biophysica" is published at irregular intervals of at least 4 weeks in numbers of different size, 250 pages marking a volume each.
6 volumes are published yearly at a subscription rate of M 216,– plus costs of delivery, price per volume M 36,–.

Order no.: 1086 and number of volume.

C 1975 by Akademie-Verlag Berlin. Printed in the German Democratic Republic.

The following volumes contain original communications on special subjects:

Bände 7 und 12, 1968; 18, 1969; 29, 1971 „Radiation Effects on Subcellular Systems and Model Compounds"
Selected Papers of the Annual Meetings of the European Society, Spindleruv Mlyn (CSSR), 1967; Interlaken (Switzerland), 1968; Ulm (Germany), 1969; Basko Polje (Yugoslavia), 1971

Band 8, 1969 „Probleme der Strahlenbiophysik, der Physik der Biopolymere, der Zellregulation, des Stofftransportes u. der medizinischen Biophysik"
Hauptjahrestagung der Gesellschaft für reine und angewandte Biophysik in der DDR, Berlin, Februar 1968

Band 9, 1968 „Anwendung ultravioletter Strahlung"
Vorträge des IV. Internat. UV-Kolloquiums, Friedrichroda, Oktober 1967

Band 11, 1968 „Biophysik pflanzlicher Systeme"
Vorträge eines Internat. Symposiums der DAL, Quedlinburg, Mai 1968

Band 14, 1969, „Biophysik zellulärer Systeme: Mathematische Modelle und Computersimulation"
Vorträge des 2. Jenaer Symposiums, Oktober 1968

Bände 15/16, 1969 und 53, 1975 „Primary and Initial Mechanisms of the Effect of Ionizing Radiation on the Cell"
Papers of the II. and III. International Symposium, Erevan 1968 and 1975

Band 19, 1969 „Grundlagen der UV-Wirkung – Primäreffekte, UV-Inaktivierung und UV-Mutagenese, (UV-)Induktion von Prophagen, Reparatur von UV-Schäden"
Vorträge des V. Internationalen UV-Kolloquiums, Rostock, Oktober 1969

Band 21/22, 1970 „Experimentelle und theoretische Biophysik"
III. Jahreshaupttagung der Gesellschaft für reine und angewandte Biophysik in der DDR, Leipzig, Februar 1970

Band 24/25, 1970 „Interaktionen bei Biopolymeren"
Vorträge des 5. Jenaer Symposiums, September 1970

Band 31/32, 1972 „Active Control of Nucleic Acid Metabolism"
Papers of the Internat. Symposium, Schloß Reinhardsbrunn, May 1972

Band 36/37, 1973 „The Bases of the Biological Effects of Ultraviolet Radiation"
Papers of the International Conference, Brno, October 1972

Band 40, 1973 „Conformational Transitions of Biopolymers"
Papers of the 6th Jenaer Symposium, May 1973

Band 50, 1975 „DNA Repair and Late Effects"
Papers of the International Conference, Budapest, September 1974

Band 56, 1976 „Biophysik der Zelloberfläche"
Vorträge eines Internat. Symposiums, Schloß Reinhardsbrunn, April 1976

Band 57, 1976 „Kinetik mit Biopolymeren"
Vorträge des 7. Jenaer Symposiums, März 1976

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 25, вып. 2 1978 г.

УДК 547.979.7

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА В МУТАНТАХ SCENEDESMUS OBLIQUUS

Л. М. ВОРОБЬЕВА, Л. С. АБРОСЬКИНА, К. В. КВИТКО, А. А. КРАСНОВСКИЙ*

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

Исследовали низкотемпературные спектры поглощения (СП) и флуоресценции (СФ) нормального и мутантных штаммов Scenedesmus obliquus и изменения при помещении темновых культур на свет. В СФ 1-й группы мутантов обнаруживается один максимум 685 нм (в СП максимум 672 нм) «Плечо» в области поглощения хлорофилла *b* при 650 нм отсутствует. В СФ 2-й группы мутантов наблюдается два максимума — 685 и 698 нм, поглощение хлорофиллов *a* и *b* незначительно. В случае, когда флуоресценция при 685 нм была значительно выше, чем при 698 нм, отмечается быстрая фотодеструкция пигмента на свету, при равной величине максимумов 685 и 698 нм освещение приводит к изменениям соотношения форм пигмента. В СФ 3-й группы мутантов большинства мутантов обнаруживаются три максимума — 685, 698 и 718—720 нм, коротковолновые максимумы относительно выше, чем у исходного штамма. СП сходен с исходным штаммом. Измерение низкотемпературных СП и СФ показало большую вариабельность структуры пигментного комплекса у мутантов Scenedesmus obliquus. Обсуждаются причины фоточувствительности хлорофилла в мутантных штаммах.

Хлорофилл в хлоропластах высших растений и водорослей является составной частью сложного белково-липидного комплекса и присутствует в разных формах, различающихся по спектральным и фотохимическим свойствам [1—4]. Была показана особая фотолабильность хлорофилла в листьях мутантов кукурузы [5, 6]. Изучение этих мутантов позволило обнаружить явление световой дезагрегации длинноволновых форм хлорофилла [6], являющейся промежуточной стадией в процессе фотодеструкции пигмента в присутствии кислорода.

Темпер и Квитко [7] классифицировали мутанты одноклеточных водорослей по различиям в способности к автотрофному росту на свету, способности к зеленению в световой культуре и светоустойчивости.

Нами проведено сравнительное исследование состояния хлорофилла в нормальном и мутантных штаммах водорослей. С этой целью измеряли низкотемпературные спектры поглощения и флуоресценции клеток природного штамма Scenedesmus obliquus 155 и полученных от него мутантов, выросших в темноте, и изменения спектральных свойств при освещении.

МЕТОДИКА

Для опытов использовали дикий тип Scenedesmus obliquus штамм 155 [8] и 40 его пигментных мутантов, полученных в Лаборатории генетики и цитогенетики микроорганизмов ЛГУ [7, 9] действием нитрозометилмочевины и рентгеновых лучей на дикий тип. Номера штаммов соответствуют описанным в [7, 9].

Водоросли культивировали при 30° в темноте на нитратной среде с агаром, содержащей глюкозу и дрожжевой автолизат [10] (темновая культура). Для спектральных исследований использовали клетки после 5—7-дневного роста. Для измерений готовили суспензию клеток. В опы-

* Ленинградский государственный университет им. А. А Жданова.

Таблица 1

Характеристики исходного штамма 155 Scenedesmus obliquus и полученных от него мутантов

Группа, поведение на свету, номера штаммов	Присутствие хлорофилла *b* (плечо 650 нм в спектре поглощения)	Максимумы флуоресценции (—196°) после 5—8 дней роста в темноте, нм	Максимумы флуоресценции (—196°) после 24 ч освещения темновой культуры светом 1000 лк, нм
Исходный штамм 155	Есть	685, 698, 720*	685, 698, 720
I-я группа выцветающие мутанты, 7, 8, 26, 32, 50, 64	Нет	635, 685	680
2-я группа, подгруппа А, выцветающие мутанты 13	Нет	635, 685, 698	635, 685, 698
122	Следы	685, 698 (плечо)	685, 698 (плечо)
Подгруппа Б, устойчивые или дезагрегирующие на свету мутанты 44, 73, 156	Есть	635, 685, 698	635, 685, 698
14	»	685, 698	685, 698
133	Нет	685, 698	685, 698
70	Есть	685, 698	685, 698
74, 123	Нет	635, 685, 698 (плечо)	635, 685, 698 (плечо)

* Подчеркнут наиболее высокий максимум в спектре флуоресценции (—196°).

Таблица 2

Характеристики зеленеющих мутантов (3-я группа), полученных от исходного штамма 155

	Подгруппы	Присутствие хлорофилла *b* (плечо 650 нм в спектре поглощения)	Максимумы флуоресценции (—196°) после 5—8 дней роста в темноте, нм	Максимумы флуоресценции (—196°) после 24 ч освещения темновой культуры светом 1000 лк, нм
А	143	Есть	635, 685*, 698	635, 685, 698, 720 (плечо)
	148	Нет	685, 698	685, 698, 720 (плечо)
	118	Есть	685, 698	685, 698, 720
	33	»	635, 685, 698	685, 698, 720
	34	»	635, 685, 698	685, 698, 720
	43	»	685, 698	685, 698, 720
Б	10	Есть	685, 698, 720 (плечо)	685, 698, 720
	1,2,49	»	685, 698 (плечо), 720 (плечо)	685, 698, 720
	59,69,105,141	Есть	685, 698, 720	685, 698, 720
	84	Нет	685 (плечо), 698, 720 (плечо)	685, 698, 720
	12,65,134	Есть	685, 698, 720	685, 698, 720
В	55	Есть	685, 698, 720	685, 698, 720
	15,48,124,130	»	685, 698, 720	685, 698, 720

* Подчеркнут наиболее высокий максимум в спектре флуоресценции (—196°).

мя как при 698 нм наблюдалось быстрое падение интенсивности флуоресценции. Такая последовательность спектральных изменений свидетельствует о том, что дезагрегация длинноволновых форм является промежуточной стадией фотовыцветания хлорофилла [6].

3-я группа (зеленеющие). Большинство мутантов этой группы имело при росте в темноте все три максимума флуоресценции, но отличалось от дикого типа низкой интенсивностью флуоресценции и более высокими максимумами поглощения и флуоресценции коротковолновых форм. Все штаммы этой группы зеленели на свету, по мере накопления хлорофилла наблюдалось постепенное образование длинноволновой формы с флуоресценцией при 720 нм.

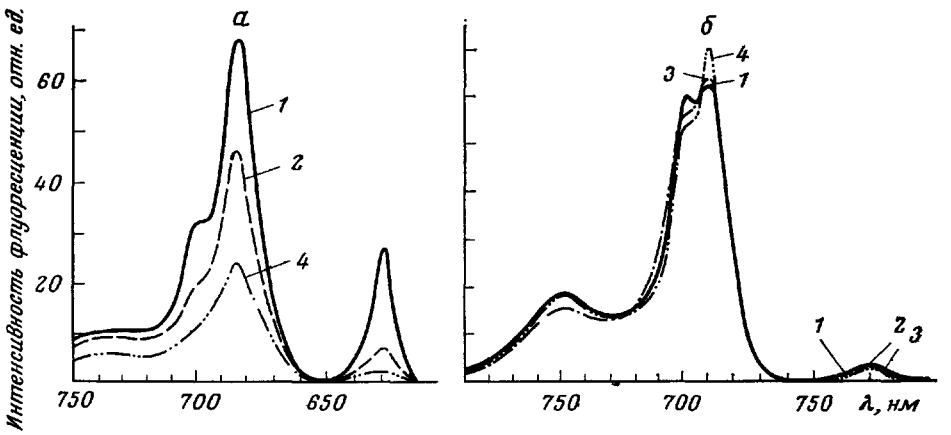


Рис. 3. Низкотемпературные спектры флуоресценции (—196°) при освещении 5—7-дневных темновых культур нефотосинтезирующих мутантов № 13 (*а*) и № 44 (*б*) светом 1000 лк

1 — темновая культура, *2*—1,5 ч, *3*—5 ч, *4*—24 ч освещения

Подгруппа А. У темновых культур два максимума флуоресценции 685 и 698 нм, у некоторых небольшой максимум 635 нм. В спектрах поглощения нечеткий максимум в области 670—680 нм. За исключением № 148, все мутанты имели максимум поглощения хлорофилла *b* при 650 нм. Эти мутанты оранжевого цвета, на свету зеленели, даже № 148, лишенный хлорофилла *b*. Уже через несколько часов по спектрам поглощения и флуоресценции обнаруживается накопление хлорофилла, сопровождающееся появлением длинноволнового максимума флуоресценции 720 нм. У ряда мутантов (№ 23, 43, 118) после 24 ч освещения спектральные свойства приближались к дикому типу. Бóльшая часть этих мутантов способна к фотосинтезу [7]. У других мутантов (№ 34, 143, 148) после 24 ч освещения коротковолновые максимумы флуоресценции оставались значительно более высокими, чем 720 нм, т. е. структура пигментного комплекса не достигала нормальной. Эти мутанты не были способны к автотрофному росту.

Подгруппа Б. Темновые культуры мутантов обладали тремя максимумами флуоресценции подобно дикому типу, однако максимум 720 нм был низким, иногда в виде плеча. Спектры поглощения сходны с мутантами подгруппы А; у № 84 отсутствовало плечо при 650 нм, принадлежащее хлорофиллу *b*. После 24 ч зеленения спектральные свойства всех мутантов (за исключением № 84) становились сходными с исходным штаммом (рис. 4), однако, судя по литературным данным [7], не все эти мутанты способны к автотрофному росту на свету.

Подгруппа В. Темновые культуры имели спектры поглощения и флуоресценции, близкие дикому типу (рис. 5). Они зеленели при освещении — в спектре флуоресценции возрастал максимум 720 нм при

относительном постоянстве форм 685 и 698 нм. Изменение спектров поглощения при зеленении заключалось в пропорциональном увеличении всех форм пигментов и появлении после продолжительного освещения (24 ч) плеча в области 700 нм. Мутанты этой группы относятся к фотосинтезирующим [7].

У мутантов, зеленеющих при 30°, не было обнаружено образования максимумов поглощения или флуоресценции, которые можно было бы приписать промежуточным продуктам биосинтеза хлорофилла. Для возможного их обнаружения мы освещали клетки зеленеющего штамма № 69, выросшие в темноте, при низкой температуре (2°), однако образования хлорофилла или накопления заметных количеств промежуточных продуктов также не было обнаружено.

Есть данные о том, что присутствие хлорофилла *b* в фотосинтезирующих клетках обусловливает светоустойчивость нативных форм хлорофилла *a* [13]. Представляло интерес сравнить скорость фотодеструкции хлорофилла *a* у темновых культур светочувствительных штаммов, обладающих сходными спектрами флуоресценции и различающихся отсутствием (мутанты 1-й группы № 8 и 32) или наличием (мутант 2-й группы № 122) в спектре поглощения плеча в области 650 нм, обусловленного хлорофиллом *b*. Штаммы № 8 и 32, а также молодые 5—7-дневные клетки штамма № 122 обладали единственным максимумом флуоресценции при 683—685 нм. О скорости фотодеструкции хлорофилла судили по понижению максимума флуоресценции (—196°) в результате освещения образца при 30°. Опыты показали более высокую скорость фотодеструкции хлорофилла у штаммов № 8 и 32, чем у № 122, что может свидетельствовать о увеличении фотостабильности пигментного комплекса при наличии заметных количеств хлорофилла *b*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение свойств мутантов Scenedesmus obliquus показало во всех образцах присутствие пигмента, сходного по спектральным свойствам с хлорофиллом *a*. Так, у оранжевого штамма № 13, росшего в темноте, не обнаруживалось полос в области поглощения хлорофиллов *a* и *b*, однако в спектре флуоресценции были видны максимумы при 685 и 698 нм.

Судя по отсутствию в спектре поглощения максимума или плеча в области 650 нм можно полагать, что у некоторых мутантных форм Sc. obliquus количества хлорофилла *b* настолько низки, что не проявляются при обычной процедуре измерения спектров поглощения (рис. 3 и 4, табл. 1 и 2).

В соответствии с известными данными [14] мы не могли наблюдать в нормальных и мутантных водорослях протохлорофиллида или протохлорофилла. По-видимому, образующийся пигмент немедленно превращается в темноте или на свету в хлорофилл. Накапливающийся у некоторых штаммов промежуточный продукт биосинтеза хлорофилла — протопорфирин IX — с максимумом флуоресценции 635 нм на свету быстро разрушается и не используется для накопления хлорофилла, что свидетельствует о блокировании биосинтеза хлорофилла у этих штаммов, по-видимому, после стадии образования протопорфирина.

Проведенное измерение низкотемпературных спектров поглощения и флуоресценции темновых культур водорослей показало большую вариабельность структуры пигментного комплекса у мутантов и существенные отличия их спектральных свойств от исходного штамма 155, позволившие разделить исследованные штаммы на три группы. Была обнаружена корреляция спектральных и фотохимических свойств при освещении темновых культур. Штаммы, обладающие одним коротковолновым максимумом флуоресценции (683—685 нм) или двумя (685 и 698 нм), но с преобладанием первого, показали особую фотолабильность, и пигменты

10. Квитко К. В., Хропова В. И. Вестн. ЛГУ. Сер. биол., № 9, 150, 1963.
11. Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Карнеева Н. В. Биол. науки, **76**, 4, 95, 1970.
12. Granick S. J. Biol. Chem., **172**, 717, 1948.
13. Аллен М. Б. В сб.: Структура и функции фотосинтетического аппарата. 343. Изд-во иностр. лит., 1962.
14. Bishop N., Senger H. Plant and Cell. Physiol., **13**, 937, 1972.
15. Singer H., Bishop N. Plant and Cell Physiol., **13**, 633, 1972.
16. Баранов А. А., Сааков В. С., Чунаев А. С., Борщевская Т. Н., Квитко К. В. Физиол. растений, **22**, 702, 1975.
17. Гиллер Ю. Е., Столбова А. В., Вахидова Л. Р., Квитко К. В. Биофизика, **16**, 67, 1971.
18. Воробьева Л. М., Красновский А. А. Биофизика, **13**, 456, 1968.
19. Любименко В. Н. Зап. Академии наук. Физ-мат. отд., **33**, 3, 1916.
20. McCord J. M., Fridovich I. J. Biol. Chem., **244**, 6049, 1969.

Поступила в редакцию
28.VI.1977

CHLOROPHYLL LUMINESCENCE IN SCENEDESMUS OBLIQUUS MUTANTS

L. M. VOROBYEVA, L. S. ABROSKINA, K. V. KVITKO, A. A. KRASNOVSKY*

A. N. Bach Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow
** A. A. Zhdanov State University, Leningrad*

Low temperature spectra of absorption (AS) and fluorescence (FS) were studied with normal and mutant strains of Scenedesmus obliquus, as well as their changes when the dark cultures were put in the light. In the first group of mutants, FS had one maximum at 685 nm and AS had a maximum at 672 nm. No „shoulder" was detected in the absorption region of chlorophyll *b* at 650 nm. FS of the second group of mutants had two maxima at 685 and 698 nm; the absorption of chlorophylls *a* and *b* was insignificant. If the fluorescence at 685 nm was more intensive than at 698 nm, rapid photodestruction of the pigment was registered in the light. If the maxima at 685 and 698 nm were identical, illumination resulted in changes in the ratio between the pigment forms. FS of the most mutants of the third group had three maxima at 685, 698 and 718—720 nm, the sort-wavelength maxima being relatively higher than those of the parent strain. AS of the mutants was similar to that of the parent strain.

Changes in the low temperature AS and FS revealed a great variability of the pigment complex structure in the mutants of Scenedesmus obliquus. Factors causing photosensitivity of chlorophyll in the mutant strains are discussed.

О СВЯЗИ МЕЖДУ ВРЕМЕНЕМ ЖИЗНИ И ЭНЕРГИЕЙ ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ. ОЦЕНКА ЭНЕРГИИ ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И БАКТЕРИОФЕОФИТИНА *a*

Н. Н. ЛЕБЕДЕВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ МЛ.

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;
Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

В предшествующих работах [1, 2] в результате детального исследования фосфоресценции нам удалось измерить энергию и время жизни триплетных состояний ряда хлорофиллов (Хл) и феофитинов (Ф) в различных растворителях (см. таблицу). При этом оказалось, что дезактивация триплетных состояний указанных пигментов определяется безызлучательным процессом, вероятно, переходом энергии возбуждения в колебательную энергию. Если этот механизм размена энергии справедлив, то, согласно теории Робинсона и Фроша [3] и Зибранда [4], энергия (E_T) и время жизни (τ_T) триплетных состояний должны быть связаны соотношением: $\lg \tau_T = A \cdot E_T + B$, где первый член суммы характеризует вероятность взаимодействия триплетного и колебательного состояний молекулы, а значение второго определяется числом путей рассеяния колебательной энергии.

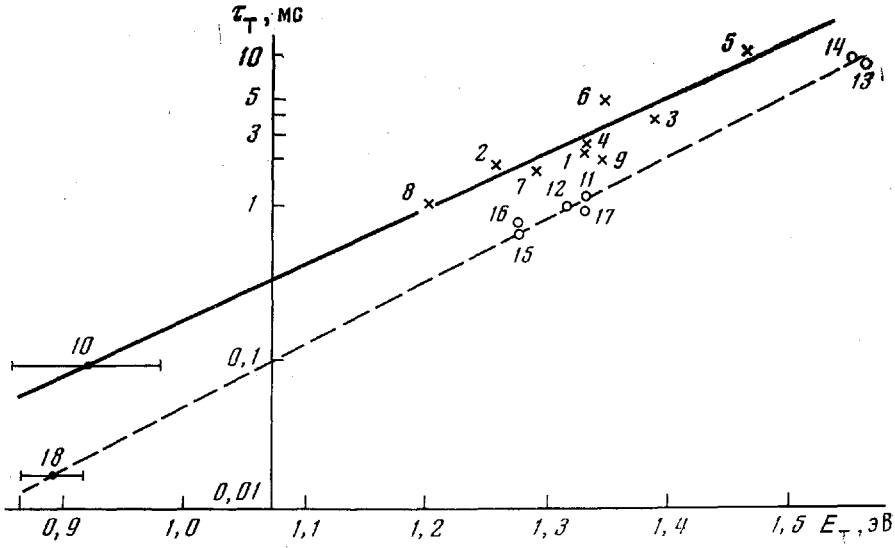
Пигмент	Диэтиловый эфир			Пиридин		
	E_T^* (эВ)	τ_T^* (мс)	экспериментальные точки на рисунке	E_T^* (эВ)	τ_T^* (мс)	экспериментальные точки на рисунке
Хлорофилл *a*	1,33	2,4	*1*	1,26	1,9	*2*
Хлорофилл *b*	1,39	4,0	*3*	1,33	2,7	*4*
Протохлорофилл	1,47	11,5	*5*	1,35	5,0	*6*
Бактериохлорофилл *c*	1,29	1,7	*7*	1,20	1,1	*8*
Бактериохлорофилл *d*	1,35	2,1	*9*	—	—	
Бактериохлорофилл *a*	—	—		0,92**	0,087***	*10*
Феофитин *a*	1,33	1,2	*11*	1,32	1,0	*12*
Протофеофитин	1,56	9,1	*13*	1,55	10,0	*14*
Бактериофеофитин *c*	1,28	0,65	*15*	1,28	0,8	*16*
Бактериофеофитин *d*	1,33	0,95	*17*	—	—	
Бактериофеофитин *a*	—	—		0,89**	0,016***	*18*

* Ошибка при определении энергии составляет ±0,5%, времени жизни — ±20%.
** Рассчитано исходя из корреляционной зависимости между $\lg \tau_T$ и E_T (см. рисунок).
*** По данным работ [6, 7, 10].

В данной работе поставлена задача выяснить, справедливо ли указанное соотношение для триплетных состояний Хл и Ф и попытаться использовать его для оценки энергии триплетных состояний бактериохлорофилла *a* (БХл) и бактериофеофитина *a* (БФ) пигментов, фосфоресценция которых до сих пор не обнаружена. Вопрос об энергии указанных бактериальных пигментов уже неоднократно поднимался в литературе и предложен ряд способов ее приближенной оценки. В результате получены значения E_T, варьирующие от 0,66 до 1,33 эВ [5—8]. В частности, в работе [8] уже предлагался аналогичный подход к оценке E_T БХл, однако авторы не проверяли применимость используемого соотношения для Хл и Ф и не оценивали энергию БФ.

Корреляционная зависимость между E_T и $\lg \tau_T$, построенная по методу наименьших квадратов, удовлетворительно аппроксимируется двумя линейными функциями (см. рисунок). Одна соответствует Хл, другая — Ф. Наклон прямых практически одинаков, различие связано с величиной параметра B. Можно заключить, что соотношение Зибранда удовлетворительно описывает дезактивацию триплетов Хл и Ф и расходование их энергии действительно определяется колебательным механизмом. Различие в константе B обусловлено, видимо, существованием у Ф дополнительных путей дезактивации возбужденных колебательных состояний через миграцию протонов по иминогруппам порфиринового кольца. На существование такой миграции указывают также данные по деполяризации фосфоресценции замороженных растворов порфиринов [9].

Построенные корреляционные зависимости позволяют оценить E_T БХл и БФ, исходя из τ_T этих пигментов, измеренных методом флеш-фотолиза [6, 7, 10]. По такой оценке E_T этих пигментов равна 0,92±0,065 и 0,89±0,025 эВ соответственно. Легко видеть, что точность нашего определения E_T лимитируется двумя основными факторами: точностью проведения прямых (ошибка, связанная с этим фактором, указана на рисунке и в приведенных значениях E_T) и точностью определения τ_T в работах [6, 7, 10]. При этом следует указать, что τ_T для БФ (16 мкс), найденная в работе



Корреляционная зависимость между логарифмом времени жизни и энергией триплетного состояния фотосинтетических пигментов

[7], значительно отличается от τ_T БХл (87 мкс), полученного в работах [6, 10]. Такое различие не соответствует соотношению между τ_T других Хл и Ф (см. таблицу). Возможно поэтому, что τ_T, полученное в работе [7], несколько занижено и тогда, в согласии с корреляционной прямой, E_T БФ должно соответствовать бóльшим значениям (вплоть до 1,0 эВ).

Авторы благодарны Ф. Ф. Литвину за обсуждение результатов, советы и замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А. мл., Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.*, Докл. АН СССР *216*, 1406, 1974; *225*, 207, 1975.
2. *Krasnovsky A. A. jr., Lebedev N. N., Litvin F. F.*, Studia biophysica, *65*, 81, 1977.
3. *Robinson G. W., Frosh R. P.*, J. Chem. Phys., *37*, 1962, 1962; *38*, 1187, 1963.
4. *Siebrand W.*, J. Chem. Phys., *44*, 4055, 1966; *46*, 440, 1967; *47*, 2411, 1967.
5. *Weiss C. jr.*, J. Mol. Spectr., *44*, 37, 1972.
6. *Connolly J., Gorman D., Seely G. R.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *206*, 649, 1973.
7. *Gouterman M., Holten D.*, Photochem. Photobiol., *25*, 85, 1977.
8. *Лосев А. П., Сагун Е. И.*, Ж. прикл. спектроскопии, *24*, 815, 1977.
9. *Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н.*, Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Минск, 1968.
10. *Pekkarinen L., Linschitz H.*, J. Amer. Chem. Soc., *82*, 2407, 1960.

Поступила в редакцию 25.XI.1977
после доработки 24.IV.1978

ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ВОССТАНОВЛЕННЫХ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ

В. В. НИКАНДРОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В нашей лаборатории было найдено, что восстановленные никотинамидные коферменты при возбуждении УФ-светом в области полосы поглощения с максимумом 340 нм способны восстанавливать ряд акцепторов электронов [1—5]. Наши исследования фотоокисления НАДН и НАДФН метилвиологеном и ферредоксином указали на возможность участия в реакции как синглетного, так и триплетного возбужденных состояний коферментов [4, 5]. Давно известно, что НАДН и НАДФН обладают флуоресценцией с максимумом около 470 нм. Однако до сих пор не была описана фосфоресценция восстановленных никотинамидных коферментов, свидетельствующая об образовании триплетных состояний.

В работе использовали препараты коферментов фирмы «Реанал» (Венгрия) — 80% НАДН и 90% НАДФН — и фирмы «Light CO» (Англия) — 63% НАДН. Спектры фосфоресценции измеряли на установке с цилиндрическим фосфороскопом и светосильным монохроматором (относительное отверстие 1 : 3, дисперсия 6 нм/мм). Спектры возбуждения фосфоресценции и кинетику затухания фосфоресценции измеряли на установке с дисковым фосфороскопом [6] и монохроматором МДР-3 (относительное отверстие 1 : 8, дисперсия 1,8 нм/мм). В качестве источников света применяли ксеноновую лампу 150 Вт или ртутную лампу ДРШ-250. Измерения проводили в кварцевом сосуде Дьюара при —196° в присутствии воздуха. Растворы коферментов в дистиллированной воде накапывали на предварительно охлажденный в жидком азоте черненый металлический держатель с отверстием так, чтобы получить прозрачный леденец толщиной 1—2 мм.

Измерения показали, что НАДН и НАДФН при —196° фосфоресцируют с максимумом 560 нм (рис. 1). Спектры фосфоресценции препаратов фирм «Reanal» и «Light CO» не отличались. Спектр возбуждения фосфоресценции НАДН в области 300—400 нм близок спектру поглощения НАДН в этой области спектра (рис. 2). Несовпадение спектров можно объяснить возможным сдвигом спектра поглощения НАДН в длинноволновую сторону при —196°. В области 200—300 нм спектр возбуждения фосфоресценции не удалось измерить из-за люминесценции кварцевого сосуда Дьюара при возбуждении в этой области. Контрольные измерения спектра возбуждения фосфоресценции водного раствора НАД+ при —196° показали отсутствие максимума в области 300—400 нм. Сходство спектра возбуждения фосфоресценции и спектра поглощения НАДН, а также совпадение спектров фосфоресценции препаратов различных фирм указывают, что наблюдаемая

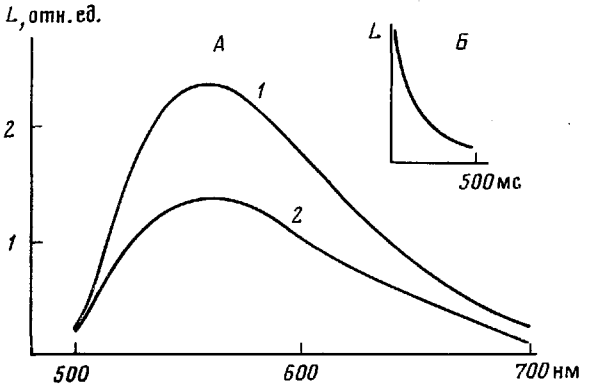


Рис. 1

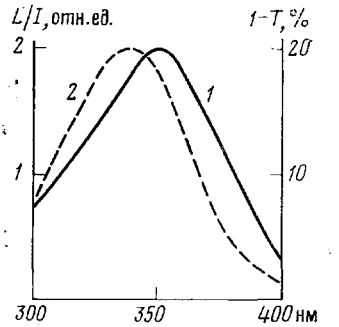


Рис. 2

Рис. 1. *А* — спектры фосфоресценции $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ М НАДН (*1*) и $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ М НАДФН (*2*). Возбуждение линиями ртути 365 нм, ширина щели монохроматора 6 нм. Спектры исправлены с учетом спектральной чувствительности установки. *L* — интенсивность фосфоресценции. *Б* — кинетика затухания фосфоресценции $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ М НАДН. Использовали светофильтры ЖС-17, СЗС-23 ($500 \leqslant \lambda \leqslant 600$ нм)

Рис. 2. Спектр возбуждения фосфоресценции (*1*) и спектр поглощения (*2*) НАДН. *1* — $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ М НАДН, длина оптического пути 0,1—0,2 см; *2* — $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ М НАДН, длина оптического пути 1,0 см. Ширина щели монохроматора 2,6 нм; использованы светофильтры ЖС-17, СЗС-23 ($500 \leqslant \lambda \leqslant 600$ нм)

фосфоресценция действительно принадлежит коферментам и не может быть вызвана примесями в препаратах. Кинетики затухания фосфоресценции НАДН (рис. 1, *Б*) и НАДФН имеют экспоненциальный характер. Время жизни фосфоресценции НАДН при —196° составило около 140 мс, НАДФН — 100 мс. Квантовые выходы фосфоресценции НАДН и НАДФН были измерены путем сравнения с фосфоресценцией водно-спиртового раствора флавинмононуклеотида (ФМН), измеренной в тех же условиях, основываясь на известном значении квантового выхода фосфоресценции ФМН — $7{,}7 \cdot 10^{-4}$ [7]. Квантовый выход фосфоресценции НАДН составил $7{,}7 \cdot 10^{-6}$, НАДФН — $4{,}4 \cdot 10^{-6}$. Как время жизни, так и квантовый выход фосфоресценции НАДН больше соответствующих значений для НАДФН, что может указывать на бо́льшую реакционную способность возбужденного НАДН. Действительно, квантовый выход фотоокисления НАДН метилвиологеном примерно в 2 раза больше квантового выхода фотореакций НАДФН [4, 5].

Таким образом, НАДН и НАДФН, как и многие другие биологически активные соединения, обладают фосфоресценцией, т. е. способны к образованию триплетных возбужденных состояний. Однако для выяснения участия триплетных возбужденных состояний восстановленных никотинамидных коферментов в фотохимических реакциях требуются дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Брин Г. П.*, Сб.: Проблемы эволюционной и технической биохимии, «Наука», 223, 1964.
2. *Красновский А. А., Брин Г. П.*, Докл. АН СССР, *163*, 761, 1965.
3. *Красновский А. А., Брин Г. П.*, Докл. АН СССР, *158*, 225, 1964.
4. *Красновский А. А., Брин Г. П., Никандров В. В.*, Докл. АН СССР, *220*, 1214, 1975.
5. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.*, Биохимия, *43*, № 4, 1978.
6. *Шувалов В. А., Красновский А. А.*, Мол. биол., *5*, 698, 1971.
7. *Bowd B., Byron P., Hudson J. B.*, Photochem. and Photobiol., *8*, 1, 1968.

Поступила в редакцию 2.II.1978

PHOSPHORESCENCE OF REDUCED NICOTINAMIDE COENZYMES

V. V. NIKANDROV, A. A. KRASNOVSKIJ

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Reduced nicotinamide coenzymes were shown to exhibit phosphorescence at —196° C in aqueous solution. NADH and NADPH exhibited phosphorescence emission maxima at 560 nm. NADH and NADPH has a value of phosphorescence lifetimes 140 ms and 100 ms and quantum yields $7{,}7 \cdot 10^{-6}$ and $4{,}4 \cdot 10^{-6}$ correspondently.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 12 1978 Вып. 6

УДК 541.144.7

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕТИЛВИОЛОГЕНА ХЛОРОПЛАСТАМИ

В. В. НИКАНДРОВ, ЧАН ВАН НИ, Г. П. БРИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Исследовали условия фотовосстановления метилвиологена хлоропластами. Продувание инертным газом или откачивание в вакууме суспензии хлоропластов подавляет восстановление метилвиологена, что, по-видимому, связано с денатурацией мембран хлоропластов на фазовых границах вода — воздух. Добавление глицерина или бычьего сывороточного альбумина, как и удаление кислорода из суспензии хлоропластов при помощи кислородпотребляющей системы, т. е. в условиях, исключающих прохождение пузырьков газа через суспензию, препятствует инактивации хлоропластов. Фотовосстановление метилвиологена, как и реакция Хилла, подавляется диуроном и *трис*-буфером, активируется разобщителями фотофосфорилирования, имеет сходную с реакцией Хилла зависимость от pH. Тритон X-100 (0,007%), этиловый эфир (2%) и нагревание (до 42°) активируют реакцию Хилла и подавляют фотовосстановление метилвиологена. Наиболее вероятно, что исходным донором электрона при фотовосстановлении метилвиологена являются молекулы воды. Предполагается, что стационарный уровень фотовосстановленного хлоропластами метилвиологена определяется соотношением скоростей реакций восстановления метилвиологена и циклического транспорта электрона через метилвиологен, замыкающего ветвь переноса электрона в фотосистеме I.

Для исследования восстановительной ветви цепи фотосинтетического переноса электрона широко применяются производные γ,γ-дипиридила — виологены. Величина окислительно-восстановительного потенциала метилвиологена (E_o = —0,45 *в*) близка к потенциалу ферредоксина, который является конечным акцептором фотосистемы I, что определяет применение метилвиологена при исследовании фотохимических реакций хлоропластов. Восстановленный метилвиологен активно реагирует с кислородом с образованием перекиси водорода, поэтому возникают трудности при наблюдении фотовосстановления виологена хлоропластами, выделяющими кислород. В некоторых работах о восстановлении виологена судят косвенно — путем измерения поглощения кислорода при освещении хлоропластов; в анаэробных условиях наблюдалось фотовосстановление метилвиологена хлоропластами (неспособными выделять кислород) в присутствии цистеина или восстановленного дихлорфенолиндофенола, играющих роль доноров электрона [1]. Описано восстановление метилвиологена хлоропластами без добавления экзогенных доноров электрона в присутствии кислородпотребляющей системы (глюкозооксидазы и глюкозы [2]), а также в присутствии системы, удаляющей перекись водорода (каталазы и этанола [3, 4]). В нашей лаборатории исследовали фотовосстановление метилвиологена хлоропластами в присутствии гидразина как исходного донора электрона в процессе постепенного нарушения структуры хлоропластов под действием органических растворителей [5]. Недавно описано восстановление метилвиологена хлоропластами без введения донора электрона, в этом случае реакция шла с низкой скоростью [6].

Использование хлоропластов в системах, осуществляющих фотообразование молекулярного водорода [7], тесно связано с изучением фотовосстановления метилвиологена, обладающего окислительно-восстановительным потенциалом, близким к потенциалу водородного электрода.

Настоящая работа посвящена выяснению условий количественного восстановления метилвиологена хлоропластами.

МЕТОДИКА

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков гороха сорта Победитель по методу Вокера [8]. 50 *г* листьев гороха гомогенизировали 30 *сек* в 100 *мл* среды выделения, которая содержала 0,5 *М* сахарозу, 0,035 *М* хлористый натрий, 0,002 *М* хлористый магний, 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 7. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли с ватой и центрифугировали 2 *мин* при 6000 *об/мин*. Осадок повторно суспендировали в среде выделения. Реакционной средой служила среда выделения, за исключением особо указанных случаев.

Скорость выделения кислорода в реакции Хилла с феррицианидом и дихлорфенолиндофенолом определяли амперометрическим методом. Активность фотосистемы 1 определяли по поглощению кислорода в суспензии хлоропластов [9], содержащей 10^{-2} *М* аскорбат натрия, $6 \cdot 10^{-5}$ *М* дихлорфенолиндофенол, $5 \cdot 10^{-4}$ *М* метилвиологен и 10^{-5} *М* диурон (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина).

Анаэробные условия в этих опытах создавались путем продувания аргоном в двух вариантах. В первом варианте концентрированная суспензия хлоропластов находилась в полярографической ячейке, а реакционная среда — в склянке Дрекселя, присоединенной перед ячейкой. При продувании газ барбатировали через реакционную среду и пропускали над суспензией хлоропластов. После 5 *мин* продувания реакционную среду перемещали давлением газа в ячейку и перемешивали с суспензией хлоропластов. Такой метод в дальнейшем будем называть раздельным продуванием. Во втором варианте суспензию хлоропластов вместе с реакционной средой (4 *мл*) помещали в склянку Дрекселя и после продувания аргоном перемещали давлением газа в ячейку (совместное продувание).

Определение скорости реакции Хилла по восстановлению феррицианида и дихлорфенолиндофенола, а также реакцию фотовосстановления метилвиологена проводили в вакуумных трубках Тунберга с дополнительным отводом. Откачивание проводили на форвакуумном насосе в течение 3—5 *мин*. Скорость реакций определяли по изменению оптической плотности в максимумах поглощения для феррицианида при 420 *нм*, для дихлорфенолиндофенола при 620 *нм* и для метилвиологена при 605 *нм*. Во время продувания аргоном или вакуумирования в этих опытах суспензия хлоропластов (0,2 *мл*) находилась или в боковом отводе (раздельное продувание или раздельное откачивание), или вместе с реакционной средой в нижней части трубки (совместное продувание или совместное откачивание).

Суспензию хлоропластов освещали конденсированным светом лампы накаливания в области 600—800 *нм* (обычно $5 \cdot 10^5$ *эрг/см²·сек*). Интенсивность света изменяли нейтральными фильтрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА УДАЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Продувание инертным газом. После продувания аргоном (5 *мин*) суспензии хлоропластов фотовосстановление метилвиологена идет с низкой скоростью, глубина реакции не превышает 5%. При увеличении времени продувания (>5 *мин*) скорость и глубина фотовосстановления

метилвиологена уменьшаются (рис. 1). При продувании происходит инактивация фотохимических систем хлоропластов; в нашей лаборатории ранее [10] наблюдалось, что реакция Хилла инактивируется после продувания суспензии хлоропластов инертным газом.

Применение раздельного продувания, когда аргон проходит над концентрированной суспензией хлоропластов, дало возможность наблюдать эффективное фотовосстановление метилвиологена (рис. 1). Оказалось, что совместное продувание подавляет реакцию восстановления метилвиологена на 90%, а реакцию Хилла и активность фотосистемы 1 — только на 15—20%. Нужно отметить, что после такого продувания сте-

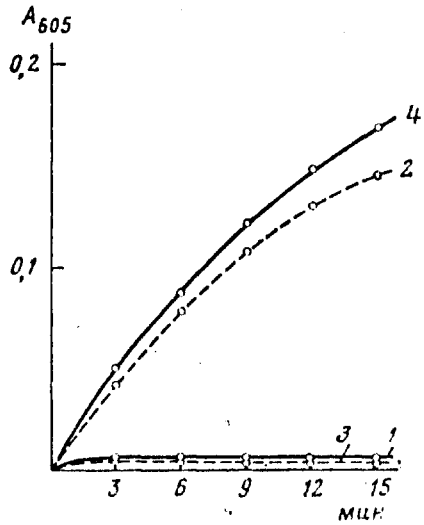


Рис. 1

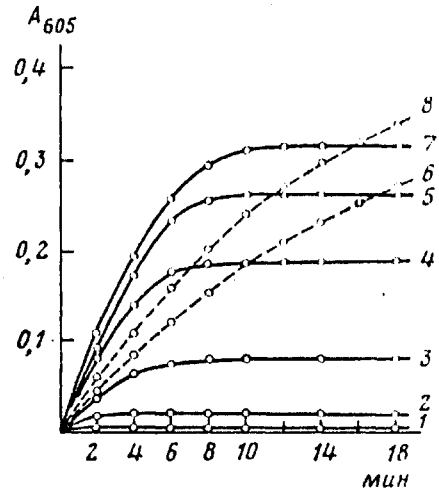


Рис. 2

Рис. 1. Влияние способа продувания хлоропластов аргоном и глицерина на фотовосстановление метилвиологена. *1* — 10 *мин* совместного продувания без глицерина, *2* — то же в присутствии 50%-ного глицерина, *3* — 5 *мин* совместного продувания без глицерина, затем добавлен 50%-ный глицерин и снова 5 *мин* совместного продувания, *4* — 10 *мин* раздельного продувания без глицерина. Реакционная среда содержала: 0,5 *М* сахарозу, 0,002 *М* $MgCl_2$, 0,035 *М* NaCl, 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 7,0, $5 \cdot 10^{-4}$ *М* метилвиологен, 7 *мкг* хлорофилла в 1 *мл* суспензии. На остальных рисунках условия те же, кроме указанных изменений

Рис. 2. Кинетика фотовосстановления метилвиологена при разных концентрациях глицерина. Содержание глицерина, %: *1* — без глицерина, *2* — 10, *3* — 20, *4* — 30, *5* — 40, *6* — 70, *7* — 50, *8* — 60. Совместное продувание 5 *мин*; 13 *мкг* хлорофилла в 1 *мл* суспензии

пень активации реакции Хилла разобщителями изменяется незначительно. Ранее [11] было отмечено активирование реакции Хилла в присутствии глицерина. Можно было ожидать, что в присутствии стабилизирующих реагентов, таких, как глицерин или бычий сывороточный альбумин, степень инактивации фотовосстановления метилвиологена уменьшится. Действительно, добавление глицерина значительно повышает скорость и глубину реакции восстановления метилвиологена после совместного продувания (рис. 1 и 2). Максимальный эффект наблюдается при добавлении 50%-ного глицерина. При бо́льших концентрациях глицерина скорость реакции падает. Такое действие глицерина, очевидно, не связано с его активирующим действием на транспорт электронов, поскольку добавление глицерина после продувания хлоропластов аргоном не оказывало влияния на скорость и глубину фотовосстановления метилвиологена (рис. 1). Подобно глицерину, бычий сывороточный альбумин в реакционной среде при совместном продувании повышает ско-

рость и глубину реакции фотовосстановления метилвиологена, причем существенно не влияет на восстановление метилвиологена в случае раздельного продувания (максимальный эффект наблюдался при концентрации бычьего сывороточного альбумина 3 *мг/мл*).

Откачивание. После откачивания хлоропластов при взбалтывании трубки Тунберга наблюдается лишь незначительное восстановление метилвиологена при освещении, как и при совместном продувании. Присутствие глицерина значительно повышает скорость и глубину фотовосстановления метилвиологена. При совместном откачивании хлоропластов глицерин оказывает максимальное действие в концентрации 50%. Однако такой же эффект можно получить в присутствии 3—5%-ного глицерина, если применить метод раздельного откачивания. В этом слу-

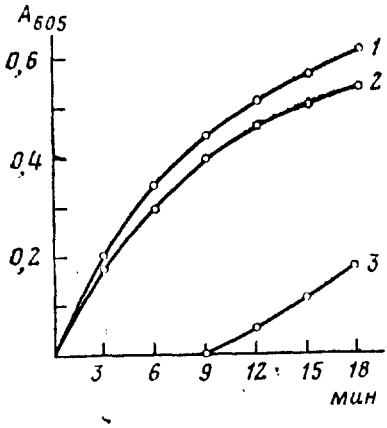


Рис. 3

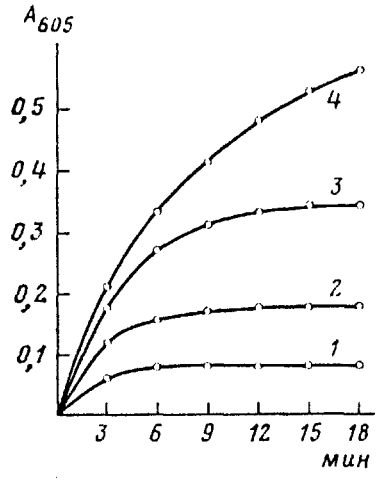


Рис. 4

Рис. 3. Влияние глюкозооксидазы с глюкозой и каталазы с этанолом на фотовосстановление метилвиологена хлоропластами (11 *мкг* хлорофилла в 1 *мл* суспензии). *1* — раздельное продувание аргоном, *2* — замена воздуха аргоном в присутствии глюкозы (10^{-2} *М*) и глюкозооксидазы (0,5 *мг/мл*), *3* — замена воздуха аргоном в присутствии каталазы (0,3 *мг/мл*) и этанола (400 *мкмоль/мл*)

Рис. 4. Кинетика фотовосстановления метилвиологена при концентрациях $6 \cdot 10^{-6}$ (*1*), $2{,}25 \cdot 10^{-5}$ (*2*), $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ (*3*) и $5 \cdot 10^{-5}$ *М* (*4*). Кислород удаляли совместным продуванием в присутствии 50%-ного глицерина, $5 \cdot 10^{-3}$ *М* хлористого аммония, pH 8,5; 15 *мкг* хлорофилла в 1 *мл* суспензии

чае 0,05—0,1 *мл* исходной (концентрированной) суспензии хлоропластов и равное количество глицерина помещают в боковой отвод трубки Тунберга, а реакционную среду — в нижнюю часть. После откачивания содержимое бокового отвода сливается в нижнюю часть и суспензия освещается.

Применение систем, потребляющих кислород. Для удаления кислорода из суспензии хлоропластов мы использовали глюкозооксидазу с глюкозой и каталазу с этанолом (при применении последней системы для удаления кислорода предполагается, что кислород хлоропластов на свету восстанавливается до перекиси водорода, которая затем используется каталазой в пероксидазной реакции с этанолом [3]). Глюкозооксидазу с глюкозой или каталазу с этанолом к суспензии хлоропластов добавляли после замены атмосферы над реакционной средой аргоном без длительного барбатирования газа. Как видно из рис. 3, глюкозооксидаза с глюкозой позволяют получить такое же эффективное восстановление метилвиологена, как и при раздельном продувании, т. е. в этом

случае устраняется инактивация хлоропластов на границе газ — жидкость. При использовании каталазы с этанолом восстановленный метилвиологен также интенсивно накапливается на свету (рис. 3). Однако в этом случае наблюдается длительный индукционный период, что, по-видимому, связано с восстановлением остаточного кислорода.

Надо отметить, что добавление глюкозооксидазы с глюкозой или каталазы с этанолом к реакционной среде после раздельного продувания или раздельного откачивания не вызывает дальнейшего увеличения скорости и глубины реакции фотовосстановления метилвиологена хлоропластами. Трудно сомневаться в том, что активация восстановления метилвиологена этими системами, описанная ранее, была связана с наличием следов кислорода из-за неполной откачки суспензии хлоропластов (до 55 *мм* рт. ст. [4] и до 25 *мм* рт. ст. [3]). По существу применение глюкозооксидазы с глюкозой или каталазы с этанолом в этих работах позволило создать анаэробные условия без повреждения хлоропластов.

Таким образом, продувание и откачивание суспензии хлоропластов приводит к подавлению реакции фотовосстановления метилвиологена. Применение раздельного продувания, раздельного откачивания, глицерина, бычьего сывороточного альбумина, глюкозооксидазы с глюкозой или каталазы с этанолом позволяет удалить кислород без повреждения хлоропластов и наблюдать эффективное накопление восстановленного на свету метилвиологена.

Для выяснения оптимальных условий фотовосстановления метилвиологена хлоропластами при раздельном продувании и раздельном откачивании мы исследовали влияние концентрации метилвиологена, pH среды, интенсивности света, разобщителей фотофосфорилирования.

ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕТИЛВИОЛОГЕНА

Влияние концентрации. На рис. 4 показано влияние начальной концентрации метилвиологена на скорость его фотовосстановления хлоропластами. При повышении концентрации до $5 \cdot 10^{-5}$ *M* скорость и глубина реакции увеличиваются.

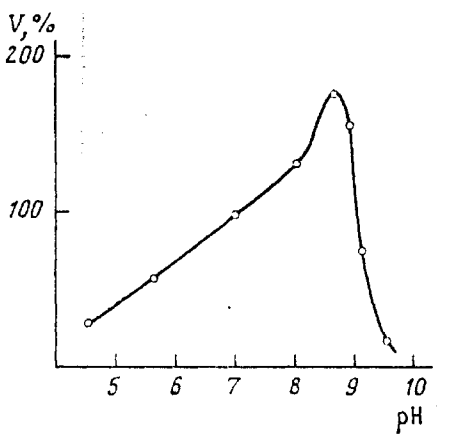


Рис. 5

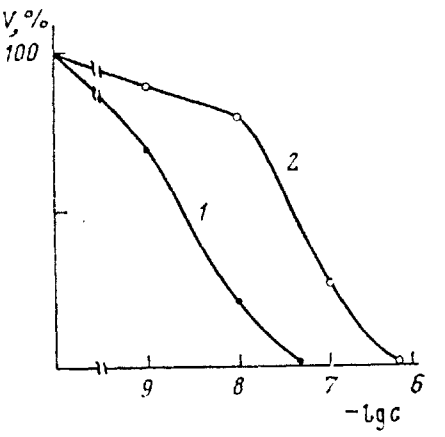


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость скорости фотовосстановления метилвиологена хлоропластами от pH. Скорость при pH 7,0 принята за 100%. Кислород удаляли раздельным продуванием, 7 *мкг/мл* хлорофилла в 1 *мл* суспензии

Рис. 6. Влияние концентрации диурона на фотовосстановление метилвиологена (*1*) и реакцию Хилла с дихлорфенолиндофенолом (*2*). Кислород удаляли раздельным откачиванием. Концентрация метилвиологена $5 \cdot 10^{-5}$ *M*, дихлорфенолиндофенола — 10^{-5} *M*, pH 8,5. 7 *мкг/мл* хлорофилла в 1 *мл* суспензии

Влияние pH среды. На рис. 5 показана зависимость скорости фотовосстановления метилвиологена от pH среды. pH изменяли путем добавления 0,1 н. HCl или 0,1 н. NaOH. Фотовосстановление метилвиологена имеет максимум при pH 8,5, что согласуется с данными опытов по восстановлению метилвиологена хлоропластами в присутствии гидразина как донора электрона [5] и с данными реакции Хилла [12].

Влияние интенсивности света. Порог насыщения соответствует реакции Хилла с феррицианидом.

Влияние разобщителей фотофосфорилирования. Метиламин или хлористый аммоний увеличивают скорость фотовосстановления метилвиологена в 2,5—3 раза. При оптимальных условиях (pH 8,5, интенсивность света $5 \cdot 10^5$ *эрг/см²·сек*, $5 \cdot 10^{-5}$ *М* метилвиологен, 10^{-2} *М* метиламин) многие препараты хлоропластов показали практически полное восстановление метилвиологена. Максимальная начальная скорость (измеренная за 30 *сек* от начала освещения) составляла 122 *мкмоль* восстановленного метилвиологена на 1 *мг* хлорофилла в час. Скорость реакции Хилла с дихлорфенолиндофенолом, измеренная при тех же условиях, составляла 195 *мкмоль* восстановленного дихлорфенолиндофенола на 1 *мг* хлорофилла в час.

ИНГИБИРОВАНИЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕТИЛВИОЛОГЕНА

Диурон. Диурон ингибирует фотовосстановление метилвиологена при концентрации 10^{-7} *М*. Для ингибирования реакции Хилла нужна концентрация на порядок выше (рис. 6).

Влияние *трис*-буфера. Предварительная обработка хлоропластов *трис*-буфером (инкубация 10 *мин* при pH 8 и 4°) приводит к ингибированию фотовосстановления метилвиологена и реакции Хилла (рис. 7). В отличие от действия диурона обработка *трис*-буфером сильнее ингибирует реакцию Хилла, чем восстановление метилвиологена. Возможно, что в обработанных хлоропластах восстановление метилвиологена частично происходит за счет эндогенных доноров электрона или в результате окисления воды, происходящего без выделения кислорода.

Влияние детергента тритона X-100. В опытах применяли раздельное продувание как для реакции Хилла, так и для восстановления метилвиологена. Время от момента смешивания исходной суспензии с реакционной средой до момента освещения 5 *мин*. В отличие от реакции Хилла, которая активируется при 0,007%-ной концентрации детергента, реакция восстановления метилвиологена не активируется, но подавляется уже в присутствии 0,004%-ного тритона (рис. 8).

Влияние этилового эфира. В этих опытах кислород удаляли методом совместного откачивания, при этом реакционная среда содержала 50% глицерина. Хлоропласты инкубировали с эфиром 10 *мин* до начала откачивания. При повышении концентрации эфира скорость восстановления метилвиологена уменьшалась значительно, тогда как скорость реакции Хилла при такой обработке оставалась практически неизменной (до концентрации эфира 5%).

Влияние предварительного нагревания. Исходную суспензию хлоропластов нагревали в боковом отводе трубки Тунберга 5 *мин* при разных температурах, затем проводили раздельное продувание аргоном и определяли скорость восстановления метилвиологена и реакции Хилла с феррицианидом. В то время как скорость реакции Хилла повышается при нагревании хлоропластов до 40—42°, скорость восстановления метилвиологена монотонно снижается при повышении температуры от 30 до 50° (рис. 9).

Таким образом, низкие концентрации тритона X-100, этилового эфира и прогревание хлоропластов выше 30° подавляют восстановление метилвиологена в отличие от реакции Хилла. По-видимому, такое различие

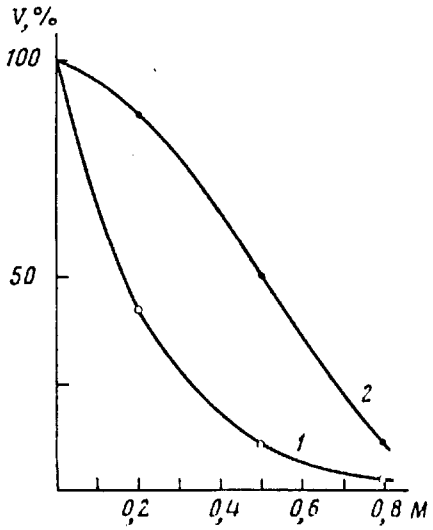


Рис. 7

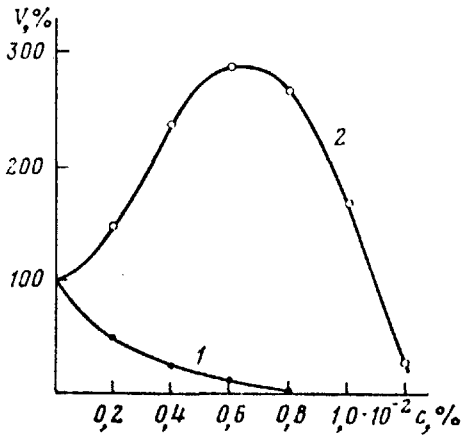


Рис. 8

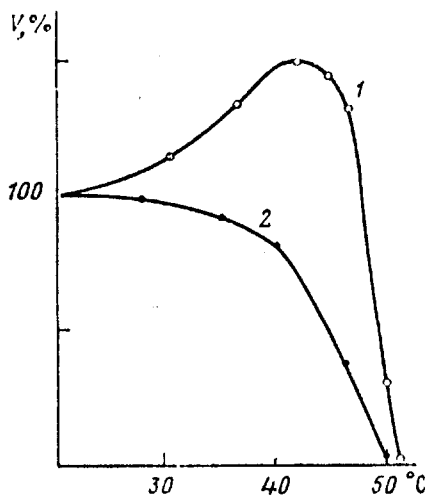


Рис. 9

Рис. 7. Зависимость скорости реакции Хилла (с феррицианидом, измерена по кислороду) (*1*) и фотовосстановления метилвиологена (*2*) от концентрации *трис*-буфера. Кислород удаляли раздельным продуванием

Рис. 8. Влияние тритона X-100 на фотовосстановление метилвиологена (*1*) и на реакцию Хилла (*2*). Кислород удаляли раздельным продуванием

Рис. 9. Влияние предварительного нагревания на реакцию Хилла (с феррицианидом) (*1*) и фотовосстановление метилвиологена (*2*). Кислород удаляли раздельным продуванием

следует объяснить большей чувствительностью реакции фотовосстановления метилвиологена к воздействию различных агентов на структуру мембран.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимость фотовосстановления метилвиологена от способа удаления кислорода. Описанные опыты показали, что продувание инертного газа или откачивание в вакууме суспензии хлоропластов подавляют восстановление метилвиологена. По-видимому, это подавление происходит в результате изменений структуры мембран хлоропластов на фазовых границах газ — жидкость. Применение раздельного продувания, когда исключается барбатирование газа через суспензию, добавление глицерина или сывороточного альбумина — агентов, способных стабилизировать мембраны хлоропластов [13], а также удаление кислорода при помощи кислородпотребляющей системы позволяют достигнуть эффективного фотовосстановления метилвиологена.

Метилвиологен гидрофилен, что, вероятно, ограничивает возможности взаимодействия этого соединения с переносчиками электронов, расположенных внутри мембраны хлоропласта. Ранее [14] было показано, что скорость фотовосстановления метилвиологена фотосистемой 1 снижается после обработки дигитонином или воздействия ультразвуком. Предполагалось, что при нарушении тилакоидных везикул восстановленный метилвиологен проходит к внутренней стороне мембраны и восстанавливает первичный донор электрона фотосистемы 1, в результате чего усиливается циклический транспорт электронов через метилвиологен. В наших опытах после продувания и откачивания суспензии хлоропластов подавление восстановления метилвиологена могло произойти по той же причине. Однако при таких воздействиях, как обработка 0,007%-ным тритоном X-100, 2%-ным этиловым эфиром или предварительное нагре-

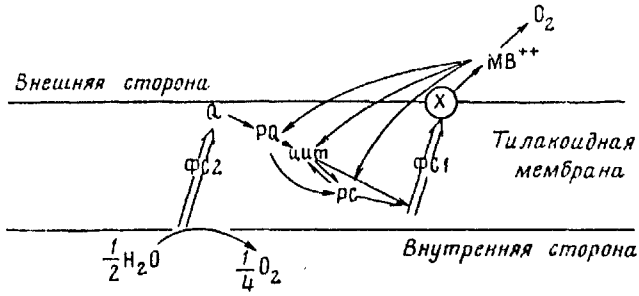


Рис. 10. Гипотетическая схема транспорта электронов в хлоропластах с метилвиологеном (MB) как акцептором электронов: Q — акцептор ФС2, PQ — пластохинон, ФС1 и ФС2 — фотосистемы 1 и 2, PC — пластоцианин

вание хлоропластов при 42°, трудно ожидать разрыва тилакоидных везикул. В этом случае увеличение циклического транспорта электронов может происходить из-за некоторого «разрыхления» мембран и увеличения проницаемости для метилвиологена.

Усилением циклического транспорта электронов через метилвиологен можно объяснить то, что диурон при низких концентрациях подавляет восстановление метилвиологена (рис. 6). При этом частично подавляется реакция Хилла, что приводит к увеличению времени нахождения в окисленном состоянии переносчиков электрона, на которые восстановленный метилвиологен передает электроны (рис. 10).

Природа доноров электрона. Возможность использования молекул воды как исходного донора электрона при фотовосстановлении метилвиологена хлоропластами в аэробных условиях была показана в масс-спектрометрических исследованиях выделяющегося кислорода [3]. В анаэробных условиях количественное восстановление метилвиологена в суспензии хлоропластов наблюдалось в присутствии кислородпоглощающих систем (глюкозы с глюкозооксидазой или этанола с каталазой [2—4]). По мнению авторов цитируемых работ, эти системы необходимы для предотвращения окисления восстановленного метилвиологена кислородом, который образуется при окислении воды и разложении перекиси водорода эндогенной каталазой.

В наших опытах фотовосстановление метилвиологена, как и реакция Хилла, подавляется диуроном и обработкой *трис*-буфером, активируется разобщителями фотофосфорилирования, имеет сходную зависимость от pH. Все это указывает на то, что фотовосстановление метилвиологена хлоропластами идет с использованием воды как исходного донора электрона. В то же время применение кислородпоглощающих систем не активировало реакцию, когда кислород из суспензии был удален раздель-

ным продуванием или раздельным откачиванием. Это могло быть вызвано участием эндогенных доноров [15]. Однако отмывание хлоропластов существенно не изменяло ход восстановления метилвиологена и не влияло на действие кислородпоглощающих систем. Добавление в суспензию хлоропластов доноров электрона, таких, как NADH, цистеин, малат, гликолат, глютамат, в концентрациях 10^{-3} *М* не приводило к активации восстановления.

Нельзя исключить возможность того, что в строго анаэробных условиях при использовании метилвиологена как конечного акцептора электрона фотоокисление воды хлоропластами может происходить без образования молекулярного кислорода. Действительно, имеются данные о несоответствии скорости выделения кислорода и восстановления феррицианида хлоропластами [16]. Описано также восстановление феррицианида хлорофилл-белковыми комплексами и частицами фотосистемы 2, идущее без выделения кислорода [15, 17, 18].

Другой возможностью является то, что кислород при освещении выделяется и реагирует с восстановленным метилвиологеном значительно быстрее, чем с глюкозооксидазой (константа скорости взаимодействия восстановленного метилвиологена с кислородом близка к диффузионной [19]), поэтому в анаэробных условиях кислородпоглощающая система не активирует восстановление метилвиологена. Отсутствие активации восстановления каталазой с этанолом может быть связано с тем, что в анаэробных условиях при освещении не образуется перекись водорода или она взаимодействует с некоторыми компонентами без образования кислорода. Действительно, в анаэробных условиях, как и ранее [20], нам не удалось обнаружить перекись водорода. При добавлении азида натрия, ингибирующего эндогенную каталазу, перекись водорода также не обнаруживалась.

Итак, проведенные исследования позволили выяснить оптимальные условия фотовосстановления метилвиологена хлоропластами. Практически полное восстановление метилвиологена с начальной скоростью 120 *мкмоль* на 1 *мг* хлорофилла в час наблюдалось при раздельном продувании, т. е. при создании анаэробных условий без барбатирования инертного газа через суспензию хлоропластов при pH 8,5 в присутствии метиламина (10^{-2} *М*) и при насыщающей интенсивности света.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arnon D. I. (1963) Photosynthesis Mechanisms in Green Plants, p. 195—212, N. Y.
2. Kok B., Rurainski H., Owrns O. (1965) Biochim. Biophys. Acta, **109**, 347—356.
3. Zweig G., Avron M. (1965) Biochim. Biophys. Res. Communs, **19**, 397—409.
4. Black C. C. (1966) Biochim. Biophys. Acta, **120**, 332—340.
5. Брин Г. П., Красновский А. А. (1972) Докл. АН СССР, **204**, 1253—1256.
6. Зайцев С. В., Колбановская Е. Ю., Варфоломеев С. Д. (1977) Биохимия, **42**, 1069—1076.
7. Красновский А. А. (1977) Изв. АН СССР, сер. биол., **5**, 650—662.
8. Walker D. A. (1971) Methodes Enzymology, **199**, 952—955.
9. Brand I., Krogmann D. W., Crane F. L. (1971) Plant Physiol., **47**, 135—138.
10. Красновский А. А., Брин Г. П., Алиев З. Ш. (1971) Докл. АН СССР, **199**, 952—955.
11. Красновский А. А., Брин Г. П. (1968) Докл. АН СССР, **179**, 726—729.
12. Bamberger E. S., Rothenberg H., Avron M. (1973) Europ. J. Biochem., **34**, 557—563.
13. Berg S. P., Izawa S. (1977) Biochim. Biophys. Acta, **460**, 206—219.
14. Hoffmann D., Thaner R., Trebst A. (1977) Z. Naturforsch., **32**, 257—262.
15. Kahn J. (1964) Biochim. Biophys. Acta, **79**, 234—240.
16. Кутюрин В. М., Улубекова М. В., Матвеева И. В. (1969) Физиол. растений, **16**, 477—491.
17. Huzisige H., Yamamote Y. (1972) Plant Cell Physiol., **13**, 477—491.
18. Кутюрин В. М., Шутилова Н. И. (1974) Биохимия, **39**, 102—110.
19. Thorneley N. F. (1974) Biochim. Biophys. Acta, **333**, 487—496.
20. Шувалов В. А., Красновский А. А. (1975) Биохимия, **40**, 358—367.

Поступила в редакцию
10.III.1978

THE STUDY OF METHYLVIOLOGEN PHOTOREDUCTION BY CHLOROPLASTS

V. V. NIKANDROV, CHAN VAN NHI, G. P. BRIN, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The condition of methylviologen photoreduction by chloroplasts was investigated. Argon bubbling through the suspension of chloroplasts or degasing in vacuum caused inhibition of methylviologen reduction probably due to the denaturation of chloroplast membranes at the water/air boundary. Adding glycerol or bovine serum albumine or removing oxygen from chloroplast suspension with the aid of the oxygen absorbing-systems preserved the activity of chloroplasts. Methylviologen photoreduction is inhibited by DCMU (10^{-7} *M*) and *Tris*-buffer treatment and is activated by uncouples. The pH-dependence is similar to that of the Hill reaction. Triton X-100 (0.007%), ethyl ether (2%) and heating up to 42° activated the Hill reaction but inhibited methylviologen reduction. Water molecule probably acts as an initial electron donor in this reaction. It is proposed that the steady level of methylviologen photoreduction is determined by a relationship between the rate of methylviologen electron acceptance and cyclic electron flow short-circuiting photosystem I.

Photosynthetic oxygen evolution
Ed. H. Metzner
Academic Press, 1978, p.p.405–410

PHOTOSENSITIZATION BY TITANIUM DIOXIDE AND ZINC OXIDE: OXYGEN AND HYDROGEN EVOLUTION

A.A. KRASNOVSKY and G.P. BRIN

A.A. Bakh Institute of Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Moscow (USSR)

It is generally assumed, that the primary reaction in photosynthesis is a charge separation. An electron passes through a series of intermediates to $NADP^+$, whereas a hole finally reaches water molecules, and oxygen is released. We wished to have a simple system to study: how under the action of light electrons and holes can be generated. Such a system we can find out in the case of inorganic photocatalysts-semiconductors like titanium dioxide, zinc oxide, etc. In this case under the action of light electrons come to the conduction band leaving behind holes in the valence band. It encouraged us to use these systems for our model experiments.

About 50 years ago Emil Baur in Switzerland discovered that under the action of light zinc oxide and some other inorganic compounds gained the property to cause oxidoreductions. Baur came to photochemistry from electrochemistry. He described the phenomenon of charge separation as "molecular electrolysis" [1]. Considering an excited sensitizer there were two sites - anodic and cathodic- and then oxidoreduction proceeded at the phase boundary. According to contemporary knowledge this may be regarded as a primitive point of view, but his basic idea looks quite plausible. We tried to construct models, which in

their action resembled oxidoreduction taking place in chloroplasts by using titanium dioxide, zinc oxide and tungsten trioxide (see review [9]). Absorption bands of titanium and zinc oxides are situated near the border between visible light and UV. Titanium and zinc oxides are white powders, a sharp absorption begins at ∿400 nm, so they are "black" in ultraviolet. In most cases we used excitation at 365 nm, but even if you choose other UV frequencies, you will see the effects described. I selected these experiments here to compare them with Metzner's silver chloride models [13], which should be mentioned in this context.

In our experiments we used fine powders of photocatalysts, having specific surfaces up to ∿20 $m^2 g^1$. We suspended them in water and studied the system in our first experiments inside quartz Warburg vessels. If we illuminate these TiO_2, ZnO or WO_3 suspensions in the presence of electron acceptors, we observe an evolution of gas. In our first experiments we observed sensitised photoevolution of oxygen in solutions of some oxidants including potassium permanganate [6].

Then we tried to simulate Hill reaction [7]. So we added ferricyanide or ferric ions. Then electrons on the phase boundary come to these acceptors, and so we measure oxygen evolution coupled to the reduction of an electron donor. The stoichiometry of the reaction strictly corresponds to the equation

$$2\ Fe^{3+} + H_2O \xrightarrow{h\nu} 2\ Fe^{2+} + 2H^+ + 1/2\ O_2$$

Then we performed experiments of this kind with water labelled with heavy oxygen. It was demonstrated, that in this case the oxygen isotope ratio of the released O_2 was the same as in the suspension water used [3]. So it was confirmed, that oxygen has really originated from water.

It is possible to reduce not only ferric compounds and ferricyanides but also quinones, like *p*-benzoquinone [10].

The quantum yield of the reaction studied did not exceed 1%. So these models show the reduction of an electron acceptor and the simultaneous evolution of oxygen molecules, which we primarily described in 1961 [6].

Summarizing these series of experiments we can say, that under the excitation of photocatalysts charge separation proceeds; if electrons can be taken into the hole from OH^- anions or H_2O molecules, radicals may be produced, which can recombine on the boundary to give molecular oxygen. The formation of OH· radicals under the described conditions had been really found earlier [5]. The electrons are accepted at the phase boundary by oxidants (electron accepting molecules).

A second type of reaction to simulate was the Mehler reaction of chloroplasts. In our model system oxygen may act as terminal electron acceptor, water molecules (or OH^- ions) as donor. The first observation of hydrogen peroxide formation on ZnO was made by Baur and Neuweiler [2]. We used a sensitive measurement of the chemiluminescence of luminol in the presence of peroxidase, so we could quantitatively determine the hydrogen peroxide produced, not only in the case of ZnO, but also in aqueous suspension of TiO_2. If we added methylviologen to this system, the reaction was greatly enhanced [11]. Here the methylviologen probably functioned as intermediate electron carrier. So we could simulate a Mehler reaction in the photocatalysts suspension in the presence of oxygen.

There is a third type of reaction. If we excluded oxygen from the suspension of photocatalysts to work under anaerobic conditions, we observed the reduction of methyl viologen [8], which in this case acts as a terminal electron acceptor. The only possible electron donor in this system was H_2O or OH^- anions, but we could not observe oxygen evolution in this case. Maybe the OH· radicals formed react with viologen, which may function as a scavenger

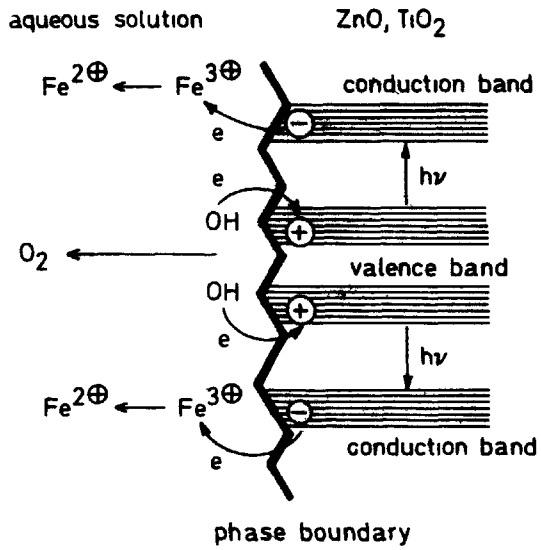


Fig. 1. Scheme of oxygen photoevolution with inorganic photocatalysts.

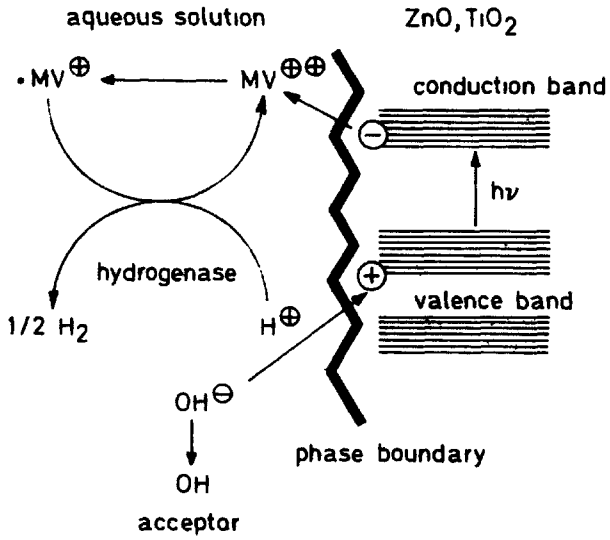


Fig. 2. Scheme of hydrogen photoevolution with inorganic photocatalysts.

of these radicals. This, however, is not clear yet.

It is well known that the redox potential of methyl-viologen slightly exceeds that of the hydrogen electrode. So by introduction of suitable catalysts we may expect to observe hydrogen gas evolution. Using gas chromatography we observed a hydrogen release indeed, if we supplied our system with a hydrogenase from photosynthetic bacteria [12]. So we found a possibility to simulate this chloroplast reaction, too.

One side of our system works like an oxygen electrode, releasing molecular oxygen; the other side may be compared to a hydrogen electrode.

In this connection I would like to mention the very interesting studies of Fujishima and Honda [4]. They are an electrochemical version of our experiments. In their essence they demonstrate a charge separation on TiO_2 "membranes". Making these layers part of electrochemical cells it could be demonstrated, that these cells produce both hydrogen and oxygen. It is remarkable, that Honda obtained a great enhancement of oxygen evolution, if he added ferric ions to his system. This makes his set-up a remarkable modification of the experiments, which we described 16 years ago.

It is important to emphasize, that the semiconductors studied function not only as photosensitizers but also as catalysts. On the interfaces there may be a recombination of the primary produced intermediates, which probably makes these experiments successful. I suppose, that this simple model may be of interest for those, who are working on the important problem of conversion of light energy into chemical energy.

References

1. Baur, E. (1928). *Z. phys. Chem.* **131**, 143-148.
2. Baur, E. and Neuweiler, C. (1927). *Helv. Chim. Acta* **10**, 901-906.
3. Fomin, G.V., Brin, G.P., Genkin, M.V., Liubimova, A.K., Blumenfeld, L.A. and Krasnovsky, A.A. (1973). *Dokl. Akad. Nauk*

SSSR **212**, 424-427.
4. Fujishima, A. and Honda, K. (1972). *Nature* **238**, 37-38.
5. Korsunovsky, G.A. (1960). *J. Fiz. Chem.* **34**, 510-517.
6. Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1961). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **139**, 142-145.
7. Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1962). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **147**, 656-659.
8. Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1965). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **163**, 761-764.
9. Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1970). *In* "Molecular Photonics" ("Nauka" Publ. House, ed.), 161-178, Leningrad.
10. Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Aliev, Z.Sh. (1971). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **199**, 952-955.
11. Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Nikandrov, V.V. (1976). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **229**, 990-993.
12. Krasnovsky, A.A., Nikandrov, V.V., Brin, G.P., Gogotov, I.N. and Ochshepkov, V.P. (1975). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **225**, 711-713.
13. Metzner, H. (1968). *Z. physiol. Chem.* **349**, 1586-1588.

БИОФИЗИКА

Том XXIV, вып. 4 1979

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА

Н. В. БУБЛИЧЕНКО, А. В. УМРИХИНА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследовали фотовзаимодействие протохлорофилла с донорами электрона (аскорбиновой кислотой, гидрохиноном, сернистым натрием) и окисление *п*-бензохиноном. Было показано, что протохлорофилл хорошо восстанавливается всеми исследованными донорами электрона и устойчив к окислению. Возникающая в ходе фотовосстановления анион-радикальная форма пигмента характеризуется синглетным сигналом ЭПР (для аскорбиновой кислоты ($\Delta H \sim 8$ Э) и гидрохинона и сернистого натрия ($\Delta H \sim 11$ Э), $g=2{,}00$) и спектром поглощения в видимой области с максимумом около 470 нм. Предполагается, что превращение протохлорофилла в хлорофилл в реакции фотовосстановления включает ряд этапов, одним из которых является образование анион-радикала пигмента.

Освещение этиолированных листьев приводит к фотовосстановлению протохлорофилла с высоким квантовым выходом. При фотовосстановлении протохлорофилла в растворе доминирует процесс образования промежуточных продуктов с максимумом поглощения при 470 нм, которые частично подвергаются дальнейшим превращениям с образованием хлорофиллоподобного продукта [1—6]. Протохлорофилл в растворе при освещении образует триплетные (бирадикальные) состояния, что было установлено путем измерения фосфоресценции этого пигмента [7, 8]; одноэлектронное фотовосстановление и фотоокисление протохлорофилла должно приводить к образованию свободных радикалов, поискам которых посвящена данная работа.

Протохлорофилл (4-винилпротохлорофилл) выделяли из внутренних оболочек семян тыквы (сорт «Столовая») по принятому в нашей лаборатории методу с конечной хроматографической очисткой на колонках из сахарозы. Протофеофитин получали путем обработки раствора протохлорофилла в серном эфире 10%-ной соляной кислотой с последующим промыванием водой, высушиванием и хроматографической очисткой. Измерения спектров ЭПР проводили на модифицированном радиоспектрометре РЭ-1301 в стеклянных ампулах диаметром 3—4 мм, которые освещали в резонаторе ЭПР-спектрометра фокусированным светом ксеноновой лампы ДКСШ-200 через светофильтр ОС-13, пропускающий спектральную область поглощения протохлорофилла.

Фотовосстановление. Донор электрона — аскорбиновая кислота. Освещение растворов протохлорофилла и аскорбиновой кислоты в пиридине в вакууме при температуре —30° С приводило к возникновению синглетного сигнала ЭПР с полушириной ~ 8 Э и $g=2{,}00$ (рис. 1). В опытах с аскорбиновой кислотой без пигмента при этой температуре не наблюдали фотоиндуцированного образования радикалов монодегидроаскорбиновой кислоты (дублет с $\Delta H=1{,}8$ Э), которые появлялись на белом свету только при более высокой температуре. Это позволило предположить, что синглетная линия ЭПР, наблюдаемая при действии света на растворы протохлорофилла и аскорбиновой кислоты, принадлежит

анион-радикальной форме пигмента. Реакцию фотовосстановления аскорбиновой кислотой изучали также на примере протопорфирина, соответствующего протохлорофиллу по уровню восстановленности полуизолированных двойных связей. Сигналы ЭПР, возникавшие при освещении образцов с протопорфирином и аскорбиновой кислотой в пиридине, представляли собой синглетные линий, аналогичные тем, которые были зарегистрированы в опытах с протохлорофиллом ($\Delta H \sim 7$ Э, $g=2{,}00$; рис. 1, 2).

Донор электрона — гидрохинон. Взаимодействие протохлорофилла с другим донором электрона — гидрохиноном в этаноле на свету приводи-

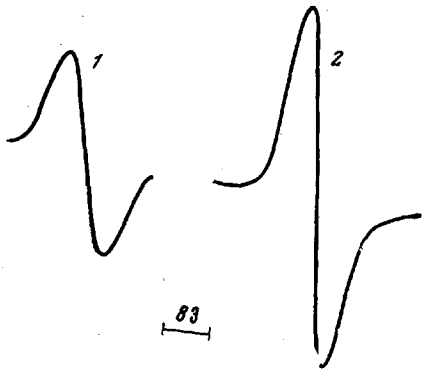


Рис. 1

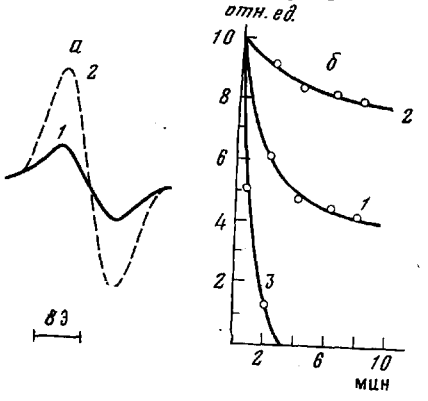


Рис. 2

Рис. 1. Сигналы ЭПР при фотохимическом восстановлении аскорбиновой кислотой: *1* — протохлорофилла; *2* — протопорфирина. Пиридин; вакуум; ОС-13; —30° С

Рис. 2. Фотовосстановление протохлорофилла гидрохиноном при —130° С: *а* — спектры ЭПР в этаноле *(1)* и в смеси этанол+10% пиридина *(2)*; *б* — кинетики исчезновения в темноте сигнала *(1)* — *1*, сигнала *(2)* — *2* и фотоиндуцированного белым светом сигнала ЭПР гидрохинона в этаноле — *3*

ло к возникновению сигнала ЭПР семихинона (пентет) при температуре —90° С и выше, который сразу же исчезал после выключения света. В диапазоне температур —90÷—160° С при освещении раствора протохлорофилла и гидрохинона в этаноле наблюдали синглетный сигнал ЭПР ($\Delta H \sim 8$ Э, $g=2{,}00$), который, как мы показали [9], представлял собой сумму двух синглетных сигналов: одного, принадлежащего радикалу семихинона, сигнал ЭПР которого при температуре ниже —90° имеет вид синглетной линии, другого — радикальной форме пигмента. Оба сигнала при сходстве параметров (ширина линии, g-факторы) характеризовались разной скоростью исчезновения после выключения света. Так, из рис. 2 видно, что в опытах с протохлорофиллом и гидрохиноном сигнал сохраняется в темноте после выключения света в течение 10 мин и более, тогда как в случае одного гидрохинона он исчезает в первые 3 мин темноты. Эти данные свидетельствуют о том, что синглетная линия ЭПР-поглощения с $\Delta H \sim 8$ Э и $g=2{,}00$, возникающая в ходе фотореакции между протохлорофиллом и гидрохиноном при температуре ниже —90° С и остающаяся после исчезновения радикалов семихинона (3 мин темноты), по-видимому, принадлежит восстановленной анион-радикальной форме пигмента. Добавление в реакционную смесь 10% пиридина вызывало значительное увеличение интенсивности фотоиндуцированного сигнала семихинона. Если реакция в этой системе протекала при —90÷÷—160° С, на свету появлялась синглетная линия ЭПР с $\Delta H \sim 8$ Э и $g=2{,}00$, длительное время сохраняющаяся в темноте (рис. 2). Освещение раствора одного гидрохинона в этаноле с добавкой пиридина не приводило к появлению сигнала ЭПР семихинона в этих условиях. Получен-

ные результаты также указывают на принадлежность наблюдаемого сигнала ЭПР ($\Delta H \sim 8$ Э и $g=2{,}00$) восстановленной радикальной форме протохлорофилла и на возможность стабилизации этой формы при низких температурах.

Донор электрона — сернистый натрий. При фотовосстановлении протохлорофилла Na_2S в пиридине, содержащем 2,5% воды, в температурном

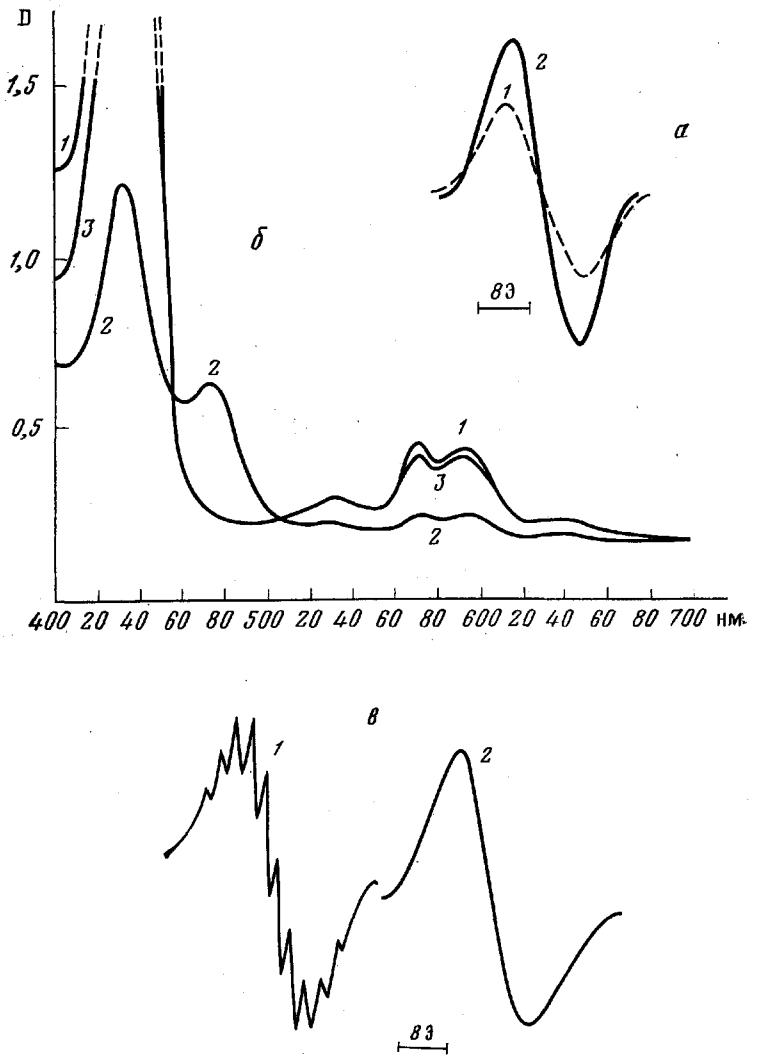


Рис. 3. Фотовосстановление сульфидом натрия: *а* — спектры ЭПР анион-радикалов протохлорофилла (*1*) и протофеофитина (*2*); *б* — спектры поглощения протофеофитина: *1* — исходный; *2* — после 5 мин освещения; *3* — после пуска воздуха. Пиридин; вакуум; —40° С. Спектры ЭПР бактериофеофитина (*в*) при фотовосстановлении Na_2S (*1*) и аскорбиновой кислотой (*2*). Условия те же

диапазоне $-70 \div +10°$ С появлялась синглетная линия ЭПР с $\Delta H \sim 11$ Э и $g=2{,}00$. Более отчетливые сигналы наблюдали в опытах по фотовосстановлению протофеофитина Na_2S ($\Delta H \sim 10{,}5$ Э; $g=2{,}00$) (рис. 3, *а*). Повышение температуры от —50 до —20° С вызывало увеличение, а затем уменьшение интенсивности сигнала ЭПР. Это можно объяснить тем, что при низких температурах происходит фотоперенос электрона в комплексе между пигментом и донором; когда достигается температура

размораживания образца, комплекс распадается и образуются свободные радикалы, которые при дальнейшем повышении температуры гибнут в реакциях диспропорционирования, взаимодействия с растворителем и т. д. Освещение растворов одного протохлорофилла и протофеофитина в пиридине, а также растворов одного Na_2S в пиридине не приводило к появлению сигналов ЭПР. Так как Na_2S при окислении не дает радикалов, сигналы ЭПР, возникающие при фотовосстановлении протохлорофилла и протофеофитина Na_2S, могут быть обусловлены только анион-радикалами пигмента.

При фотовосстановлении протохлорофилла и протофеофитина Na_2S в условиях, когда выход радикальных продуктов был максимальным (температура —40°), в спектре поглощения в видимой области наблюдали появление максимума при 470 нм, который, по-видимому, принадлежит анион-радикалу пигмента или его гидрированной форме. При разогревании раствора и пуска воздуха форма с максимумом поглощения 470 нм практически полностью регенерировала в исходный пигмент (рис. 3, *б*). Спектральные изменения, возникающие при фотовосстановлении протохлорофилла и протофеофитина аскорбиновой кислотой, рассматривались нами ранее [4].

В отличие от протохлорофилла и протофеофитина бактериохлорофилл при фотовосстановлении Na_2S давал спектр ЭПР со слабо разрешенной сверхтонкой структурой, бактериофеофитин — с хорошо разрушенной СТС (рис. 3, *в*). Следует отметить, что восстановление бактериальных пигментов аскорбиновой кислотой (рис. 3, *в*) приводило, как и в случае протохлорофилла, к возникновению бесструктурных синглетных сигналов ЭПР ($\Delta H \sim 13{,}5$ Э; $g = 2{,}00$).

Фотоокисление. Для сравнения с исследованной ранее способностью к фотоокислению бактериохлорофиллов *a*, *b* и *c* [9—12] изучали фотоокисление протохлорофилла *n*-бензохиноном в этаноле. В опытах с бактериохлорофиллами *a* и *b* сигналы ЭПР катион-радикалов пигментов появлялись в температурном диапазоне $-160 \div +10°$ С [9, 10]. Катион-радикал бактериохлорофилла *c* удалось обнаружить в диапазоне $-160 \div -100°$ С [11]. При действии света на растворы протохлорофилла и хинона в интервале температур $-160 \div +30°$ С наблюдали образование свободных радикалов. В отличие от фотоокисления бактериальных пигментов хиноном здесь не удалось зарегистрировать спектр окисленной радикальной формы протохлорофилла. В температурном диапазоне $+30 \div -90°$ С фотоиндуцированный в реакции между протохлорофиллом и хиноном сигнал ЭПР представлял собой пятилинейчатый спектр ЭПР семихинона; при более низких температурах — синглетную линию ЭПР-поглощения ($\Delta H \sim 8$ Э, $g = 2{,}00$). Однако при этом кинетики исчезновения сигналов ЭПР, появляющихся при освещении красным светом растворов протохлорофилла и хинона и белым растворов одного хинона в этаноле, в отличие от взаимодействия протохлорофилла с гидрохиноном (см. выше), были практически одинаковы в температурном интервале $-150 \div -100°$ С (рис. 4). Это позволяет заключить, что наблюдаемые спектры ЭПР обусловлены семихинонными радикалами, возникающими на белом свету в реакции хинона с растворителем или на красном свету в сенсибилизированной протохлорофиллом реакции между молекулами хинона и растворителя или примесей.

Тот факт, что мы не смогли зарегистрировать сигнал ЭПР катион-радикальной формы протохлорофилла, согласуется с его известной устойчивостью к окислению, обусловленной наименьшей степенью восстановленности полуизолированных двойных связей пигмента по сравнению с хлорофиллом и бактериохлорофиллом. Полученные данные свидетельствуют об устойчивости протохлорофилла к окислению и его склонности к восстановлению различными донорами электрона. Продукты фотовосстановления протохлорофилла и протофеофитина всеми исследо-

ванными восстановителями характеризуются синглетным сигналом ЭПР и спектром поглощения в видимой области с максимумом при 470 нм.

Возможно, что превращение протохлорофилла в хлорофилл в реакции фотовосстановления включает ряд этапов, первым из которых является образование анион-радикала протохлорофилла. Дальнейшие ста-

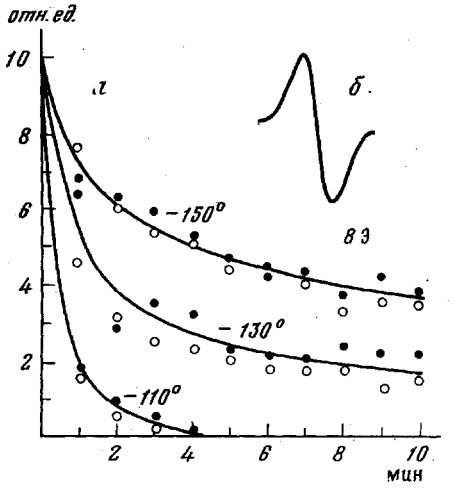


Рис. 4. Кинетика исчезновения (*а*) сигнала ЭПР (*б*), возникающего при действии света (фильтр ОС-13) на растворы протохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле (точки), и в освещенных белым светом растворах *n*-бензохинона в этаноле (кружочки)

дии приводят к образованию дигидроформы протохлорофилла, изомеризующейся в хлорофилл (см. схему).

$$\text{Пхл}^* + \bar{e} \quad \text{Пхл}^{\cdot-},$$
$$\text{Пхл}^{\cdot-} + \bar{e} \quad \text{Пхл}^{--},$$
$$\text{Пхл}^{--} + 2\text{H}^+ \quad \text{ПхлH}_2,$$
$$\text{ПхлH}_2 \xrightarrow{\text{изомеризация}} \text{Хл},$$

где ПХл* — протохлорофилл в возбужденном состоянии; $\text{Пхл}^{\cdot-}$ — радикал протохлорофилла в ионной форме; Пхл^{--} и ПхлH_2 — дианион и дигидроформа протохлорофилла соответственно; Хл — хлорофилл. Подобный механизм был показан нами ранее [6] на примере превращения аналогов протохлорофилла протопорфирина и гематопорфирина в хлорин с высоким квантовым выходом.

Возможность промежуточного образования свободных радикалов при фотовосстановлении протохлорофилла в этиолированных листьях требует исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Войновская К. К.*, Докл. АН СССР, *66*, № 4, 663, 1949.
2. *Красновский А. А., Войновская К. К.*, Докл. АН СССР, *112*, 911, 1957.
3. *Красновский А. А., Быстрова М. И.*, Биохимия, *27*, № 5, 958, 1962.
4. *Быстрова М. И., Умрихина А. В., Красновский А. А.*, Биохимия, *31*, № 1, 83, 1966.
5. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Ланг Ф.*, Докл. АН СССР, *194*, № 6, 1441, 1970.
6. *Умрихина А. В., Юсупова Г. А., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *175*, № 6, 1400, 1967.
7. *Красновский А. А. мл., Литвин Ф. Ф.*, Изв. АН СССР, Сер. физ., *39*, № 9, 1968, 1975.
8. *Красновский А. А., мл., Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.*, Докл. АН СССР, *225*, № 1, 207, 1975.
9. *Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Бегичев В. Н., Красновский А. А.*, Докл. АН СССР, *221*, № 4, 974, 1975.

10. *Красновский А. А., Пушкина Е. М., Дроздова Н. Н., Бубличенко Н. В., Умрихина А. В.*, Докл. АН СССР, *221*, № 6, 1457, 1975.
11. *Умрихина А. В., Быстрова М. И., Бубличенко Н. В., Мальгошева И. Н., Красновский А. А.*, Биофизика, *22*, № 5, 780, 1977.
12. *Красновский А. А., Умрихина А. В., Бубличенко Н. В.*, в сб.: Спектроскопия фотопревращений в молекулах, 106, «Наука», Л., 1977.

Поступила в редакцию
22.III.1979

FORMATION OF FREE RADICALS IN PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF PROTOCHLOROPHYLL

N. V. BUBLICHENKO, A. V. UMRIKHINA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Photointeraction between photochlorophyll and some electron donors (ascorbic acids, hydroquinone, sodium sulfide) and oxidation with *p*-benzoquinone were studied. Protochlorophyll was shown to be well reduced by all the electron donors studied; it is stable to oxidation. The anion radical pigment form which appears in the course of photoreduction is characterized by the ESR signal which has the shape of a singlet line ($\Delta H \sim 8E$ and $\Delta H \sim 11E$ for ascorbic acid and hydroquinone, and sodium sulfide respectively, $g = 2.00$); and absorption spectrum is in the visible region with the maximum about 470 nm. It is suggested that transformation of protochlorophyll into chlorophyll during photoreduction comprises several stages, the one of which is the formation of the pigment anionradical.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 13 1979 Вып. 3

УДК 541.144.7 : 547.963.4

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА САМОСБОРКИ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *с*

М. И. БЫСТРОВА, И. Н. МАЛЬГОШЕВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Изучали особенности межмолекулярного взаимодействия бактериохлорофилла *с* и его феофитина в неполярных растворителях и твердых пленках по спектрам поглощения в видимой и инфракрасной (1800—1600 и 3800—3000 $см^{-1}$) областях. Исследовали влияние на спектры отсутствия воды и ее наличия, а также пиридина и концентрации пигмента. Сделано заключение о том, что у бактериохлорофилла *с* самосборка агрегированных форм всех типов с поглощением в пределах 680—745 *нм* связана с возникновением межмолекулярных связей, в которых участвуют кетогруппы циклопентаноновых колец молекул, а также, по-видимому, гидроксильные (оксиэтильные) группы первых пиррольных колец. Кетогруппы образуют координационные связи с центральными атомами магния. Гидроксильные группы координационно взаимодействуют с магнием при одновременном образовании водородных связей с пиррольным азотом. В отличие от хлорофилла *а* и бактериохлорофилла *а* у бактериохлорофилла *с* молекулы воды не участвуют в образовании межмолекулярных связей при самосборке длинноволновых агрегированных форм. С отмеченными особенностями строения связана термостойкость агрегированных форм бактериохлорофилла *с* и их довольно высокая устойчивость к дезагрегации. Бактериофеофитин *с* в любом состоянии (раствор, твердая пленка) не обнаруживает способности к самосборке длинноволновых агрегированных форм и образованию межмолекулярных связей с участием карбонильных групп. Обсуждаются специфические особенности сборки агрегированных структур бактериохлорофилла *с*, моделирующих состояние пигмента антенны зеленых фотосинтезирующих бактерий.

Главная масса пигментов фотосинтезирующих бактерий находится в агрегированных формах, играющих роль светособирающей антенны в процессе бактериального фотосинтеза и функционирующих в реакционных центрах. Работами нашей лаборатории [1—9] было показано, что бактериохлорофилл *с* в твердых пленках образует такие же, как и в клетках интактных бактерий, агрегированные структуры, в которых доминирует форма с максимумом поглощения $\sim$750 *нм* и люминесценцией при 780 *нм*. Ранее [8] мы изучали агрегацию бактериохлорофилла *с* по спектрам поглощения в видимой и инфракрасной областях под влиянием различных дезагрегирующих воздействий. Однако оставалась невыясненной специфика молекулярной организации его агрегированных структур по сравнению с другими Mg-содержащими пигментами.

Данная работа проведена с целью изучения особенностей межмолекулярного взаимодействия бактериохлорофилла *с* и соответствующего феофитина в твердых пленках и неполярных растворителях с помощью измерения спектров поглощения в видимой и инфракрасной областях. Особое внимание уделено вопросам включения воды в структуру агрегированных форм и характеру межмолекулярных связей, возникающих при их сборке.

Мы исследовали бактериохлорофилл *c*, или хлоробиум-хлорофилл 660, выделяемый из культуры зеленых бактерий *Chloropseudomonas ethylicum* и представляющий собой одну из двух известных модификаций хлоробиум-хлорофилла [10, 11]. Этот пигмент, будучи однородным по спектральным и хроматографическим свойствам, состоит из смеси близких гомологов, которые являются магниевыми комплексами фарнезилового эфира 2-девинил-2-α-гидроксиэтил пирофеофорбида *a* и различаются углеводородными заместителями у C(4) и C(5). Его формула представлена на рис. 1 (нами выделены атомы, участвующие в образовании межмолекулярных связей).

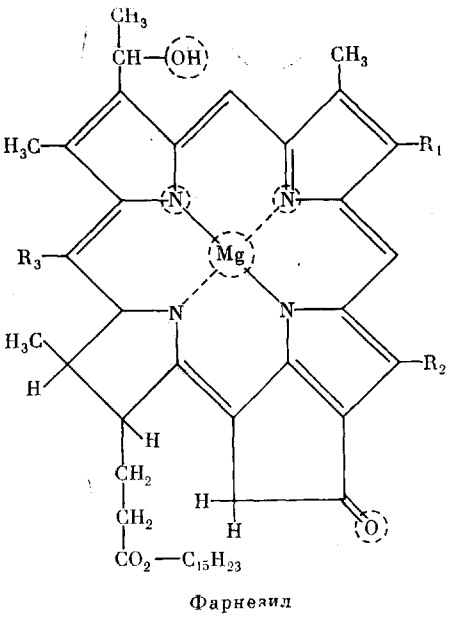


Рис. 1. Структура бактериохлорофилла *c* [11]. R_1 — этил, пропил, изобутил, R_2, R_3 — метил, этил

МЕТОДИКА

Бактериохлорофилл *c* получали по открытому ранее методу [8]. Осажденные центрифугированием клетки бактерий экстрагировали ацетоном, пигменты переводили в диэтиловый эфир. Осадок, получающийся после испарения эфира, промывали петролейным эфиром и хроматографировали в смеси диэтилового и петролейного эфиров (3 : 7, по объему). Использовали диэтиловый эфир, высушенный над металлическим натрием и свежеперегнанный. Бактериофеофитин *c* получали обработкой эфирного раствора пигмента 0,2 н. HCl с последующим промыванием водой и хроматографической очисткой. Бактериохлорофилл *a* получали из бактериальной массы *Rhodospirillum rubrum* по методу, принятому в нашей лаборатории, с конечной хроматографической очисткой на сахарозе.

Безводные растворы пигментов получали в вакуумных трубках Тунберга путем последовательного растворения образца в сухом CCl_4 и удаления растворителя откачиванием в вакууме, повторяя эту процедуру 2—3 раза. Таким образом получали и твердые пленки пигментов для измерения электронных спектров.

Твердые пленки пигментов для измерения ИК-спектров получали на пластинках из NaCl и KF (флуорита) путем испарения эфира из растворов с последующим высушиванием в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 в течение 12—24 *час*. Для удаления следов воды пленки откачивали на диффузионном вакуумном насосе (10^{-5} *мм* рт. ст.) при 90° в течение 12 *час*. Такая обработка пленок не вызывала деструкции пигмента. Отсутствие воды контролировали с помощью газовой хроматографии (на газовом хроматографе «Цвет 1-64»).

CCl_4 сушили над молекулярным ситом 5 Å фирмы «Roch» (Польша) несколько дней и перегоняли, отбрасывая начальные фракции.

Электронные спектры измеряли на спектрофотометре СФ-14, модифицированном для измерения в диапазоне 400—950 *нм*. ИК-спектры регистрировали на двулучевом спектрофотометре UR-20 («Karl Ceiss», Иена) с призмами NaCl и LiF. Нас интересовала структура ИК-спектров в области характеристических частот валентных колебаний карбонильных (1800—1600 $см^{-1}$) и гидроксильных (3800—3000 $см^{-1}$) групп.

Раствор бактериохлорофилла *с* в сухом CCl_4 имеет спектр с основным максимумом в красной области при 710 *нм* и другим, меньшим по величине, ~680 *нм* (рис. 2). Поглощение в области 680 *нм*, вероятно, принадлежит димерам пигмента, при 710 *нм* — более агрегированной, полимерной форме [8]. Относительное количество длинноволновой формы уменьшается в присутствии воды, что скорее всего связано с ее дез-

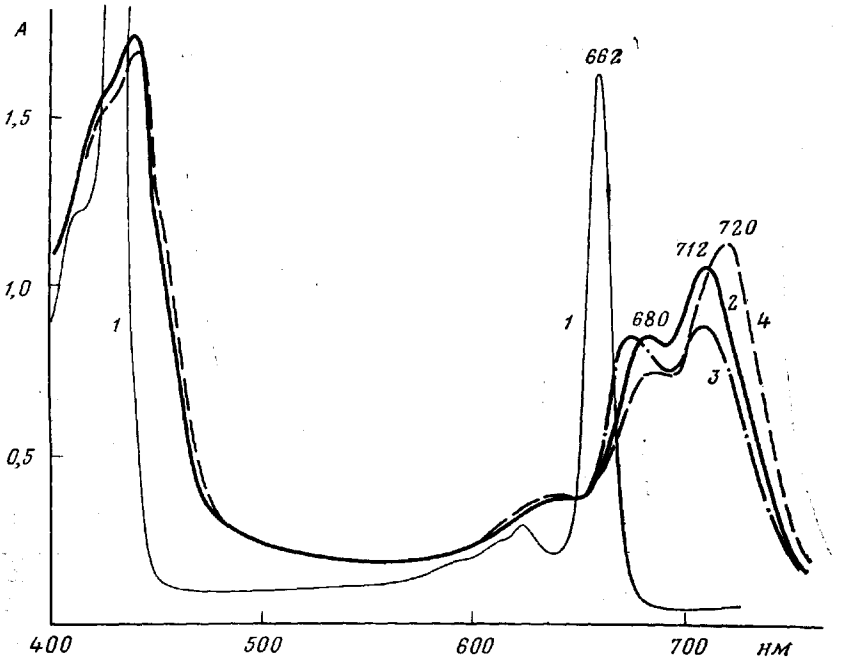


Рис. 2. Спектры поглощения бактериохлорофилла *с* при 20°. 1 — $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М* раствор в диэтиловом эфире, 2 — $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М* безводный раствор в CCl_4, 3 — раствор в CCl_4 в присутствии воды, 4 — 10^{-3} *М* раствор в CCl_4

агрегацией. Раствор бактериохлорофилла *с* в диэтиловом эфире с той же концентрацией пигмента содержит «мономерный» пигмент с главным максимумом при 662 *нм* (рис. 2).

Увеличение концентрации бактериохлорофилла *с* в CCl_4 до ~10^{-3} *М* способствует самосборке формы с поглощением при 720 *нм* за счет уменьшения количества формы с поглощением при 680 *нм* (рис. 2). В результате понижения температуры раствора в CCl_4 даже при обычной концентрации пигмента (10^{-5} *М*) можно достигнуть образования формы с поглощением при 720 *нм*, как и другой, наиболее длинноволновой (745 *нм*), принадлежащей структуре с предельно высокой степенью агрегации (рис. 3). Сборка формы, поглощающей при 745 *нм*, наблюдается и при 20° после добавления к сухому CCl_4 углеводородного растворителя (пентана, гексана, гептана и пр.). На рис. 4 можно видеть образование бактериохлорофилла *с* (745 *нм*) во времени. Следует отметить, что разные растворители углеводородной природы при добавлении к раствору в CCl_4 оказывают сходное влияние на агрегацию пигмента, хотя и различаются по эффективности. Варьируя состав и соотношение компонентов в смеси CCl_4 — углеводород, а также время «созревания» структуры, можно при одной и той же концентрации пигмента в широких пределах варьировать соотношение форм, поглощающих при 680, 710 и 745 *нм*.

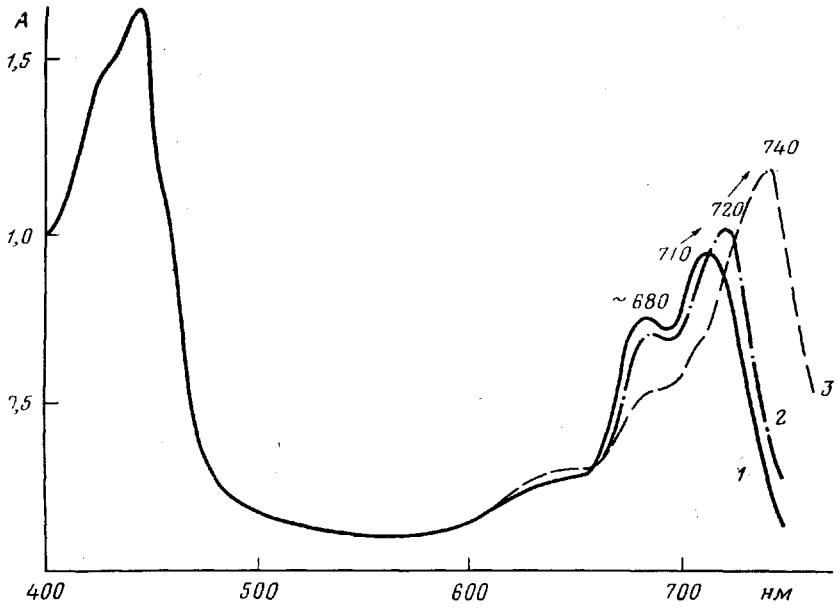


Рис. 3. Спектры поглощения безводного раствора бактериохлорофилла *c* ($\sim 1{,}5 \cdot 10^{-5}$ *M*) в CCl_4: *1* — при 20°, *2—3* — по мере охлаждения до —20°

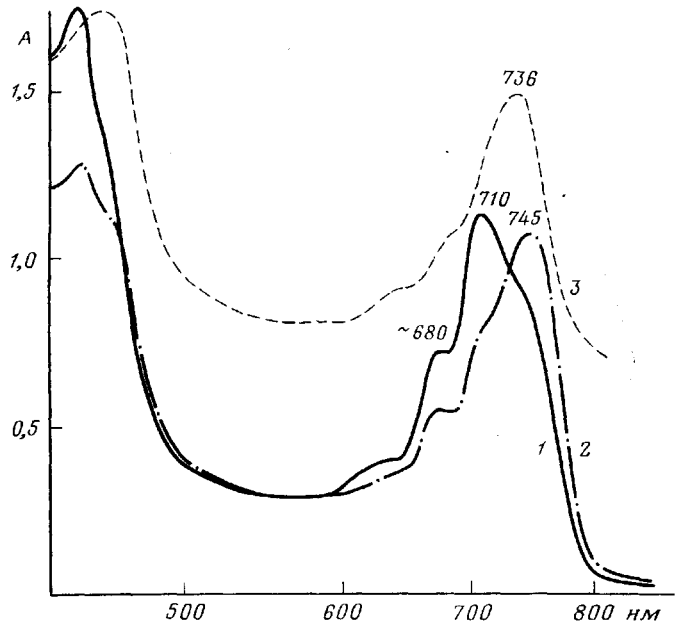


Рис. 4. Спектры поглощения бактериохлорофилла *c*: *1* — безводный раствор в смеси CCl_4 — гептан (1 : 9), *2* — то же через 12 *час* после получения, *3* — безводная твердая пленка

В твердых пленках бактериохлорофилла *c*, получаемых в отсутствие воды (при испарении CCl_4 в вакууме), наблюдается самосборка структуры, имеющей поглощение в области 730—735 *нм* (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что самосборка длинноволновых агрегированных форм бактериохлорофилла *c* (710, 720, 730 и 745 *нм*) в неполярных растворителях и твердых пленках не требует включения в структуру молекул экзогенной воды. В этом — уникальная

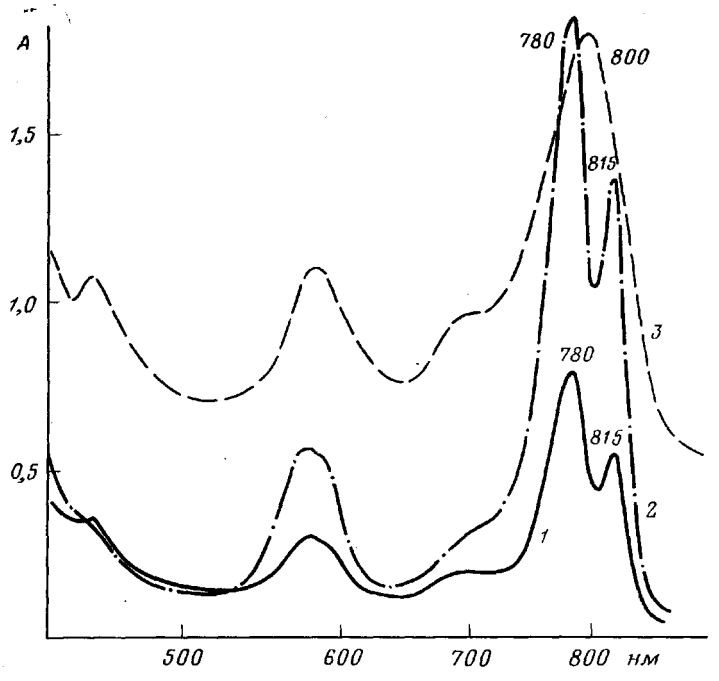


Рис. 5. Спектры поглощения бактериохлорофилла *a*. *1* — $\sim 10^{-5}$ *M*, *2* — $\sim 5 \cdot 10^{-5}$ *M* безводный раствор в CCl_4, *3*— безводная твердая пленка

особенность агрегации бактериохлорофилла *c* по сравнению с другими пигментами хлорофиллового типа, у которых сборка длинноволновых высокоагрегированных форм связана с обязательным участием воды или других комплексообразующих аддендов, включающихся в межмолекулярные связи структуры [9, 12—14].

Агрегация бактериохлорофилла *a* в безводных условиях ограничивается сборкой форм, обладающих небольшим длинноволновым смещением. Это форма с поглощением при 800 *нм* в твердых пленках и при 815 *нм* в CCl_4 и других неполярных растворителях (рис. 5). Заметим, что понижение температуры и увеличение концентрации пигмента не способствуют образованию более длинноволновых форм. Наши результаты согласуются с данными о преимущественном образовании агрегатов низкого порядка в растворах бактериохлорофилла и хлорофилла *a* в CCl_4 вплоть до предельно высокой концентрации пигмента (0,1 *M*) [15—17].

Длинноволновая форма бактериохлорофилла *c* в пленках отличается высокой термостойкостью и выдерживает длительное (несколько часов) нагревание до 100° без нарушения структуры. Длинноволновые формы бактериохлорофилла *a* и хлорофилла *a* в пленках, формирующиеся с включением молекул воды или других аддендов, напротив, термолабильны и разрушаются при температуре выше 50°, переходя в более устойчивые коротковолновые формы. Форма бактериохлорофилла *a* наиболее термолабильна и разрушается в значительной степени уже при 30° [18].

Мы нашли, что длинноволновые формы бактериохлорофиллов *c* и *a* в пленках заметно различаются и по чувствительности к дезагрегирующему действию пиридина. Длинноволновая форма бактериохлорофилла *c* в парах пиридина разрушается в результате дезагрегации при комнатной температуре более чем за 1 *час*, а бактериохлорофилла *a* — всего за несколько минут (рис. 6). При этом следует иметь в виду, что, несмотря на разницу скоростей дезагрегации, механизм процесса в том и другом

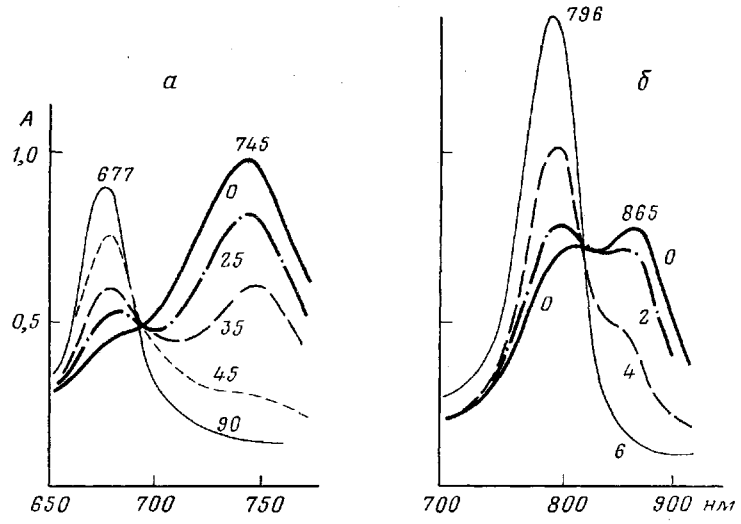


Рис. 6. Действие паров пиридина на твердые пленки бактериохлорофиллов *c* (*а*) и *a* (*б*) при 20° (спектры поглощения). Цифры — время экспозиции, *мин*

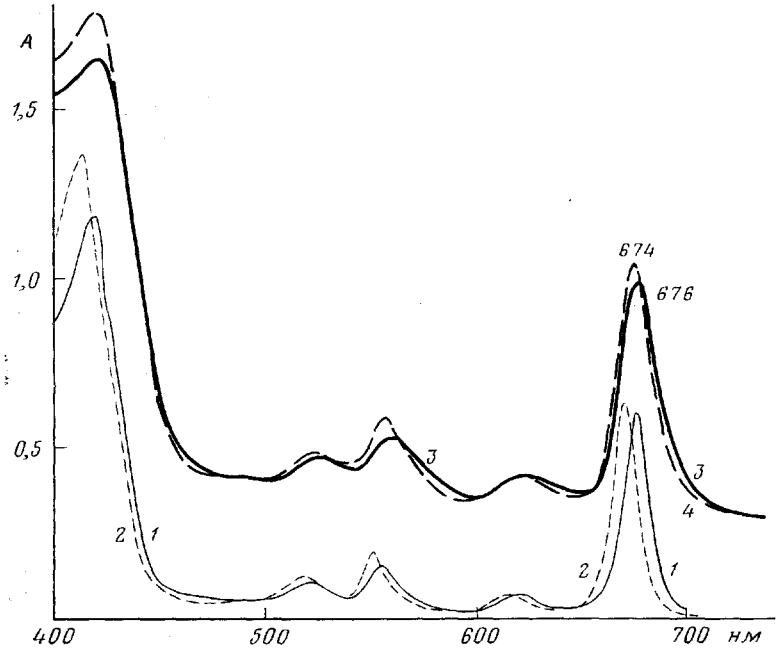


Рис. 7. Спектры поглощения бактериофеофитина *c*. *1* — $\sim 10^{-5}$ *M* раствор в эфире, *2* — в CCl_4, *3* — твердая пленка, *4* — то же после обработки парами пиридина (1 *час*, 20°)

случаях, по-видимому, один и тот же и связан с образованием коротковолновых (но не мономерных!) форм (бактериохлорофилла *c* — с поглощением при 677 *нм* и бактериохлорофилла *a* — при 800 *нм*).

Бактериофеофитин *c* в CCl_4 имеет основной максимум при 676 *нм*, отличаясь от раствора в диэтиловом эфире лишь длинноволновым смещением на 7 *нм* (рис. 7). Увеличение концентрации пигмента, а также добавление углеводородов не сказывается на характере спектров. В присутствии пиридина (до концентрации 10^{-2} *M*) спектры растворов практически не изменяются.

Твердые пленки бактериофеофитина *с*, как и растворы в CCl_4, имеют электронные спектры с основным максимумом при 676 *нм* (рис. 7). Обработка парами пиридина (30—60 *мин* при 20°) практически не вызывает изменений спектра.

Таким образом, безмагниевое производное бактериохлорофилла *с* не обнаруживает способности к образованию длинноволновых агрегированных форм. Этим он отличается от феофитина *а* и бактериофеофитина *а*, которые при агрегации образуют структуры с далеким длинноволновым поглощением [6, 18].

ИК-СПЕКТРЫ В ОБЛАСТИ 1800—1600 $см^{-1}$

Раствор бактериохлорофилла *с* в диэтиловом эфире, содержащий мономерный пигмент, имеет спектр (рис. 8, *а*, *1*), сходный по структуре со спектром хлорофилла *а*. Доминирует интенсивная полоса 1695 $см^{-1}$, проявляющаяся за счет поглощения свободных кетогрупп циклопентаноновых колец [19—21]. Кроме нее обнаруживаются полосы 1740 $см^{-1}$ (карбонилы сложноэфирных групп у С(7)) и 1610 $см^{-1}$ (группы С=С и С=N молекулярного скелета) [19—21].

Бактериохлорофилл *с* в CCl_4 обладает иным спектром, в котором доминирует симметричный интенсивный максимум 1653 $см^{-1}$ при незначительном поглощении свободных кетогрупп (1688—1710 $см^{-1}$). Относительная величина основного максимума заметно возрастает при увеличении концентрации пигмента (рис. 8, *а*, *2*, *3*). Этот максимум отсутствует у феофитина. По аналогии с трактовкой «агрегационного» максимума в ИК-спектре раствора хлорофилла *с* в CCl_4 [12, 20] он может быть приписан образующимся при агрегации пигмента межмолекулярным связям кетогрупп циклопентаноновых колец с центральными атомами магния.

При добавлении к раствору в CCl_4 пиридина (10^{-1} *М*) исчезает поглощение в области 1650 $см^{-1}$, увеличивается интенсивность полосы свободных кетогрупп ($\sim$1690 $см^{-1}$), которая становится доминирующей; спектр приобретает вид, характерный для растворов в полярных растворителях (рис. 8, *а*, *4*).

У растворов бактериохлорофилла *с* в CCl_4 обращает на себя внимание наличие в области поглощения свободных кетогрупп двух компонентов — 1688 и 1705—1710 $см^{-1}$. Аналогичное явление наблюдается и у бактериофеофитина *с* в неполярных средах (см. ниже). Оно может свидетельствовать о структурной «неэквивалентности» кетогрупп циклопентаноновых колец и связано с особенностями химического строения молекул.

С увеличением концентрации бактериохлорофилла *с* в CCl_4 положение и форма агрегационного максимума не изменяются, хотя его относительная интенсивность и возрастает. В присутствии пентана (1 : 9) сохраняется та же структура ИК-спектра (рис. 8, *а*, *5*). Вместе с тем, судя по измерению электронных спектров, и увеличение концентрации пигмента, и добавление пентана повышают относительное содержание формы с длинноволновым поглощением. Таким образом, изменение степени агрегации бактериохлорофилла *с* в растворе не сказывается на положении и форме агрегационного максимума. Отсюда можно полагать, что агрегированные формы разных типов не различаются по характеру межмолекулярных связей с участием кетогрупп.

Твердые пленки бактериохлорофилла *с* с главным максимумом поглощения при 745 *нм*, получаемые при испарении диэтилового эфира, обнаруживают ИК-спектры, сходные по структуре с растворами пигмента в неполярных растворителях. В спектре пленок, как и растворов, проявляются максимумы 1737, 1650 и 1608 $см^{-1}$ при почти полном отсутствии поглощения свободных кетогрупп (рис. 8, *б*, *1*). Доминирует

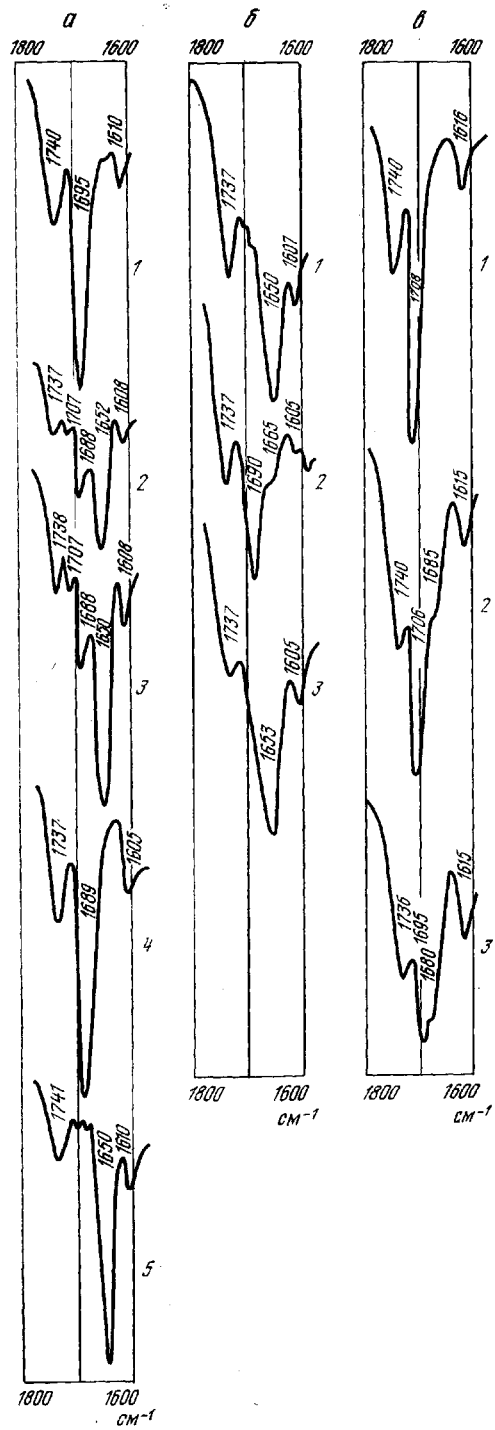


Рис. 8. ИК-спектры поглощения. *а* — растворы бактериохлорофилла *с*: *1* — в диэтиловом эфире, $\sim 2 \cdot 10^{-2}$ *М*, *2* — в CCl_4, $\sim 10^{-3}$ *М*, *3* — в CCl_4, $2 \cdot 10^{-2}$ *М*, *4* — то же в присутствии 4%-ного пиридина, *5* — в смеси CCl_4 — пентан (1 : 9); *б* — твердая пленка бактериохлорофилла *с*: *1* — исходная, *2* — после обработки парами пиридина (1 *час*, 20°), *3* — то же после эвакуации ($\sim 10^{-3}$ *мм* рт. ст., 1 *час*) и последующей обработки парами эфира (30 *мин*, 20°); *в* — бактериофеофитин *с*: *1* — $2 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор в эфире, *2* — 10^{-2} раствор в CCl_4, *3* — твердая пленка

интенсивный максимум 1650 $см^{-1}$, который сходен с агрегационным максимумом в неполярных растворителях и может быть приписан тем же межмолекулярным связям (кето-C=O···Mg).

Существенно, что длительная (12 *час*) обработка пленок бактериохлорофилла *с* в высоком вакууме (10^{-5} *мм* рт. ст.) с нагреванием до 90° не оказывает влияния на ИК-спектры. Электронные спектры при этом также не изменяются.

При такой обработке пленок хлорофилла *а* с поглощением при 745 *нм* в структуре их ИК-спектров наблюдаются характерные изменения, свидетельствующие об изменении межмолекулярных связей [22—24]. Эти изменения коррелируют с потерей длинноволнового и одновременным ростом коротковолнового максимумов в электронных спектрах.

Обработка пленок бактериохлорофилла *с* парами пиридина (1,5 *час* при 20°) вызывает увеличение поглощения свободных кетогрупп ($\sim$1688 $см^{-1}$) и падение интенсивности агрегационного максимума вместе с его смещением в высокочастотную область (до $\sim$1665 $см^{-1}$) (рис. 8, *б*, *2*). В электронных спектрах пленок при действии пиридина отмечаются изменения, свидетельствующие о дезагрегации пигмента (рис. 6, *а*). Удаление пиридина в вакууме с последующей экспозицией в парах эфира восстанавливает исходный вид ИК-спектра (рис. 8, *б*, *3*), что соответствует появлению в электронном спектре длинноволнового максимума ($\sim$720 *нм*).

Действие пиридина на пленки бактериохлорофилла *с*, как и других Mg-комплексов [9], связано с его способностью сольватировать молекулы пигмента за счет присоединения к центральному атому магния [25], что приводит к разрушению межмолекулярных связей и освобождению кетогрупп из сферы координационного взаимодействия с металлом. Следует отметить, что характеристические частоты карбонильных групп пигментов в присутствии пиридина не обнаруживают значительных изменений по сравнению с другими полярными средами. Частично сохраняющиеся в условиях дезагрегации пиридином координационные связи, по-видимому, подвергаются деформации в результате возможного увеличения расстояния между взаимодействующими молекулами, что способствует некоторому смещению остаточного агрегационного максимума в высокочастотную область.

Обработка пленок бактериохлорофилла *с* с формами, поглощающими при 720 или 730 *нм*, парами воды (в течение нескольких суток) не приводит к увеличению агрегации. Пары метанола и других комплексообразующих аддендов, способствующих усилению межмолекулярного взаимодействия в пленках хлорофилла и бактериохлорофилла *а* [26], также не влияют на пленки бактериохлорофилла *с*.

Полученные результаты свидетельствуют о необычности межмолекулярного взаимодействия бактериохлорофилла *с* по сравнению с другими Mg-содержащими пигментами.

Бактериофеофитин *с* в неполярных растворителях и твердых пленках в отличие от Mg-комплекса не имеет агрегационных максимумов в ИК-спектрах (рис. 8, *в*). Его растворы в CCl_4 в широком диапазоне концентраций обнаруживают спектры, которые по общей структуре сходны со спектрами растворов в полярных растворителях. В обоих случаях доминирует поглощение свободных кетогрупп. Вместе с тем полоса свободных кетогрупп ($\sim$1705 $см^{-1}$) в неполярных растворителях смещена на 3—4 $см^{-1}$ в низкочастотную область и обнаруживает заметное «плечо» с коротковолновой стороны ($\sim$1685 $см^{-1}$).

У твердых пленок феофитина поглощение свободных кетогрупп проявляется в виде еще более отчетливо различимых и соизмеримых по величине компонентов — $\sim$1695 и $\sim$1680 $см^{-1}$ (рис. 8, *в*). Возможно, это обусловлено взаимовлиянием кетогрупп соседних молекул, которые могут оказаться сближенными в плоскостной структуре пленки при испа-

рении растворителя, в результате чего их валентные колебания испытывают деформацию. Вместе с тем для части молекул не исключена возможность образования копланарных водородных связей между кетогруппами и гидроксильными группами первых пиррольных колец.

Обработка пленок парами пиридина (60 *мин* при 20°), как и следовало ожидать из измерения электронных спектров, не влияет на структуру ИК-спектров в карбонильной области.

ИК-СПЕКТРЫ В ОБЛАСТИ 3800—3000 $см^{-1}$

Бактериохлорофилл *с* в CCl_4 в области характеристических частот связей ОН-групп обнаруживает полосу 3170 $см^{-1}$, доминирующую в спектре. С увеличением концентрации пигмента ее относительная интенсивность возрастает (рис. 9, *1*, *2*). Агрегация бактериохлорофилла *с*, судя по электронным спектрам, при этом также увеличивается.

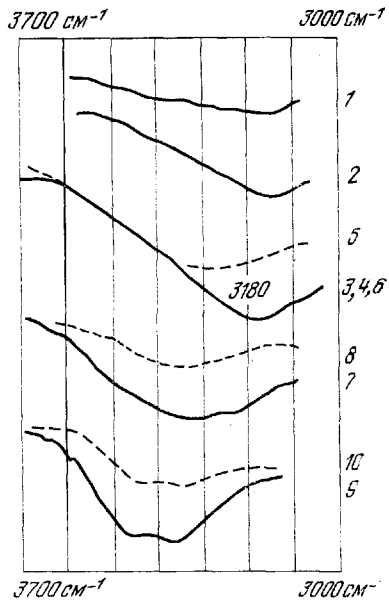


Рис. 9. ИК-спектры поглощения. *1* — $\sim 8 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор бактериохлорофилла *с* в CCl_4, *2* — $2 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор в CCl_4, *3* — исходная твердая пленка бактериохлорофилла *с*, *4* — после эвакуации (10^{-5} *мм* рт. ст., 12 *час*, 90°), *5* — после обработки парами пиридина (1 *час*, 20°), *6* — то же после эвакуации (10^{-3} *мм* рт. ст., 1 *час*, 20°) и последующей обработки парами эфира (30 *мин*, 20°), *7* — исходная твердая пленка бактериохлорофилла *а*, *8* — после эвакуации (10^{-5} *мм* рт. ст., 12 *час*, 90°), *9* — твердая пленка бактериофеофитина *а*, исходная, *10* — после эвакуации (10^{-5} *мм* рт. ст., 12 *час*, 90°)

Твердые пленки бактериохлорофилла *с* обнаруживают близкий (3180 $см^{-1}$), еще более отчетливый максимум (рис. 9, *3*). На его интенсивности практически не сказывается использование для получения пленок растворов, содержащих избыток воды.

Вакуумирование пленок (10^{-5} *мм* рт. ст.) при 100—80° в течение 12 *час* не изменяет интенсивность максимума 3180 $см^{-1}$.

В отличие от бактериохлорофилла *с* твердые пленки бактериохлорофилла *а* после такой обработки обнаруживают заметное уменьшение поглощения в гидроксильной области ИК-спектра (рис. 9, *7*, *8*), что свидетельствует об удалении связанной воды. Таким же свойством обладают твердые пленки хлорофилла *а* [22—24].

При действии паров пиридина на пленки бактериохлорофилла *с* максимум 3180 $см^{-1}$ исчезает вместе с исчезновением агрегационной полосы в карбонильной области ИК-спектра и длинноволнового максимума в спектре поглощения. Удаление пиридина в вакууме частично восстанавливает исходную структуру спектра. Последующая экспозиция в парах диэтилового эфира (30 *мин* при 20°) приводит к полному восстановлению полосы 3180 $см^{-1}$ (рис. 9, *6*), что коррелирует с реконструкцией полосы 1650 $см^{-1}$ в карбонильной области ИК-спектра и длинноволнового максимума в спектре поглощения.

У бактериофеофитина *с* в растворах и твердых пленках полоса 3180—3170 $см^{-1}$ отсутствует.

Пленки бактериофеофитина *с* обладают основными максимумами ~3450 и 3360 $см^{-1}$, которые уменьшаются при длительном вакуумировании (рис. 9, *9*, *10*). Отсюда можно предположить наличие в твердом бактериофеофитине *с* воды, связанной, по-видимому, с NH-группами пиррольных колец, что сближает безмагниевое производное бактериохлорофилла *с* с феофитином *а* [27].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимум 3170—3180 $см^{-1}$, характерный для агрегированных форм бактериохлорофилла *с*, обусловлен межмолекулярным взаимодействием с участием центральных атомов магния молекул. Указанный максимум обнаруживает зависимость от концентрации пигмента и исчезает при дезагрегации пиридином.

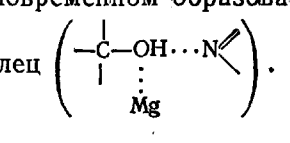
В присутствии воды, как и при ее удалении в высоком вакууме при нагревании, интенсивность полосы 3180 $см^{-1}$ не изменяется. Поэтому можно предположить, что ее происхождение не связано с присоединением к пигменту молекул воды в процессе сборки агрегированных форм и включением в структуру молекулярных соединений. Однако нельзя полностью исключить вероятность участия молекул прочно связанной воды в организации структуры длинноволновых высокоагрегированных форм бактериохлорофилла *с*, что требует дополнительного исследования.

Наши результаты дают достаточно оснований для предположения о том, что появление максимума 3180 $см^{-1}$ у агрегированных форм бактериохлорофилла *с* связано с включением в межмолекулярные связи гидроксильных (оксиэтильных) группировок первых пиррольных колец (см. рис. 1). ОН-группа одной молекулы пигмента, возможно, координационно взаимодействует с центральным атомом магния другой молекулы при одновременном образовании водородной связи с азотом второго (или четвертого) пиррольного кольца, что и проявляется в виде характерной спектральной полосы.

Полученные результаты свидетельствуют о своеобразии сборки агрегированных форм бактериохлорофилла *с* по сравнению с другими Mg-содержащими пигментами.

Так, у бактериохлорофилла *с* все агрегированные формы образуются с участием одних и тех же межмолекулярных связей, что определяет постоянство структуры ИК-спектров при изменении степени межмолекулярного взаимодействия. У других Mg-содержащих пигментов — протохлорофилла, хлорофиллов *а* и *в*, бактериохлорофилла *а* — сборка высокоагрегированных длинноволновых форм происходит при видоизменении межмолекулярных связей за счет включения в них низкомолекулярных аддендов, что обусловливает характерные изменения структуры ИК-спектров с появлением новых агрегационных полос.

Образование агрегированных форм бактериохлорофилла *с* в любом состоянии пигмента (раствор, твердая пленка) не требует включения в структуру экзогенной воды или других комплексообразующих соединений, как у других Mg-содержащих пигментов.

Самосборка агрегированных структур бактериохлорофилла *с* на всех стадиях агрегации осуществляется при возникновении межмолекулярных связей с участием кетогрупп циклопентаноновых колец молекул и гидроксильных (оксиэтильных) групп. Кетогруппы образуют координационные связи с центральными атомами магния (кето-C=O...Mg). Гидроксильные группы взаимодействуют с центральными атомами магния при одновременном образовании водородных связей с азотом пиррольных колец  . Благодаря указанным связям до-

стигается та взаимная ориентация молекул в агрегированных структурах, которая определяет длинноволновый сдвиг поглощения при агрегации.

При агрегации бактериохлорофилла *c* можно представить образование цепочек ступенчато расположенных молекул, из которых каждая последующая молекула связана с кетогруппой, центральным атомом магния, а также с азотом второго (или четвертого) пиррольного кольца предыдущей молекулы соответственно своим атомом магния и кислородом и водородом гидроксильной группировки. Координационное число атомов Mg в такой структуре составляет 6. Таким образом, две соседние молекулы, составляющие структурную единицу, сцеплены друг с другом в трех точках. Одновременно включение в межмолекулярные связи атома О кетогруппы, а также атомов О и Н гидроксильной группы, вероятно, обеспечивает ту надежность работы механизма ориентации молекул, которая обусловливает высокую воспроизводимость процесса формирования длинноволновых форм бактериохлорофилла *c* в разных условиях.

Самосборке высокоагрегированных структур благоприятствует строение молекулы бактериохлорофилла *c* — отсутствие карбометоксильной группы, которая заменена на атом водорода, и фитола, замененного на более короткий и менее разветвленный фарнезол.

Отмеченные особенности строения (сцепление по трем точкам без соединительных молекул комплексообразователей) обусловливает термостойкость длинноволновых агрегированных форм бактериохлорофилла *c* в пленках, которая отличает их от длинноволновых форм других магниевых комплексов, разрушающихся при нагревании.

Безмагниевое производное бактериохлорофилла *c* не обладает способностью к образованию длинноволновых форм в отличие от феофитина и бактериофеофитина *a*, образующих в твердых пленках агрегированные формы с дальним красным поглощением. Это свойство бактериофеофитина *c*, возможно, связано с особенностями строения молекулярного скелета, «геометрия» которого не благоприятствует взаимодействию π-электронных систем, как у других феофитинов [9, 18]. Вместе с тем отсутствие агрегационных максимумов в ИК-спектрах объединяет свойства бактериофеофитина *c* с другими безмагниевыми пигментами.

Агрегированные формы бактериохлорофилла *c* фотосинтетического аппарата бактерий имеют, по-видимому, ту же, что и искусственные агрегированные формы, структуру, которая наилучшим образом приспособлена к выполнению основной функции антенны — передаче энергии электронного возбуждения реакционным центрам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А., Пакшина Е. В. (1959) Докл. АН СССР, **127**, 913—916.
2. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Федорович И. Б. (1960) Докл. АН СССР, **134**, 1232—1235.
3. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Хун Юй-цюнь (1962) Докл. АН СССР, **143**, 456—459.
4. Красновский А. А., Ерохин Ю. Е., Гуляев Б. А. (1963) Докл. АН СССР, **152**, 1231—1234.
5. Красновский А. А., Быстрова М. И., Пакшина Е. В. (1966) Докл. АН СССР, **167**, 691—694.
6. Быстрова М. И., Красновский А. А. (1967) Мол. биол., **1**, 362—373.
7. Быстрова М. И., Красновский А. А. (1968) Мол. биол., **2**, 847—858.
8. Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н. (1969) Докл. АН СССР, **189**, 885—888.
9. Быстрова М. И., Мальгошева И. Н., Красновский А. А. (1976) Мол. биол., **10**, 193—205.
10. Holt A. S., Purdie J. W., Wasley J. W. F. (1966) Canad. J. Chem., **44**, 88—93.
11. Holt A. S. (1966) in: The Chlorophylls (Vernon L. P., Seely G. R., eds), p. 112—116, Acad. Press, New York — London
12. Ballschmiter K., Katz J. J. (1969) J. Amer. Chem. Soc., **91**, 2661—2677.

13. Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н. (1972) Докл. АН СССР, **204**, 1473—1476.
14. Ballschmiter K., Katz J. J. (1972) Biochim. Biophys. Acta, **256**, 307—327.
15. Sauer K., Smith J. R. L., Schultz A. J. (1966) J. Amer. Chem. Soc., **88**, 2681—2688.
16. Ballschmiter K., Truesdell K., Katz J. J. (1969) Biochim. Biophys. Acta, **184**, 604—613.
17. Cotton T. M., Trifunac A. D., Ballschmiter K., Katz J. J. (1974) Biochim. Biophys. Acta, **368**, 181—198.
18. Красновский А. А., Быстрова М. И., Умрихина А. В. (1977) Докл. АН СССР, **235**, 232—235.
19. Holt A. S., Jacobs E. E. (1955) Plant Physiol., **30**, 553—559.
20. Katz J. J., Closs G. L., Pennington F. C., Thomas M. R., Strain H. H. (1963) J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3801—3809.
21. Anderson A. F. H., Calvin M. (1964) Arch. Biochem. Biophys., **107**, 251—259.
22. Карякин А. В., Кутюрин В. М., Чибисов А. К. (1961) Докл. АН СССР, **140**, 1321—1323.
23. Карякин А. В., Чибисов А. К. (1961) Биофизика, **7**, 561—567.
24. Холмогоров В. Е., Сидоров А. Н., Теренин А. Н. (1962) Докл. АН СССР, **147**, 954—957.
25. Сидоров А. Н., Теренин А. Н. (1960) Оптика и спектроскопия, **8**, 482—491.
26. Красновский А. А., Быстрова М. И. (1967) Докл. АН СССР, **174**, 480—483.
27. Карякин А. В., Чибисов А. К. (1963) Биофизика, **8**, 441—445.

Поступила в редакцию
4.VII.1978

THE STUDY OF MOLECULAR MECHANISM OF SELF-ASSEMBLAGE OF AGGREGATED BACTERIOCHLOROPHYLL *c*

M. I. BYSTROVA, I. N. MALGOSHEVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The intermolecular interaction of bacteriochlorophyll *c* and its pheophytin was studied in nonpolar solvents and solid films with the aid of absorption and infra-red (in the region of 1800—1600 and 3800—3000 cm^{-1}) spectra. The influence of water removing and its addition on these spectra has been investigated. Besides the effects of pyridine treatment and pigment concentration were examined. The self-assemblage of all types of bacteriochlorophyll *c* aggregated forms absorbing in the range 680—745 *nm* is due to the formation of intermolecular bonds in which keto groups of cyclopentanone rings and perhaps hydroxyl (hydroxyethyl) groups of the first pyrrol rings take part. Keto groups form coordinate bonds with the central magnesium atom (keto-C=O...Mg). Hydroxyl groups interact coordinately with magnesium and simultaneously form hydrogen bonds with pyrrol nitrogen. In contrast to chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a*, water molecules in the case of bacteriochlorophyll *c* do not participate in the intermolecular bond formation in the course of long-wave aggregated forms production. The thermostability of bacteriochlorophyll *c* aggregates and their rather high stability to desaggregating agents is related to the mentioned peculiarities of their structure. Bacteriopheophytin *c* in any state (solution or solid film) is not capable to form intermolecular bonds by its carbonyl groups and long-wave aggregates. The specific features of the assemblage of bacteriochlorophyll *c* aggregates modelling antenna of the green photosynthetic bacteria are discussed.

БИОХИМИЯ
Т. 44, вып. 5 1979

УДК 547.979

ДЕЙСТВИЕ ПАРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВЫЙ КОМПЛЕКС ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ. УСЛОВИЯ ОБРАТИМОГО И НЕОБРАТИМОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, И. Ю. ЩЕРБАКОВА и А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Измеряя низкотемпературные спектры флуоресценции (—196°), исследовали спектральные свойства и способность к фотопревращению пигментов в этиолированных листьях, обработанных парами органических растворителей (ОР). Под влиянием ОР происходило постепенное понижение флуоресценции при 655 нм и возрастание в области 630—640 нм. Действие ОР зависело от упругости пара. Способность к фотопревращению пигментов понижалась в соответствии с возрастанием флуоресценции при 630 нм. Максимум флуоресценции образованного на свету пигмента сдвигался в коротковолновую сторону на 10—18 нм. Обнаружена частичная обратимость нарушающего действия диэтилового эфира. Удаление паров эфира приводило к относительному возрастанию флуоресценции при 640—645 нм в этиолированных листьях и уменьшению доли «неактивного» на свету пигмента; максимум флуоресценции пигмента, образованного на свету, смещался в длинноволновую сторону (~5 нм) по сравнению с листом, освещенным без удаления эфира. Частичная функциональная реконструкция указывает на то, что по крайней мере часть пигментных молекул способна образовывать с белком протохлорофиллид (протохлорофилл)-белковый комплекс, сходный с нативным.

Введение органических растворителей в гомогенаты этиолированных листьев вызывает постепенную дезагрегацию пигмент-белкового комплекса с конечным отрывом пигмента от белка и подавление способности превращения протохлорофиллида в хлорофиллид [1, 2]. В связи с этим следовало выяснить зависимость превращения протохлорофилловых пигментов от степени нарушения состояния пигмент-белкового комплекса этиолированных листьев и возможность обратного возвращения функции после удаления растворителя. Обратимость нарушений функций хлоропластов, вызываемых органическими растворителями, была обнаружена ранее в нашей лаборатории [3]. В данной работе мы исследовали воздействие на этиолированные листья паров органических растворителей с их последующим удалением в вакууме.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этиолированную фасоль сорта Сакса растили в темноте на растворе Кнопа. Опыты проводили с 8—12-дневными растениями. Все операции с этиолированными листьями осуществляли в темноте. Перед опытом листья прикрепляли к стеклянной палочке, которую помещали в вакуумную трубку. Лист находился на высоте 2—3 см от слоя растворителя, налитого на дно вакуумной трубки. Было изучено действие паров диэтилового эфира, метанола, гексана и пиридина. После воздействия паров растворителя лист вынимали и измеряли низкотемпературные спектры флуоресценции (—196°) этиолированных листьев или после их освещения на воздухе при температуре, при которой действовали парами растворителя. Темновые превращения пигментов после действия паров растворителей или после освещения тормозили немедленной фиксацией листьев жидким азотом.

Этиолированные листья освещали 15 с — 3 мин светом лампы накаливания ($3 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$). При изучении обратимости воздействия растворителей лист после обработки помещали в вакуумную трубку и откачивали пары растворителей в течение 3—5 мин. Удлинение времени откачки до 25—40 мин не приводило к увеличению эффекта.

Мерой нарушающего действия растворителей были положение и относительная величина максимумов флуоресценции пигментов в этиолированных листьях после обработки и способность к образованию хлорофиллида (хлорофилла). Контролем служили листья, выдержанные над парами воды при той же процедуре эксперимента. Далее мы обозначаем сумму протохлорофиллида и протохлорофилла у этиолированных листьев, как «протохлорофилл», а сумму хлорофиллида и хлорофилла после действия света, как «хлорофилл».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие растворителей на этиолированные листья приводит к постепенному понижению флуоресценции при 655 нм и возрастанию в области 630—640 нм (рис. 1 и 2). Скорость этого процесса и положение коротковолнового максимума флуоресценции зависят от природы растворителя. Величина нарушающего действия соответствует убывающему ряду: пиридин — диоксан — диэтиловый эфир — гексан.

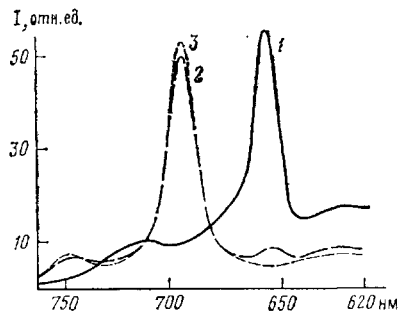


Рис. 1

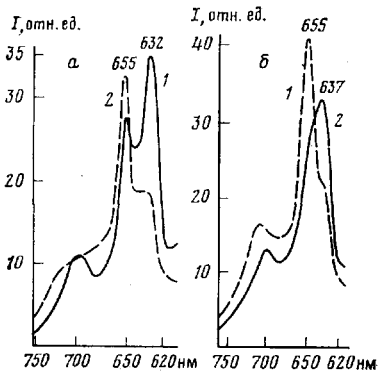


Рис. 2

Рис. 1. Низкотемпературные спектры флуоресценции (—196°) этиолированного листа фасоли (*1*) и после его освещения при 20° в течение 15 с (*2*) и 3 мин (*3*)

Рис. 2. Влияние паров органических растворителей на спектры флуоресценции (—196°) этиолированных листьев

а: *1* — 1 мин, эфир, 24°; *2* — 2 мин. эфир, 18°; *б*: *1* — 20 мин. гексан; *2* — 1,5 ч, гексан, 20°

Повышение температуры, ведущее к увеличению упругости пара растворителя, способствовало увеличению скорости спектральных изменений. Так, при 18° 2-минутное воздействие эфира приводило к образованию «плеча» 630—635 нм, тогда как после 1-минутного действия эфира при 24° в спектре флуоресценции обнаруживался один максимум, расположенный при 630—632 нм, и более длительное действие эфира (до 60 мин) уже не изменяло вида спектра.

Освещение этиолированных листьев после воздействия растворителей. В контрольных листьях (над водой) после 3 мин освещения происходило полное превращение протохлорофилла 655 нм (рис. 1). По мере увеличения времени действия паров растворителей способность к световому превращению постепенно понижалась в соответствии с возрастанием максимума флуоресценции «неактивного» протохлорофилла при 630—635 нм (рис. 3). Флуоресценция образованного хлорофилла также сдвигалась от 695—698 нм (контрольные листья) в коротковолновую сторону на 10—18 нм.

На ранних стадиях действия паров эфира, соответствующих преобладанию в этиолированном листе формы протохлорофилла 637—645 нм,

максимум хлорофилла после освещения располагался при 685 нм, при более продолжительном действии эфира, ведущем к дальнейшему коротковолновому сдвигу максимума флуоресценции протохлорофилла, флуоресценция хлорофилла проявлялась уже при 677—680 нм (рис. 3).

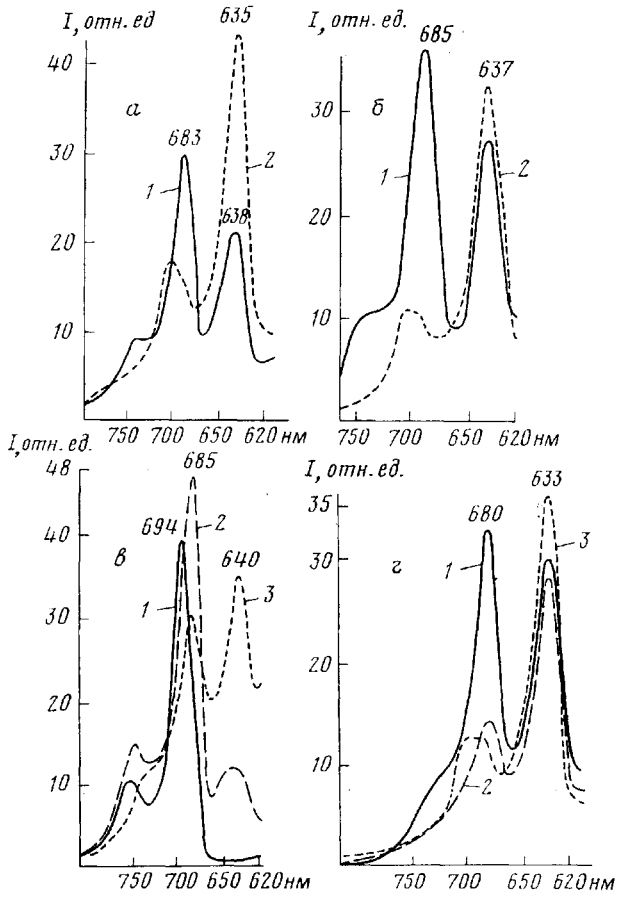


Рис. 3. Действие паров органических растворителей на фотопревращение пигментов в этиолированных листьях фасоли, освещенных 3 мин. Спектры флуоресценции (—196°)

а: *1* — 10 мин, метанол, *2* — 30 мин, метанол, 20°; *б*: *1* — 5 мин, этанол; *2* — 10 мин, этанол (20°); *в*: *1* — 10 мин, гексан; *2* — 30 мин, гексан; *3* — 1,5 ч, гексан (20°); *г*: *1* — 5 мин, эфир; *2* — 10 мин, эфир; *3* — 20 мин, эфир (18°)

Органические растворители по силе воздействия на образование хлорофилла при освещении обработанных ими листьев соответствовали убывающему ряду, указанному выше для нарушения состояния протохлорофилла в этиолированных листьях.

Обратимость действия паров органических растворителей. Наибольший эффект обратимости действия был получен в опытах с эфиром. На рис. 4 изображены результаты опыта с откачиванием паров эфира. После 5 мин действия эфира при 20° обнаруживались максимумы протохлорофилла около 630—632 и 640—645 нм (кривая *1*). В большинстве опытов интенсивность флуоресценции в максимуме 630 нм была выше, чем при 645 нм.

После 15 с освещения этиолированного листа, обработанного 5 мин парами эфира (рис. 4, кривая *3*), происходило частичное превращение пигментов, ведущее к появлению флуоресценции хлорофилла при 678—680 нм. Доля неактивного протохлорофилла была высокой, о чем сви-

детельствует соотношение максимумов флуоресценции 630 и 680 нм. За это же время освещения в контрольном этиолированном листе максимум флуоресценции 655 нм понижался почти полностью (рис. 1).

После 5 мин откачки паров растворителя (рис. 4, кривая *2*) происходило перераспределение высоты максимумов флуоресценции протохлорофилла в этиолированном листе, обработанном эфиром, сопровождающееся относительным возрастанием флуоресценции в максимуме 640—645 нм.

Освещение этиолированных листьев после откачки паров эфира (рис. 4, кривая *4*) вызывало значительное снижение максимума 640—645 нм и образование максимума флуоресценции хлорофилла в более длинноволновой области (683—685 нм), чем до удаления эфира. Доля неактивного протохлорофилла в освещенном после удаления эфира листе в большинстве опытов заметно уменьшалась. Отклонения от описанной картины, наблюдающиеся в ряде опытов, могут быть следствием разнородности листьев.

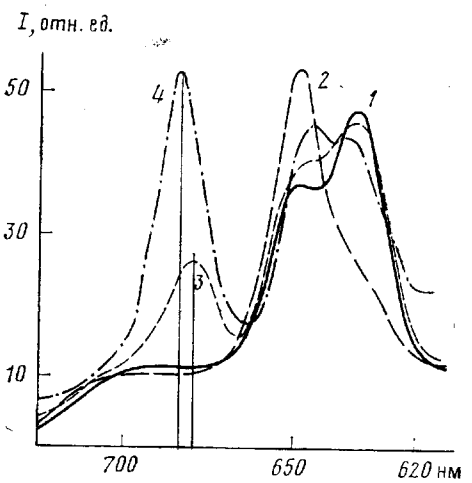


Рис. 4. Обратимость действия паров серного эфира на спектральные свойства и способность к фототрансформации пигментов в этиолированных листьях (ЭЛ) фасоли. Спектры флуоресценции (—196°)

1 — ЭЛ, 5 мин, эфир (20°); *2* — то же после 5-мин откачки паров растворителя; *3* — ЭЛ, 5 мин, эфир (20°), освещение 15 с; *4* — ЭЛ, 5 мин, эфир (20°), 5 мин откачка паров растворителя, освещение 15 с

Особенно отчетливо эффект удаления серного эфира проявлялся после непродолжительного воздействия. Однако в ряде опытов даже после 20 мин воздействия эфира при 18°, когда наблюдалась почти полная инактивация протохлорофиллового комплекса, после откачки паров эфира и последующего освещения в области 680—685 нм проявлялся небольшой, но отчетливый максимум, принадлежащий хлорофиллу.

Небольшой эффект обратимости действия растворителей на способность протохлорофилл-белкового комплекса к фототрансформации был обнаружен также после удаления паров гексана и метанола. Действие пиридина и диоксана было необратимым.

Проведенные опыты показали, что пары органических растворителей вызывают падение флуоресценции «активного» протохлорофилла 655 нм и возрастание коротковолнового максимума флуоресценции 630—640 нм. Подобная дезагрегация протохлорофиллового комплекса наблюдалась ранее при нарушении структуры [4] и замораживании-оттаивании этиолированных листьев [5].

Дезагрегация пигментов в этиолированных листьях под влиянием паров органических растворителей и в предельном случае, по-видимому, отрыв от белка сопровождаются функциональными нарушениями: уменьшением или полной потерей способности протохлорофиллового комплекса к превращению в хлорофилл. Степень нарушения состояния пигментного комплекса и связанной с ним способности к превращению под действием света зависели от природы, продолжительности действия и упругости паров растворителей.

Соответственно измененному (дезагрегированному) состоянию протохлорофиллового комплекса, хлорофилл, образованный после освещения листьев, обработанных парами растворителей, обладал флуоресцен-

цией, сдвинутой в коротковолновую область до 685—680 нм, что наблюдалось ранее при дезагрегации протохлорофилл-белкового комплекса в результате нарушения структуры [4] или замораживания-оттаивания [5] этиолированных листьев перед освещением.

Нам удалось наблюдать частичную обратимость спектральных нарушений, вызванных диэтиловым эфиром, после удаления его паров, характеризующуюся вторичным образованием длинноволновых форм пигментов, как до, так и после освещения этиолированных листьев. Спектральная тождественность пигмент-белкового комплекса исходному после удаления паров эфира не наблюдалась, так как после откачивания главный максимум флуоресценции протохлорофилла располагался не при 655, но около 645 нм, а флуоресценция образованного на свету пигмента обнаруживалась при 685 нм вместо 695—698 нм, как было в контрольных освещенных листьях.

Частичная функциональная реконструкция указывает на то, что по крайней мере часть пигментных молекул способна снова образовать с белком протохлорофилл (протохлорофиллид)-белковый комплекс, сходный с нативным. В соответствии с данными нашей лаборатории по реконструированию реакции Хилла у хлоропластов, ингибированных диэтиловым эфиром [3], пигментно-белковые структуры, образующиеся в этиолированных листьях после удаления или уменьшения концентрации растворителя, оказались способными осуществлять «привычные» для данной системы реакции. В образующемся комплексе происходит фотовосстановление протохлорофилла (протохлорофиллида), несмотря на спектральные отличия фотоактивной формы протохлорофилла (протохлорофиллида) в реконструированной системе после удаления серного эфира (максимум флуоресценции 640—645 нм). На соотношение максимумов в спектре флуоресценции этиолированных и зеленеющих листьев может оказывать влияние квантовый выход флуоресценции отдельных форм пигмента и перенос энергии между формами, но это требует дополнительного исследования [6].

Итак, пары органических растворителей обусловливают дезагрегацию пигментного комплекса этиолированных листьев, что сопровождается уменьшением количеств пигмента, способного к фототрансформации. Удалось наблюдать частичную обратимость повреждающего действия после удаления растворителя, наиболее отчетливую в опытах с серным эфиром.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кособуцкая Л. М., Красновский А. А. (1954) Биохимия 19, 37—44.
2. Красновский А. А., Быстрова М. И. (1960) Биохимия 25, 168—179.
3. Красновский А. А., Брин Г. П. (1968) Докл. АН СССР 179, 726—729.
4. Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А. (1963) Биохимия 28, 524—534.
5. Butler W. L., Briggs W. R. (1966) Biochim. et biophys. acta 112, 45—53.
6. Литвин Ф. Ф., Ефимцев Е. И., Игнатов Н. В. (1976) Физиол. растений 23, 653—659.

Поступила в редакцию
25.VIII.1978

THE EFFECTS OF ORGANIC SOLVENT VAPOURS ON THE PROTOCHLOROPHYLLIC COMPLEX FROM ETYOLATED LEAVES. CONDITIONS FOR REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE DESTRUCTION

L. M. VOROB'EVA, L. Yu. SHCHERBAKOVA and A. A. KRASNOVSKIJ

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The spectral properties and the ability of etyolated leaves pigments treated with organic solvent vapours (OS) for phototransformations were studied by measuring low temperature fluorescence spectra (-196° C). Under

the effects of OS the fluorescence at 655 nm was gradually decreased and that at 630—640 nm was increased. The effects of OS depended on the partial pressure of OS. The ability of the pigments for phototransformations was decreased with an increase in fluorescence at 630 nm. The emission maximum of fluorescence of the pigment formed in the light was shifted by 10—18 nm towards the shortwave region. Partial reversibility of the destroying effects of diethyl ester was found. A removal of the ester vapours resulted in a relative increase of fluorescence in the etyolated leaves at 640—645 nm and a decrease of the amount of «photo-inactive» pigment. The maximum of fluorescence of the pigment formed in the light was shifted towards the long-wave region (~5 nm) as compared to the leaves irradiated in the presence of the ester. Partial functional reconstitution indicates that at least part of the pigment molecules are able to form a protochlorophyllide (protochlorophyll) — protein complex, similar to the native one.

Dokl. AN SSSR, vol. 249, No 2, 1979

БИОЛ. 22
Х 22
485-488
УДК 577.3 № 2610 Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 2 БИОФИЗИКА

В.В. КЛИМОВ, С.И. АЛЛАХВЕРДИЕВ, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

СИГНАЛ Э.П.Р. ПРИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ ФЕОФИТИНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2 ХЛОРОПЛАСТОВ

В ряде работ ([1-5]) была показана возможность участия феофитина (Фф) в первичных процессах фотосинтеза в качестве акцептора электрона, функционирующего между $П_{680}$, первичным донором электрона фотосистемы 2 и Q, первичным акцептором электрона этой фотосистемы. В условиях, когда Q в хлоропластах ([4,5]) или выделенных из них препаратов фотосистемы 2 ([1-3]) предварительно восстановлен в темноте, наблюдается обратимое фотовосстановление Фф, регистрируемое по характерным изменениям поглощения в видимой области спектра. Предполагается, что при этом в реакционных центрах (р.ц.) фотосистемы 2 происходит фотонакопление долгоживущего состояния $[П^{+}_{680} \cdot Фф^{-}]$. Эта фотореакция подавляется при инактивации фотосистемы 2 и значительно активируется при добавлении Mn^{2+} ([4,5]), что подчеркивает ее связь с функционированием реакционных центров фотосистемы 2. Исследование кинетики затухания и температурной зависимости люминесценции, сопровождающей рекомбинацию зарядов в паре $[П^{+}_{680} \cdot Фф^{-}]$ показало, что для возбуждения $П_{680}$ электрону, покидающему $Фф^{-}$, необходимо преодолеть барьер, равный ~0,08 эВ, и что время жизни состояния $[П^{+}_{680} \cdot Фф^{-}]$ составляет 2-4 нс ([1]).

Сопоставление спектра фотоиндуцированных изменений поглощения при фотовосстановлении Фф в фотосистеме 2 ([1–5]) с дифференциальным спектром восстановления Фф в растворе ([6], [7]) показывает, что Фф в фотосистеме 2 восстанавливается до анион-радикала. Целью настоящей работы был поиск сигнала э.п.р, соответствующего фотовосстановлению Фф в р.ц. фотосистемы 2.

Работу проводили на "тяжелых" частицах фотосистемы 2 (ДТ-20), высокоочищенных от примеси фотосистемы 1, выделяемых после обработки хлоропластов 1%-ным дигитонином и 0,05%-ным тритоном X-100 ([8]). Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции ($\Delta\Phi$) хлорофилла с $\lambda > 660$ нм и изменения поглощения (ΔA) измеряли с помощью фосфороскопической установки, как описано ранее ([1]). Спектры э.п.р. регистрировали на спектрометрах РЭ 1306 и РЭ 1302 в 0,1-миллиметровой кювете при 20 °С и в 3-миллиметровом капилляре при –80 °С. Опыты проводили в среде, содержащей 50 м*M* трис-HCl, pH 8; 35 м*M* NaCl и 2м*M* $MgCl_2$.

При освещении фрагментов ДТ-20 действующим светом насыщающей интенсивности при окислительно-восстановительном потенциале (E_h) среды ≈ + 400мВ выход флуоресценции хлорофилла возрастает более, чем в 2 раза (рис. 1), что связано с фотовосстановлением Q ([9]). Такого же уровня флуоресценция достигает в темноте при E_h ниже –400 мВ (рис. 1), что свидетельствует о темновом восстановлении Q. При освещении такого образца действующим светом наблюдаются ΔA (рис. 1 и 2*а*), связанные с фотовосстановлением Фф в р.ц. фотосистемы 2([1–5]), что сопровождается уменьшением выхода флуоресценции хлорофилла. Эти спектральные изменения быстро (за несколько секунд) релаксируют после выключения действующего света при E_h в области от –100 до –200 мВ ([1–5]). При E_h ниже –400 мВ состояние р.ц. фотосистемы 2 с восстановленным Фф может жить при 20 °С более 30 мин, что позволяет искать соответствующий сигнал э.п.р. при различных температурах.

На рис 2*б* представлены спектры э.п.р. фрагментов ДТ-20 при E_h ниже –400 мВ, измеренные при –80 °С. У образца, не подвергавшегося освещению, наблюдается слабый сигнал с *g*-фактором 2,0043 ± 0,0002 и шириной линии ~ 9 Э, природу которого мы подробно не изучали. После освещения образца действующим светом в течение 30 с при 20 °С, приводящего к практически необратимому фотовосстановлению Фф в р.ц. фотосистемы 2 (что регистрировалось по фотоиндуцированному уменьшению выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2), и замораживания при –80 °С обнаруживается интенсивный сигнал э.п.р., который характеризуется (по сравнению с темновым сигналом) более широкой линией и меньшим *g*-фактором. Вычитание темнового спектра из светового (рис. 2*б*) показывает, что на свету появляется сигнал с *g*-фактором 2,0035 ± 0,0004 и шириной линии 12,5 ± 0,5 Э. Этот сигнал уменьшался более чем в 20 раз, если образец перед освещением подвергался 10-минутной инкубации при 60 °С, вызывающей ингибирование фотосистемы 2 (что проявлялось в полном подавлении положительных фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ при $E_h \simeq +400$ мВ). Ширина линии и *g*-фактор фотоиндуцированного сигнала э.п.р. мало зависели от температуры в области –80 до –160 °С. Он насыщался при довольно низкой мощности с.в.ч. поля: при –80 °С 50%-ное уменьшение этого сигнала (как и сигнала э.п.р. $П_{700}$ в субхлоропластных частицах фотосистемы 1) достигалось при падающей на резонатор мощности ~ 5 мВт.

При 20 °С кинетика фотоиндуцированного сигнала э.п.р. соответствует кинетике фотовосстановления Фф в р.ц. фотосистемы 2, регистрируемого по фотоиндуцированным $\Delta\Phi$ и ΔA при 685 нм и 676 нм (рис. 1) и в других характерных точках дифференциального спектра поглощения (рис. 2*а*), При этом не наблюдалось каких-либо дополнительных ΔA, которые можно было бы приписать фотопревращению других, отличных от Фф пигментов, например, хлорофилла. Спектр сигнала э.п.р., соответствующего по кинетике фотовосстановлению Фф при 20 °С, сходен с таковым, измеренным при –80 °С (рис. 2*б* и *в*). Все эти данные позволяют сделать

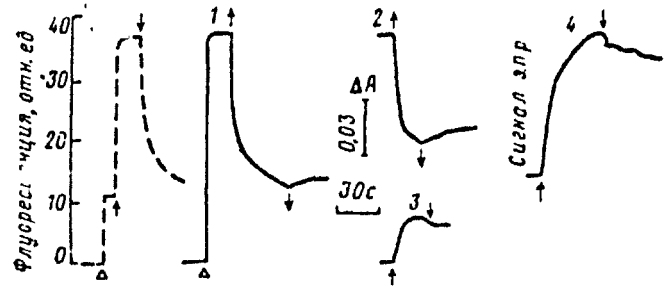


Рис. 1. Кинетика фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ (*1*), изменений поглощения при 685 нм (*2*) и 676 нм (*3*) и сигнала э.п.р. (*4*) (в точке *А* спектра, показанного на рис. 2, *б*) фрагментов ДТ-20 при E_h ниже –400 мВ, 20 °С. Пунктиром показано кинетика $\Delta\Phi$ при E_h = + 400 мВ Треугольник – включение измерительного света (480 нм; 50 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$), возбуждающего флуоресценцию; стрелки вверх и вниз – включение и выключение действующего света ($\lambda > 600$ нм; $1{,}5 \cdot 10^3$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$). Измерение в кювете 0,1 × 10 × 30 мм. Содержание хлорофилла 6 мг/мл. Мощность с.в.ч. поля 0,5 мВт; глубина модуляции магнитного поля 2 Э

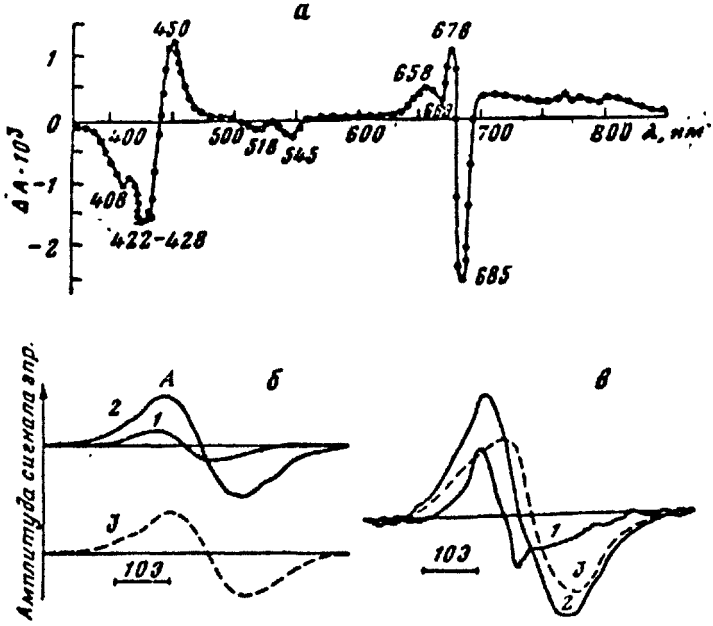


Рис. 2. Дифференциальный спектр поглощения "свет минус темнота" при 20 °С (в 10-миллиметровой кювете) – *а* и спектры э.п.р. при – 80 °С (в 3-миллиметровом капилляре) – *б* и при 20 °С (в 0,1-миллиметрочой кювете) – *в* фрагментов ДТ-20 при E_h ниже –400 мВ: *1* – до освещения и *2* – после освещения образца действующим светом (как показано на рис. 1), *3* – разницы спектров *2* и *1*. Содержание хлорофилла: *а* – 15 мкг/мл; *б* – 6 мг/мл; *в* – 0,5 мг/мл Мощность с.в.ч. поля: *б* – 0,5 мВт и *в* – 4 мВт: глубина модуляции магнитного поля: *б* – 4 Э и *в* – 2 Э

вывод, что появляющийся при освещении парамагнитный центр связан именно с фотовосстановлением Фф в р.ц. фотосистемы 2.

По своим характеристикам (*g*-фактор, ширина линии, зависимость от мощности с.в.ч. поля и от температуры) обнаруженный здесь сигнал э.п.р подобен спектру э.п.р. анион-радикала Фф, измеренному в растворах ([8], [10]), а также, так называемому, узкому сигналу э.п.р. анион-радикала бактериофеофитина в р.ц. пурпурных

бактерий ([11], [12]). Это дает основание предположить, что в р.ц. фотосистемы 2 функционирует мономерная форма Фф (подобно бактериофеофитину в р.ц. бактерии ([13–15])), который в результате первичной световой реакции фотосистемы 2 восстанавливается до анион-радикала. Величина окислительно-восстановительного потенциала пары Фф/Фф$^-$ в р.ц. фотосистемы 2 (–610 ± 30 мВ по отношению к водородному электроду ([4])) также соответствует мономерному Фф (от –610 до –640 мВ ([6], [14])).

Заключение о функционировании мономерной формы Фф в р.ц. фотосистемы 2 позволяет внести уточнения в интерпретацию дифференциального спектра поглощения, связанного с фотовосстановлением Фф (рис. 2*а*). С одной стороны, выцветание всех полос (при 685, 545, 518, 422 и 408 нм) можно приписать фотовосстановлению Фф, а появление полос при 450 и 658 нм – образованию анион-радикала Фф$^-$. Тогда узкий положительный максимум при 676 нм можно интерпретировать как результат сдвига полосы поглощения какого-то пигмента. С другой стороны, полоса при 685 нм, вероятно, не может принадлежать восстанавливающемуся мономерному Фф, поскольку она сдвинута на 18 нм по сравнению с аналогичной полосой поглощения Фф в растворе (667 нм). По аналогии с интерпретацией дифференциального спектра поглощения при фотовосстановлении бактериофеофитина в р.ц. пурпурных бактерий ([11-12]) можно предположить, что выцветание полосы поглощения при 685 нм и появление поглощения при 676 нм – результат коротковолнового сдвига полосы поглощения хлорофилла, имеющего максимум при ~680 нм, под действием поля восстановленного Фф. При этом восстановление самого Фф сопровождается выцветанием его полосы поглощения при 669–670 нм. В результате наложения изменений поглощения противоположного знака наблюдается лишь небольшое увеличение поглощения в области 670–680 нм, (которое гораздо меньше по величине, чем отрицательная полоса при 685 нм), а выцветание полосы поглощения Фф проявляется лишь в виде глубокого минимума при 669 нм на фоне увеличения поглощения в области 620 – 680 нм (рис. 2*а*).

Таким образом, обнаруженный у фотосистемы 2 фотоиндуцированный сигнал э.п.р. при E_h ниже –400 мВ показывает, что в р.ц. фотосистемы 2, вероятно, функционирует мономерная форма Фф (подобно бактериофеофитину в р.ц. пурпурных бактерий) и подтверждает предположение о фотовосстановлении этого пигмента до анион-радикала в результате первичной световой реакции фотосистемы 2.

В заключение мы хотели бы поблагодарить И.И. Проскурякова за помощь в измерении э.п.р., а также В.А. Шувалова и А.В. Клеваника за обсуждение работы.

Институт фотосинтеза Академии наук СССР,
Пущино Московской обл.

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

Поступило
20 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

[1] *V.V. Klimov, A.V. Klevanik et al.*, FEBS Letters, v. 82 183 (1977). [2] *А.В. Клеваник, В.В. Климов и др.* ДАН, 236, 241, (1977). [3] *В.В. Климов, С.И. Аллахвердиев, В.З. Пашенко,* ДАН, 242, 1204, (1978). [4] *В.В. Климов, С.И. Аллахвердиев и др.*, Физиол. раст. т. 26, 1115, (1979). [5] *J. Fujita, M.S. Davis, J. Fajer,* J. Am. Chem. Soc., v. 100, 6280 (1978). [6] *Е.В. Пакшина, А.А. Красновский,* Биофизика, т. 19, 238, (1974). [7] *И.И. Шутилова, В.В. Климов и др.*, Биофизика, т. 20, 844, (1975). [8] *L.N.M. Duysens, K.E. Sweers,* In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo, 1963, p. 353. [9] *А.А. Красновский, А.В. Умрихина, И.В. Бубличенко.* В сб. Спектроскопия фотопревращений в молекулах, Л., "Наука", (1977), стр. 106. [10] *V.A. Shuvalov, V.V. Klimov,* Biochim. et biophys. acta, v. 440, 587 (1976) [11] *D.M. Tiede, R.C. Prince, P.L. Dutton,* Biochim. et biophys. acta, v. 449, 447 (1976). [12] *R.K. Clayton, T. Yamamoto,* Photochem. Photobiol., v. 24, 67 (1976). [13] *Б.Н. Киселев, Ю.Н. Козлов, В.Б. Евстигнеев,* ДАН, т. 226, 67, (1976).

Академик
А. А. КРАСНОВСКИЙ

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

Жизнь на Земле основана на фотосинтезе растений, который обеспечивает организмы пищей и кислородом. Кислородная атмосфера Земли образовалась в результате фотосинтетической деятельности растений.

В настоящее время энергетические потребности человечества на 95% удовлетворяются сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза (угля, нефти, газа) и лишь около 5% — атомными и гидроэлектростанциями. По некоторым прогнозам, и в 2000 г. до 80% потребности человечества в энергии будут по-прежнему удовлетворяться за счет сжигания продуктов фотосинтеза [1]. К этому надо добавить, что значительная часть промышленного сырья и строительных материалов также имеет фотосинтетическое происхождение.

В настоящее время трудно прогнозировать сроки технического овладения термоядерной энергией, которая, как надеются, обеспечит грядущие энергетические потребности человеческого общества. Поэтому наша зависимость от преобразования солнечной энергии растениями сохранится надолго.

Энергетика фотосинтеза

В основе использования солнечной энергии растениями лежит реакция образования кислорода и углеводов из воды и углекислоты:

$$H_2O + CO_2 = O_2 + {}^1/_6C_6H_{12}O_6.$$

Увеличение свободной энергии ($+\Delta F$) при этой реакции составляет 120 *ккал*, и реакцию можно осуществить, лишь подводя энергию извне. Поэтому кислород и углеводы из воды и углекислоты, в принципе, нельзя получить путем каталитических реакций, тогда как обратный, термодина-

[1] См.: Н. Н. Семенов.— «Наука и жизнь», 1972, № 9, 10.

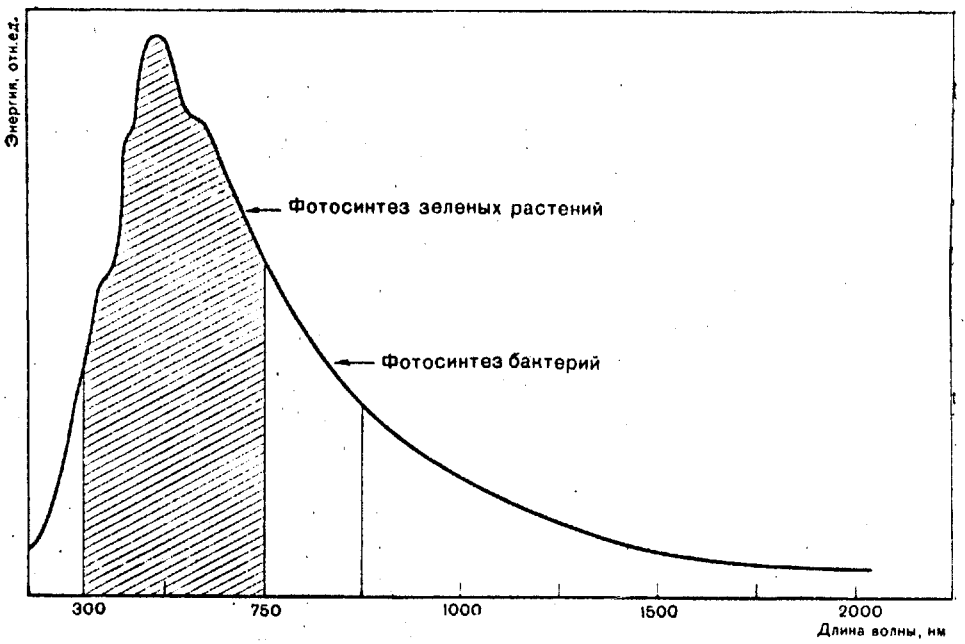


Рис. 1. Распределение энергии в солнечном спектре

мически вероятный процесс — окисление сахаров кислородом — протекает в организмах при дыхании с использованием разнообразных ферментов — биокатализаторов.

Хлорофилл и другие пигменты служат той антенной, которая улавливает излучение Солнца и преобразует его в химическую энергию продуктов фотосинтеза.

При энергии Эйнштейна красного света в максимуме поглощения хлорофилла (680 *нм*) около 40 *ккал* для компенсации дефицита свободной энергии реакции фотосинтеза требуется минимум 3 кванта (120/40) света на молекулу выделяющегося кислорода или ассимилируемой углекислоты.

Измерение квантового выхода фотосинтеза одноклеточных водорослей в оптимальных условиях показало, что на молекулу усваиваемой углекислоты расходуется, по данным разных лабораторий, от 8 до 12 квантов. Если принять среднюю величину 10 квантов, то максимально достижимый коэффициент полезного действия фотосинтеза, то есть преобразования поглощенной солнечной энергии в потенциальную химическую энергию, достигает 30%. Остальные 70% энергии квантов солнечного света, поглощенного хлорофиллом, в конечном счете преобразуются в тепло. Эта избыточная энергия расходуется на преодоление потенциальных барьеров промежуточных реакций, на обратные реакции активных фотопродуктов и, возможно, используется для других внутренних нужд зеленой клетки.

В спектре солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, коротковолновая граница при 300 *нм* определяется поглощением более короткого ультрафиолетового излучения слоем озона в верхних слоях атмосферы. Приблизительно половина энергии солнечного излучения (до длины волны 700 *нм*) лежит в видимой области спектра (рис. 1); это фотосинтетически активная радиация (ФАР). Другая половина относится к инфракрасной области; она не используется растениями для фотосинтеза. Следует, однако, отметить, что существуют фотосинтезирующие бактерии

(содержащие бактериохлорофилл *b*), которые могут использовать инфракрасное излучение с длиной волны до 1 *мкм*.

Таким образом, лишь половина энергии солнечного излучения представляет собой фотосинтетически активную радиацию. Поэтому следует полагать, что максимально возможное использование солнечной энергии при фотосинтезе составляет не более 15%.

Возникает вопрос: как в действительности используется солнечное излучение поверхностью нашей планеты? Грубые подсчеты показывают, что не более 0,1% солнечной радиации, падающей на поверхность Земли, используется для фотосинтеза растениями суши и планктоном океана. Но и это в 10 раз превышает все энергетические затраты человечества, как следует из приводимых ниже данных.

	Количество энергии	
	Дж в год	%
Использование солнечной энергии:		
падает на поверхность Земли	$3 \cdot 10^{24}$	100
запасается при фотосинтезе	$3 \cdot 10^{21}$	0,1
используется в виде пищи	$1{,}5 \cdot 10^{19}$	0,001
Потребление всех видов энергии (1970 г.)	$3 \cdot 10^{20}$	0,01

Из общей продукции фотосинтеза на суше менее 1% потребляется в качестве пищи. Еще меньше полезное использование фотосинтетических продуктов океана; преимущественно это уловы рыбы, находящейся в самом конце биологической цепи. В целом использование первичной продукции фотосинтеза океанов не превышает сотых долей процента.

Основная масса органического вещества, производимого растениями, — целлюлоза. В год на Земле образуется до 10^{11} *т* целлюлозы, значительная часть которой расходуется в качестве топлива и строительных материалов. Однако главная масса фотосинтетически созданной целлюлозы вступает в биологический круговорот, вовлекаясь в различные процессы окисления и распада.

Энергоемкость сельского хозяйства

Существуют громадные резервы для более интенсивного использования солнечной энергии при фотосинтезе суши и океана. Наиболее продуктивные растения (например, сахарный тростник) за год потребляют для фотосинтеза в среднем около 2% энергии солнечного излучения, а зерновые культуры — до 1%. По существу, повышение полезного использования солнечной энергии растениями и растительными сообществами — это главная проблема физиологии растений и агротехники [2].

Чтобы добиться высокой продуктивности культурных растений, необходимо полностью удовлетворять их потребности в воде и минеральных веществах, механизировать трудоемкие процессы, широко применять удобрения, гербициды и т. д. Иными словами, за высокие урожаи нужно

[2] См.: А. А. Ничипорович.— В сб.: Итоги науки и техники, сер. «Физиология растений», № 3. М., ВИНИТИ, 1977.

расплачиваться быстро растущими энергетическими затратами, о чем свидетельствуют, например, следующие данные [3].

Отрасли сельского хозяйства	Отношение запасаемой солнечной энергии к энергозатратам
Земледелие	
экстенсивное	20
интенсивное	2
Животноводство	0,2
Тепличное хозяйство	0,02

При экстенсивном земледелии начала нашего века энергозатраты были незначительны. Современное интенсивное земледелие требует громадного количества энергии для орошения, производства удобрений, работы тракторов и других сельскохозяйственных машин и механизмов и т. д. Следует также учитывать характер и степень использования возделываемых растений. Д. Холл отмечает, что культура кукурузы в Англии, где почти вся биомасса растения идет на корм скоту, менее энергоемка, чем в США, где потребляется преимущественно зерно [4].

В тепличном хозяйстве затраты энергии намного превосходят использование солнечного излучения. В животноводстве также энергозатраты весьма велики, так как не более 10% химической энергии растительных кормов превращается в химическую энергию синтезируемых в организме животных мяса и жира.

Сто лет назад энергетические и пищевые нужды человечества покрывались преимущественно новообразованными продуктами фотосинтеза; отходы животноводства использовались в сельском хозяйстве, так как производство искусственных химических удобрений было ничтожным. Но из-за недостаточной продуктивности сельское хозяйство не могло удовлетворить потребности быстро растущего населения в пище. Поэтому в развитых странах стал неизбежным переход к высокопродуктивному крайне энергоемкому земледелию.

По данным американских авторов [5], на одну калорию пищи затрачивается ныне до 10 калорий энергии; сюда входят энергозатраты сельского хозяйства, энергия, необходимая для работы разнообразных механизмов, перерабатывающих его продукты, транспорта, для упаковки, хранения, работы системы снабжения и т. д.

Таким образом, пищевые продукты производятся в развитых странах путем расточительного расходования ископаемых продуктов фотосинтеза. В условиях, когда в сельском хозяйстве расходуется громадное количество горючего, необходимо внимательное технико-экономическое рассмотрение микробиологического пути получения белков из нефти, минуя традиционное ее использование в качестве топлива, характерное для современной агротехники.

Биологическая фиксация азота

Для снижения энергоемкости сельского хозяйства большое значение имеет проблема биологической фиксации азота. Ведь при выращивании высокоурожайных культурных растений только на производство азотных удобрений путем химической фиксации атмосферного азота расходуется до 30% энергозатрат сельского хозяйства.

---

[3] См.: D. Hall. Solar Energy. L., Ed. UK-ISES, 1976.
[4] Ibid.
[5] См.: J. S. Steinhart.— «Science», 1974, vol. 184, p. 307—316.

Древние фотосинтезирующие организмы — прокариоты, фотосинтезирующие бактерии (в том числе цианобактерии, или, как их обычно называют, синезеленые водоросли) — способны фиксировать молекулярный азот воздуха, используя химическую энергию продуктов фотосинтеза. Эволюция растений привела к специализации их функций, в результате чего высшие растения утратили способность к фотосинтетической фиксации азота. Поэтому культурные злаковые растения приходится снабжать химически связанным азотом, причем количество вносимых азотных удобрений достигает огромных величин; например, по данным ФАО, в Голландии вносят под зерновые до 0,4—0,5 *т* азота на 1 *га*.

Как известно, потребность в азоте у бобовых растений удовлетворяется их симбиозом с клубеньковыми бактериями, которые способны к гетеротрофной фиксации молекулярного азота. Этот процесс может быть весьма эффективным. Например, растения сои при избыточном снабжении углекислотой могут фиксировать до 0,4 *т* азота. Возможный путь усвоения молекулярного азота растениями — симбиоз зерновых культурных растений с бактериями-азотфиксаторами, которые были бы способны жить на корнях не только бобовых, но и злаковых растений. Исследования, которые ведутся в этом направлении, весьма перспективны. Обсуждается также возможность использовать методы генной инженерии для возвращения высшим растениям утраченной ими в процессе эволюции способности к фиксации молекулярного азота.

Чрезвычайно важная проблема — использование автотрофных фотосинтезирующих азотфиксаторов, таких, как синезеленые водоросли, пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии. На рисовых полях Индии, Индонезии, Японии, синезеленые водоросли дают значительную часть необходимого рису азота. Вероятно, на почвах средней полосы масштабы фотосинтетического связывания азота могут значительно возрасти при условии правильного подбора культур. Исследование механизма фиксации азота синезелеными водорослями и фототрофными бактериями позволит выяснить биохимические механизмы связи этого процесса с фотосинтезом. Известно, что восстанавливающая молекулярный азот энзиматическая система — нитрогеназа использует органические продукты фотосинтеза в качестве доноров водорода и источника аденозинтрифосфата, однако проблема взаимосвязи процессов фотосинтеза и азотфиксации еще ждет своего решения.

Молекулярный механизм фотосинтеза

Каким же образом происходит процесс преобразования солнечной энергии растениями?

Наиболее характерные устройства фотосинтезирующей клетки — органы, улавливающие солнечную энергию: хлоропласты у растений и хроматофоры у бактерий. В этих органах, обладающих мембранной структурой, сосредоточены хлорофилл и другие пигменты, улавливающие солнечное излучение, а также энзиматические системы, участвующие в темновых стадиях фотосинтетических реакций.

Процесс фотосинтеза у организмов, содержащих хлорофилл, можно разделить на две основные части: цепь фотосинтетического переноса электрона и углеродный цикл (рис. 2).

В результате работы цепи фотосинтетического переноса электрона образуются восстановленные никотинамидадениндинуклеотидфосфаты (НАДФ.Н, или НАДН) и

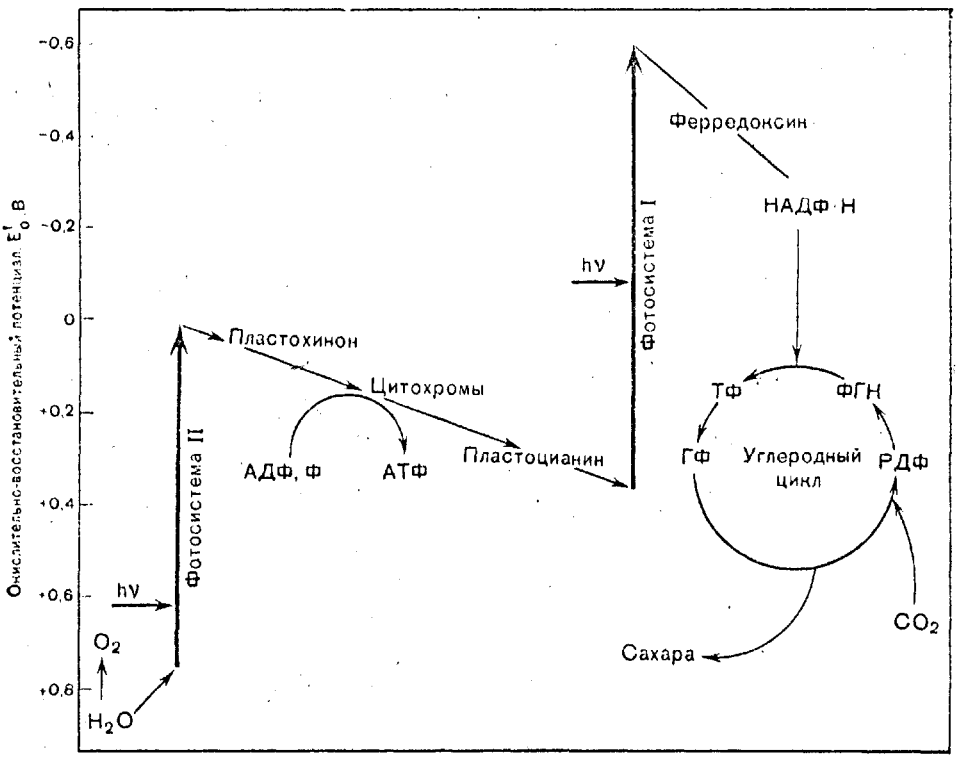


Рис. 2. Схема механизма фотосинтеза растений

РДФ — рибулезодифосфат, ФГК — фосфоглицериновая кислота, ТФ — триозофосфат, ГФ — гексозофосфат

аденозинтрифосфат (АТФ) из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфора (Ф). НАДФ.Н и АТФ поступают в углеродный цикл, работа которого не требует непосредственно энергии света.

Как известно, механизм работы углеродного цикла фотосинтеза был расшифрован преимущественно путем применения углекислоты, меченной долгоживущим изотопом углерода ^{14}C еще в 50-х годах нашего столетия[6]; поступающая в углеродный цикл углекислота связывается с акцептором — рибулезодифосфатом, затем образуется фосфоглицериновая кислота, которая, восстанавливаясь с помощью НАДФ.Н, образует триозофосфат и далее гексозофосфат и углеводы, которые выходят из цикла. Часть промежуточных соединений путем сложных превращений возвращается в цикл и приводит к регенерации рибулезодифосфата.

Преобразование энергии света в химическую энергию происходит в цепи фотосинтетического переноса электрона, которая у фотосинтезирующих растений использует в качестве исходного донора водорода молекулы воды, что приводит к выделению молекулярного кислорода. Фототрофные бактерии используют в этом процессе органические или неорганические доноры водорода; их метаболизм протекает в большинстве случаев в анаэробных условиях, и они не способны к фотохимическому выделению кислорода воды.

Усилиями многих лабораторий выявлена последовательность фотохимических и энзиматических реакций, при которых энергия кванта света используется дважды (см. рис. 2) в различных участках цепи для последо-

[6] См.: M. Calvin.— «Science», 1974, vol. 184, p. 375.

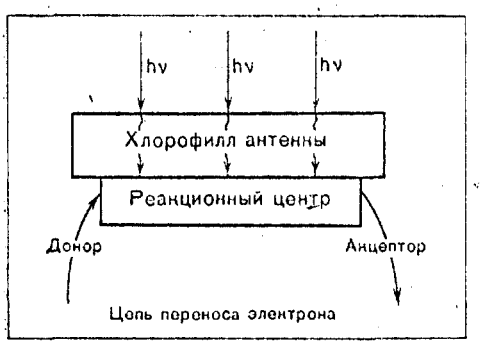


Рис. 3. Миграция энергии в фотосистемах от антенны к реакционному центру

вательного поднятия электрона от уровня кислородного (0,8 В) до уровня водородного электрода (0,42 В).

От молекулы воды электрон за счет энергии света, поглощаемой пигментами так называемой второй фотосистемы (*II*), переносится к пластохинонам, а затем через цитохромы и пластоцианин поступает в фотосистему *I*, которая «поднимает» электрон до уровня ферредоксина, что обеспечивает возможность восстановления пиридиннуклеотидов (НАД и НАДФ).

Все эти реакции сопряжены в мембранах хлоропластов. Тонкие методы разборки этих биологических структур, детергенты и изощренная техника разделения позволяют изолировать фотосистемы и исследовать их функции.

В каждой фотосистеме основная масса хлорофилла представляет собой улавливающую свет антенну; гораздо меньшая часть пигмента сосредоточена в реакционных центрах, непосредственно участвующих в цепи переноса электрона. Энергия света, поглощаемая хлорофиллами «антенны», мигрирует к реакционным центрам (рис. 3), где происходит первичный фотохимический процесс.

Используя технику постепенной солюбилизации антенного хлорофилла с помощью детергентов, можно в ряде случаев выделить реакционные центры и изучить происходящие в них процессы. Именно реакционные центры — та структурная единица, в которой происходит первичное преобразование энергии света.

В настоящее время наиболее изучены реакционные центры, выделенные из фотосинтезирующих пурпурных бактерий. В этих центрах содержатся бактериохлорофилл, его безмагниевый аналог бактериофеофитин, а также доноры и акцепторы электрона, смонтированные на белковых структурах. Существенно то, что квантовый выход первичного переноса электрона в реакционных центрах достигает единицы и механизм их работы определяет пути первичного преобразования энергии света.

Основными компонентами реакционных центров служат молекулы хлорофилла и феофитина, поэтому необходимо изучить природу действия света на эти пигменты, то есть фотохимию хлорофилла и его аналогов.

Фотохимия хлорофилла

В Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР в течение многих лет изучалась фотохимия хлорофилла и его аналогов: обратимые и необратимые превращения пигментов под действием света[7].

Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в синглетное возбужденное состояние, длительность которого около 10^{-9} *с*. Из этого состояния с некоторой потерей энергии хлорофилл переходит в длительноживущее триплетное возбужденное состояние.

[7] См.: А. А. Красновский. Преобразование энергии света при фотосинтезе; молекулярные механизмы. М., «Наука», 1974.

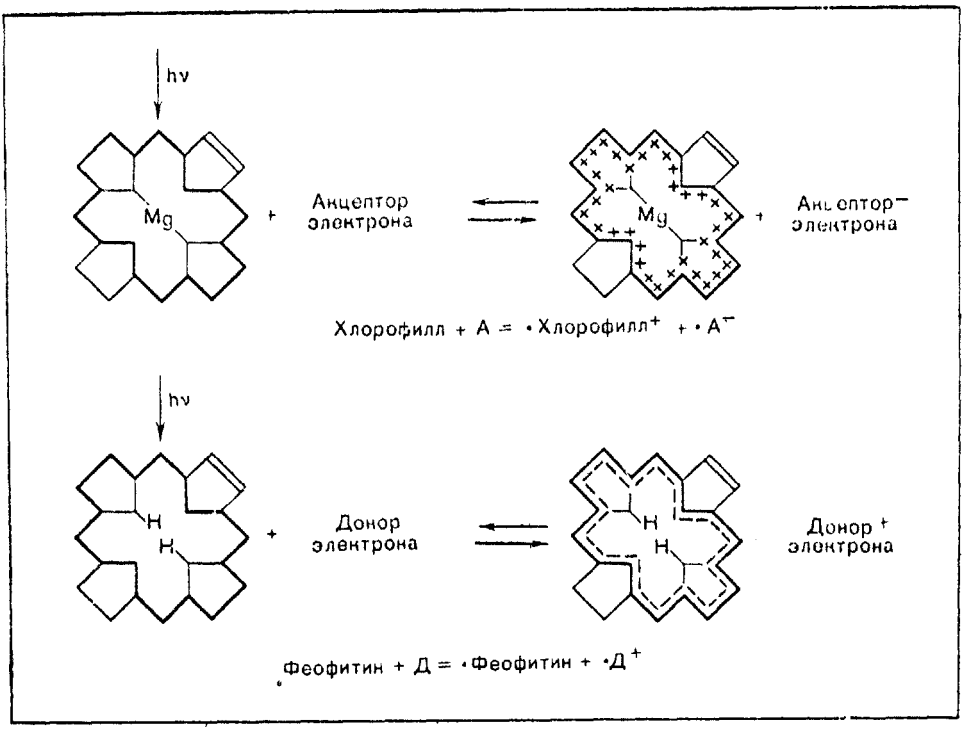


Рис. 4. Обратимое фотоокисление и фотовосстановление хлорофилла и феофитина
Электрон или дырка делокализованы в системе сопряженных связей молекулы пигмента

Возбужденные синглетные и триплетные молекулы хлорофилла (Хл*) обладают повышенной реакционной способностью. Их взаимодействие с молекулой донора или акцептора электрона приводит к первичному фотохимическому процессу, при котором возбужденная молекула хлорофилла отдает электрон акцептору (А) или воспринимает электрон от донора (Д). При этом образуется пара ион-радикалов, катион- или анион-радикал хлорофилла и радикалы молекулы партнера:

$$Хл^* + Д \rightleftarrows \cdot Хл^- + \cdot Д^+$$
$$Хл^* + А \rightleftarrows \cdot Хл^+ + \cdot А^-.$$

Эти реакции легко обратимы (рис. 4). Образующиеся промежуточно радикальные формы хлорофилла могут участвовать в процессе фотохимического переноса электрона. Сравнительное исследование фотохимических свойств хлорофилла и его безмагниевого аналога феофитина показало, что возбужденный хлорофилл обладает большей склонностью к отдаче электрона, а возбужденная молекула феофитина — к восприятию электрона. Фундаментальное свойство возбужденных молекул хлорофилла и его аналогов к обратимому переносу электрона лежит в основе действия пигментов в реакционных центрах.

По данным американских ученых[8], в состав этих центров у фотосинтезирующих пурпурных бактерий входят три субъединицы белка (каждая весом около 25 килодальтон), четыре молекулы бактериохлорофилла, две молекулы бактериофеофитина, один-два атома железа в комплексе с уби-

[8] См., в частности: G. F e h e r.— «Photochem. Photobiol.», 1971, vol. 14, p. 373.

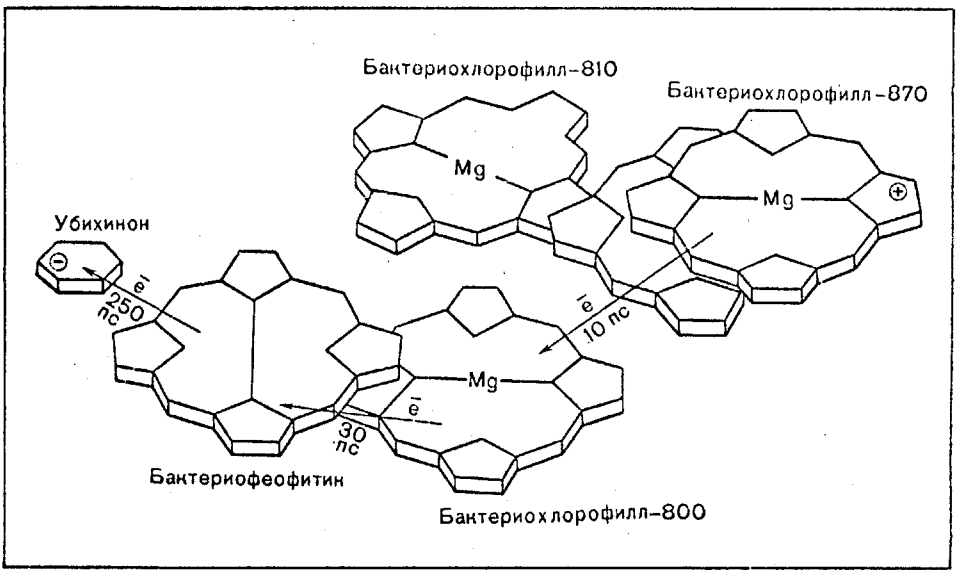


Рис. 5. Гипотетическая схема переноса электрона в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий

хиноном. Бактериохлорофилл в центрах находится в агр[illegible] состоянии.

С помощью лазерной и импульсной спектроскопии удалось определить длительность элементарных актов переноса электрона в реакционном центре. Так была установлена последовательность разделения зарядов между молекулами бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона, входящих в состав реакционных центров бактерий [9]. По данным В. А. Шувалова и др.[10], при поглощении света происходит перенос электрона от димера бактериохлорофилла с максимумом поглощения 880 *нм* за время 10 *пс* к другой форме бактериохлорофилла с максимумом поглощения 800 *нм*. Далее происходит перенос электрона к бактериофеофитину за время около 30 *пс*. В свою очередь электрон от восстановленной формы бактериохлорофилла воспринимается убихиноном за время около 250 *пс* (рис. 5).

Эти элементарные процессы приводят к пространственному разделению зарядов между димером бактериохлорофилла (форма 880 *нм*) и убихиноном с квантовым выходом около единицы. Состояние реакционного центра с разделенными зарядами обладает большой длительностью жизни — до 0,1 *с* и принимает непосредственное участие в цепи фотохимического переноса электрона.

Фотоперенос электрона от бактериохлорофилла к убихинону в реакционных центрах американские исследователи наблюдали при температуре жидкого гелия. Это указывает на то, что перенос электрона в центрах происходит по туннельному механизму. Вероятно, особенности пространственного расположения молекул бактериохлорофилла и бактериофеофитина в реакционных центрах благоприятствуют эффективному разделению зарядов.

[9] См., например: M. G. Rockley, W. W. Windsor, R. I. Cogdell, W. W. Parson.— «Proc. Nat. Acad. Sci.», 1975, vol. 72, p. 2251; P. L. Dutton, K. I. Kaufmann, B. Chance, P. M. Rentzepis.— «FEBS Letters», 1975, vol. 60, p. 275.

[10] См.: В. А. Шувалов, А. В. Клеваник, Л. В. Шарков и др.— «Докл. АН СССР», 1978, т. 243, с. 4.

Реакционные центры фотосистем *I* и *II* зеленых растений пока не выделены в достаточно чистом виде, хотя недавно в препаратах, обогащенных центрами фотосистемы *II*, удалось наблюдать фотохимический перенос электрона от хлорофилла к феофитину с образованием восстановленной формы этого пигмента [11]. Таким образом, можно полагать, что система хлорофилл — феофитин — это универсальный участник эстафетного переноса электрона в реакционных центрах.

Фотосистемы и цепь переноса электрона расположены в мембранах хлоропластов и хроматофорах так, что образующиеся активные окислители и восстановители пространственно разобщены. Это определяется спецификой молекулярной организации цепи переноса электрона в мембранах. В настоящее время распространена теория Митчела, которая постулирует анизотропное расположение цепи переноса электрона в мембранах и непроницаемость мембраны для ионов водорода. Вопросы, связанные с механизмом работы пигментированных мембран и путями трансформации энергии света в электрическую энергию, подробно рассмотрены В. П. Скулачевым [12].

Пути биологического использования энергии Солнца

Моделирование фотосинтеза. Внимание исследователей привлекает применение принципов фотосинтеза для построения искусственных фотосистем, более полно и в более широкой спектральной области использующих энергию солнечного излучения. При этом следует отметить отсутствие значительных термодинамических ограничений в преобразовании энергии квантов света в потенциальную химическую энергию с коэффициентом полезного действия, значительно превышающим максимальный к.п.д. фотосинтеза растений.

Для построения таких искусственных систем в качестве фоторецепторов используются хлорофилл и другие пигменты, изолированные клеточные структуры, содержащие пигменты, а также выделенные из клеток ферментные системы.

В нашей лаборатории, например, создана фотобиохимическая система, в которой происходит фотовыделение водорода в мицеллах детергентов, включающих хлорофилл, бактериальную гидрогеназу, доноры электрона и метилвиологен как переносчика электрона (рис. 6) [13].

Процесс фотохимического разделения зарядов удается моделировать с помощью неорганических полупроводников, обладающих фотосенсибилизирующим действием (рис. 7). Применение двуокиси титана или окиси цинка позволило наблюдать фотосенсибилизированное выделение кислорода [14] либо фотохимическое образование водорода [15].

В настоящее время интенсивно изучаются фотоэлектрохимические процессы с участием хлорофилла и других красителей, при которых не происходит накопления продуктов, запасающих энергию света, а электрон и дырка взаимодействуют с инертным электродом, приводя к образованию

[11] См.: А. В. Клеваник, В. В. Климов, В. А. Шувалов, А. А. Красновский.— «Докл. АН СССР». 1977, т. 236, с. 241.

[12] См.: В. П. Скулачев.— «Успехи современной биологии», 1977, т. 84, с. 165.

[13] См.: А. А. Красновский, Г. П. Брин, И. П. Гоготов и др.— «Докл. АН СССР», 1975, т. 225, с. 711.

[14] См.: А. А. Красновский, Г. П. Брин.— «Докл. АН СССР», 1961, т. 139, с. 142; 1962, т. 147, с 656; 1965, т. 163, с. 761; Молекулярная фотоника. Л., «Наука», 1970.

[15] См.: А. А. Красновский, Г. П. Брин, В. В. Никандров.— «Докл. АН СССР», 1975, т. 220, с. 1214.

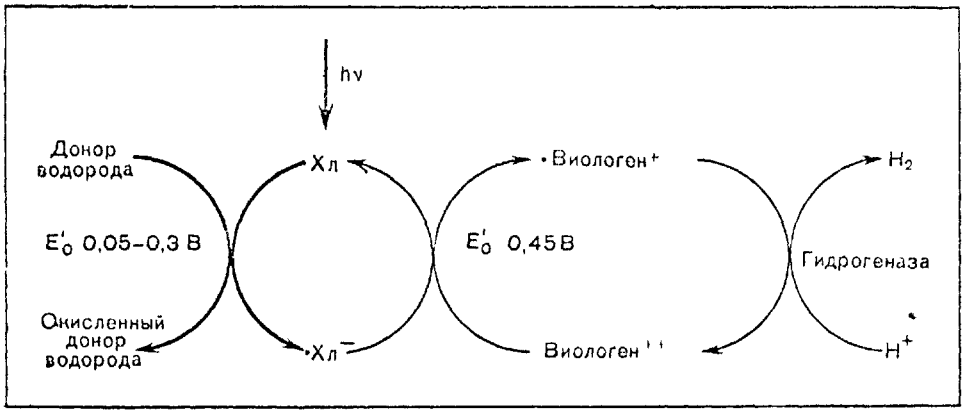


Рис. 6. Схема фотообразования водорода в мицеллах детергентов, содержащих хлорофилл и бактериальную гидрогеназу

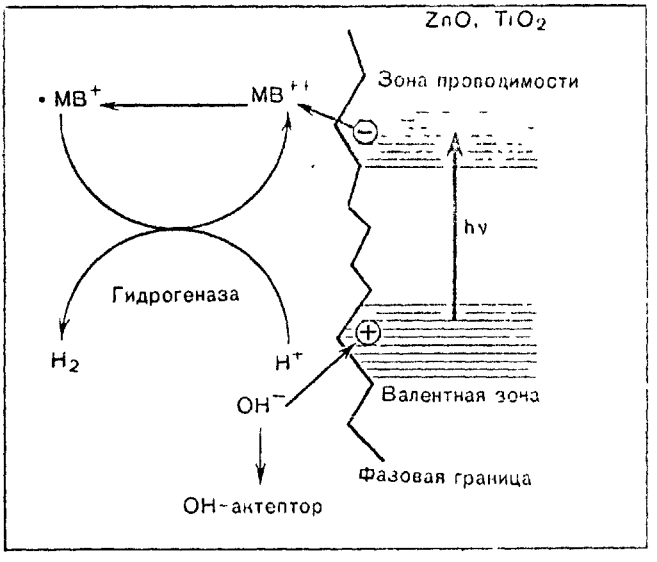


Рис. 7. Схема фотообразования водорода на неорганических фотокатализаторах

МВ — метилвиологен

разности потенциалов. Японские авторы[16] использовали электрод, покрытый двуокисью титана, что можно рассматривать как электрохимический вариант описанных выше опытов нашей лаборатории с суспензиями двуокиси титана и окиси цинка.

Весьма эффективное направление — создание искусственных мембран, в которых фотохимически образующиеся активные продукты (активные окислители и восстановители) разделяются на мембране. Большое внимание привлекают работы по включению в искусственные липидные мембраны пигментных систем с тем, чтобы воспроизвести в искусственных условиях процесс образования АТФ или отдельные стадии фотохимического переноса электрона.

Понятно, что исследования такого рода не должны ставить своей целью слепое копирование фотосинтетического аппарата, возникшего у растений в процессе биологической эволюции. Весьма вероятно конструирование эффективных фотохимических систем, построенных более просто, чем биологические системы.

[16] См.: A. Fusishima, K. Honda.— «Nature», 1972, vol. 238, p. 37.

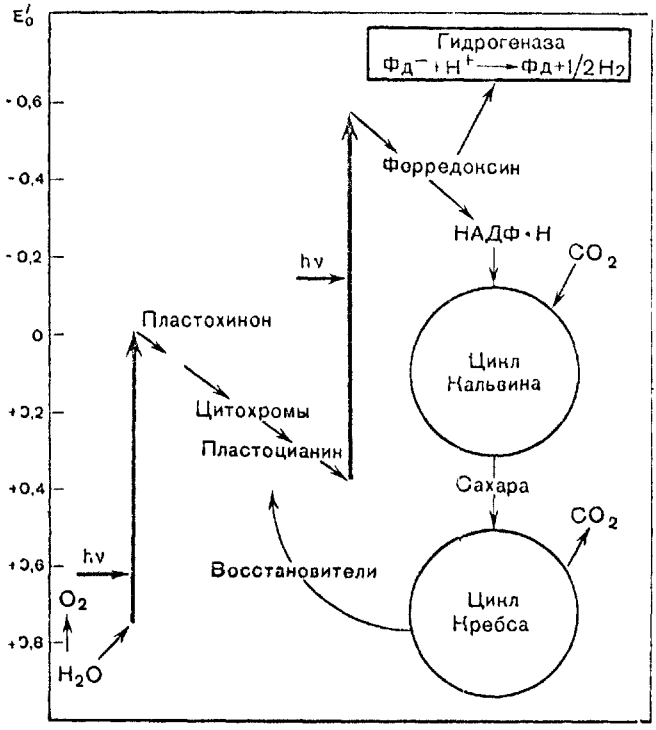


Рис. 8. Гипотетический механизм фотообразования водорода клетками водорослей

Фд — ферредоксин

Изменение путей фотосинтетического обмена для направленного синтеза необходимых продуктов. Наибольшее внимание исследователей привлекают сегодня такие проблемы, как фотообразование водорода и фотоассимиляция молекулярного азота, а также повышение эффективности биосинтеза углеводородов (например, каучука) или липидов фотосинтезирующими организмами.

Американский исследователь Г. Гаффрон обнаружил в 1942 г., что одноклеточные водоросли в анаэробных условиях теряют способность выделять кислород и вместо него выделяют газообразный водород. Исследование механизма этого процесса показало, что выделение водорода происходит с участием фермента гидрогеназы и тесно связано с углеродным обменом фотосинтезирующей клетки (рис. 8). Этой проблеме посвящено большое число работ [17].

Остается неясным, в какой степени эффективность фотообразования водорода связана с использованием продуктов фотосинтеза внутри той же клетки и не будет ли более рациональным сочетание фотосинтетических организмов со специализированными микроорганизмами, перерабатывающими органическое вещество с выделением водорода или метана.

Для фотосинтетического выделения водорода могут быть использованы не только клетки водорослей, но и изолированные хлоропласты, освещение которых в присутствии гидрогеназы, выделенной из бактерий, также ведет к выделению водорода. В перспективе следует оценить экономическую эффективность получения водорода при фотосинтезе по сравнению с электролизом воды (например, с использованием атомных электростанций или солнечных батарей).

Использование биомассы растений. Чрезвычайно важна проблема рационального использования растительной биомассы, в том числе стеблей, листьев, корней растений, и громадного количества древесных отходов, содержащих целлюлозу. Основные пути утилизации растительной биомассы связаны с ее переработкой в пищевые и технические продукты.

Переработка и утилизация биомассы растений (в основном целлюлозы), образующейся при фотосинтезе, и органических отходов для пищевых и

[17] См.: А. А. Красновский.— «Изв. АН СССР, сер. биологическая», 1977, № 5, с. 650.

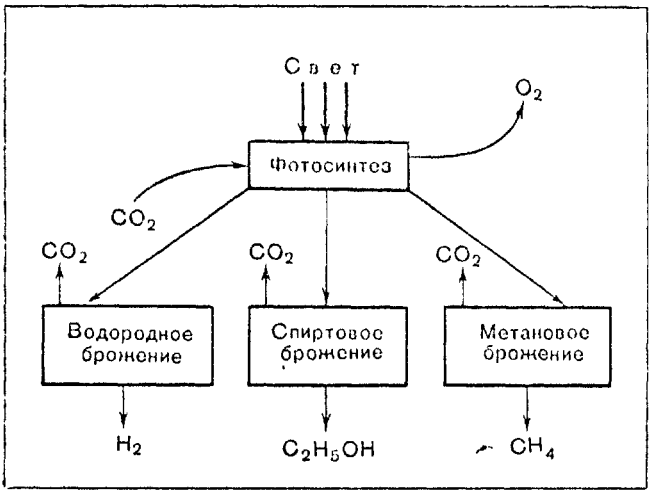


Рис. 9. Возможные пути переработки биомассы, образующейся при фотосинтезе

энергетических целей — в значительной степени микробиологическая проблема. Здесь важная стадия — химическая или энзиматическая переработка целлюлозы для последующего микробиологического синтеза белка, получения спиртов или горючих газов — метана и водорода (рис. 9).

Можно предполагать, что усовершенствование технологии сбора и переработки растительной биомассы позволит удовлетворить значительную часть кормовых потребностей животноводства и энергетических нужд человечества.

Возможный путь увеличения биомассы связан с селекцией растений, эффективно преобразующих солнечную энергию, с тем чтобы суммарная биомасса — листья, стебли, корни — могла использоваться для энергетических целей.

Поиски оптимальных путей использования биомассы растений тесно связаны с необходимостью решать сложнейшие технологические и экономические вопросы, с выявлением наиболее рациональных методов сбора и переработки сырья и отходов.

Наиболее важной остается глобальная проблема повышения использования солнечной энергии культурными растениями и понижения энергозатрат, связанных со сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза. Эта проблема требует обширного комплекса исследований по физиологии растений и агротехнике, с ней тесно связано изучение механизмов регуляции фотосинтетической деятельности растений и их продуктивности.

□

В заключение сравним фотосинтез растений с другими способами преобразования солнечной энергии. Как уже говорилось, предел полезного использования всей энергии солнечного излучения при фотосинтезе растений достигает 15%. Кремниевые солнечные батареи, которые применяются для энергообеспечения космических аппаратов, используют до 20% солнечного излучения. В перспективе к.п.д. фотополупроводниковых устройств может быть еще выше, тем более что в этих устройствах возможно частично использовать инфракрасную область излучения Солнца, которая не участвует в фотосинтезе растений. Что же касается тепловых машин, то при высокой температуре теплоносителя их к.п.д., по-видимому, может приближаться к к.п.д. фотосинтеза растений.

Препятствием к широкому использованию энергии Солнца при ныне существующей технологии остаются экономические соображения: установочная стоимость одного киловатта солнечных электростанций пока в сотни раз выше, чем у тепловых и атомных электростанций. Однако технология солнечной энергетики развивается быстро, и можно думать, что уже в ближайшем будущем в этой области будут найдены экономически целесообразные решения. Судя по имеющимся данным, быстрее всего будет развиваться область солнечной теплоэнергетики, связанной с отоплением домов при помощи автономных устройств, которые уже разработаны.

Непрерывное совершенствование полупроводниковой технологии позволяет надеяться, что в будущем солнечные батареи станут основными преобразователями энергии Солнца в электроэнергию, тогда как источником пищи и кислорода по-прежнему будет служить фотосинтез растений.

Развитие человеческого общества неизбежно потребует более полного овладения солнечной энергией, и трудно сомневаться в том, что биологический путь ее использования останется важнейшим на долгие годы.

УДК 581.132

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ ФОТОСИНТЕЗА И
ФОТОБИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А. Н. БАХА
ИНСТИТУТ ФОТОСИНТЕЗА

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

(рекомендации Научного совета
по перспективам исследований)

ПУЩИНО·1979

Записку составил академик А.А.Красновский с учетом замечаний, которые сделали канд. биол. наук Ю.Е.Ерохин, д-р биол. наук Н.В.Карапетян, проф. Е.Н.Кондратьева, канд. биол. наук Ф.Ф.Литвин, чл.-кор. АН СССР А.А.Ничипорович, чл.-кор. АН СССР А.А.Шлык.

Проблеме физиологии фотосинтеза и продуктивности растений была посвящена составленная чл.-кор. АН СССР А.А.Ничипоровичем "Программа исследований по проблемам фотосинтеза и фотобиологии растений", М., Наука, 1976.

© Научный центр биологических исследований АН СССР в Пущине, 1979

В В Е Д Е Н И Е

При фотосинтезе растений образуются органические вещества и кислород, которые используются всеми организмами, живущими на нашей планете. Ископаемые продукты фотосинтеза древних геологических эпох (уголь, нефть, газ) используются для нужд энергетики. Согласно известным прогнозам на 2000 г., 80% потребности человечества в энергии будут по-прежнему удовлетворяться за счет сжигания продуктов фотосинтеза и лишь 20% – за счет атомных и гидроэлектростанций. Изучение фотосинтеза растений привлекает все большее внимание в связи с лавинным ростом народонаселения Земли и всевозрастающим потреблением энергии, пищи и кислорода. Главными проблемами являются пути повышения продуктивности растений и выяснение принципов преобразования энергии света в потенциальную химическую энергию с целью управления фотосинтезом и создания искусственных систем, использующих солнечную энергию. Проблема продуктивности растений тесно связана с общими вопросами физиологии растений, экологии и научного земледелия.

Ниже будут рассмотрены перспективы изучения проблемы преобразования энергии света при фотосинтезе.

Прогресс физики и химии за последние 30 лет во многом определил развитие исследований фотосинтеза на молекулярном уровне. Усилиями многих лабораторий во всех странах мира выяснилась следующая картина всего процесса. Солнечное излучение поглощается пигментной системой растения, центральное место в которой принадлежит хлорофиллу. Возбужденные молекулы хлорофилла и других пигментов

передают энергию возбуждения в реакционный центр, где осуществляется первичный процесс разделения зарядов и переноса электрона. Первичный фотоперенос электрона в реакционном центре сопряжен с работой энзиматических систем, образующих цепь фотосинтетического переноса электрона, которая локализована в хлоропластах растений или в хроматофорах бактерий. В результате работы цепи фотосинтетического переноса электрона зеленых растений из воды образуется молекулярный кислород, а электрон (водород) молекулы воды через цепь переносчиков воспринимается конечным акцептором – НАДФ. В процессе переноса электрона в мембранах хлоропластов и хроматофоров образуется также АТФ. Восстановленные НАДФ и АТФ, в которых запасена энергия света, используются для восстановления CO_2 в углеродном цикле, принципы работы которого удалось выяснить, используя углекислоту, меченную изотопом углерода ^{14}C. В этом циклическом процессе углекислота восстанавливается до сахаров, а НАДФ и АДФ вновь используются в цепи переноса электрона. Образованные в углеродном цикле органические соединения используются для синтеза белков, аминокислот, липидов и других компонентов клетки. В этой общей картине процесса остаются, однако, неясными молекулярная организация преобразующей свет системы и целый ряд этапов, ведущих к преобразованию энергии света. Поэтому проблема изучается сотнями лабораторий всего мира.

Рассмотрим более подробно задачи исследования отдельных стадий всего процесса фотосинтеза.

1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРВИЧНОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ СВЕТА ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Все растения и большинство фототрофных бактерий содержат хлорофилловые пигменты. Кванты солнечного излучения поглощаются хлорофиллом и другими пигментами, расположенными в мембранах хлоропластов и хроматофоров. Большая часть хлорофилла в клетках функционирует в качестве "антенны", которая поглощает падающую солнечную радиацию, тогда как меньшая часть хлорофилла расположена в

реакционных центрах. Под действием квантов света происходит возбуждение хлорофилла "антенны" с последующей миграцией энергии возбуждения к реакционному центру, где разыгрывается первичный процесс переноса электрона. Поглощение кванта света и миграция энергии возбуждения являются физическими процессами и изучаются преимущественно спектральными методами на разных уровнях организации системы – от изолированных пигментов до интактных клеток. Так, изучаются свойства пигментов в органических растворителях, в водных растворах детергентов, в твердых пленках, в липосомах, в бислойных мембранах и т.д. Следующей ступенью организации являются модельные и выделенные из клеток пигмент-белковые комплексы, изолированные реакционные центры и выделенные из клеток фотосинтетические структуры – хлоропласты и хроматофоры. Наконец, применение современных быстродействующих физических методов позволяет изучать первичные процессы непосредственно в живых клетках растений и бактерий. Сопоставление результатов, полученных в более простых системах, позволит выяснить природу элементарных стадий, идущих в живых клетках фотосинтезирующего организма в естественных условиях.

Фотофизические процессы – возбуждение, миграция энергии и испускание люминесценции – протекают за время от 10^{-12} до 10^{-9} с, поэтому для их исследования в последние годы, наряду с "обычными" спектральными методами, широко применяются лазеры с различной длительностью светового импульса: наносекундные лазеры (10^{-9} с) и, в последнее время, пикосекундные лазеры с длительностью импульса 10^{-12} с. Наряду с этим, широкое применение в таких исследованиях находят различные типы абсорбционной и люминесцентной спектроскопии и радиоспектроскопии при комнатной и низкой температурах. Применение низких температур позволяет выключать энзиматические процессы в клетке, изолируя таким образом первичный фотофизический процесс поглощения и испускания квантов света, миграции и фотохимического преобразования энергии. В работах ряда лабораторий удалось выяснить условия образования и дезактивации синглетных и триплетных возбужденных состояний, возможные механизмы миграции энергии возбуждения, квантовые выходы элементарных процессов. Следует отметить, что условием эффективной миграции энергии к реакционному центру яв-

ляется определенная структурная организация пигментной системы в мембранах.

Итак, энергия возбуждения мигрирует к реакционному центру, где осуществляется первичный фотопроцесс переноса электрона. Реакционный центр является структурной единицей, в которой на специфических белковых носителях расположены молекулы хлорофилла и его аналогов (доноры электрона) и молекулы первичных акцепторов электрона. Следует подчеркнуть, что пигментные комплексы "антенны" и реакционный центр включены в мембрану, являясь ее составной частью, и способ их молекулярной организации во многом определяет эффективность действия всей системы. Применение разнообразных поверхностно-активных веществ - детергентов - и биохимических методов разделения позволяет выделить изолированные реакционные центры и изучать идущие в них процессы без сопряжения со стадией миграции энергии в пигментных "антеннах". Исследование первичных фотопроцессов, осуществляемых изолированными молекулами хлорофилла, позволило установить способность возбужденных молекул пигментов к обратимому восприятию или отдаче электрона соответствующему акцептору. Существенно, что эти свойства изолированных молекул хлорофилла проявляются при их функционировании в реакционных центрах. Наиболее изучены первичные процессы в реакционных центрах бактерий. В этом случае первичным фотопроцессом, текущим с высоким квантовым выходом, является перенос электрона от возбужденной молекулы бактериохлорофилла к первичному акцептору (убихинону) с промежуточным участием бактериофеофитина, также расположенного в активном центре. Несколько молекул бактериохлорофилла и бактериофеофитина, обладая специфической молекулярной геометрией, составляют ту первичную структуру, которая воспринимает энергию возбуждения и реализует ее в форме первичного процесса переноса электрона. В этом элементарном акте происходит преобразование энергии возбуждения в химическую энергию. Возникает, однако, вопрос, почему обратные реакции не приводят к эффективной растрате этой энергии и каковы пути стабилизации фотохимически мобилизованного электрона. Обычно принимают, что электрон, перешедший к первичному акцептору (убихинон), переносится далее по цепи и пространственное удаление от реакционного центра препятствует об-

ратной реакции. С другой стороны, пигментный комплекс, отдавший электрон первичному акцептору, воспринимает электрон от первичного донора, также включенного в цепь переноса электрона. Условиями эффективной работы цепи являются чередующиеся акты отдачи и восприятия электрона; применение низких температур и коротких световых импульсов позволяет изолировать элементарный процесс с целью его изучения.

Первичные процессы в реакционном центре несколько лучше изучены в случае фотосинтезирующих бактерий в связи с более простой организацией цепи переноса электрона, включающей, по-видимому, лишь одну фотосистему. В хлоропластах зеленых растений в цепи переноса электрона сопряжены две фотореакции, в которых происходит ступенчатое фотоокисление воды (фотосистема 2) и фотовосстановление ферредоксина и НАДФ (фотосистема 1).

Исследование фотохимических реакций хлорофилла и его аналогов в модельных системах, в реакционных центрах и в интактных организмах позволили прийти к важному выводу, что первичный процесс преобразования энергии света заключается в переносе электрона, в котором участвует возбужденная молекула пигмента. Первичный элементарный процесс весьма эффективен, и его квантовый выход близок к 1. В изолированных системах происходит сравнительно быстрая потеря энергии и квантовый выход образования первичных продуктов фотоокисления и фотовосстановления гораздо ниже, чем в организмах, где создаются условия эффективного предотвращения обратных реакций, что также связано с пока невыясненной спецификой молекулярной организации реакционного центра.

Направление исследований:

1.1. Выяснение природы процессов, ведущих к преобразованию энергии света в химическую энергию и моделирование этих реакций в искусственных системах.

1.2. Исследование возбужденных состояний пигментов-фоторецепторов.

1.3. Установление механизма участия хлорофилла в фотохимических реакциях.

1.4. Изучение структуры, фотофизических и фотохимических свойств агрегированных форм хлорофилла и других пигментов.

1.5. Выяснение механизма миграции энергии в светособирающих комплексах хлорофилла и сопровождающих пигментов и от них к хлорофиллам реакционных центров.

1.6. Установление механизма разделения зарядов и стабилизация энергии в реакционных центрах фотосистем.

1.7. Разработка фотохимических систем, преобразующих с высокой эффективностью энергию света в химическую или электрическую энергию.

2. РАБОТА ЦЕПИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Перенос электрона от воды к НАДФ в зеленых растениях происходит ступенчатым путем. В этом процессе участвуют промежуточные переносчики электрона (водорода): пластохиноны, цитохромы типа B и C, пластоцианины, ферредоксины, флавопротеины и др. В результате работы большого числа лабораторий выяснена природа многих переносчиков электрона, изучены их свойства и возможная последовательность их функционирования в электронтранспортной цепи. Исследования ведутся как с интактной цепью переноса электрона в структурах хлоропластов, так и с разделенными участками всей цепи переноса - с изолированными фотосистемами.

Несмотря на общие успехи в изучении фотосинтетической цепи переноса электрона растений до сих пор остается неясной природа компонентов в целом ряде участков цепи. Прежде всего это относится к той части транспорта электрона, которая примыкает к реакциям фотовыделения кислорода, а также к участку цепи, где образуются наиболее восстановленные продукты (непосредственно перед ферредоксином). Наименее ясен механизм выделения кислорода при фотосинтезе. Работы последних лет свидетельствуют о включении ряда неидентифицированных переносчиков электрона между участком фоторазложения воды и пигментами реакционных центров фотосистемы 2. Имеются предварительные данные об участии соединений марганца в осуществлении фотоокисления воды. Свойства и природа неизвестных компонентов цепи переноса электрона в акцепторной части

фотосистемы 1 выясняются с использованием методов импульсной и низкотемпературной спектрофотометрии.

Принципиальным вопросом является структурная организация всей цепи переноса электрона хлоропластов и хроматофоров. Важно выяснить, в каких участках фотосинтетической мембраны расположены те или иные компоненты цепи переноса электрона, то есть на внешней или внутренней стороне мембраны. Решению этой задачи в немалой степени способствует использование иммунохимических методов. Установление пространственной организации цепи переноса электрона позволит подойти к выяснению механизма фотофосфорилирования.

Работа цепи переноса электрона сопряжена с образованием АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Этот процесс требует сохранения интактности мембранных структур и тесно связан с переносом протона и других ионов в мембранах. В настоящее время выяснены участки цепи переноса электрона, которые сопряжены с образованием АТФ в результате совместной работы фотосистем 1 и 2, а также циклический путь образования АТФ в хроматофорах бактерий. Эта проблема тесно связана с принципами преобразования энергии в митохондриях и с явлением так называемой энергизации мембран в результате разделения зарядов (ионов) на разных сторонах мембраны. Теория Митчелла позволяет дать удовлетворительное объяснение механизму сопряжения переноса электрона и переносу протона, связанному с образованием АТФ за счет энергии квантов света.

Направление исследований:

2.1. Исследование природы отдельных компонентов фотосистем и способов их сопряжения.

2.2. Изучение состава, функций и путей пространственного сопряжения цепи фотосинтетического переноса электрона.

2.3. Выяснение механизма и промежуточных стадий выделения кислорода при фотосинтезе.

2.4. Выяснение природы процессов, ведущих к образованию высокоэнергетических состояний фотосинтетических мембран и генерации электрических потенциалов.

2.5. Выяснение механизма сопряжения фотофосфорилирования с работой цепи фотосинтетического переноса электрона.

3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА И ЕГО ФОРМИРОВАНИЕ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА

Высокая эффективность первичных процессов преобразования энергии света и последующих реакций переноса электрона связана со спецификой организации фотосинтетического аппарата в мембранах фотосинтезирующих организмов. Изучается не только молекулярная организация интактных мембран, что является общебиологической проблемой, но также организация отдельных узлов всей цепи, к числу которых относятся: молекулярная организация агрегированных форм пигментов, структура и состав пигмент-белковых комплексов и реакционных центров, молекулярная организация всей цепи переноса электрона. Применение методов рентгеноструктурного анализа позволило расшифровать пространственную структуру гемоглобина и природу его взаймодействия с кислородом. Подобные работы с пигмент-белковыми комплексами только начинаются. Пространственная организация цепи переноса электрона связана с более общей проблемой молекулярной организации мембран.

Характерным для биологических функций является то, что работающая система образуется в процессе постепенного биосинтеза, и за время ее работы происходит последовательная замена испорченных частей в результате старения, побочных процессов фотоокисления и т.д. Биосинтез и репарация связаны с получением надлежащей генетической информации для построения белоксинтезирующей системы фотосинтетического аппарата. В связи с этим изучаются вопросы генетики фотосинтезирующих клеток и фотосинтетических структур (хлоропластов). Существенным является то, что хлоропласты, находясь под общим ядерным контролем, несут свою собственную информацию, обладая своей ДНК и РНК. Проблема биосинтеза фотосинтетического аппарата тесно связана с постепенным формированием отдельных составных частей и структур и представляет большой интерес в связи с изучением функции в процессе ее становления. Так например, постепенное зеленение этиолированных листьев позволяет изучать природу различных форм пигментов и постепенно образующихся белковых структур и фотосистем. Применение изотопных методов позволило обнаружить об-

новление молекул хлорофилла в клетках высших растений с новообразованием фотосинтетического аппарата. Таким образом, изучение биосинтеза фотосинтетического аппарата и его компонентов – белков, липидов, пигментов – тесно связано с проблемой изучения фотосинтеза на молекулярном уровне. Следует обратить внимание на организацию биосинтетического процесса и его регулирования под действием света и совокупности физиологических факторов.

Направление исследований:

3.1. Структурная интеграция и молекулярная топография компонентов пигментной системы и электронтранспортной цепи в мембранах фотосинтезирующих организмов.

3.2. Выяснение принципов биосинтеза пигмент-белково-липидных структур и их молекулярной организации у высших растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий.

3.3. Изучение центров биосинтеза хлорофилла и закономерностей биосинтеза и организации системы нативных форм хлорофилла и свойств этих форм в связи с их участием в световых реакциях фотосинтеза.

3.4. Выяснение последовательности процессов формирования фотосинтетических структур, компонентов цепи переноса электрона и фотосистем.

3.5. Выяснение особенностей организации пигментов реакционных центров и светособирающих комплексов фотосистем и их метаболических соотношений.

3.6. Структурно-функциональное исследование фотосинтетических структур и механизмов генетического регулирования образования фотосинтетического аппарата.

4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКТОВ ФОТОСИНТЕЗА И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА И АЗОТА

Применение долгоживущего изотопа углерода ^{14}C позволило расшифровать последовательность энзиматических реакций, ведущих к связыванию и восстановлению углекислоты. Принцип работы цикла заключается в следующем: углекислота связывается пятиуглеродным акцептором – рибулозодифосфатом – и образует две молекулы трехуглеродного соединения фосфоглицериновой кислоты. Фосфоглицериновая кис-

лота восстанавливается с помощью НАДФН, образованного в результате работы цепи фотосинтетического переноса электрона, который восстанавливает карбоксил фосфоглицериновой кислоты до альдегидной группы. В результате конденсации двух молекул триозы образуются гексозы в форме фосфорных эфиров, которые в результате цепи сложных превращений приводят к регенерации рибулозодифосфата и выводу сахаров из цикла. Аминирование промежуточных продуктов ассимиляции углекислоты (кетокислот) приводит к образованию аминокислот и белков. Продукты фиксации углекислоты вступают в сложные циклы метаболических процессов, ведущих к биосинтезу органического вещества клеток, а также используются для энергетических нужд клетки в циклах дыхания и гликолиза. Сложное переплетение реакций углеродного метаболизма, непосредственно связанного с фотосинтезом, и использование запасных органических соединений составляют предмет биохимии и физиологии растений со всей сложностью и многообразием этих разделов биологии.

С использованием продуктов фотосинтеза связана проблема ф о т о д ы х а н и я, за счет которого происходит окисление кислородом части первичных продуктов фотосинтеза, и поэтому – снижение эффективности конечного запасания света.

Важной проблемой является регуляция углеродного метаболизма, которая связана с направленным получением веществ с определенной химической структурой. Так например, действие красного света приводит преимущественно к накоплению углеводов, а синего – к накоплению белков; определенные метаболические режимы ведут к преимущественному биосинтезу липидов. Круговорот углерода в растениях тесно связан с вовлечением в их метаболизм азота, фосфора, железа, калия и других неорганических компонентов земной коры; фотосинтез является биогеохимическим процессом, под влиянием которого происходило формирование поверхностной части земной коры – биосферы и земной атмосферы.

Наиболее важной проблемой является вовлечение молекулярного азота в цепь фотосинтетических реакций. Как известно, высшие растения неспособны непосредственно фиксировать молекулярный азот, используя для своего мета-

болизма соли аммония, нитраты и нитриты. В отличие от них прокариоты – фотосинтезирующие бактерии и ряд сине-зеленых водорослей (называемые сейчас цианобактериями) – способны использовать в своем метаболизме молекулярный азот, обладая необходимым механизмом восстановления азота до аммиака. Известно, например, что культивируемые на рисовых полях в тропических странах сине-зеленые водоросли могут обеспечить большую часть требуемого высшим растениям азотного питания.

Направление исследований:

4.1. Пути эволюции фотосинтетического аппарата; сравнительное изучение в филогенетическом плане.

4.2. Выяснение путей углеродного и сопряженного с ним азотного метаболизма и принципов их регуляции у различных типов автотрофных организмов с целью выяснения путей управления этими процессами.

4.3. Исследование фотосинтетической фиксации молекулярного азота у фотосинтезирующих бактерий и сине-зеленых водорослей.

4.4. Выяснение механизмов регуляции фотосинтеза у фотосинтезирующих бактерий: отбор штаммов, эффективных по азотфиксации, выделению молекулярного водорода и т.д.

5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОТОСИНТЕЗА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ. ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА

Наибольшую часть продуктов фотосинтеза составляет целлюлоза, будучи основной массой древесины, соломы, корней и т.д. Энзиматический и химический гидролиз целлюлозы, сопряженный с энзиматической переработкой сахаров, может приводить к образованию водорода, метана, этилового спирта. Эти процессы привлекают сейчас большое внимание в связи с ростом цен на нефть и перспективой исчерпания ее запасов в течение ближайших столетий. Работы по использованию продуктов фотосинтеза для энергетических целей уже ведутся в большом масштабе. Так например, Бразилия, которая является крупнейшим производителем сахарного тростника, использует мелассу для сбраживания и по-

лучения спирта. В этой стране декретировано введение 15%-ного этилового спирта в моторное топливо. Получение метана при сбраживании содержащих целлюлозу отходов также получило широкое практическое применение. Наконец, биологическое образование водорода и его использование в тепловых машинах или топливных элементах является привлекательной проблемой, требующей специального рассмотрения.

Заслуживает внимания разработка теоретических основ энергетических плантаций, обеспечивающих быстрый рост биомассы с последующим использованием ее в качестве источника энергии.

Проблема фотосинтетического водорода. Цепь фотосинтетического переноса электрона работает в пределах окислительно-восстановительных потенциалов водородного и кислородного электродов. При наличии в клетках фермента – гидрогеназы – работа цепи фотосинтетического переноса электрона может быть направлена в сторону образования молекулярного водорода. В 1942 г. была открыта способность клеток зеленых водорослей к фотосинтетическому образованию водорода в атмосфере инертного газа. Изучение механизма этого процесса показало возможность того, что водород выделяется не путем прямого фотолиза воды, а посредством энзиматических превращений образованных при фотосинтезе восстановленных углеродных соединений. Требуется выяснить, какой процесс более экономичен: получение кислорода и водорода в одной и той же клетке при разных метаболических режимах или использование специализированных организмов (например, клостридий), потребляющих фотосинтетически образованные органические соединения для выделения водорода. Проблема нуждается в изучении, в особенности ее экономические аспекты.

Наконец, внимание привлекает прямой синтез растениями ценных веществ, например углеводородов – натурального каучука. Следует отметить способность растений выделять непредельные углеводороды – этилен, изопрен (процессы, не связанные непосредственно с фотосинтезом).

Направление исследований:

5.1. Установление механизма процессов, ведущих к выделению молекулярного кислорода и водорода фотосинтезирующими организмами.

5.2. Выяснение возможностей создания высокоэффективных

фотосистем и иммобилизованных структур, способных с высокой эффективностью выделять водород на свету в течение длительного времени.

5.3. Разработка путей микробиологической переработки продуктов фотосинтеза с выделением горючих газов – метана, водорода.

5.4. Изучение связи между фотосинтезом и биосинтезом углеводов (изопреновых соединений и т.д.).

6. ФОТОРАЗЛОЖЕНИЕ ВОДЫ

При фотосинтезе растений в результате работы цепи переноса электрона происходит фотоокисление воды с выделением молекулярного кислорода и фотовосстановление пиридиннуклеотидов, которые используются в цикле восстановления углекислоты. Как уже упоминалось, одноклеточные водоросли в анаэробных условиях способны к выделению молекулярного водорода. Возникает вопрос, можно ли осуществить фоторазложение воды на кислород и водород, минуя цепь фотосинтетического переноса электрона или используя ее лишь частично. Возможность такого рода процесса в живых клетках или в хлоропластах еще до конца не выяснена, поскольку, по имеющимся данным, выделение водорода связано с работой углеродного цикла.

Таким образом, следует выяснить, возможно ли осуществить фотолиз воды в хлоропластах, не прибегая к участию углеродных циклов. Имеются данные, что хлоропласты способны выделять водород в присутствии экзогенных доноров водорода (например, НАДФН, цистеин), однако, до сих пор не удалось наблюдать одновременного выделения водорода и кислорода хлоропластами. Нужно выяснить возможность изолированных клеточных структур, а также интактных клеток к осуществлению фотолиза воды с использованием компонентов цепи переноса электрона и экзогенной гидрогеназы.

Независимой проблемой является фотохимическое разложение воды на водород и кислород без использования фотосинтетического аппарата. Фотолиз молекулы воды происходит в короткой ультрафиолетовой области спектра, в которой находится собственное поглощение воды. Задача заключается

в том, чтобы фотосенсибилизировать эту реакцию к более длинноволновой области спектра в пределах солнечного излучения, достигающего поверхности Земли (коротковолновая граница 300 нм). В настоящее время имеются данные о том, что некоторые неорганические фотокатализаторы – полупроводники (двуокись титана, окись цинка) – при возбуждении в области собственного поглощения (до 400 нм) способны к выделению молекулярного кислорода, сопряженного с восстановлением экзогенных окислителей, либо к восстановлению систем с потенциалом водородного электрода. С помощью этих соединений созданы фотоэлектрохимические системы, в которых под действием ультрафиолетового излучения наблюдается выделение водорода и кислорода. Квантовый выход этих процессов пока мал, и задача заключается в сенсибилизации этих реакций к более длинноволновой области спектра.

В качестве фотосенсибилизаторов фотолиза воды, помимо неорганических фотокатализаторов, могут использоваться органические фотосенсибилизаторы – красители, в том числе хлорофилл. Удалось создать системы, в которых сочетание фотохимических реакций хлорофилла с работой энзиматических систем (гидрогеназа) ведет к выделению водорода. Перспективным является создание искусственных мембран, в которые включены красители–сенсибилизаторы, и обеспечивается возможность разделения активного окислителя и восстановителя на разных сторонах мембраны.

Направление исследований:

6.1. Выяснение условий использования хлоропластов для выделения кислорода и водорода в присутствии экзогенных энзиматических систем (гидрогеназа и т.д.).

6.2. Использование неорганических фотокатализаторов для фотохимического разложения воды на кислород и водород с последующей реализацией электрохимического процесса.

6.3. Использование хлорофилла и синтетических красителей в качестве фотосенсибилизаторов выделения кислорода и водорода из воды в фотокаталитических системах и в искусственных мембранах.

7. ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ФОТОСИНТЕЗОМ

Действие света на растения определяет не только процесс фотосинтеза, но и разнообразные фотобиологические процессы, связанные с ростом и развитием растения. Сюда относятся различные виды фототаксиса и фототропизма, фотопериодическая реакция растения, фотодыхание, явления фотоморфогенеза, действие света на заключительные стадии биосинтеза хлорофилла и др. Процессы фотоморфогенеза управляются фитохромной системой, которая близка по своему химическому строению к фикобилинам.

За последние годы особый интерес вызывает процесс образования АТФ в галобактериях, обладающих в качестве пигментной системы бактериородопсином, пигментом, близким к родопсину зрительных органов. Образование АТФ галобактериями не связано с переносом электрона, что дает возможность изучать этот процесс в более простой мембранной системе. Работы в этом направлении разрабатываются по проекту "Родопсин".

Выяснение механизма перечисленных фотобиологических процессов чрезвычайно важно для осуществления направленного регулирования биосинтезов, происходящих в растениях.

Направление исследований:

7.1. Исследование механизмов светового образования АТФ в галобактериях с помощью бактериородопсина.

7.2. Исследование молекулярного механизма явлений фотоморфогенеза при участии фитохрома.

7.3. Исследование механизмов фототаксиса, фототропизма и других фотобиологических процессов.

7.4. Исследование световых стадий биосинтеза хлорофилла и других пигментов.

8. ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Согласно теории академика Опарина, основой для возникновения фотоавтотрофии послужила хорошо развитая гетеротрофия, возникшая в бескислородных условиях. Вопросы

происхождения и путей эволюции фотосинтеза имеют существенное значение для выяснения механизма преобразования энергии света при фотосинтезе. По-видимому, фотосинтез возник на определенной стадии биологической эволюции, когда содержание органических веществ абиогенного происхождения в среде резко уменьшилось.

Большие успехи, достигнутые в изучении механизма фотосинтеза различных организмов, стоящих на разных ступенях эволюции, дают возможность делать заключения о возможных путях эволюции пигментного аппарата, реакционных центров и компонентов цепи переноса электрона, а также ферментных систем, ответственных за процессы ассимиляции и восстановления CO_2. Проведение исследования механизма фотосинтеза в сравнительно-эволюционном аспекте открывает новые подходы для выяснения принципов преобразования световой энергии при фотосинтезе. Моделирование этого процесса с учетом условий, существовавших во время его возникновения на Земле, достаточно перспективно. Такие модели созданы как для части электронтранспортной цепи, ответственной за выделение кислорода, так и для части цепи, ответственной за образование НАДН. Для суждения о путях эволюции необходимо исследование органических веществ в докембрийских отложениях.

Направление исследований:

8.1. Моделирование происхождения механизма фотосенсибилизации в биологических мембранах.

8.2. Исследование путей эволюции механизма фотосенсибилизации с участием различных пигментов (флавинов, каротинов, НАД и НАДН, ферредоксинов, хлорофиллов и др.).

8.3. Выяснение принципов фотосенсибилизированного действия хлорофиллов как главного пути эволюции этого процесса.

8.4. Исследование эволюции фотосинтетических пигментов (хлорофиллов, каротинов, фикобилинов и др.).

8.5. Выяснение возможных путей эволюции фотосистем, включая цепь переноса электрона.

8.6. Исследование путей эволюции механизма фотосинтетической ассимиляции CO_2 и реакций его метаболизма.

8.7. Пути эволюции структуры фотосинтетического аппарата.

З А К Л Ю Ч Е Н И Е

Изучение преобразования энергии света при фотосинтезе на молекулярном уровне позволит в перспективе управлять обменом веществ фотосинтезирующих организмов и использовать принципы фотосинтеза растений для построения искусственных систем, преобразующих солнечную энергию. Проблема управления обменом веществ растения выходит далеко за рамки проблемы фотосинтеза, охватывая широкий круг вопросов биохимии и физиологии растений, и в дальнейшем послужит теоретической базой для решения агротехнических проблем.

Предполагается, что изучение механизма фотосинтеза позволит осуществить направленный обмен веществ с получением желаемых продуктов или регулирование метаболических процессов. На очереди направленное регулирование фотосинтетического метаболизма с целью преимущественного получения белков, липидов или углеводов. С этим связана проблема биосинтеза углеводов, хотя они и не являются прямыми продуктами фотосинтеза. К этой проблеме относится выделение водорода фотосинтетическими организмами, тесно связанное с углеродным метаболизмом в клетке. Выбор оптимальных метаболических режимов выделения водорода водорослями является одной из первоочередных задач, имеющих практическую направленность. Наконец, следует указать на явление фотодыхания, которое может приводить к окислению части первично образованных продуктов фотосинтеза и, таким образом, к растрате запасаемой энергии света; регулирование фотодыхания, вероятно, позволит повысить полезный выход продуктов фотосинтеза сельскохозяйственных растений. Имеются также данные об использовании изолированных клеточных структур (хлоропластов, хроматофоров, мембран галобактерий) для направленного фотосинтеза полезных продуктов, например АТФ.

Проблемой, имеющей исключительно большое практическое значение, является фотосинтетическая фиксация молекулярного азота. Выяснение механизма этого процесса у синезеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий позволит увеличить эффективность этого процесса и привести к значительной экономии связанного азота в ценозах, состоящих из водорослей и высших растений.

Независимой проблемой молекулярной биологии является использование методов генной инженерии для создания растений, способных к фиксации молекулярного азота.

Другой важнейшей проблемой, связывающей фотосинтез с вопросами технической микробиологии, является сочетание фотосинтезирующих организмов с гетеротрофными культурами, преобразующими органические продукты фотосинтеза в горючие газы, белки или легкоусвояемые метаболиты. Эта проблема привлекает большое внимание микробиологов; выше уже указывалось на получение этилового спирта, метана или водорода при сочетании одноклеточных водорослей с метанобразующими бактериями или клостридиями. Эта проблема далеко выходит за рамки фотосинтеза, однако познание энергетики и метаболизма фотосинтезирующих организмов (экскреции органических продуктов) позволит выяснить пути их сопряжения с гетеротрофными культурами. Здесь приобретает особое значение проблема биотехники и экономики, поскольку большую часть спирта, этилена, метана в настоящее время получают из нефти или натурального газа. Как известно, сырьем для синтетических волокон служат продукты переработки нефти, и вопрос использования, например, этилена биологического происхождения (из этилового спирта) нуждается в детальном экономическом анализе.

С другой стороны, выяснение принципов запасания энергии света и предотвращение обратных реакций первичных фотопродуктов позволит построить промышленные фотохимические системы, запасающие энергию света. Возможно создание искусственных мембран, в которые включены фоторецепторы; создается возможность осуществления окислительных и восстановительных процессов на разных сторонах мембраны, несущей пигменты–фоторецепторы.

Фотосинтез растений по диапазону окислительно–восстановительных потенциалов соответствует фотолизу воды на кислород и водород. При фотосинтезе этот процесс осуществляется двухступенчатым путем. Используя кванты большой величины, можно пытаться осуществить "одноквантовый" фотолиз воды, применяя разнообразные фоторецепторы. Существенно изучение "многоквантовых" процессов, при которых использование квантов малой величины может вести к фотолизу воды. В более далекой перспективе – моделирование восстановления углекислоты в искусственных системах.

Проблема запасания энергии света при фотосинтезе непосредственно связана с общими проблемами теоретической и экспериментальной фотохимии и фотобиологии. Сюда относится изучение возбужденных состояний и первичных фотопродуктов, их стабилизация и предотвращение обратных реакций, сопряжений первичных фотопроцессов с каталитическими реакциями, которые перерабатывают первичные фотопродукты.

Таким образом, проблема преобразования солнечной энергии при фотосинтезе связана, с одной стороны, с проблемой продуктивности сельского хозяйства и развитием микробиологической промышленности, а с другой стороны – с общими проблемами фотохимии, мембранологии и молекулярной биологии. Эти обстоятельства приводят к необходимости координации работ по биологическому использованию солнечной энергии по всем перечисленным выше направлениям, что является трудной задачей, требующей неотложного решения.

С О Д Е Р Ж А Н И Е

Введение. 3

1. Молекулярные основы первичного преобразования энергии света при фотосинтезе. 4

2. Работа цепи фотосинтетического переноса электрона. 8

3. Молекулярная организация фотосинтетического аппарата и его формирование в процессе биосинтеза. 10

4. Изучение продуктов фотосинтеза и фотосинтетической ассимиляции углерода и азота. 11

5. Использование фотосинтеза в энергетических целях. Фотосинтетическое выделение водорода 13

6. Фоторазложение воды. 15

7. Фотобиологические явления, связанные с фотосинтезом. 17

8. Происхождение и эволюция фотосинтеза. 17

Заключение. 19

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА
ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ
(рекомендации Научного совета по перспективам исследований)

Отредактировано и подготовлено к печати в Отделе научно-технической информации НЦБИ

Редактор Т.К.Тевзиева
Технический редактор С.М.Ткачук
Корректор Т.К.Крейцер

Подписано в печать 9/I-79 г. Т-03814. Уч.-изд. л. 1,0. Физ. печ. л. 1,4. Формат 60x90/16. Тираж 300 экз. Бумага офсетная. Заказ 5943Р. Изд. № 93

Отпечатано на ротапринте в Отделе научно-технической информации Научного центра биологических исследований АН СССР в Пущине



АЛЕКСАНДР АБРАМОВИЧ КРАСНОВСКИЙ — биохимик и биофизик, академик, заведующий лабораторией Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.
Основное направление исследований — изучение молекулярных механизмов фотосинтеза и фотобиологических процессов.

ПУТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

Энергетика фотосинтеза

Жизнь на Земле основана на фотосинтезе растений, который обеспечивает организмы пищей и кислородом. Кислородная атмосфера Земли создана именно в результате фотосинтетической деятельности растений. Энергетика человечества в настоящее время на 95% обеспечивается сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза (угля, нефти, газа) и лишь в малой мере покрывается атомными и гидроэлектростанциями. По некоторым прогнозам на 2000 г., до 80% потребности человечества в энергии по-прежнему будет удовлетворяться сжиганием продуктов фотосинтеза. Кроме того, значительная часть сырья для промышленности и строительных материалов также имеет фотосинтетическое происхождение.

Таким образом, зависимость человечества от преобразования солнечной энергии растениями сохранится надолго, до эпохи технического овладения термоядерной энергией, которая, как наде-

ются, должна обеспечить грядущие потребности человеческого общества.

В основе преобразования солнечной энергии растениями лежит суммарная реакция образования кислорода и углеводов из воды и углекислоты:

$$H_2O + CO_2 = O_2 + 1/6\ C_6H_{12}O_6$$

Запасание энергии ($+\Delta F$) при этой реакции составляет 120 ккал. Такую реакцию можно осуществить, лишь подводя энергию извне. Поэтому образование кислорода и сахаров из воды и углекислоты в принципе нельзя осуществить путем каталитических реакций, тогда как обратный, термодинамически вероятный процесс (окисление углеводов кислородом) осуществляется в организмах при дыхании с использованием разнообразных ферментов биокатализаторов.

Хлорофилл и другие пигменты растений — антенна, которая улавливает излучение солнца и преобразует его в химическую энергию продуктов фотосинтеза.

Максимум поглощения у хлорофилла в области красного света (680 нм). Энергия одного эйнштейна* здесь около 40 ккал. Для компенсации дефицита свободной энергии реакции фотосинтеза потребуется (120–40) минимум 3 кванта красного света на молекулу выделяющегося кислорода или ассимилируемой углекислоты. При фотосинтезе одноклеточных водорослей в оптимальных условиях при низких интенсивностях света расходуется от 8 до 12 квантов на молекулу усваиваемой углекислоты. Если принять среднюю величину 10 квантов, то максимальный достижимый коэффициент полезного действия фотосинтеза (т. е. преобразования поглощенной солнечной энергии в потенциальную химическую энергию) составляет 30%. Остальные 70% энергии квантов солнечного света, поглощенного хлорофиллом, в конечном счете преобразуются в тепло. Эта избыточная энергия расходуется для преодоления потенциальных барьеров промежуточных реакций, на обратные реакции активных фотопродуктов и, возможно, используется для других внутренних нужд зеленой клетки.

В спектре солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, коротковолновая граница (300 нм) определяется поглощением коротковолнового ультрафиолета слоем озона в верхних слоях атмосферы. Приблизительно половина энергии солнечного излучения лежит в видимой области спектра (до 700 нм), которая является фотосинтетически активной радиацией (ФАР), и около

* Эйнштейн — единица измерения количества квантов света, применяемая в фотохимии. 1 эйнштейн = $6{,}02252 \cdot 10^{23}$ кванта монохроматического света.

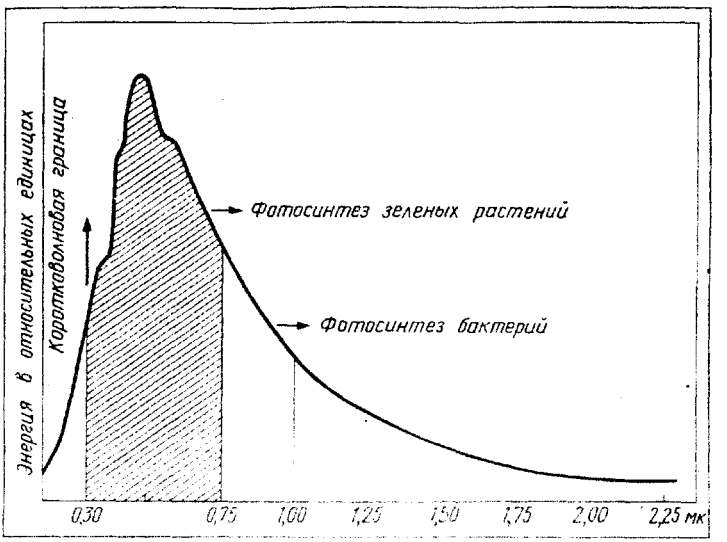


Рис. 1. Распределение энергии в солнечном спектре. Отмечены области, которые используют для фотосинтеза зеленые растения и фотосинтезирующие бактерии

половины энергии лежит в инфракрасной области спектра, которая не используется растениями для фотосинтеза. Следует, однако, отметить, что существуют фотосинтезирующие бактерии, содержащие бактериохлорофилл *b*, которые могут использовать излучение с длиной волны до 1 мк (рис. 1).

Таким образом, лишь половина энергии солнечного излучения представляет собой фотосинтетически активную радиацию. Поэтому следует полагать, что максимально возможное использование солнечной энергии при фотосинтезе составляет не более 15%.

Возникает вопрос, как в действительности используется солнечное излучение поверхностью нашей планеты? Грубые подсчеты показывают, что в среднем не более 0,1 % солнечного излучения, падающего на поверхность Земли, идет на фотосинтез растений суши и планктона океана. Но и эта величина в 10 раз превышает все энергетические затраты человечества (табл. 1).

Таблица 1

Использование солнечной энергии на Земле

Энергия	Джоулей в год	%
Падающая на поверхность Земли	$3 \cdot 10^{24}$	100
Запасаемая при фотосинтезе	$3 \cdot 10^{21}$	0,1
Используемая в виде пищи	$1{,}5 \cdot 10^{19}$	0,001
Энергетические затраты человечества (1970 г.)	$3 \cdot 10^{20}$	0,01

Из общей продукции фотосинтеза на суше менее 1% используется в качестве пищи. Еще меньше мы потребляем фотосинтетических продуктов океана, причем в пищу идет в основном рыба, находящаяся в самом конце биологической цепи, поэтому использование первичной продукции фотосинтеза океанов не превышает сотых долей процента.

Молекулярный механизм фотосинтеза

Даже наиболее продуктивные растения используют для фотосинтеза лишь малый процент доступной солнечной энергии: сахарный тростник — в среднем за год не больше 2%, а зерновые культуры до 1%. По существу, повышение полезного использования солнечной энергии растениями и растительными сообществами становится главной проблемой физиологии растений и агротехники*.

Чтобы управлять фотосинтетической деятельностью растений, нужно знать, как происходит в них процесс преобразования солнечной энергии.

Для фотосинтезирующей клетки наиболее характерны органы, улавливающие энергию квантов. Это хлоропласты у растений и хроматофоры у бактерий, заполняющие все клетки фототрофного организма. В этих органах, обладающих мембранной структурой, сосредоточен весь хлорофилл и другие пигменты, улавливающие энергию света, и энзиматические системы, участвующие в темновых стадиях фотосинтетических реакций.

Весь процесс фотосинтеза у организмов, содержащих хлорофилл, можно разделить на две основные части: цепь фотосинтетического переноса электрона и углеродный цикл.

* Подробнее об этом см. в статье А. А. Ничипоровича «Фотосинтез и «сумма жизни» на Земле», опубликованной в седьмом выпуске ежегодника «Будущее науки» (1974 г.). — Ред.

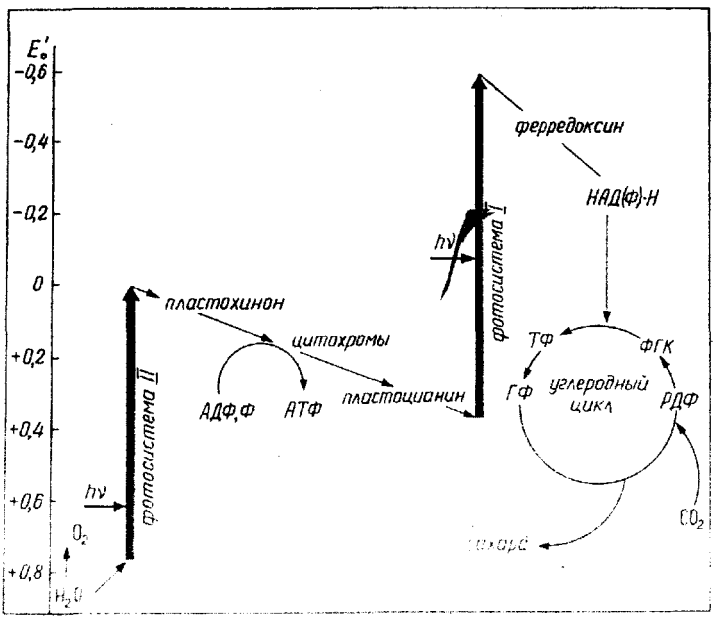


Рис. 2. Механизмы фотосинтеза растений: цепь переноса электрона с образованием АТФ и НАД(Ф)·Н и углеродный цикл

В результате работы цепи фотосинтетического переноса электрона образуются НАД(Ф)·Н или НАДН — восстановленные никотинамидадениндинуклеотидфосфаты — и аденозинтрифосфат (АТФ) — продукты, запасающие энергию солнечного излучения. НАД(Ф)·Н и АТФ поступают в углеродный цикл, работа которого не требует непосредственно энергии света.

Механизм работы углеродного цикла растений и большинства фототрофных бактерий был расшифрован преимущественно путем применения долгоживущего изотопа углерода ^{14}C в 50-х гг. За эти работы американский химик М. Калвин был удостоен Нобелевской премии. Принципы работы этого цикла заключаются в следующем (рис. 2): углекислота, поступающая в углеродный цикл, связывается с акцептором — рибулезодифосфатом (РДФ), далее образуется фосфоглицериновая кислота (ФГК), которая, восстанавливаясь при помощи НАД(Ф)·Н, образует триозофосфат (ТФ) и далее

гексозофосфат (ГФ) и сахара, выходящие из цикла. Часть промежуточных соединений путем сложных превращений возвращается в цикл и приводит к регенерации рибулезодифосфата.

Преобразование энергии света в химическую энергию осуществляется в цепи фотосинтетического переноса электрона, которая у фотосинтезирующих растений использует в качестве исходного донора водорода молекулу воды, что ведет к выделению молекулярного кислорода. Фототрофные бактерии используют в этом процессе органические или неорганические доноры водорода, их метаболизм протекает в большинстве случаев в анаэробных условиях, и они не способны к фотохимическому выделению кислорода.

Усилиями многих лабораторий обоснована последовательность фотохимических и энзиматических реакций, при которых энергия квантов света используется дважды в различных участках цепи для последовательного поднятия электрона от уровня кислородного до уровня водородного электрода, т. е. от 0,8 до −0,42 в.

На рис. 2 схематично показана фотосинтетическая цепь переноса электрона. Электрон от молекулы воды за счет энергии света, поглощаемой хлорофиллом так называемой фотосистемы II, переносится к пластохинонам, а затем через цитохромы и пластоцианин поступает к фотосистеме I, которая поднимает электрон до уровня ферредоксина, что обеспечивает возможность восстановления пиридиннуклеотидов.

Все эти реакции происходят в мембранах хлоропластов. Путем применения тонких методов разборки биологических структур, детергентов (поверхностно-активных веществ) и изощренной техники разделения удается изолировать фотосистемы друг от друга и исследовать их функции.

В каждой фотосистеме главная масса хлорофилла представляет собой улавливающую свет антенну, а гораздо меньшая часть пигмента находится в реакционных центрах, непосредственно участвующих в цепи переноса электрона. Энергия света, поглощаемая хлорофиллом, мигрирует к реакционным центрам, где происходит первичный фотохимический процесс.

Используя соответствующую технику, в ряде случаев удается выделить также сами реакционные центры и изучить происходящие в них процессы переноса электрона.

В настоящее время наиболее изучены реакционные центры, выделенные из фотосинтезирующих пурпурных бактерий. В этих центрах содержится бактериохлорофилл, его безмагниевый аналог — бактериофеофитин, а также доноры и акцепторы электрона, смонтированные на белково-липидных структурах. Существенно то, что квантовый выход первичного переноса электрона в реакционных центрах достигает единицы, и механизм их работы определяет пути первичного преобразования энергии света.

Так как основными компонентами реакционных центров являются молекулы хлорофилла и феофитина, то нужно представить ясно природу элементарного действия света на эти пигменты.

Фотохимия хлорофилла

В Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР в течение многих лет изучалась фотохимия хлорофилла и его аналогов: обратимые и необратимые превращения хлорофилла под действием света*. Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в кратковременное (так называемое синглетное) возбужденное состояние, длящееся около 10^{-9} с. Синглетное возбужденное состояние с некоторой потерей энергии переходит в длительноживущее (триплетное) состояние хлорофилла.

Возбужденные синглетные и триплетные молекулы хлорофилла (Хл*) обладают повышенной реакционной способностью. Их взаимодействие с молекулой донора или акцептора электрона приводит к первичному фотохимическому процессу (рис. 3), при котором возбужденная молекула хлорофилла отдает электрон акцептору (А) или воспринимает электрон от донора (Д). При этом образуется пара ион-радикалов: катион- или анион-радикал хлорофилла и радикалы молекулы партнера:

$$Хл^* + Д \rightleftharpoons Хл^- + Д^+$$
$$Хл^* + А \rightleftharpoons Хл^+ + А^-$$

Эти реакции быстро обратимы. Промежуточно образующиеся радикальные формы хлорофилла могут участвовать в процессе фотохимического переноса электрона. Сравнительное исследование фотохимических свойств хлорофилла и его безмагниевого аналога феофитина показало, что возбужденный хлорофилл обладает большей склонностью к отдаче электрона, а возбужденная молекула феофитина — к восприятию электрона. Фундаментальная способность возбужденных молекул хлорофилла и его аналогов к обратимому переносу электрона лежит в основе действия пигментов в реакционных центрах.

Реакционные центры

Согласно работам Клейтона, Даттона и других (США), в состав реакционных центров фотосинтезирующих пурпурных бактерий

* Подробнее об этом можно прочесть в книге А. А. Красновского «Преобразование энергии света при фотосинтезе; молекулярные механизмы». М., «Наука», 1974. — Ред.

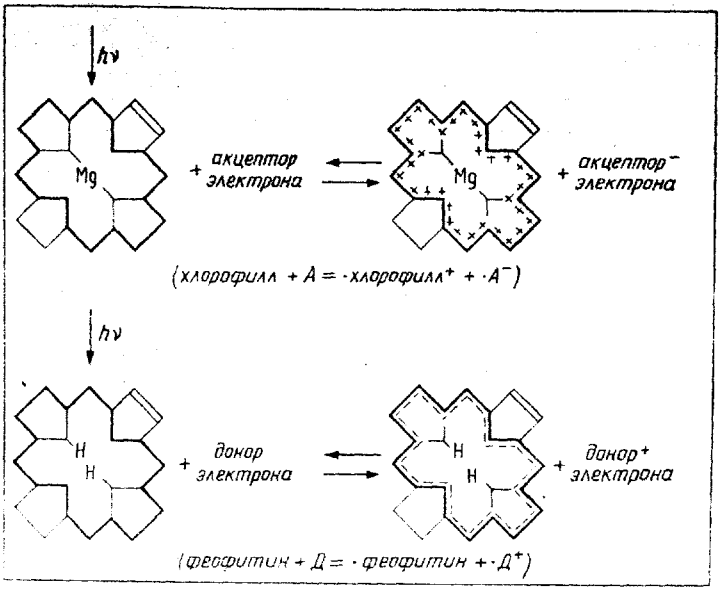


Рис. 3. Обратимое фотоокисление и фотовосстановление хлорофилла и его безмагниевого аналога — феофитина

входят 3 субъединицы белка, 4 молекулы бактериохлорофилла, 2 молекулы бактериофеофитина, 1—2 атома железа в комплексе с убихиноном. Бактериохлорофилл в центрах находится в агрегированном состоянии.

Применение лазерной и импульсной спектроскопии позволило определить длительность элементарных актов переноса электрона в реакционном центре. Так, например, Даттон, Роклей и другие (1975 г.) установили последовательность разделения зарядов между молекулами бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона, входящих в состав реакционных центров бактерий. По данным Шувалова и других советских исследователей, при поглощении света происходит перенос электрона от димера бактериохлорофилла с максимумом поглощения 870 нм за время 10 пс (пикосекунда = 10^{-12} с) к другой форме бактериохлорофилла с максимумом поглощения 800 нм. Далее происходит перенос электрона к бактериофеофитину (*BPheo*) за время около 30 пс. В свою оче-

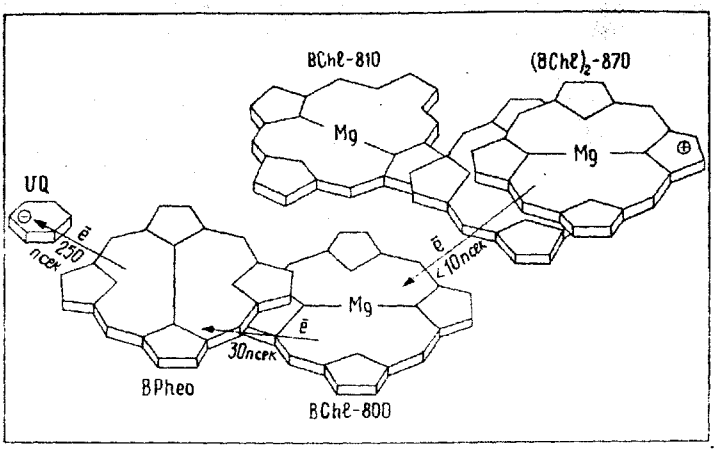


Рис. 4. Перенос энергии в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий

редь, электрон от восстановленной формы бактериофеофитина воспринимается убихиноном (рис. 4) за время около 250 пс.

Эти элементарные процессы приводят к пространственному разделению зарядов между димером бактериохлорофилла *BChl-870* (форма с максимумом поглощения 870 нм) и убихиноном (*UQ*) с квантовым выходом около единицы. Состояние реакционного центра с разделенными зарядами обладает большой длительностью жизни — до 0,1 с и принимает непосредственное участие в цепи фотохимического переноса электрона. Фотоперенос электрона от бактериохлорофилла к убихинону в реакционных центрах американские авторы наблюдали при температуре жидкого гелия. Это указывает на то, что перенос электрона в центрах происходит по так называемому туннельному механизму. Вероятно, особенности пространственного расположения молекул бактериохлорофилла и бактериофеофитина в реакционных центрах благоприятствуют эффективному разделению зарядов.

Реакционные центры I и II фотосистем зеленых растений пока не удалось выделить в достаточно чистом виде, хотя в препаратах, обогащенных центрами фотосистемы II, удалось наблюдать фотохимический перенос электрона от хлорофилла к феофитину с образованием восстановленной формы этого пигмента (А. В. Клеваник, В. В. Климов, В. А. Шувалов, А. А. Красновский, ДАН СССР, 236, 241, 1977 г.). Таким образом, вероятно, что система

хлорофилл — феофитин является универсальным участником эстафетного переноса электрона в реакционных центрах.

Фотосистемы и цепь переноса электрона смонтированы в мембранах хлоропластов и хроматофорах таким образом, что образующиеся активные окислители и восстановители пространственно разобщены на разных сторонах мембраны. Это определяется спецификой молекулярной организации цепи переноса электрона в мембранах. В настоящее время распространена теория Митчела, которая постулирует анизотропное расположение цепи переноса электрона в мембранах и непроницаемость мембраны для ионов водорода*.

Переходя к рассмотрению перспектив биологического использования солнечной энергии, можно наметить нижеследующие главные направления.

Моделирование фотосинтеза

Отсутствие значительных термодинамических ограничений в преобразовании энергии квантов света в потенциальную химическую энергию допускает осуществление фотохимических реакций с коэффициентом полезного действия, значительно превышающим максимальный КПД фотосинтеза растений.

В лабораторных условиях при построении таких искусственных систем в качестве фоторецепторов используют хлорофилл и другие разнообразные пигменты, изолированные клеточные структуры, содержащие пигменты, а также ферментные системы, выделенные из клеток.

Так, например, в нашей лаборатории создана фотобиохимическая система, в которой осуществлено фотовыделение водорода в мицеллах (коллоидных частицах) детергентов, включающих хлорофилл, бактериальную гидрогеназу, доноры электрона и метилвиологен.

Процесс фотохимического разделения зарядов удается моделировать с помощью неорганических полупроводников-фотокатализаторов. Используя двуокись титана или окись цинка, в нашей лаборатории удалось наблюдать фотосенсибилизированное выделение кислорода либо фотохимическое образование водорода.

В настоящее время интенсивно изучаются фотоэлектрохимические процессы с участием хлорофилла и других красителей, при которых не происходит накопления продуктов, запасающих энергию света, а образуется разность потенциалов. Японские авторы использовали для этого электрод, покрытый двуокисью титана, что

* О механизме работы мембран и путях трансформации энергии света в электрическую энергию см. в обзоре В. П. Скулачева, опубликованном в журнале «Успехи современной биологии», 84, с. 165 (1977).

является электрохимическим вариантом осуществленных ранее в нашей лаборатории опытов с суспензиями двуокиси титана и окиси цинка.

Весьма эффективный путь исследования фотосистем — создание искусственных мембран, в которых активные продукты, образующиеся фотохимическим путем, разделяются на разных сторонах мембраны. Большое внимание привлекает включение в искусственные липидные мембраны пигментных систем с целью образования АТФ или воспроизведения отдельных стадий переноса электрона в искусственных условиях.

Конечно, исследования такого рода не должны слепо копировать фотосинтетический аппарат растения, возникший в процессе биологической эволюции. Весьма вероятно конструирование эффективных фотохимических систем, построенных более просто, чем биологические системы.

Продуктивность растений и энергоемкость сельского хозяйства

Наиболее практически важной является глобальная проблема повышения эффективности использования солнечной энергии культурными растениями и понижения энергозатрат, основанных на использовании ископаемых продуктов фотосинтеза. Добиваться высокой продуктивности культурных растений нельзя без полного удовлетворения их нужд в воде и необходимых минеральных компонентах. Высокие урожаи требуют механизации трудоемких процессов, применения удобрений, гербицидов и т. д.

За высокие урожаи нужно расплачиваться быстро растущими уровнями энергетических затрат. Чрезвычайно интересные данные об энергозатратах сельского хозяйства (отношение количества запасаемой солнечной энергии к энергозатратам) приводит английский ученый Д. Холл* (табл. 2).

Экстенсивное земледелие начала нашего столетия было связано с преимущественным запасанием солнечной энергии культурными растениями, и энергозатраты были незначительны (отношение 20).

При современном интенсивном земледелии, например, высоких урожаях кукурузы, это соотношение приближается к 2, что говорит о громадном количестве энергии, потребной для орошения, производства удобрений, расходуемой тракторами, автомобилями и прочими механизмами. Д. Холл отмечает, что, например, в Англии по сравнению с США культура кукурузы менее энергоемка (соотношение составляет 6—8), так как в качестве кормов используется

* D. Hall. Solar Energy, Ed. UK ISES L. (1976).

Таблица 2

Энергоемкость сельского хозяйства

Хозяйственная отрасль	Отношение запасенной энергии к энергозатратам
Экстенсивное земледелие	20
Интенсивное земледелие	2
Животноводство	0,2
Тепличное хозяйство	0,02

биомасса почти всего растения, тогда как в США большей частью только зерно.

В тепличном хозяйстве энергозатраты намного превосходят использование солнечного излучения. В случае животноводства они весьма велики, поскольку не более 10% химической энергии корма превращается в химическую энергию синтезируемых в организме животных мяса и жира.

По данным американских авторов*, на 1 кал пищи, достигающую потребителя, затрачивается до 10 кал энергии за счет работы разнообразных механизмов, транспорта, упаковки, системы снабжения и т. д.

Таким образом, в наш век в экономически развитых странах пища производится, по существу, не столько путем преобразования современной солнечной энергии, сколько путем расточительного расходования ископаемых продуктов фотосинтеза (угля, нефти и т. п.). Снижение этих затрат — насущная проблема науки и практики.

Хотя агротехника прошлого требовала преимущественной затраты мускульной силы человека и животных, однако в силу недостаточной продуктивности с единицы поверхности Земли она не могла удовлетворить потребности в пище быстрорастущего населения. Поэтому в развитых странах неизбежным был переход к высокопродуктивному земледелию, которое является крайне энергоемким. В условиях, когда громадное количество горючего из нефти расходуется в сельском хозяйстве, следует внимательно рассмотреть с технико-экономических позиций путь микробиологического получения белков из нефти, минуя использование нефтяного горючего в сложном хозяйстве современной агротехники.

С проблемой повышения эффективности использования

*J. S. Steinhart. Science, 184, с. 307—316 (1974).

солнечной энергии культурными растениями тесно связано изучение механизмов регуляции фотосинтетической деятельности растений, их продуктивности, и в нее входит обширный комплекс исследований по физиологии растений и агротехнике.

Биологическая фиксация азота

При выращивании высокоурожайных культур расход энергии на производство азотных удобрений путем химической фиксации азота атмосферы достигает 30—50%. Поэтому проблема биологической фиксации азота имеет большое значение для снижения энергоемкости сельского хозяйства.

Древние фотосинтезирующие организмы — прокариоты, фотосинтезирующие бактерии, включая цианобактерии (синезеленые водоросли) — способны фиксировать молекулярный азот воздуха за счет использования химической энергии продуктов фотосинтеза. Дальнейшая эволюция растений пошла по пути специализации функций: зеленые водоросли и высшие растения утратили способность к фотосинтетической фиксации азота. Поэтому культурные злаковые растения приходится снабжать химически связанным азотом. При высоких урожаях количество вносимых азотных удобрений достигает огромной величины: так, по данным ФАО, в Голландии вносят до 0,4—0,5 т азота на 1 га зерновых.

У бобовых растений потребность в азоте удовлетворяется, как известно, за счет симбиоза с клубеньковыми бактериями (живущими на корнях), которые способны к гетеротрофной фиксации молекулярного азота. Этот процесс может быть весьма эффективным, так, например, растения сои при избыточном снабжении углекислотой могут фиксировать до 0,4 т азота за счет работы клубеньковых бактерий.

Возможный путь усвоения молекулярного азота — симбиоз растений с бактериями-азотфиксаторами, которые были бы способны жить не только на корнях бобовых, но и на корнях злаковых. Исследования, ведущиеся в этом направлении, весьма перспективны. Обсуждается также вопрос о том, чтобы с помощью методов генной инженерии вернуть высшим растениям способность к фиксации молекулярного азота, которую они утратили в процессе биологической эволюции.

Чрезвычайно важно также исследовать пути использования в земледелии автотрофных фотосинтезирующих азотфиксаторов, таких, как синезеленые водоросли, пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии. На рисовых полях Индии, Индонезии, Японии синезеленые водоросли обеспечивают значительную часть потребного рисовым растениям азота. На почвах средней полосы фотосинтетическое связывание азота может быть значительно

увеличено путем применения хорошо подобранных культур. Наконец, исследование механизма фиксации азота синезелеными водорослями и фотосинтезирующими бактериями позволит выяснить связь его с фотосинтезом. Имеются, например, данные о том, что энзиматическая система азотфиксаторов, восстанавливающая молекулярный азот, использует органические продукты фотосинтеза в качестве доноров водорода и источника богатого энергией аденозинтрифосфата, однако проблема взаимосвязи фотосинтеза с азотфиксацией еще ждет своего решения.

Изменение путей фотосинтетического метаболизма

Наибольшее внимание привлекает фотообразование водорода, фотоассимиляция молекулярного азота, а также повышение эффективности биосинтеза углеводородов (например, каучука) или липидов фотосинтезирующими организмами.

Американский ученый Гаффрон обнаружил в 1942 г., что одноклеточные водоросли в анаэробных условиях теряют способность к выделению кислорода, а вместо этого выделяют газообразный водород. Исследование механизма этого процесса показало, что выделение водорода происходит с участием фермента гидрогеназы и тесно связано с углеродным обменом фотосинтезирующей клетки. Этой проблеме посвящено большое количество работ и обзоров (Е. Н. Кондратьева. И. Н. Гоготов. Изв. АН СССР, сер. биол., 1976, № 1, 69; А. А. Красновский. Изв. АН СССР, сер. биол., 1972, № 1, 87).

Остается неясным, в какой степени эффективность фотообразования водорода связана с использованием продуктов фотосинтеза внутри той же клетки и не будет ли более рациональным сочетание фотосинтетических организмов с другими специфическими организмами, перерабатывающими органическое вещество с выделением водорода или метана. Для фотосинтетического выделения водорода могут использоваться не только клетки водорослей, но и изолированные хлоропласты, освещение которых в присутствии гидрогеназы (выделенной из бактерий) также ведет к выделению водорода. В перспективе следует оценить экономическую эффективность получения водорода при фотосинтезе по сравнению с электролизом воды, с использованием, например, атомных электростанций или солнечных батарей.

Использование биомассы

Главная масса органического вещества, производимого растениями, приходится на целлюлозу (до 10^{11} т в год). Значительное

количество целлюлозы используется человечеством в качестве топлива и в виде строительных материалов. Однако в основном фотосинтетически образованная целлюлоза вступает в биологический круговорот, вовлекаясь в разнообразные процессы окисления и распада.

Чрезвычайно важна проблема рационального использования биомассы — древесины, стеблей, листьев, корней растений, громадного количества отходов, содержащих целлюлозу (древесные отходы, бумага и т. д.). Чаще всего такую биомассу используют путем ее микробиологической переработки в пищевые и технические продукты, а также в горючие газы (в энергетических целях).

Поэтому переработка и использование биомассы, образуемой при фотосинтезе (в основном целлюлозы), и органических отходов для пищевых и энергетических целей — в значительной степени микробиологическая проблема. Важной стадией является химическая или энзиматическая переработка целлюлозы для последующего микробиологического синтеза белка, образования спиртов или горючих газов — метана и водорода.

Один из путей использования биомассы в энергетических целях связан с селекцией растений, обладающих способностью эффективно улавливать солнечную энергию для получения наибольшей суммарной биомассы. Поиски оптимальных путей использования биомассы тесно связаны с необходимостью решения сложнейших технологических и экономических вопросов, выборов того или иного пути сбора и переработки сырья и отходов.

Можно предполагать, что усовершенствование технологии сбора и использования растительной биомассы и органических отходов поможет обеспечить значительную часть кормовых потребностей животноводства и различных энергетических нужд человечества.

Заключение

Сравним фотосинтез растений с другими способами использования солнечной энергии. Мы уже указывали на то, что предел полезного использования всей энергии солнечного излучения при фотосинтезе растений достигает 15%. Кремниевые солнечные батареи, которые применяются для энергообеспечения спутников, используют до 20% излучения Солнца. В перспективе преобразование солнечной энергии фотополупроводниковыми устройствами может достигать гораздо более высокой величины, тем более что в этих устройствах возможно частичное использование инфракрасной области излучения Солнца, чего нет в растениях.

В тепловых машинах использование солнечной энергии при

высокой температуре теплоносителя, по-видимому, может достигать КПД не меньшего, чем при фотосинтезе.

Препятствием к широкому использованию энергии солнца при ныне существующей технологии является то, что установочная стоимость киловатта солнечных электростанций пока в сотни раз выше, чем обычных тепловых и атомных электростанций. Однако технология солнечной энергетики развивается очень быстро, что позволяет надеяться на экономически целесообразные решения уже в ближайшем будущем. Одно из них — отопление домов с помощью автономных устройств, технология которых разработана; не следует забывать того, что в средних широтах до 40% энергии расходуется на отопление жилищ.

Быстрое развитие полупроводниковой технологии позволяет надеяться, что в будущем солнечные батареи будут основными преобразователями энергии Солнца в электроэнергию, тогда как источником пищи и кислорода надолго останется фотосинтез растений.

Развитие человеческого общества неизбежно требует более полного овладения и использования солнечной энергии, и трудно сомневаться, что биологический путь останется важнейшим на долгие годы.

УДК 541.145

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Академик А.А. КРАСНОВСКИЙ, Г.П. БРИН, А.Н. ЛУГАНСКАЯ, В.В. НИКАНДРОВ

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ СУЛЬФИДОМ КАДМИЯ

Ранее в нашей лаборатории изучали фотокаталитическое действие окислов цинка, титана и вольфрама, обладающих поглощением в близкой ультрафиолетовой области спектра. В водных суспензиях этих соединений удалось наблюдать фотосенсибилизированное выделение кислорода ([1-3]), восстановление метилвиологена и выделение водорода ([4, 5]). Следовало выяснить возможность осуществления этих реакций под действием видимого света.

В отличие от окислов титана и цинка, поглощение которых лежит в у.-ф. области спектра, поглощение CdS простирается в видимую область до 600 нм. Мы исследовали фотосенсибилизирующее действие этого соединения. Фотообразование H_2O_2 в водных суспензиях CdS было описано ранее ([6]).

Мы использовали два препарата CdS: люминофорный и полученный нами следующим образом: раствор $CdSO_4$ (х.ч. "Реахим") продували H_2S в кислой среде; полученный осадок CdS фильтровали, промывали и сушили при 150 °С. Оба препарата обладали близкой фотохимической активностью.

Поглощение кислорода измеряли микроманометрическим методом Варбурга. Сосуды с 10 мл водной суспензии 25 мг CdS освещали со стороны дна лампы накаливания (10^5 эрг/см^2 · с) или лампой ПРК-2 в стеклянной муфте ($5 \cdot 10^6$ эрг/см^2 · с). Тепловым фильтром служил слой воды термостата. Для определения H_2O_2 применяли метод измерения хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы ([7]). За восстановлением метилвиологена следили по увеличению оптической плотности при 605 нм; в этом случае опыты проводили в трубке Тунберга, приспособленной для измерения поглощения в сфере Ульбрихта спектрофотометра СФ-14. Водород измеряли с помощью газового хроматографа ([8]).

В описанных опытах с ZnO и TiO_2 наблюдалось выделение кислорода в присутствии феррицианида и хинона; в отличие от этого в водных суспензиях CdS нам не удалось наблюдать выделения кислорода.

При освещении водной суспензии CdS в присутствии кислорода воздуха наблюдается образование H_2O_2 в согласии с работой ([6]). В зависимости от длительности освещения суспензии CdS выход H_2O_2 вначале возрастает, затем наступает насыщение реакции.

Мы сопоставили кинетику образования H_2O_2 на CdS и TiO_2 и ZnO. При освещении линиями ртути 365 нм двуокись титана образует H_2O_2 на два порядка

меньше, чем ZnO и CdS (табл. 1). Это явление можно объяснить фотосенсибилизированным разложением перекиси водорода на двуокиси титана ([9]).

Таблица 1

Средняя скорость образования H_2O_2 и поглощение O_2 (моль / /мин) · 10^4

Фотокатализатор	H_2O_2	O_2
CdS	0,12	0,15
ZnO	0,32	0,32
TiO_2	$0{,}05 \cdot 10^{-2}$	$3{,}0 \cdot 10^{-2}$

Стехиометрия поглощения O_2 и образования H_2O_2 за 10 мин освещения у.-ф. светом показывает следующее (см. табл. 1). В случае ZnO это соотношение близко к единице, т.е. практически весь поглощенный O_2 превращается в H_2O_2. При использовании CdS и TiO_2 кислорода поглощается больше, чем образуется H_2O_2. Расхождение увеличивается с возрастанием времени освещения, что, очевидно, связано с возможным фоторазложением H_2O_2 как темновым путем, так и при освещении TiO_2 и CdS.

Ранее мы нашли, что добавление метилвиологена к водным суспензиям ZnO и TiO_2 приводит при освещении к увеличению количества H_2O_2 за счет взаимодействия восстановленного метилвиологена с кислородом воздуха ([5]). Подобным образом метилвиологен активирует образование H_2O_2 в суспензиях CdS (рис. 1). Квантовый выход образования H_2O_2 достигал 1%.

Освещение видимым светом водной суспензии CdS в вакууме с метилвиологеном ведет к образованию синей восстановленной формы метилвиологена, которая обратимо окисляется после пуска воздуха. В контрольном опыте в отсутствие фотокатализатора фотовосстановления метилвиологена не происходит. С фотокатализатором глубина и скорость восстановления метилвиологена увеличиваются с повышением pH раствора до 12 (рис. 2). Освещение водной суспензии, содержащей сульфид кадмия и метилвиологен, приводит к смещению pH раствора в кислую сторону, что ведет к снижению скорости восстановления метилвиологена, вследствие чего реакцию изучали в водных буферных растворах.

Введение доноров электрона — тиомочевины, глицина и гидразина увеличивает скорость и глубину реакции (см. рис. 2). В присутствии глицина наблюдается полное восстановление метилвиологена при pH раствора от 6 до 12; дальнейшее освещение приводит к падению оптической плотности раствора при 605 нм и обесцвечиванию суспензии. По-видимому, при этом происходит дальнейшее восстановление синего катион-радикала метилвиологена ($MB^{\cdot+}$) до дигидроформы (MB).

Для проверки этого предположения поставлен следующий опыт. Метилвиологен был фотовосстановлен в вакуумной трубке Тунберга в водной суспензии CdS в присутствии глицина (0,02 *M*) сначала до синей формы, а затем, при дальнейшем освещении — до бесцветной. Затем в вакууме в темноте из "головки" трубки Тунберга к продуктам реакции был прилит раствор метилвиологена (10^{-4} *M*). Наблюдалось посинение раствора и увеличение оптической плотности при 605 нм на 15%. Это свидетельствовало о восстановление метилвиологена при его реакции с дигидроформой до синей радикальной формы:

$$MB^{++} + MB \rightarrow 2MB^{\cdot+}.$$

Нормальный окислительно-восстановительный потенциал первой ступени электрохимического восстановления MB^{++} до $MB^{\cdot+}$ составляет — 0,45 В, а второй ступени — восстановления $MB^{\cdot+}$ до MB — 0,8 В ([10]). Таким образом, освещение суспензии CdS увеличивает восстановительный потенциал системы до величины, значительно превышающей потенциал водородного электрода. Следовало ожидать образования в этой системе молекулярного водорода при введении катализатора — гидрогеназы, по аналогии с описанными нами ранее опытами с TiO_2 и ZnO ([5]).

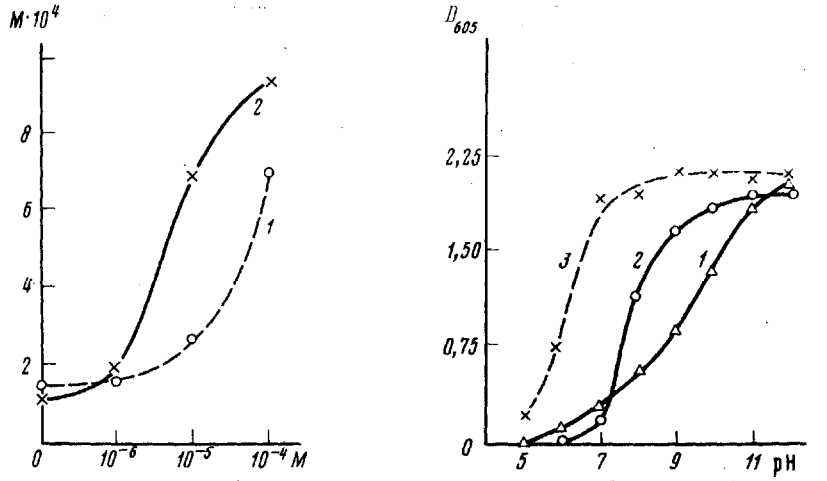


Рис. 1. Зависимость образования H_2O_2 (*1*) и поглощения O_2 (*2*) в водной суспензии CdS (3 мг/мл) от концентрации метилвиологена. Освещение лампой накаливания ($6 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с) 21 мин

Рис. 2. Зависимость фотовосстановления метилвиологена от pH в 5 мл водной суспензии CdS, 10 мг (*1*) с донорами: тиомочевиной, 0,8 *M* (*2*) и гидразином, 0,01 *M* (*3*).

Опыт проводили в системе: 3 мг CdS, 0,8 мл глицинового буфера pH 9 (0,05 *M*), 0,1 мл метилвиологена ($5 \cdot 10^{-3}$ *M*) и 0,1 мл гидрогеназы* из фототрофных бактерий Thiocapsa rescopersicina (удельный активности 10 мкл H_2 на 1 мл) помещали в стеклянную ячейку объемом 2 мл, продували аргоном в течение 10 мин, затем освещали светом ртутнокварцевой лампы ДРШ-250 через светофильтр СЗС-24 (10^6 эрг/см^2 · с) при 20 °С и непрерывном перемешивании. Через 20 мин отбирали шприцем пробу 0,1 мл газовой фазы из ячейки и анализировали на газовом хроматографе ([8]). Результаты опытов показали фотообразование водорода в суспензии кадмия со скоростью до 0,1 мкл H_2 в 1 мин. По грубой оценке квантовый выход реакции не превышал 0,1%. В контрольных опытах без глицина или без гидрогеназы фотообразования водорода обнаружено не было; таким образом, глицин служит донором электрона. В отличие от этого выделение водорода на TiO_2 наблюдалось и без введения экзогенного донора электрона.

Следует высказать общие соображения о механизме реакций. При освещении полупроводника электрон переходит из валентной зоны в зону проводимости. Это ведет к появлению электронодонорных и электроноакцепторных центров на фазовой границе полупроводник – раствор. Далее реализуется элементарный окислительно-восстановительный процесс, за которым следует цепь темновых стадий на поверхности фотокатализатора и в объеме раствора. Такой механизм был описан при реакциях на поверхности ZnO и TiO_2; при этом не наблюдалось заметной коррозии фотокатализаторов и выхода в раствор катионов. В отличие от этого в фотоэлектрохимической ячейке, где анодом служил CdS, при освещении наблюдалось его разложение с выходом в раствор ионов кадмия и образованием серы ([11]).

Действительно, освещение CdS в водной суспензии в присутствии кислорода приводило к накоплению ионов кадмия и изменению pH среды в щелочную сторону (от pH 6,4 до 7,3). Существенно, что освещение CdS в водной суспензии в отсутствие кислорода не приводит к накоплению ионов кадмия в растворе и изменению pH среды.

* Гидрогеназа любезно предоставлена нам И.П. Гоготовым (Институт фотосинтеза АН СССР).

Эти наблюдения позволяют предположить следующий возможный механизм образования H_2O_2:

$$CdS + O_2 \xrightarrow{h\nu} Cd^{++} + S + O_2^-,$$

$$O_2^- + H^+ \longrightarrow HO_2; \quad 2HO_2 \longrightarrow H_2O_2 + O_2.$$

Однако нам не удалось измерить соответствие выхода ионов кадмия в раствор и накопления H_2O_2 согласно схеме. По-видимому, наряду с предложенным механизмом могут использоваться имеющиеся в растворе доноры электрона (неорганические анионы), что приводит к торможению коррозии CdS за счет нейтрализации электронной вакансии, образующейся при действии света.

При фотовосстановлении метилвиологена в отсутствие доноров электрона вероятен элементарный процесс, также связанный с выходом ионов кадмия в раствор, однако введение доноров электрона (глицина, гидразина и др.) предотвращает коррозию CdS:

$$CdS + MB^{++} \xrightarrow{h\nu} CdS^+ + MB^{\cdot+},$$

$$CdS^+ + Д \rightarrow CdS + Д^+$$

с последующим образованием из $Д^+$ устойчивых продуктов окисления.

Таким образом, в водных суспензиях CdS при действии видимого света удается наблюдать фотообразование H_2O_2, фотовосстановление метилвиологена и фотовыделение водорода в присутствии гидрогеназы.

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

Поступило
7 VIII 1979

ЛИТЕРАТУРА

[1] *А.А. Красновский, Г.П. Брин,* ДАН, т. 139, 142 (1961). [2] *А.А. Красновский, Г.П. Брин,* ДАН, т. 147, 656 (1962). [3] *А.А. Красновский, Г.П. Брин,* В сб.: Молекулярная фотоника, "Наука", 1970, стр. 161. [4] *А.А. Красновский, Г.П. Брин,* ДАН, т. 213, 1431 (1973). [5] *А.А. Красновский, Г.П. Брин, В.В. Никандров,* ДАН, т. 229, 990 (1976). [6] *R.E. Stephens, B. Ke, D. Trivich,* J. Phys. Chem., v. 59, 966 (1955). [7] *M.J. Cormier, P.M. Prichard,* J. Biol. Chem., v. 234, 4706 (1968). [8] *В.П. Ощепков, А.А. Красновский,* Прикладная биохимия и микробиология, т. 10, 760 (1974). [9] *А.А. Красновский, Т.Н. Гуревич,* ДАН, т. 75, 715 (1950). [10] *R.M. Elofson, R.L. Edsberg,* Canad. J. Chem., v. 35, 646 (1957). [11] *A.B. Ellis, S.W. Kaiser, M.S. Wrighten,* J. Am. Chem. Soc., v. 98, 22, 6855 (1976).

Биофизика том XXIV, вып. 3, 1979.

АКТИВАЦИЯ И ИНГИБИРОВАНИЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОТОНОВ В ХРОМАТОФОРАХ RHODOSPIRILLUM RUBRUM ДЕТЕРГЕНТАМИ И РАСТВОРИТЕЛЯМИ

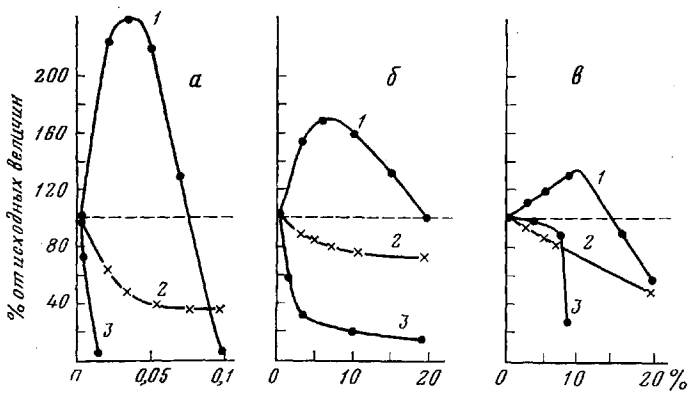
М. Г. ШАПОШНИКОВА, Е. В. ПАКШИНА, В. В. ШУБИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Ранее было показано, что при действии на хлоропласты диэтилового эфира и других растворителей наблюдается ингибирование реакции Хилла и дезагрегация хлорофилла; удаление растворителя приводило к обратимому восстановлению функции и состояния хлорофилла [1]. Однако в этих условиях нам не удалось наблюдать обратимого восстановления фотофосфорилирования и транслокации протона в хлоропластах. Мы нашли, что хроматофоры, выделенные из фотосинтезирующих бактерий, гораздо устойчивее к действию растворителей, детергентов и нагреванию, чем хлоропласты [2]. Ниже описаны последствия этих воздействий на хроматофоры с попыткой связать световые изменения pH, фотофосфорилирование и электрохромный сдвиг полосы поглощения каротиноидов.

Методы выделения хроматофоров и измерение обратимых изменений pH в нефосфорилирующих условиях (ΔpH) и необратимых изменений pH, характеризующих фотофосфорилирование (ФФ), проводили как описано ранее [2, 3]. Электрохромный эффект ΔD измеряли на длинах волн 570 и 535 нм на дифференциальном спектрофотометре «Hitachi-356» при освещении хроматофоров через светофильтр КС-19. Измерения ΔpH и ΔD_{570} проводили в 0,1 М KCl, pH 6,5; фотофосфорилирование измеряли в среде, содержащей 4 мМ KH_2PO_4, 13 мМ $MgCl_2$, 0,4 мМ сукцината натрия, 0,4 мМ АДФ и хроматофоры с концентрацией бактериохлорофилла 85 мкМ, pH 8,3.

Результаты исследования влияния возрастающих концентраций детергента и растворителей на обратимые изменения pH (рисунок) показали, что тритон X-100 (0,03—0,05%), метанол (5%) и диэтиловый эфир (5—7%) увеличивают амплитуду сигнала в 1,5—4 раза. Наибольшая активация наблюдается при использовании тритона. Увеличение амплитуды не сопровождается существенным изменением кинетики обратной реакции после выключения света, что может служить указанием на неизменность скорости темновой релаксации градиента pH, обусловленной пассивной проницаемостью мембраны для водородных ионов. Наибольшее ингибирование фотофосфорилирования достигается при тех же концентрациях, при которых наблюдается максимальная активация светового изменения pH; органические растворители приводят к ингибированию только при значительно больших концентрациях. Активирующие концентрации детергента и растворителей практически не изменяют спектры поглощения хроматофоров.



Влияние тритона X-100 (*а*), метанола (*б*) и диэтилового эфира (*в*) на: *1* — ΔpH, *2* — ΔD_{570}, *3* — ФФ; изменения функций представлены в процентах от исходной величины для интактных хроматофоров, которая принята за 100%: световое обратимое изменение pH при насыщении равно 0,2, необратимое изменение pH при ФФ на линейном участке Δ pH/мин равно 0,3 и величина каротиноидного сдвига $\Delta D_{570} = 0{,}05$

Светоиндуцируемые изменения основного каротиноида R. rubrum спириллоксантина на длине волны 570 нм только наполовину отражают наличие электрического потенциала на мембране [4], поэтому наблюдаемое ингибирование электрохромного эффекта наполовину при 0,03% детергента свидетельствует о возможном снятии электрического заряда на мембране. При действии до 20% растворителей наблюдается постепенное уменьшение ΔD_{570}, достигающее 30% от контроля, что свидетельствует о частичном сохранении мембранного потенциала и может объяснять неполное ингибиро-

вание фотофосфорилирования. В описанных опытах наибольшее внимание привлекает активация светоиндуцированных изменений pH. Ранее были известны наблюдения по активации световой транслокации протонов в хроматофорах под действием ионофоров типа валиномицина или проникающих в мембрану анионов [5, 6]. Авторы предложили единое объяснение этого эффекта: проникающие анионы снимают положительный заряд на внутренней поверхности мембраны и облегчают поглощение протонов, тогда как в случае валиномицина облегчается выброс катионов (вероятно, калия), что также приводит к снятию положительного заряда и к увеличению градиента протонов. Возможно, что это объяснение применимо и для активации эффекта детергентами и растворителями в наших опытах. При действии этих веществ в больших концентрациях, вероятно, происходят изменения мембраны, увеличивающие проницаемость для водородных ионов, что приводит к прекращению световых изменений pH. По-видимому, активирующее действие изученных соединений, не приводящее к деструкции мембраны, должно быть обратимым, тогда как ингибирование эффекта было необратимым.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Брин Г. П.*, Докл. АН СССР, *179*, 726, 1968.
2. *Пакшина Е. В., Шапошникова М. Г., Красновский А. А.*, Биохимия, *42*, 1953, 1977.
3. *Nishimura M., Ito T., Chance B.*, Biochim. Biophys. Acta, *59*, 177, 1962.
4. *Глинский В. П., Самуилов В. Д., Скулачев В. П.*, Мол. биол., *6*, 664, 1972.
5. *Jackson J. B., Crofts A. R., von Stedingk L.-V.*, Europ. J. Biochem., *6*, 41, 1968.
6. *Gromet-Elhanan Z., Leiser M.*, Arch. Biochem. Biophys., *159*, 583, 1973.

Поступила в редакцию 13.XII.1978

STIMULATION AND INHIBITION OF LIGHT-INDUCED PROTON UPTAKE IN R. RUBRUM CHROMATOPHORES BY DETERGENTS AND SOLVENTS

M. G. SHAPOSHNIKOVA, E. V. PAKSHINA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effects of detergents (Triton X-100) and solvents (diethyl ether, metanol) on the reversible light-induced proton uptake, photophosphorylation and band shift of the carotenoid in chromatophores from R. rubrum are described. All these compounds were found to stimulate the extent of light-induced proton uptake with subsequent inhibition when the concentrations were increased. Stimulation of proton uptake is accompanied by inhibition of both phosphorylation and carotenoid absorbance shift.

Photosynthesis in relation to model systems, edited by J. Barber
© Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1979

Chapter 9

Photoproduction of Hydrogen in Photosynthetic and Artificial Systems

A.A. KRASNOVSKY

A.N. Bakh Institute of Biochemistry of the U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

CONTENTS

9.1. Introduction 282
9.2. Photoevolution of hydrogen by green algae 284
9.3. Chloroplasts: photoreduction of viologens and hydrogen evolution 287
9.4. Chorophyll solutions: photoreduction of viologen and photoevolution of hydrogen 289
9.5. Photoactivation of reduced pyridine nucleotides: reduction of viologen and hydrogen evolution 291
9.6. Use of inorganic photocatalysts for oxygen and hydrogen evolution 292
9.7. Prospects for technical use 295

Abbreviation

DCMU, 3-(3-dichlorophenyl-1,1-dimethylurea.

9.1. INTRODUCTION

As emphasised several times in this book the existence of mankind on the earth depends upon photosynthesis occurring in plants. The food and oxygen consumed by man and other organisms are produced by plants as a result of their photosynthetic activity. The energy which ensured the development of civilization on the earth was provided by the combustion of carbonaceous compounds resulting from photosynthesis (wood, coal, oil and natural gas). In addition to this, the photosynthetic process is responsible for maintaining significant levels of oxygen in the atmosphere.

Today some 95% of the energy consumed by mankind is derived from coal, oil and gas, and only about 5% comes from hydroelectric and nuclear power stations; according to some forecasts, by the year 2000 these stations will satisfy not more than 20% of the energy demand (Semenov, 1972), and most of the energy requirements will continue to be met by photosynthetic products. With the rates of energy consumption steadily growing, it is feared that the oil and natural gas reserves may be exhausted within the next few hundred years.

The practically unlimited production of energy in thermonuclear synthesis may be expected to lead to an economically profitable chemical synthesis of the basic food elements such as carbohydrates, proteins and lipids from carbonates, water and molecular nitrogen. Most authors, however, are very cautious in their forecasts of the possible time when thermonuclear reactions will be technically used.

The promising approach thus is to make a more efficient use of the solar energy reaching the earth's surface: the quantity of this energy exceeds by five orders the quantity of energy of all kinds produced on the earth. The question is how best to collect and utilize solar energy.

Possible ways of utilizing solar energy for heating and powering thermal generators of electricity have long been the subject of discussion, research and development. Much attention is given to the direct conversion of solar energy into electric energy in solar batteries (whose efficiency attains 20%). Although they are widely employed in earth satellites their broader applications in "terrestrial" energetics must await the solution of complicated technological and economic problems (see chapter 1).

I would like to dwell here on the traditional method of energy utilization habitual to man, namely, on prospects for the use of photosynthetic products not only as a source of food but also as an energy source.

The reaction between water and carbon dioxide which gives rise to sugars and oxygen proceeds with the increase of free energy of the system ($+\Delta F$). So, this reaction cannot be aided by catalysts, i.e. enzymes, because it proceeds "against" the thermodynamic potential gradient.

In order to bring about photosynthesis, a maximum of 120 kcal per gram molecule of evolved oxygen (or of consumed carbon dioxide) must be

introduced in the system:

$$H_2O + CO_2 \rightarrow \frac{1}{6} C_6H_{12}O_6 + O_2 \ (+\Delta F = 120 \text{ kcal}) .$$

An Einstein of red light, Nhp, constitutes about 40 kcal. Thus, in order to gain free energy in the reaction of photosynthesis, a minimum of three quanta of red light must be put into the system.

Estimates of the minimum quantum requirement (as measured in different laboratories) range from 8 to 12 quanta. Hence the probable limit of absorbed light conversion to potential chemical energy in photosynthesis lies within 25% and 40%. The average estimate of 30% is usually accepted.

About half of all solar radiation energy reaching the earth's surface lies predominantly in the visible region of the spectrum (see chapter 1); the infrared region practically is not used by terrestrial plants; (but there are photosynthesizing bacteria *Rhodopseudomonas viridis* which can use infrared light with wavelengths down to 1 μs).

Assuming that all active solar radiation is absorbed the limit of utilization of incident solar radiation by plants is about 15%. Actually, on average green plants on the earth's surface use no more than 0.1% of the incident solar radiation.

Attainment of the maximum possible utilization of solar energy by plants (15%) presents a real challenge for the future: the vigorous development of plant physiology, biochemistry and genetics will undoubtedly permit an approach towards this limit. This problem is being investigated intensively and the reader is referred to relevant reviews (e.g. see Calvin, 1976).

The metabolism of animals and other non-photosynthetic organisms has been adapted through evolution to the utilization of various carbonaceous products of photosynthesis. However, one can ask whether it is reasonable to burn in furnaces complex organic compounds intended to use in specialized metabolism. Can photosynthesis be stopped at the stage of water decomposition to realise hydrogen as the product and thus avoid its normal function to reduce carbon dioxide?

As the preceeding chapters in this book emphasised, the possibility of using hydrogen in energetics is now attracting much attention. Hydrogen has several advantages as a fuel: it does not yield combustion products polluting the environment and with oxygen it can be used with a high efficiency (up to 80%) in fuel elements to produce electric power.

Green plants which acquired the capacity to use water molecules as a primary hydrogen donor combine two consecutive photochemical steps of electron transfer — one from water to cytochromes and quinones, and the other from reduced cytochromes to ferredoxin and pyridine nucleotides, resulting in their reduction. Electron transfer is coupled to the formation of adenosine triphosphate (ATP). The light energy-storing substances, reduced pyridine nucleotides and ATP, enter the carbon cycle. This reaction system •

involving electron transfer is located in membranes of chloroplasts and chromatophores in such a way that the water oxidation products (for example, oxygen) are spatially separated from the reduced products ($NADPH_2$). The range of the redox potential in which the photosynthetic electron transport chain operates, lies between the redox potentials of the oxygen and hydrogen electrodes. Therefore the energy model of photosynthesis represents a chlorophyll-sensitized decomposition of water into hydrogen and oxygen.

As discussed in some detail in the first three chapters of this book, primary light energy conversion in photosynthesis may be visualized as charge separation in reaction centers of photosystems. Electrons are transferred through a chain of intermediates with ferredoxin and NADP' acting as the terminal electron acceptors. The electron vacant "hole" is also transported via suitable carriers finally to be used in the oxidation of water and bring about the evolution of molecular oxygen (see chapter 8).

In general, there is a possibility to stop an electron or its associated "hole" from reaching the terminal points by introducing suitable electron donors and electron acceptors.

For example, R. Hill in 1937 discovered that the introduction of electron acceptors to isolated chloroplasts switched off physiological electron transport to carbon dioxide but did not stop the path of the "positive hole" to the water splitting system so that oxygen was evolved as in the intact cell. Introduction of electron donors which can substitute for water molecules has also led to a possibility to switch off this branch of electron transfer. In the case where electron flow is stopped at the level of ferredoxin then in the presence of hydrogenase it is possible to observe hydrogen evolution (see chapter 10). Moreover it is possible to induce different types of hydrogen evolution by substitution of diverse physiological donors and acceptors of electron; so it is possible to construct simple systems of electron transfer leading to creation of non-physiological artificial model systems. The main purpose of this review is to consider the gradual simplification of the photosynthetic system but still maintaining the capability to evolve hydrogen. Firstly I will deal with hydrogen evolution by algal cells and then come to chloroplasts. Finally I will consider model systems using chlorophyll and inorganic photocatalysts; the case when charge separation is most pronounced. The review is mainly based on the experiments of my laboratory and the conditions used in the experiments are described in originaly papers cited.

9.2. PHOTOEVOLUTION OF HYDROGEN BY GREEN ALGAE

In 1942 Gaffron and Rubin discovered that illumination of unicellular algae under anaerobic conditions can lead to the formation of hydrogen gas

(see review Gaffron, 1972). In 1949 Gest and Kamen found that photosynthesising bacteria were also capable of bringing about the photochemical evolution of hydrogen. In this case, however, hydrogen, is donated not by water but by various organic and inorganic substances used in bacterial metabolism. Under normal conditions molecular nitrogen inhibits the release of hydrogen so that this process is accompanied in bacteria by photosynthetic fixation of molecular nitrogen. The extensive literature dealing with the production of hydrogen by bacteria and algae has been surveyed in recent reviews by Kondratieva and Gogotov (1976) and Oshchepkov and Krasnovsky (1976) as well as by Hallenbeck and Benemann in chapter 11 of this book.

The evolution of hydrogen by unicellular algae has been studied in our laboratory (Oshchepkov and Krasnovsky, 1972, 1974). For this purpose, a device was constructed consisting of a gas chromatograph and a monochromator (Oshchepkov and Krasnovsky, 1974). A cuvette with a magnetic stirrer containing 1 ml of *Chlorella* suspension was connected to the gas chromatograph. Illumination of the algal suspension in air resulted in oxygen evolution. After bubbling of argon, hydrogen evolution occurred without any adaptation period.

In accordance with Gaffron, addition of glucose or other exogenous hydrogen donors sharply increased the production of hydrogen. Carbon dioxide was released simultaneously, and oxygen and hydrogen were evolved alternatively. Under steady-state conditions, no simultaneous stoichiometric release of oxygen and hydrogen was usually observed. However, Efimtzev et al. (1975), who used a sensitive amperometric method, recently recorded simultaneous evolution of hydrogen and oxygen in many photosynthesising organisms during the induction period. The evolution of hydrogen by

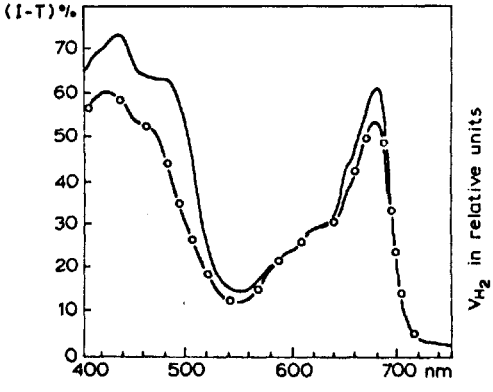


Fig. 9.1. Action spectrum of hydrogen photoproduction by *Chlorella* (o———o) as compared to the absorption spectrum.

Chlorella was measured as a function of wavelength of incident light (Oshchepkov and Krasnovsky, 1972, 1974). As Fig. 9.1 shows the action spectrum for the hydrogen evolved proved to be close to that of oxygen evolution. Some differences were noticed in the far-red region where hydrogen was evolved more effectively. These measurements have shown that no more than five quanta of red light are required to release 1 mol of hydrogen upon illumination of a *Chlorella* suspension. As 8—10 quanta are required to evolve 1 mol of oxygen during photosynthesis, the above data indicate that the photoevolution of hydrogen is more effective from the energetic point of view. However, the results of the above measurements should not be overestimated, since hydrogen is evolved as a result of photometabolism of the organic substances stored in the cell during ordinary photosynthesis. It is well known that this process may occur in general by way of enzymatic reactions without any light energy. Thus, a "dark" evolution of hydrogen is observable in *Chlorella* and, especially, in blue-green algae (Oshchepkov et al., 1973). In the case of the latter organisms, heterocysts can probably function by releasing hydrogen while normal cells can affect photosynthesis by giving off oxygen (Benemann and Weare, 1974).

Of significance is the fact that oxygen inhibits the photoevolution of hydrogen either by interacting with reduced products or by inhibiting the enzyme hydrogenase. The mechanism of hydrogen photoevolution could be visualized simply by a scheme in which oxygen is given off at one "end" of the photosynthetic electron transport chain while hydrogen is released at the other "end". Such a simple scheme, however, is not consistent with experimental evidence.

That hydrogen evolution is invariably accompanied by a release of carbon dioxide was already demonstrated in Gaffron's experiments. In the case of mutants deficient in Photosystem II (Bishop and Gaffron, 1963), hydrogen could still be evolved. Thus no rigid connection exist between photolysis of water (in Photosystem II) and evolution of hydrogen. This is consistent with the action of diuron which at a concentration of 10^{-6} M suppresses the release of oxygen without affecting that of hydrogen. It follows that the photoproduction of hydrogen is closely linked with the carbon metabolism of the cell (Gaffron, 1972; Gaffron and Rubin, 1942). Hydrogen is evolved by way of a number of enzymatic and photochemical intermediate reactions with participation of reduced compounds formed during the operation of carbon cycles of photosynthesis and respiration (see Fig. 9.2). However, in the overall process, the molecular hydrogen evolved is derived from water molecules since no other hydrogen source is present in the system. Most likely, in the course of carbon cycles of photosynthesis and respiration, active hydrogen donors are formed which enter Photosystem I of the electron transport chain. Reduced pyridine nucleotides are formed in the Krebs cycle. These compounds may enter a locus of Photosystem I where chlorophyll sensitizes electron transport to ferredoxin. That such a mecha-

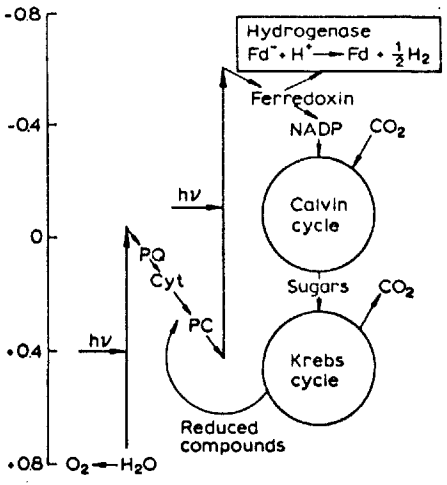


Fig. 9.2. A hypothetic diagram of metabolic pathways of hydrogen evolution (modified Gaffron's scheme).

nism is possible is indicated by model experiments described below.

The question arises as to whether photolysis of water can occur without the participation of carbon cycles. To answer this, the reactions must be done with isolated structures such as chloroplasts lamella where the photosynthetic electron transport chain is localized.

9.3. CHLOROPLASTS: PHOTOREDUCTION OF VIOLOGENS AND HYDROGEN EVOLUTION

To study the reducing branch of the photosynthetic electron transport chain, wide use is made of viologens, derivatives of γ-γ-dipyridyl, which were first applied in biochemical research by Michaelis more than four decades ago. The reversible reduction of viologens leads to the formation of blue-coloured ion radicals with an absorption maximum at about 600 nm. The redox potential of methyl viologen, $E_0' = -0.455$ V, is close to that of ferredoxin which is the final electron acceptor of Photosystem I, and is higher than the E_0' of the hydrogen electrode (−0.42 V). The reduced viologen is easily oxidized by oxygen to form hydrogen peroxide. To observe the accumulation of reduced viologens by chloroplasts, either oxygen production must be inactivated (i.e. Photosystem II), for example by heating, or an oxygen-consuming system must be introduced into the chloroplast suspension.

Arnon et al. (1961) reported photoreduction of methyl viologen by chloroplasts in the presence of cysteine and dichlorophenolindophenol,

which acted as electron donors. Kok and his co-workers (1965) observ photoreduction of viologens by chloroplasts in the presence of glucose a glucose oxidase. Zweig and Avron (1965) and Black (1966) described t reduction of various viologens by chloroplasts in the presence of ethanol ar catalase (see also chapter 10).

We have studied photoreduction of methyl viologen by chloroplasts usir hydrazine as the hydrogen donor during the course of progressive disruptio of chloroplast structure by organic solvents (Brin and Krasnovsky, 1972. This reaction proceeded most actively at pH close to 8.5. With 10% o solvent the process was activated, while with 50% solvent treatmen complete inhibition occurred. With 70–80% of solvent, chlorophyll wa extracted and active photoreduction of viologen was resumed. Illumination of chloroplasts in the presence of oxygen led to oxygen reduction with formation of hydrogen peroxide. Addition of methyl viologen resulted in a multifold increase of the amount of peroxide formed. Viologen competes with oxygen for electrons of Photosystem I and the cation radical of methyl viologen that is formed is reversibly oxidized by oxygen to form hydrogen peroxide (Shuvalov and Krasnovsky, 1975). Photoreduction of viologens by chloroplasts indicates that the system has reached the hydrogen electrode potential which is a precondition for release of molecular hydrogen if the system includes a catalyst (hydrogenase) promoting the reaction $2H + 2e \rightarrow H_2$.

Boichenko (1949) reported that isolated chloroplasts of higher plants were capable of releasing hydrogen in the presence of glucose. In Arnon's experiments (1961) photorelease of hydrogen by chloroplasts was observed in the presence of bacterial hydrogenase and with cysteine as the electron donor. ATP formation accompanied hydrogen production.

Benemann et al. (1973) have described photoproduction of hydrogen in a similar system (but without cysteine) consisting of isolated chloroplasts, ferredoxin and hydrogenase isolated from a *Clostridium pasteurianum* culture. They believed that the reaction is accompanied by oxygen production which, however, they were unable to measure. Oxygen is presumed to be used to oxidize exogenous electron donors such as glucose. However, as in Arnon's experiments, endogenous electron donors other than water may have been used. Hall and co-workers (1976) recently described a prolonged hydrogen evolution in similar systems and concluded that H_2O was the source of electrons (see chapter 10). Ben-Amotz and Gibbs (1975) showed hydrogen evolution in cell-free preparations from algae mixed with hydrogenase and dithioerythritol as electron donors.

In our laboratory photoproduction of hydrogen by chloroplasts was observed (see Table 9.1) in the presence of hydrogenase isolated by Gogotov et al. (1974) from photosynthesising bacteria, with $NADH_2$ acting as the electron donor (Krasnovsky et al., 1975). Also further experiments performed in our laboratory revealed that bubbling of argon or deoxygena-

TABLE 9.1.

HYDROGEN EVOLUTION IN RED AND WHITE LIGHT BY BEAN LEAVES CHLOROPLASTS

System	Hydrogen (μl/min)	
	Red light 600—750 nm	White light 400—700 nm
Without $NADH_2$	0.000	0.000
$NADH_2$	0.007	0.015
$NADH_2 + MV^{2+}$	0.072	0.150

Chlorophyll concentration 0.05 mg/ml; $NADH_2$ concentration, 10^{-3} M; methyl viologen (MV) concentration, 10^{-3} M. Light intensities: $7 \cdot 10^5$ (red light) and 10^6 (white light) erg cm^{-2} sec^{-1}.

tion in vacuo of the suspension led to inhibition of the ability of chloroplasts to photoreduce methyl viologen (Nikandrov et al., 1978a). The cause of this phenomenon is probably denaturation of functionally active membranes on the liquid—gas interphases. When glycerol (up to 50%) or bovine serum albumin was introduced into the system the activity of chloroplasts was preserved during the procedure of deoxygenation. It was revealed earlier in our laboratory that glycerol greatly activated the Hill reaction (Krasnovsky and Brin, 1968) as well as millisecond afterglow of chloroplasts (Chan-Van-Ni et al., 1977). For instance, without addition of exogenous electron donors chloroplast suspended in the presence of 50% glycerol were capable of photoreducing practically all the methyl viologen (10^{-4} M) introduced into the system.

The uncouplers studied (NH_4Cl, CH_3NH_2) greatly activated the reaction and DCMU inhibited the function of chloroplasts.

Probably water molecules serve as initial electron donors to photoreduce viologen as well as some endogenous electron donors probably stored inside the structures of chloroplast membranes. Nevertheless in this system it was impossible to measure evolution of oxygen which reacts rapidly with reduced viologen.

9.4. CHLOROPHYLL SOLUTIONS: PHOTOREDUCTION OF VIOLOGEN AND PHOTOEVOLUTION OF HYDROGEN

Studies carried out in our laboratory many years ago revealed that during the photoreduction of chlorophyll, an intermediate is formed with an E_0' close to that of the hydrogen electrode. In 1949, we revealed the possibility of chlorophyll-sensitized reduction of NAD (Krasnovsky and Brin, 1949).

In a reaction of this type, chlorophyll acts as a light-excited electron carrier from electron-donating molecules to electron acceptors (see for review Krasnovsky, 1974). More recently, we have investigated the photosensitized reduction of methyl viologen under the action of red light absorbed by chlorophyll in the presence of a number of electron donors. The reactions were done in organic solvents and aqeuous solutions of detergents where chlorophyll and other reaction components were dissolved (Brin et al., 1967; Krasnovsky, 1974; Krasnovsky and Brin, 1965). The most efficient photoreduction of methyl viologen under anaerobic conditions was observed when phenylhydrazine, cysteine and $NADH_2$ were used as electron donors; thiourea was inactive under these conditions. Efficient photosensitized reduction of methyl viologen in the presence of thiourea did, however, occur in experiments without preliminary evacuation of air (Luganskaya and Krasnovsky, 1970). The mechanism of this reaction was as follows. As a result of photosensitized oxidation of thiourea by oxygen, active long-lived reductants were formed which were capable of reducing methyl viologen. The anaerobiosis which had developed due to photosensitized reduction of oxygen, prevented reoxidation of reduced viologen. In pyridine solution, the "red" photoreduced form of chlorophyll is capable of a dark reaction with viologen. In this medium, a possible mechanism for the reaction consists of photoreduction of chlorophyll by electron donor followed by a reaction between the reduced chlorophyll and viologen (see Fig. 9.3). On the other hand, observations of fluorescence quenching by chlorophyll, and its analogs, by methyl viologen point to a possible primary photooxidation of the sensitising pigment (Krasnovsky and Drozdova, 1966). Thus, photoreduction of methyl viologen in a chlorophyll solution can be achieved at the expense of the light absorbed by chlorophyll. To have molecular hydrogen released in the reactions described above, a catalyst of the reaction $2H + 2e \rightarrow H_2$ should be introduced into the system. Indeed, addition of bacterial hydrogenase to an aqueous solution of Triton X-100 containing chlorophyll and cysteine (or $NADH_2$) did result in release of molecular hydrogen upon illumination (Krasnovsky et al., 1975a). Addition of methyl viologen considerably activated the reaction, as in the case of chloroplasts (see Table 9.2).

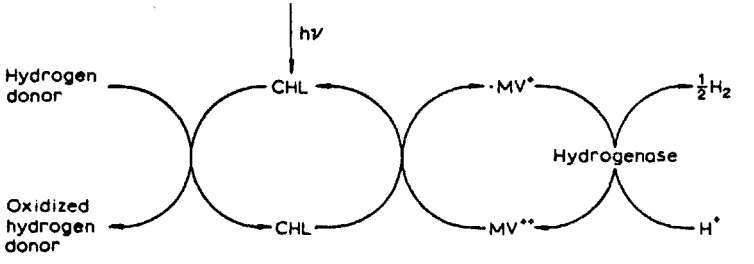


Fig. 9.3. Scheme of chlorophyll-photosensitized hydrogen evolution.

TABLE 2

CHLOROPHYLL-SENSITIZED PHOTOEVOLUTION OF HYDROGEN IN AQUEOUS SOLUTION OF TRITON X-100 UPON ILLUMINATION WITH RED AND WHITE LIGHT

System	Hydrogen (μl/min)	
	Red light 600—750 nm	White light 400—700 nm
$NADH_2$	0.070	0.100
$NADH_2 + MV^{2+}$	0.150	0.260
Cysteine	0.006	0.010
Cysteine + MV^{2+}	0.125	0.200

Hydrogenase was added in each system. $NADH_2$, cysteine and methyl viologen (MV) concentrations. $1.4 \cdot 10^{-3}$ M; Triton X-100 concentration, 0.5%. Light intensities, $5 \cdot 10^5$ (red light) and 10^6 (white light) erg cm^{-2} sec^{-1}.

9.5. PHOTOACTIVATION OF REDUCED PYRIDINE NUCLEOTIDES: REDUCTION OF VIOLOGEN AND HYDROGEN EVOLUTION

In the reactions described above, light-excited chlorophyll reacts which non-excited $NADH_2$. However, absorbing a light quantum in their own absorption region (at 340 nm), $NADH_2$ and $NADPH_2$ are activated and their redox potential becomes more negative than the E_0' of the hydrogen electrode. Thus excited $NADH_2$ ($NADH_2^*$) can reduce methyl viologen and ferredoxin (Krasnovsky et al., 1975):

$$NADH_2^* + 2\,MV^{2+} \rightarrow NAD + 2 \cdot MV^{+} + H^{+}$$

$NADH_2$ probably reacts via a triplet excited state. The phosphorescence of $NADH_2$ was revealed in frozen solutions. The mechanisms of the reaction are

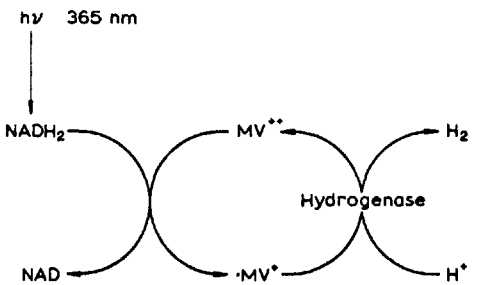


Fig. 9.4. Scheme of hydrogen evolution as a result of $NADH_2$ and $NADPH_2$ photoexcitation.

TABLE 9.3

HYDROGEN EVOLUTION UPON ILLUMINATION OF AQUEOUS SOLUTION PYRIDINE NUCLEOTIDE

System	Hydrogen (μl/min)
$NADH_2$	0.120
$NADH_2 + MV^{2+}$	0.400

Hydrogenase was added in each system. $NADH_2$ and methyl viologen (MV) concen tions, $1.4 \cdot 10^{-3}$ M. Light intensity, $2 \cdot 10^5$ erg cm^{-2} sec^{-1} at 365 nm.

considered in detail in our recent paper (Nikandrov et al., 1978). The acti tion of $NADH_2$ by light has been investigated in a series of studies unc taken in our laboratory. Just as in above-mentioned reactions, introduct of hydrogenase led to release of hydrogen (Krasnovsky et al., 1975a) u illumination of aqueous solutions of $NADH_2$ with ultraviolet light at 365 (see Fig. 9.4 and Table 9.3).

9.6. USE OF INORGANIC PHOTOCATALYSTS FOR OXYGEN AND HYDRO EVOLUTION

It is generally assumed, that the primary reaction in photosynthesis charge separation process (see chapters 1 and 3). For this reason i desirable to have a simple system to study so as to understand how light generate electrons and "holes". Such a system exists with inorganic ph active semiconductors like titanium dioxide, zinc oxide, etc. In this typ system the action of light is to excite electrons to the conduction b leaving behind "holes" in the valence band. Thus the light-induced ch separation which take place in these systems is ideal for model experimer

About 50 years ago Emil Baur (1928) discovered that under the actio light zinc oxide gained the property to cause oxido-reductions. He descr the phenomenon as "molecular electrolysis". Considering an exc sensitizer there were two sites, anodic and cathodic, so that oxido-reduc proceeded at the phase boundary. According to contemporary knowl this may be regarded as a primitive point of view, but his basic idea is c plausible. We tried to construct models, which in their action resem oxido-reduction taking place in chloroplasts by using titanium dioxide, oxide and tungsten trioxide (see for review Krasnovsky and Brin, 19 Absorption bands of titanium and zinc oxides are situated near the bc between visible light and UV. Titanium and zinc oxides are white pow a sharp absorption begins at ~400 nm, so they are "black" in ultraviol most cases we used excitation at 365 nm. Metzner's silver chloride m (Metzner, 1968) should be mentioned in this context.

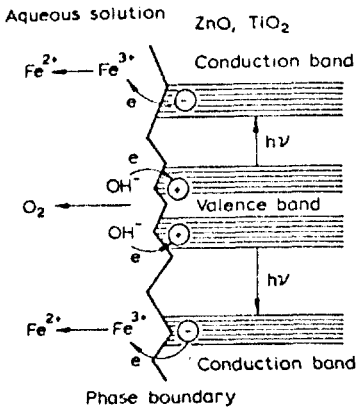


Fig. 9.5. Scheme of hydrogen evolution with inorganic photocatalysts (TiO_2 and ZnO).

We used fine powders of photocatalysts, having a specific surface up to $\sim 20\ m^2\ g^{-1}$. If we illuminate these TiO_2, ZnO or WO_3 suspensions in the presence of electron acceptors we observed an evolution of gas. In the first experiments sensitized photoevolution of oxygen was observed in solutions of some oxidants including potassium permanganate (Krasnovsky and Brin, 1961). Then we tried to simulate Hill reaction (Krasnovsky and Brin, 1962) by using as electron acceptors, ferricyanide or Fe^{3+}. The stoichiometry of the reactions that followed strictly corresponded to the equation:

$$2\ Fe^{3+} + H_2O \xrightarrow{h\nu} 2\ Fe^{2+} + 2\ H^+ + \tfrac{1}{2}\ O_2$$

Experiments of this kind were performed in water labelled with heavy oxygen. In this case the oxygen isotope ratio of the released O_2 was the same as in the water suspension used (Fomin et al., 1973) thus confirming that the oxygen had originated from water molecules (see Fig. 9.5).

It was possible to reduce not only ferric compounds and ferricyanides but also quinones, like *p*-benzoquinone (Krasnovsky et al., 1971). The quantum yield of the reactions studied did not exceed 1%.

Summarising these series of experiments we can conclude that under the excitation of photocatalysts charge separation proceeds if electrons can be donated to the "hole" from OH^- anions or H_2O molecules and radicals can be produced which can recombine on the boundary to give molecular oxygen. The formation of OH · radicals under the described conditions had been found earlier (Korsunovsky, 1960). The electrons are accepted at the phase boundary by oxidants, that is by electron-accepting molecules.

A second type of photosynthetic reaction to attempt to simulate was the Mehler reaction of chloroplasts (see chapters 4 and 5 of Volume 1 of this series). In model systems studied oxygen may act as terminal electron

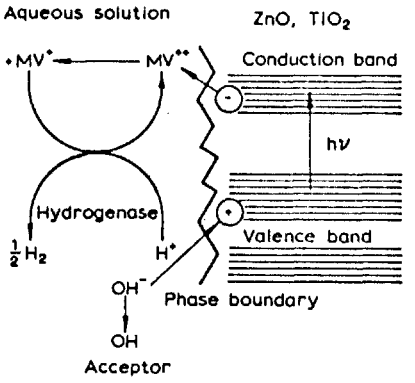


Fig. 9.6. Scheme of oxygen photoevolution with inorganic photocatalysts (TiO_2, ZnO, WO_3).

acceptor and water molecule (or OH^-) as a donor. The first observation of hydrogen peroxide formation with ZnO was made by Baur and Neuweiler (1927). We have used a sensitive measurement involving the chemiluminescence of luminol in the presence of peroxidase (Cormier and Prichard, 1968), in order to quantitatively determine the hydrogen peroxide produced, not only in the case of ZnO but also in water suspensions of TiO_2. If we added methyl viologen to this system, the reaction was greatly enhanced (Krasnovsky et al., 1976). Here methyl viologen probably functioned as intermediate electron carrier. So we could simulate a Mehler reaction in the photocatalysts suspension in the presence of oxygen.

There is a third type of reaction which is of interest. If we excluded oxygen from the suspension of photocatalysts so as to work under anaerobic conditions, a reduction of methyl viologen is observed (Krasnovsky and Brin, 1973). In this case methyl viologen acts as a terminal electron acceptor. The only possible electron donor in this system is H_2O or OH^- radicals but we

TABLE 9.4

EVOLUTION OF HYDROGEN UPON ILLUMINATION OF AQUEOUS SUSPENSION OF INORGANIC PHOTOCATALYSTS

System	Hydrogen (μl/min)
Titanium dioxide	0.009
Titanium dioxide + MV^{2+}	0.094
Zink oxide	0.002
Zink oxide + MV^{2+}	0.005

Hydrogenase was added in each system. Methyl viologen (MV) concentration, 10^{-3} M. Light intensity, $2 \cdot 10^5$ erg cm^{-2} sec^{-1} at 365 nm. Illumination time, 1 min.

have not been able to observe oxygen evolution in this case. May be the OH · radicals formed react with viologen which may function as a scavenger of these radicals. This, however, is not clear yet; the situation is rather similar to viologen reduction in chloroplasts.

It is well known that the redox potential of methyl viologen slightly exceeds that of hydrogen electrode. So by introduction of suitable catalysts we may expect to observe hydrogen gas evolution. Using gas chromatography, a hydrogen photoproduction was indeed observed if the system was supplied with a hydrogenase from photosynthetic bacteria (Krasnovsky et al., 1975a).

One side of our system works like an oxygen electrode, releasing molecular oxygen while the other side may be compared to a hydrogen electrode.

In this connection I would like to mention studies of Fujishima and Honda (1972). They have reported an electrochemical version of our experiments. In their case they demonstrate a charge separation on TiO_2 "membranes". By making these layers part of electrochemical cells it could be demonstrated that these cells produce both hydrogen and oxygen. It is remarkable that the authors obtained a great enhancement of oxygen evolution if they added Fe^{2+} to the system. This means that their set-up has a striking similarity to that used in our experiments which we described in 1961.

It is important to emphasize that the semiconductors studied, function not only as photosensitisers but also as catalysts. On the interfaces there may be a recombination of the primary produced intermediates, which probably makes these experiments successful. I suppose, that these simple models may be of interest for those who are working on the problem of conversion of light energy into chemical energy.

9.7. PROSPECTS FOR TECHNICAL USE

The current energy shortage has enhanced interest in the possible better utilisation of solar energy. As a consequence some workshops have been organized in the USA *. These workshops outlined possible lines of research that could be developed and discussed various points of view regarding their prospects. In particular, Gaffron, who discovered the phenomenon of hydrogen photoevolution by algae, has pointed out that effective photolysis of water by solar radiation absorbed in photosynthesis is a research problem which is unlikely to receive practical outlets in the next few years to come. He believes that this problem belongs to the domain of fundamental science since a much better understanding of the mechanism of photosynthesis is

* The author is most grateful to Professor A. Hollander who has kindly sent me the proceedings of these meetings for 1972 and 1973.

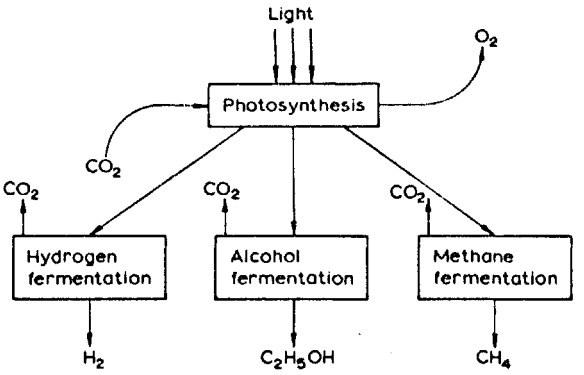


Fig. 9.7. Cooperation of photosynthetic and heterotrophic organisms producing hydroge methane or ethanol.

needed before it can be put to some form of technical use. Nevertheless, is clear that unicellular algae are capable, under anaerobic conditions, releasing molecular hydrogen by utilizing organic substances built up in th process of "normal" photosynthesis and therefore oxygen and hydrogen ca be evolved through the use of the biochemical mechanisms operating in th same algal cell.

A further point to consider is whether it is better to use carbonaceou compounds within the same algal cell or to use a symbiosis of specialize organisms. One may conceive the following scheme of division of functio between organisms of different types. "ordinary" photosynthesis leads t consumption of carbon dioxide, formation of organic substances and evolu tion of oxygen. In the next cycle, the organic substances formed (algal bic mass) could be used by specialised heterotrophic organisms to forr methane, hydrogen or alcohol (see Fig. 9.7). The carbon dioxide evolved i this process reenters the photosynthetic cycle. Such cooperation woul probably require the introduction of intermediate bacterial cycles to prepar the organic substance of green cells for utilization by hydrogen or methan producers.

An important consideration is whether biochemical processes of this kin can use cellulose which constitutes the bulk of the photosynthetic produc of forests and of the enormous amounts of agricultural wastes such as stems straw, roots, etc. With such cooperation of autotrophic photosynthesizin organisms and heterotrophic organisms using photogenic organic matter, i would be possible to develop technological schemes that would probably b more efficient than a combination of processes within the green cell itself Thus, for instance, a combination of algal photosynthesis and methan fermentation has been described where unicellular bacteria are cultivate together with methane-forming bacteria in pilot plants. Calvin (1974

proposed that addition of ethanol produced by fermentation to motor fuels may already be economically acceptable.

In contrast simpler photobiochemical reactions leading to a release of oxygen or hydrogen still remain to be studied. It is feasible, for example, to bring about photoreduction of viologens and, in a separate cycle, to achieve a release of molecular hydrogen with the aid of hydrogenase. The question is whether or not a reaction of this kind would be effective enough in a technological sense. The model photochemical systems described above have low quantum yields, and prospects for their technical use depend on the development of methods that would considerable enhance their efficiency.

Although many problems still remain unsettled the objectives and probable lines of research can be seen. One clear problem remaining for experimental solution is that of biophotolysis of water into hydrogen and oxygen with a sufficient high efficiency of solar energy utilization (up to 10%?) (see chapter 8).

In conclusion, some of the possible lines of research may be listed.

(i) A search for those algal strains which are capable of hydrogen evolution; of particular importance here are genetic studies aimed at finding appropriate mutants, including those that may block the carbon cycle.

(ii) Studies of various ways of combining photosynthetic systems with heterotrophic bacterial cultures to attain effective processing of photosynthetic products.

(iii) Development of effective photoenzymatic systems on the basis of chloroplasts and immobilized enzymes, and searches for a hydrogenase resistant to oxygen.

(iv) Creation of artificial photocatalytic systems releasing oxygen and hydrogen.

Clearly, research efforts along these lines are necessary not only in order that photosynthesis might be used to solve energy problems but also because they are important for intensifying photosynthesis as a source of food. The future will show which aspect of the problem will be more important.

REFERENCES

Arnon, D.I., Mitsui, A. and Paneque, A. (1961) Science, 134, 1425—1429.
Baur, E. (1928) Z. Phys. Chem., 131, 143—148.
Baur, E. and Neuweiler, C. (1927) Helv. Chim. Acta, 10, 901—906.
Ben-Amotz, A. and Gibbs, M. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 355—359.
Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O. and Kamen, M.D. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 2317—2320.
Benemann, J.R. and Weare, N.M. (1974) Science, 184, 174—175.
Bishop, N.I. and Gaffron, H. (1963) in Photosynthetic Mechanisms in Green Plants, p. 441. N.A.S.-N.R.C., Publ.
Black Jr., C.C. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 120, 332—340.
Boichenko, E.A. (1949) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 64, 545—548.

Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1972) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 204, 1253—1256.
Brin, G.P., Luganskaya, A.N. and Krasnovsky, A.A. (1967) Dokl. Akad. SSSR, 174, 221—224.
Calvin, M. (1974) Science, 184, 174—178.
Calvin, M. (1976) Photochem. Photobiol., 23, 425—444.
Chan-Van-Ni, Nikandrov, V.V. and Krasnovsky, A.A. (1977) Biofizika, 22, 1056—1061.
Cormier, M.J. and Prichard, P.M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 4706—4714.
Efimtsev, E.I., Boichenko, E.A. and Litvin, F.F. (1975) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 220, 986—989.
Fomin, G.V., Brin, G.P., Genkin, M.V., Liubimova, A.K., Blumenfeld, L.A. and Krasnovsky, A.A. (1973) Dok. Akad. Nauk SSSR, 212, 424—427.
Fujishima, A. and Honda, K. (1972) Nature, 238, 37—38.
Gaffron, H. (1972) Horizons of Bioenergetics. Academic Press Inc., New York.
Gaffron, H. and Rubin, J. (1942) J. Gen. Physiol., 26, 219—240.
Gest, G. and Kamen, M. (1949) Science, 109, 558—559.
Gogotov, I.N., Zorin, N.A. and Bogorov, L.V. (1974) Mikrobiologiya, 43, 5—10.
Kok, B., Rurainski, H. and Owens, O. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 109, 347—356.
Kondratieva, E.N. and Gogotov, I.N. (1976) Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol., 1, 69—86.
Korsunovsky, G.A. (1960) J. Fiz. Chim., 34, 510—517.
Krasnovsky, A.A. (1974) Transformation of light energy in photosynthesis. Nauka Publishing House, Moscow.
Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1949) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 67, 325—328.
Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1961) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 139, 142—145.
Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1962) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 147, 656—659.
Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1968) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 179, 726—729.
Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1970) in Molecular Photonics, pp. 161—178, Nauka Publishing House, Leningrad.
Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1973) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 213, 1431—1434.
Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Aliev, Z.Sh. (1971) Dokl. Aka. Nauk SSSR, 199, 952—955.
Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Nikandrov, V.V. (1975a) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 220, 1214—1217.
Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Nikandrov, V.V. (1976) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 229, 990—993.
Krasnovsky, A.A. and Drozdova, N.N. (1966) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 167, 928—930.
Krasnovsky, A.A., Nikandrov, V.V., Brin, G.P., Gogotov, I.N. and Oshchepkov, V.P. (1975b) Dokl. Akad. Nak SSSR, 225, 711—713.
Luganskaya, A.N. and Krasnovsky, A.A. (1970) Mol. Biol. (Moscow), 4, 848—859.
Metzner, H. (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 1586—1590.
Nikandrov, V.V., Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1978) Biokhimiya 43, 636—645.
Nikandrov, V.V., Chan-Van-Ni, Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1978a) Mol. Biol. (Moscow), 12, 1278—1287.
Oshchepkov, V.P. and Krasnovsky, A.A. (1972) Fiziol. Rast. 19, 1090—1097; (1974) Fiziol. Rast. 21, 462—467.
Oshchepkov, V.P. and Krasnovsky, A.A. (1974) Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 10, 760—764.
Oshchepkov, V.P. and Krasnovsky, A.A. (1976) Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol., 1, 87—100.
Oshchepkov, V.P., Nikitina, K.A., Gusev, M.V. and Krasnovsky, A.A. (1973) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 213, 739—742.
Rao, K.K., Rosa, L. and Hall, D.O. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 21—28.
Semenov, N.N. (1972) Sci. Life (SSSR), No. 9—10.
Shuvalov, V.A. and Krasnovsky, A.A. (1975) Biokhimiya, 40, 358—366.
Zweig, G. and Avron, M. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 397—400.

ОБРАТИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ CHLAMYDOMONAS REINHARDII 494 ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Л. М. ВОРОБЬЕВА, Л. С. АБРОСЬКИНА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Интенсивный свет вызывает необратимые изменения спектров флуоресценции [1—3] и поглощения [3] фотосинтезирующих клеток, свидетельствующие о дезагрегации хлорофилла. В поисках обратимой дезагрегации пигментного комплекса под действием света в данной работе использовали клетки Chlamydomonas reinhardii 494, выращенные на свету ($5 \cdot 10^{-4}$ Вт·см$^{-2}$) в жидкой среде. Изучали влияние изменений режима освещения клеток при +25° С на спектры флуоресценции, измеренные при —196° С с помощью фотоэлектрического спектрофлуориметра при возбуждении линией ртути 365 нм. Действующий свет применяли в двух вариантах интенсивности: «слабый» свет — лампа накаливания 40 Вт ($5 \cdot 10^{-4}$ Вт·см$^{-2}$) и «сильный» свет — лампа с иодным циклом КИМ 9×75 (0,35 и 1,0 Вт·см$^{-2}$). Для характеристики изменений в спектрах флуоресценции использовали соотношение высоты максимумов флуоресценции 685 и 716 нм.

Действие слабого света. При затемнении культуры, выросшей на свету, наблюдалось возрастание длинноволнового максимума флуоресценции 716 нм и понижение коротковолновых максимумов 685 и 696 нм. При возвращении клеток из темноты на свет наблюдался обратный процесс (рис. 1, *а*).

При освещении клеток, выросших на свету, но затем затемненных на 24 ч, также наблюдалось относительное возрастание коротковолновых максимумов флуоресценции (рис. 1, *б*). Эти спектральные изменения имели сложную зависимость от времени освещения (рис. 2), указывающую на то, что они обусловлены несколькими процессами, идущими одновременно. В ряде опытов под действием секундных интервалов света происходило возрастание флуоресценции по всему спектру, падение при 716 нм отсутствовало. Однако рост соотношения I_{685}/I_{716} и в этом случае свидетельствовал о возрастании коротковолнового максимума. Затемнение культуры на всех интервалах освещения приводило к обратным изменениям.

Действие сильного света также приводило к обратимым изменениям, подобно описанным выше, но лишь при коротких интервалах освещения. Так, на свету 0,35 Вт·см$^{-2}$ возрастание коротковолновых максимумов флуоресценции обнаруживалось при длительности освещения до 3 мин и наибольшим было после 15 с. При дальнейшем увели-

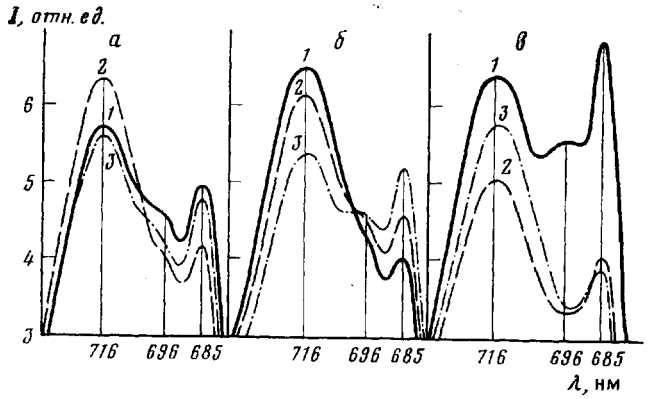


Рис. 1. Обратимые и необратимые изменения в спектрах флуоресценции (—196° С) клеток Chlamydomonas при воздействии света и темноты +25° С. *а*; *1* — световая культура; *2* — 15 мин темноты; *3* — 15 мин темноты, 15 мин освещения слабым светом; *б*: *1* — световая культура после 24 ч темноты; *2* — 15 с освещения слабым светом, *3* — 45 мин освещения; *в*: *1* — световая культура; *2* — 30 с освещения сильным светом (1 Вт·см$^{-2}$); *3* — 30 с освещения сильным светом, 3 мин темноты

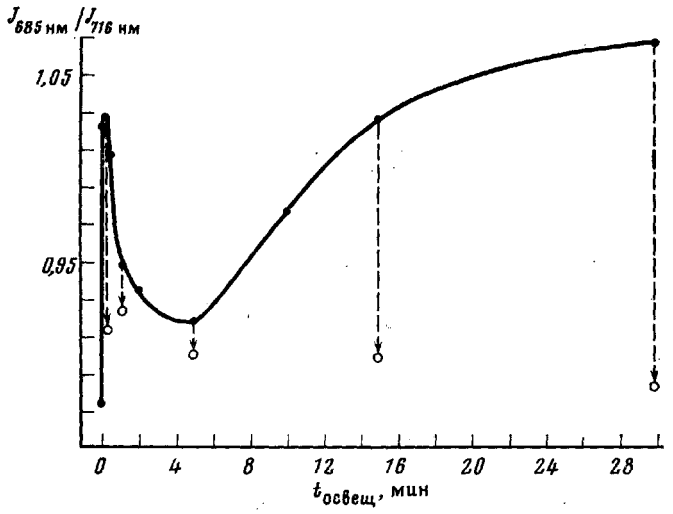


Рис. 2. Изменение соотношения высоты максимумов флуоресценции $I_{685\,нм}/I_{716\,нм}$ (—196° С) при освещении затемненных на 24 ч клеток Chlamydomonas слабым светом при +25° С. Стрелки — изменение этого соотношения в результате затемнения клеток в данной точке освещения на промежуток времени, равный интервалу освещения

чении интенсивности света до 1 Вт·см$^{-2}$ описанные обратимые изменения возможно было наблюдать лишь до 2—5 с освещения. Более длительное освещение приводило к необратимому понижению флуоресценции коротковолновых форм хлорофилла, по-видимому, вследствие деструктивного выцветания (рис. 1, *в*).

Измерения спектров при —196° С были сопоставлены с измерениями интенсивности флуоресценции при +25° С (максимум флуоресценции 685 нм). После выхода флуо-

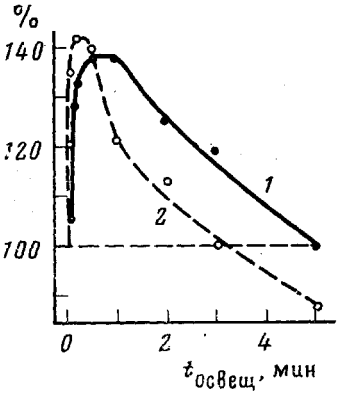


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции при +25° С (685 нм) в зависимости от времени освещения клеток и интенсивности действующего света (*1* — 0,35 Вт·см$^{-2}$; *2* — 0,7 Вт·см$^{-2}$. Ордината — интенсивность флуоресценции спустя 2 с после выключения действующего света в процентах от стационарного уровня флуоресценции до освещения)

ресценции на стационарный уровень клетки освещали импульсами сильного света возрастающей продолжительности от 1 с до 5 мин. При этом наблюдалось обратимое усиление флуоресценции, величина которого зависела от времени освещения и интенсивности действующего света (рис. 3). Понижение флуоресценции ниже исходной при длительном освещении, по-видимому, было связано с фотодеструкцией хлорофилла. Опыты указывают на корреляцию изменений флуоресценции при +25° С и изменений относительной высоты максимумов флуоресценции пигмента при —196° С после освещения клеток водоросли при +25° С. В связи с этим следует указать на работы, в которых было описано возрастание коротковолновых максимумов флуоресценции в процессе индукции флуоресценции при —196° С [4].

Обратимые изменения в спектрах флуоресценции при переходе клеток водорослей от темноты к свету и обратно по-видимому, отражают изменения структуры пигментного комплекса (дезагрегации) и условий миграции энергии возбуждения между формами хлорофилла.

Исходная культура Chlamydomonas reinhardii 494 была любезно предоставлена К. В. Квитко.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А.,* Докл. АН СССР, *183*, 711—714, 1968.
2. *Воробьева Л. М., Красновский А. А., Каюпова Г. А.,* Физиол. раст., *22*, 16—26, 1975.
3. *Чернова С. И., Звалинский В. И.,* в сб.: Экологические аспекты фотосинтеза морских макроводорослей, стр. 167—174, № 11, Владивосток, 1978.
4. *Шубин В. В., Синещеков В. А., Литвин Ф. Ф.,* Биофизика, *21*, 760—762, 1976.

Поступила в редакцию 10.X.1979

REVERSIBLE REARRANGEMENT OF FLUORESCENCE SPECTRA OF CHLAMYDOMONAS CELLS UPON ILLUMINATION

L. M. VOROBYEVA, L. S. ABROSKINA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Illumination of Chlamydomonas reinhardii cells at +25° C resulted in a reversible increase of shortwave fluorescence maxima 685 and 696 nm measured at 77 K. The reversible photoconversions are probably due to desaggregation of pigment complex upon illumination and changes of energy migration between different forms of chlorophyll in the complex.

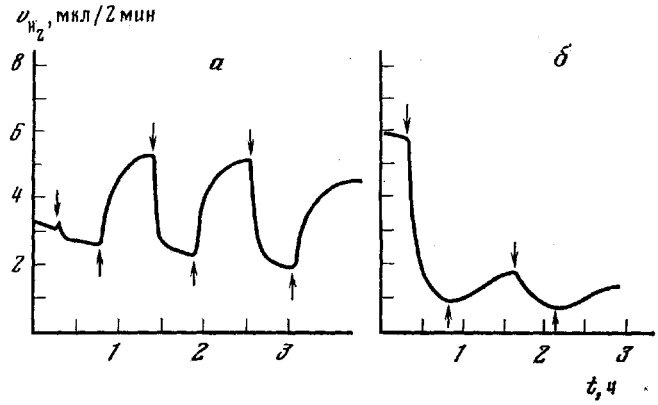
ОБРАТИМОЕ ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА БАКТЕРИЯМИ CLOSTRIDIUM BUTYRICUM

Л. В. ЖУКОВА, В. В. НИКАНДРОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В работах [1, 2] высказывалось предположение, что световая активация первичных гетеротрофных организмов, не содержащих хлорофилла, могла быть эволюционным вариантом перехода к фотоавтотрофии. Удобным объектом для проверки этого предположения являются гетеротрофные анаэробные бактерии C. butyricum — представители наиболее древнего в эволюционном отношении рода. Ранее сообщалось, что освещение этих бактерий в определенных режимах приводило к увеличению синтеза белка и клеточного деления [3]. В данной работе о влиянии света на бактерии C. butyricum судили по скорости выделения водорода, который является одним из конечных продуктов метаболизма.

Культуру бактерий C. butyricum выращивали из спор на глюкозо-пептонной среде [4] с добавлением $FeSO_4$ (0,05 г/л) и биотина (10 γ/л) при 37° С. Для удаления кислорода среду перед посевом кипятили в течение 1 ч. Для опыта брали культуру в период максимального выделения ею H_2. Оптическая плотность бактерий в среде, измеренная на приборе Specord UV VIS в кюветном отделении для рассеивающих образцов, равнялась 1,2—1,4 при 400 нм. Для проведения опытов в буферном растворе бактерии отделяли от среды центрифугированием, отмывали анаэробным 0,06 М К-Na-фосфатным буфером pH 5,0 и ресуспендировали в нем с добавлением глюкозы (10 г/л). Полученную суспензию разбавляли до оптической плотности 3,0 при 400 нм, продували аргоном, активировали 20 мин при 37° С и через определенные промежутки времени отбирали пробы для опыта. После отбора проб суспензию вновь продували аргоном и выдерживали в темноте при 28±1° С. Регистрацию выделяемого H_2 проводили газохроматографическим методом [5] через каждые 2 мин до, во время и после освещения. Для опыта 1 мл суспензии вносили в стеклянную ячейку и продували аргоном. Толщина слоя суспензии — 0,3 см. Активность выделения H_2 в разных посевах бактерий после перенесения в буфер изменялась от 3,0 до 6,0 мкл/2 мин. Ячейку освещали ртутной лампой СВД-120А через светофильтр СЗС-24, пропускающий линии ртути длиннее 330 нм. Интенсивность падающего на ячейку света, измеренная термостолбиком, равнялась $2 \cdot 10^2$ Вт/м^2. Эффект действия света выражали в процентах к скорости выделения H_2 до освещения.



Влияние освещения на выделение H_2 бактериями C. butyricum: *а* — через 20 мин инкубации в фосфатном буфере с глюкозой, *б* — через 15 ч инкубации в глюкозо-пептонной среде; ↓ — включение света, ↑ — выключение света

В опытах, результаты которых представлены на рис. 1, после освещения в течение 30 мин наблюдалось уменьшение скорости выделения H_2 у бактерий, взятых через 20 мин инкубации, на 20—30%, а через 15 ч инкубации — на 80—90%. При выключении света скорость выделения H_2 возрастала и за 30 мин достигала у бактерий, взятых через 20 мин инкубации, 130—170%, а через 15 ч инкубации — 20—30% от скорости до освещения. Изменение скорости выделения H_2 происходило сразу после первого освещения, при повторном освещении наблюдалось обратимое подавление. Различие во влиянии света на бактерии не связано со средой, поскольку с увеличением времени инкубации бактерий в буфере действие света становится схожим с его воздействием на бактерии в глюкозо-пептонной среде. Так, если из одной и той же суспензии бактерий в буфере брались пробы сразу после активации, через 2—2,5 и через 4—5 ч инкубации в темноте, то за 10 мин освещения наблюдалось уменьшение скорости выделения H_2 в этих пробах на 10—25, 15—45 и 30—70% соответственно. После выключения света выделение H_2 возрастало и достигало в опытах с бактериями, взятыми в те же временные интервалы, 115—130, 105—125 и 90—100% от скорости выделения H_2 до освещения. Предполагается, что наблюдаемое изменение скорости выделения H_2 отражает наложение эффектов активации и подавления выделения H_2 светом. С увеличением длительности инкубации соотношение изменяется от активации к подавлению. Фотоактивным был свет от 330 до 570 нм. Это указывает на то, что фоторецепторами в наблюдаемом явлении могут быть флавины и восстановленные никотинамидные коферменты. Фотоактивность НАДН и НАДФН была показана в нашей работе [6]. Активация выделения H_2, возможно, происходит за счет фотовосстановления компонентов клеток бактерий. Образование восстановленных соединений, в частности НАДН и НАДФН, наблюдалось при освещении бесклеточных экстрактов метанобразующих бактерий Methanobacillus kuzneceovii [7].

Выяснение механизма действия света на выделение H_2 бактериями требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А.*, в сб.: Возникновение жизни на земле, стр. 355, Изд-во АН СССР, М., 1957.
2. *Красновский А. А.*, в сб.: Происхождение жизни и эволюционная биохимия, стр. 133, «Наука», М., 1975.
3. *Рубин Л. Б., Еремеева О. В., Фрайкин Г. Я., Швинка Ю. Э.*, Докл. АН СССР, *210*, 971, 1973.
4. *Азова Л. Г., Гусев М. В., Ивойлов В. С.*, Микробиология, *39*, 55, 1970.
5. *Ощепков В. П., Красновский А. А.*, Прикл. биохим. и микробиол., *10*, 759, 1974.
6. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.*, Биохимия, *43*, 636, 1978.
7. *Панцхава Е. С.*, Биохимия, *42*, 549, 1977.

Поступила в редакцию 15.IV.1980

REVERSIBLE ACTION OF LIGHT ON HYDROGEN EVOLUTION BY CLOSTRIDIUM BUTYRICUM

L. V. ZHUKOVA, V. V. NIKANDROV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

The action of light of the mercury lamp (330—570 nm) reversibly inhibits hydrogen evolution by Clostridium butyricum. The overlapping of stimulation and inhibition by light is supposed to occur. The flavins, NADH and NADPH are probably photoreceptors of the phenomenon observed.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 14 1980 Вып. 2

УДК 577.158.2

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ЭФФЕКТИВНОГО ФОТОВЫДЕЛЕНИЯ ВОДОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГИДРОГЕНАЗЫ

А. А. КРАСНОВСКИЙ, ЧАН ВАН НИ, В. В. НИКАНДРОВ, Г. П. БРИН

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

Проводилось сравнительное исследование фотовыделения водорода хлоропластами и солюбилизированным хлорофиллом в присутствии метилвиологена и препаратов гидрогеназы из *Clostridium butyricum*. Предполагается, что фотовыделение водорода хлоропластами в отсутствие экзогенных доноров электрона, а также при использовании необратимо окисляющихся дитиотреитола и цистеина лимитируется циклическим транспортом электронов через метилвиологен, замыкающим ветвь переноса электронов в фотосистеме 1. Эффективность фотовыделения водорода хлоропластами с аскорбатом и NADP·H лимитируется обратной реакцией между восстановленным на свету метилвиологеном и окисленным донором электронов. Использование комбинации доноров электрона (дитиотреитол и аскорбат) при создании анаэробных условий без повреждения хлоропластов позволяет предотвратить расходование восстановленного метилвиологена на восстановление окисленного донора электрона и исключить замыкание переноса электрона. В этих условиях фотовыделение водорода хлоропластами происходило со скоростью 350—400 *мкмоль* H_2/*мг* хлорофилла в час, что соответствует полному использованию способности фотосистемы 1 к фотопереносу электрона для выделения водорода.

После открытия способности одноклеточных водорослей к фотовыделению водорода [1] эта функция исследовалась в более простых модельных системах. Арнон и соавт. [2] обнаружили фотовыделение водорода при сопряжении хлоропластов с бактериальной гидрогеназой, используя цистеин как донор электронов. Бен-Амотц и Гиббс [3] описали фотовыделение водорода в подобной системе, используя в качестве донора электронов дитиотреитол. Беннеман и соавт. [4] наблюдали фотовыделение водорода хлоропластами шпината в присутствии бактериального ферредоксина и гидрогеназы и в отсутствие экзогенных доноров электрона со скоростью 1,7 *мкмоль* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час. Предполагалось, что низкая эффективность системы обусловлена тем, что выделяющийся на свету кислород окисляет восстановленный на свету ферредоксин и инактивирует гидрогеназу. Подобные результаты описаны для хлоропластов гороха [5]. Рао и соавт. [6], используя системы, реагирующие с кислородом (глюкоза, глюкозооксидаза) и перекисью водорода (этанол, каталаза), наблюдали фотовыделение водорода хлоропластами шпината в присутствии ферредоксина шпината и гомогенатов *Escherichia coli* (источник гидрогеназы) в течение 6 *час* со скоростью 10 *мкмоль* H_2/*мг* хлорофилла в час. Введение в реакционную среду сывороточного альбумина [7] позволило наблюдать фотообразование водорода хлоропластами шпината, ферредоксином и гидрогеназой в течение 20 *час*. Авторы предположили, что выделение водорода прекращается из-за инактивации фотосистемы 2, а скорость реакции лимитируется стадией сопряжения хлоропластов с гидрогеназой. В последу-

ющем было показано [8], что скорость реакции снижается из-за окисления ферредоксина выделяющимся кислородом. Рао и соавт. [9] описали фотовыделение водорода хлоропластами *Chenopodium album* с ферредоксином и гидрогеназой *Cl. pasteurianum* со скоростью до 94 *мкмоль* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час. Гоффман и соавт. [10] исследовали факторы, влияющие на фотовыделение водорода хлоропластами в присутствии метилвиологена, гидрогеназы и доноров электрона. При использовании в качестве донора электронов аскорбата натрия с тетраметилфенилендиамином фотовыделение водорода происходило со скоростью до 125 *мкмоль* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час. По мнению авторов, фотовыделение водорода и фотовосстановление метилвиологена лимитируются циклическим транспортом электронов в фотосистеме 1. Нами было показано [11], что эффективность фотовосстановления метилвиологена хлоропластами действительно связана с эффективностью циклического транспорта электронов. Ранее [12] мы наблюдали фотовыделение водорода хлоропластами гороха с гидрогеназой и метилвиологеном в присутствии NAD·H и обнаружили фотовыделение водорода в простейшей модельной системе — водных растворах хлорофилла, солюбилизированного детергентом, в присутствии бактериальной гидрогеназы, доноров электрона и метилвиологена.

Для изучения условий, способствующих эффективному фотовыделению водорода, и механизма этого процесса мы провели сравнительное исследование фотовыделения водорода хлоропластами и солюбилизированным хлорофиллом в присутствии препаратов гидрогеназы *Cl. butyricum*.

МЕТОДИКА

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков гороха сорта Победитель по методу, описанному ранее [13], в среде следующего состава: 0,5 *М* сахароза, 0,035 *М* хлористый натрий, 0,002 *М* хлористый магний, 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 7. Хлоропласты использовали сразу после получения или после хранения в присутствии 50%-ного глицерина при —70°. Перед опытом хлоропласты разбавляли средой выделения без сахарозы.

Cl. butyricum выращивали на среде, описанной ранее [14]. Для получения гомогенатов 2 *г* замороженных в жидком азоте клеток измельчали в 10 *мл* фосфатного буфера, pH 7, в анаэробных условиях. Суспензию инкубировали 30 *мин* при 4° в атмосфере аргона, затем центрифугировали при 12 500·*g*. Гомогенат замораживали и хранили при —70° во флаконах с водородом. Частично очищенные препараты гидрогеназы получали после фракционирования гомогената $(NH_4)_2SO_4$ и хроматографии на колонке с сефадексом G-25. Для опытов брали насыщающее реакцию количество гомогената или препаратов гидрогеназы (0,1—0,3 *мл*) в зависимости от активности препаратов.

Скорость выделения водорода определяли амперометрически [15] с использованием платинового электрода, покрытого тефлоновой пленкой. Скорость поглощения и выделения кислорода определяли также амперометрическим методом. Реакционную смесь во время опытов перемешивали магнитной мешалкой и освещали сфокусированным при помощи конденсора светом лампы накаливания в области 600—800 *нм* (обычно $5 \cdot 10^5$ *эрг/см²·сек*). Интенсивность света изменяли при помощи нейтральных светофильтров. В опытах по выделению водорода анаэробные условия создавали методом раздельного продувания [12]: аргон барбатировали через реакционную среду (4 *мл*) в склянке Дрекселя и пропускали над концентрированной суспензией хлоропластов или водным коллоидным раствором хлорофилла (0,1 *мл*) в полярографической ячейке. Таким образом, анаэробные условия создавались без барбатирования газа через суспензию хлоропластов. После 5 *мин* продувания

аргоном в ячейку вводили 0,1—0,3 *мл* препарата гидрогеназы, затем реакционную среду передавливали при помощи аргона в ячейку и перемешивали с суспензией хлоропластов или коллоидным раствором хлорофилла, к которому добавляли 0,3 *мл* предварительно освобожденного от кислорода 10%-ного раствора тритона X-100. Коллоидный раствор хлорофиллов $a+b$ готовили следующим образом: 3 *мг* твердой смеси хлорофиллов $a+b$ растворяли в 5 *мл* ацетона, затем добавляли 5 *мл* фосфатного буфера, pH 7, и после перемешивания удаляли ацетон откачиванием на форвакуумном насосе.

Фотовосстановление метилвиологена и метилового красного измеряли в вакуумных трубках Тунберга с дополнительным отводом. Для опытов с хлоропластами анаэробные условия создавали методом раздельного откачивания [11]: во время откачивания форвакуумным насосом 4 *мл* реакционной среды находятся в нижней части трубки, а 0,1 *мл* концентрированной суспензии хлоропластов с равным объемом глицерина— в боковом отводе. После 5 *мин* откачивания суспензию хлоропластов переливали к реакционной среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФОТОВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ

Фотовыделение водорода без экзогенных доноров электрона. Освещение хлоропластов гороха в присутствии препаратов гидрогеназы *Cl. butyricum* при создании анаэробных условий методом раздельного продувания приводит к выделению водорода со скоростью до 4 *мкл* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час. Добавление метилвиологена в эту систему значительно активирует эту реакцию (табл. 1). Разобщитель фотофосфорилирования NH_4Cl также активирует фотовыделение водорода хлоропластами. Диурон в концентрации 10^{-5} *M* полностью подавляет реакцию, что указывает на участие фотосистемы 2 в переносе электрона к гидрогеназе. Ранее мы нашли, что фотовосстановление метилвиологена хлоропластами не активируется системами, используемыми для поглощения кислорода [11]. Подобным образом глюкозооксидаза с глюкозой и каталаза с этанолом не приводят к активации фотовыделения водорода хлоропластами. По-видимому, это связано с тем, что выделяющийся при фотореакции кислород реагирует с восстановленным метилвиологеном гораздо эффективнее, чем с глюкозооксидазой.

Фотовыделение водорода в присутствии экзогенных доноров электрона. Использовали дитиотреитол, цистеин, NADP·H и аскорбат натрия. В этом случае в реакции участвует лишь фотосистема 1. Для ингибирования фотосистемы 2 в реакционную среду добавляли диурон в концентрации 10^{-5} *M*.

Таблица 1

Фотовыделение водорода хлоропластами без экзогенных доноров электрона

Реакционная среда содержала 0,035 *M* NaCl, 0,002 M MgCl, 0,05 *M* фосфатный буфер, pH 7; 0,2 *мл* препарата гидрогеназы, 20 *мкг* хлорофилла в 1 *мл* суспензии. На остальных таблицах условия такие же, кроме оговоренных

Система	*V*, *мкл* H_2/*мг* хлорофилла в час	Система	*V*, *мкл* H_2/*мг* хлорофилла в час
Без добавок	4,0	То же+NH_4Cl	15,0
$5\cdot10^{-5}$ *M* метилвиологен	10,5	То же+10^{-5} *M* диурон	0

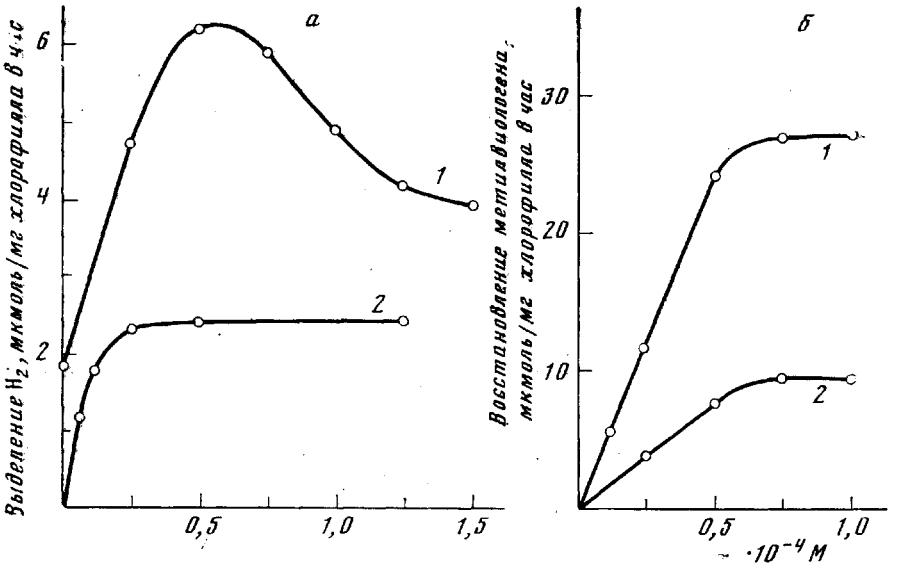


Рис. 1. Зависимость фотовыделения водорода (*а*) и фотовосстановления метилвиологена (*б*) хлоропластами (*1*) и хлорофиллом в 1%-ном растворе тритона Х-100 (*2*) с дитиотреитолом ($5 \cdot 10^{-2}$ *М*) от концентрации метилвиологена. 13 *мкг/мл* хлорофилла в суспензии хлоропластов, 20 *мкг/мл* — в растворе

Влияние концентрации метилвиологена. Хлоропласты с гидрогеназой и донорами электрона медленно выделяют водород. При добавлении метилвиологена скорость реакции повышается. Максимальное выделение водорода наблюдается при концентрации метилвиологена $5 \cdot 10^{-5}$ *М*

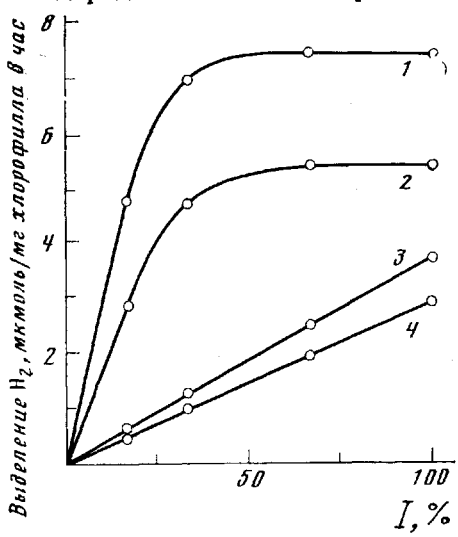


Рис. 2

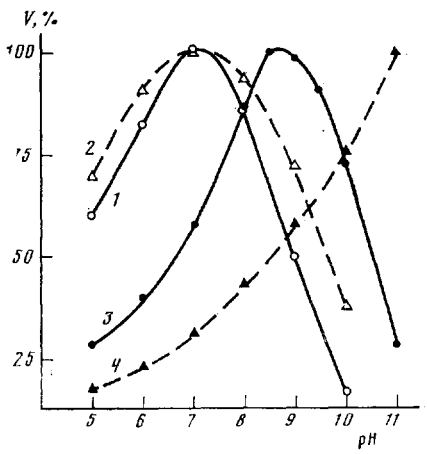


Рис. 3

Рис. 2. Световая зависимость выделения водорода хлоропластами (*1, 2*) и хлорофиллом в растворе тритона Х-100 (*3, 4*) с $5 \cdot 10^{-2}$ *М* дитиотреитолом (*1, 3*) и 10^{-1} *М* цистеином (*2, 4*). 10 *мкг/мл* хлорофилла в суспензии хлоропластов, 15 *мкг/мл* — в растворе

Рис. 3. Влияние pH среды на фотовыделение водорода (*1, 2*) и фотовосстановление метилвиологена (*3, 4*) хлоропластами (*1, 3*) и хлорофиллом в растворе тритона Х-100 (*2, 4*). Скорость фотовыделения водорода хлоропластами и хлорофиллом при pH 7, фотовосстановления метилвиологена хлоропластами при pH 8,5 и фотовосстановления метилвиологена хлорофиллом при pH 11 принята за 100%. Для опытов брали минимальное количество гомогената *Clostridium*, насыщающее реакцию фотовыделения водорода хлоропластами и хлорофиллом при pH 7

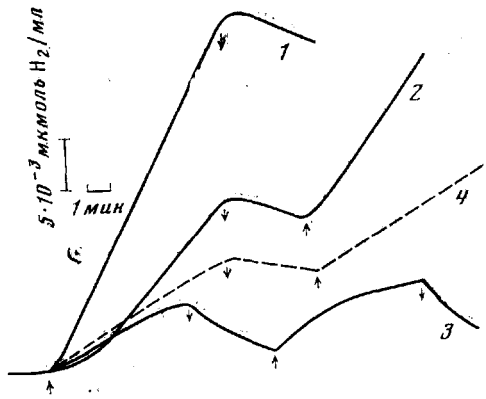


Рис. 4. Кинетика фотовыделения водорода хлоропластами (*1—3*) и хлорофиллом в растворе тритона X-100 (*4*) с $5 \cdot 10^{-2}$ *М* дитиотреитолом (*1*), 10^{-1} *М* цистеином (*2*) и $2 \cdot 10^{-3}$ *М* NADP·H (*3*, *4*). 29 *мкг/мл* хлорофилла в суспензии хлоропластов, 36 *мкг/мл* — в растворе. Стрелки — включение и выключение света

(рис. 1). Дальнейшее увеличение концентрации метилвиологена приводит к снижению скорости реакции. Это не связано с уменьшением скорости восстановления метилвиологена, которая остается постоянной. Подобная зависимость фотовыделения водорода хлоропластами от концентрации метилвиологена была описана ранее [10].

Влияние интенсивности света. Фотовыделение водорода с дитиотреитолом и цистеином достигает насыщения при интенсивности света, составляющей примерно 50% от интенсивности, насыщающей реакцию Хилла с феррицианидом, проводимую в этих же условиях (рис. 2).

Влияние pH среды. Скорость реакции фотовыделения водорода хлоропластами с дитиотреитолом максимальна при pH ~7 (рис. 3). По-видимому, такая зависимость связана с активностью гидрогеназы, поскольку фотовосстановление метилвиологена хлоропластами с этим же донором электрона наблюдается при pH 8,5 (рис. 3).

Влияние разобщителей фотофосфорилирования. Фотовыделение водорода с $2 \cdot 10^{-2}$ *М* дитиотреитолом и $5 \cdot 10^{-2}$ *М* цистеином активируется хлористым аммонием и метиламином (табл. 2). Фотовосстановление метилвиологена также активируется этими разобщителями. Следует отметить, что при более высоких концентрациях доноров электрона разобщители фотофосфорилирования не активируют реакцию. По-видимому, высокие концентрации дитиотреитола и цистеина обладают разобщающим действием.

Природа доноров электрона. С дитиотреитолом и цистеином наблюдается длительное фотовыделение водорода (рис. 4). С NADP·H реак-

Таблица 2

Влияние разобщителей фотофосфорилирования на скорость фотовыделения водорода и фотовосстановления метилвиологена хлоропластами с $5 \cdot 10^{-2}$ *М* цистеином и $2 \cdot 10^{-2}$ *М* дитиотреитолом (% от контроля без разобщителей)

Разобщитель	Выделение водорода		Восстановление метилвиологена	
	дитиотреитол	цистеин	дитиотреитол	цистеин
$5 \cdot 10^{-3}$ *М* NH_4Cl	260	250	350	310
$1{,}2 \cdot 10^{-2}$ *М* метиламин	270	230	330	280

ция длится только 3—4 *мин*, что, по-видимому, связано с функционированием в хлоропластах ферредоксин-NADP-редуктазы, которая восстанавливает образованный на свету $NADP^+$ за счет восстановленного метилвиологена. Это подтверждается подавлением фотовыделения водорода и фотовосстановления метилвиологена хлоропластами с дитиотреитолом при добавлении 10^{-3} *М* $NADP^+$. Ингибирование фотовыделения водорода хлоропластами при добавлении $NADP^+$ отмечали ранее Рао и соавт. [6]. Фотовыделение водорода по-разному зависит от концентрации дитиотреитола и цистеина (рис. 5), что, по-видимому, обусловлено меньшей проницаемостью мембран хлоропластов для цистеина по сравнению с дитиотреитолом. Предварительное прогревание хлоропластов в течение 5 *мин* при 50° значительно активирует выделение водорода при низких концентрациях цистеина. Это не связано с ингибированием фотовыделения кислорода, как предполагалось ранее [2], поскольку прогревание активирует реакцию и в присутствии диурона или после обработки хлоропластов *трис*-буфером. По-видимому, прогревание хлоропластов увеличивает проницаемость мембран хлоропластов для цистеина. Следует отметить, что диурон не влияет на фотовыделение водорода при использовании всех доноров электрона. Это свидетельствует о том, что местом восприятия электронов от доноров является фотосистема 1.

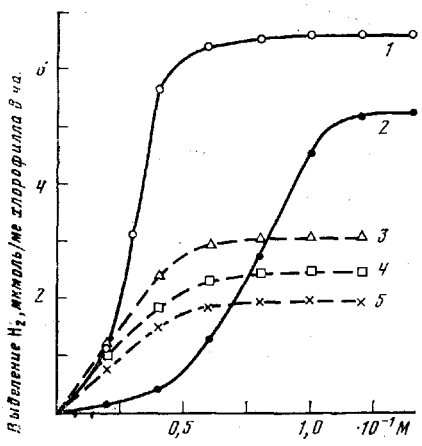


Рис. 5. Зависимость скорости фотовыделения водорода хлоропластами (*1*, *2*) и хлорофиллом в растворе тритона X-100 (*3*—*5*) с дитиотреитолом (*1*, *3*), цистеином (*2*, *5*) и NADP·H (*4*) от концентрации доноров электрона. 16 *мкг* хлорофилла в суспензии хлоропластов, 24 *мкг* — в растворе

Мы сопоставили скорости фотовыделения водорода, фотовосстановления метилвиологена и фотопоглощения кислорода хлоропластами с различными донорами электрона (табл. 3). Результаты показывают, что скорость выделения водорода хлоропластами с дитиотреитолом и цистеином близка к скорости восстановления метилвиологена, но значительно меньше скорости поглощения кислорода при использовании этих же доноров электрона. При использовании аскорбата натрия с тетраметилфенилендиамином или дихлорфенолиндофенолом скорости выделения водорода и восстанов-

Таблица 3

Фотовыделение водорода, фотовосстановление метилвиологена и фотопоглощение кислорода хлоропластами в присутствии доноров электрона (*мкэкв/мг* хлорофилла в час)

Донор электрона (*М*)	Выделение водорода	Восстановление метилвиологена	Поглощение кислорода
$5 \cdot 10^{-2}$ *М* дитиотреитол	23,4	24,0	336
$5 \cdot 10^{-2}$ *М* цистеин	16,4	17,5	224
10^{-3} *М* аскорбат + 10^{-5} *М* тетраметилфенилендиамин	5,2	0,2	184
10^{-3} *М* аскорбат + 10^{-5} *М* дихлорфенолиндофенол	3,4	0,1	236

Таблица 4

Влияние комбинации дитиотреитола ($5 \cdot 10^{-2}$ *М*) и аскорбата натрия на фотовыделение водорода, фотовосстановление метилвиологена ($5 \cdot 10^{-5}$ *М*) и фотовосстановление метилового красного ($5 \cdot 10^{-4}$ *М*) хлоропластами (*мкэкв/мг* хлорофилла в час). $5 \cdot 10^{-2}$ *М* цистеин

Доноры электрона	Выделение водорода	Восстановление метилвиологена	Восстановление метилового красного
Дитиотреитол	6,4	9,2	524
Аскорбат	0,4	0	536
Аскорбат+дитиотреитол	768	84	540

ления метилвиологена меньше, а скорости выделения кислорода близки к скоростям соответствующих реакций для дитиотреитола и цистеина. Низкие скорости фотовыделения водорода с необратимо окисляющимися дитиотреитолом и цистеином, по-видимому, можно объяснить циклическим транспортом электронов, замыкающим первую фотосистему через метилвиологен. При использовании аскорбата натрия низкая эффективность реакции может быть обусловлена не только циклическим транспортом, но и обратной реакцией между восстановленным метилвиологеном и окисленным аскорбатом. При использовании кислорода в качестве конечного акцептора электронов достигается высокая скорость переноса электронов, так как в этом случае циклический транспорт электронов исключается.

Влияние комбинации доноров электрона. В работе Гофман и соавт. [10] описано фотовыделение водорода хлоропластами со скоростью 125 *мкмоль/мг* хлорофилла в час при использовании в качестве донора электронов аскорбата натрия с тетраметилфенилендиамином. В наших опытах фотовыделение водорода хлоропластами при использовании аскорбата натрия с этим соединением или с дихлорфенолиндофенолом шло с малой скоростью (1—3 *мкмоль/мг* хлорофилла в час), что согласуется с данными [4]. Возможно, что эффективное выделение водорода, описанное Гофман и соавт. [10], происходило благодаря наличию в реакционной среде дитиоэритритола, который добавляли для защиты гидрогеназы от инактивации. Действительно, мы наблюдали, что при совместном присутствии в реакционной среде аскорбата натрия и дитиотреитола (изомер дитиоэритритола) фотовыделение водорода происходило со скоростью, на несколько порядков превышающей скорость реакций при использовании каждого донора электронов отдельно (табл. 4). Это явление нельзя объяснить повышением активности гидрогеназы или защитой ее от инактивации при добавлении дитиотреитола, поскольку фотовыделение водорода хлоропластами с использованием его в качестве донора электрона также малоэффективно. Существенно также и то, что при совместном присутствии аскорбата натрия и дитиотреитола активируется и фотовосстановление метилвиологена (табл. 4) — реакция, при которой гидрогеназа не используется. Наиболее вероятно, что в присутствии обоих доноров происходит подавление циклического транспорта электронов, осуществляемого через метилвиологен. Действительно, фотовосстановление хлоропластами метилового красного, который в отличие от метилвиологена восстанавливается необратимо, идет с высокой скоростью и не зависит от того, применялись ли аскорбат натрия и дитиотреитол отдельно или в комбинации (табл. 4). При использовании комбинаций доноров электрона цистеин+ +дитиотреитол или цистеин+аскорбат натрия фотовыделение водорода не активировалось. По-видимому, подавление циклического тран-

спорта электронов при использовании аскорбата натрия с дитиотреитолом происходит благодаря тому, что при этом эффективно восстанавливаются все переносчики электронов, расположенные между фотосистемой 1 и фотосистемой 2. Цистеин в комбинации с аскорбатом натрия не заменяет дитиотреитол, по-видимому, вследствие неспособности конкурировать с восстановленным метилвиологеном за восстановление окисленного аскорбата.

О влиянии циклического транспорта электронов на фотовыделение водорода хлоропластами свидетельствует также подавление фотовыделения водорода при барбатировании инертного газа через суспензию хлоропластов или детергентом тритон Х-100 — воздействиями, изменяющими состояние мембран хлоропластов.

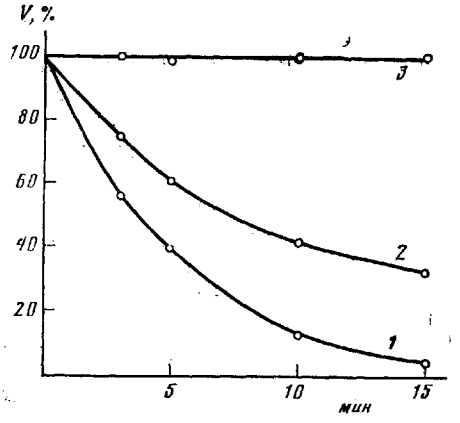


Рис. 6

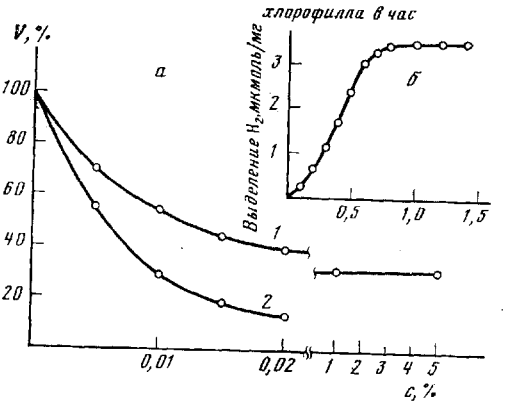


Рис. 7

Рис. 6. Зависимость фотовыделения водорода (*1*), фотовосстановления $5 \cdot 10^{-5}$ *М* метилвиологена (*2*) и $5 \cdot 10^{-4}$ *М* метилового красного (*3*) хлоропластами с дитиотреитолом ($5 \cdot 10^{-2}$ *М*) от времени продувания суспензии хлоропластов аргоном. Содержание хлорофилла 22 *мкг* в 1 *мл*. Скорость реакции после предварительного раздельного продувания суспензии хлоропластов аргоном принята за 100%

Рис. 7. Влияние тритона Х-100 на фотовыделение водорода (*1*) и фотовосстановление метилвиологена ($5 \cdot 10^{-5}$ *М*) (*2*) хлоропластами (*а*) и хлорофиллом (*б*) с дитиотреитолом ($5 \cdot 10^{-2}$ *М*). 16 *мкг/мл* хлорофилла в суспензии хлоропластов, 20 *мкг/мл* — в растворе

Воздействия, изменяющие состояние мембран хлоропластов. Ранее мы наблюдали, что фотовосстановление метилвиологена хлоропластами в отсутствие доноров электрона подавляется при барбатировании инертного газа через суспензию хлоропластов или при воздействии низких концентраций тритона Х-100 [11]. Предполагалось, что при этом происходит изменение состояния мембран хлоропластов, в результате которого усиливается циклический транспорт электронов в фотосистеме 1.

Продувание аргона через суспензию хлоропластов в течение 10 *мин* подавляет фотовыделение водорода хлоропластами в отсутствие экзогенных доноров электрона от 15 до 3 *мкл* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час, а 0,007%-ного тритона Х-100 — до 5,5 *мкл* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час. Продувание аргона через суспензию хлоропластов, как и присутствие тритона Х-100, подавляет также фотовыделение водорода и фотовосстановление метилвиологена хлоропластами с дитиотреитолом (рис. 6, 7). В отличие от фотовыделения водорода и фотовосстановления метилвиологена продувание аргоном суспензии хлоропластов не влияет на скорость восстановления метилового красного (рис. 6). Ранее нами [11] было показано, что фотопоглощение кислорода хлоропластами также практически не изменялось после продувания аргона через суспензию хлоропластов.

Для дальнейшего выяснения механизма фотовыделения водорода хлоропластами мы исследовали фотовыделение водорода, солюбилизированное хлорофиллом, т. е. в отсутствие организационной цепи переноса электрона.

ФОТОВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА В РАСТВОРАХ ХЛОРОФИЛЛА

Вляние концентрации детергента. Освещение коллоидного раствора хлорофилла в фосфатном буфере в присутствии препаратов гидрогеназы, метилвиологена и дитиотреитола без детергента не приводит к фотовыделению водорода, а добавление тритона Х-100, солюбилизирующего хлорофилл, вызывает его. Скорость реакции повышается при увеличении концентрации детергента и достигает насыщающего значения в присутствии 0,7%-ного тритона Х-100 (рис. 7).

Влияние концентрации метилвиологена. В отсутствие метилвиологена фотовыделение водорода в растворе хлорофилла не наблюдается. При повышении концентрации метилвиологена скорость реакции повышается и насыщается при концентрации последнего $2 \cdot 10^{-5}$ *М* (рис. 1). При дальнейшем повышении концентрации метилвиологена скорость реакции остается постоянной.

Влияние интенсивности света. В отличие от хлоропластов фотовыделение водорода, сенсибилизированное хлорофиллом с дитиотреитолом или с цистеином, не насыщается в исследованном интервале интенсивностей света (рис. 2).

Влияние pH среды. Максимальное фотовыделение водорода, сенсибилизированное хлорофиллом, как и для хлоропластов, наблюдается при pH 7, т. е. зависит от активности гидрогеназы. В щелочной среде реакция подавляется в такой же степени, как и для хлоропластов, и в кислой среде система с хлорофиллом более устойчива (рис. 3). Для сравнения на рис. 3 приведена зависимость фотовосстановления метилвиологена хлорофиллом от pH.

Природа доноров электрона. С дитиотреитолом, цистеином и NADP·H наблюдается длительное фотовыделение водорода в растворах хлорофилла в 0,7%-ном тритоне Х-100. Реакция насыщается при одной и той же концентрации доноров электрона (рис. 5). Как видно из табл. 5,

Таблица 5

Фотовыделение водорода и фотопоглощение кислорода в растворе хлорофилла в 1%-ном тритоне Х-100 (*мкмоль/мг* хлорофилла в час)

Концентрация дитиотреитола, цистеина и аскорбата натрия $5 \cdot 10^{-2}$ *М*, NADP·H — 10^{-3} *М*. Реакционная среда содержала 0,05 *М* фосфатный буфер, pH 7, $5 \cdot 10^{-5}$ *М* метилвиологен, 0,2 *мл* гомогената *Clostridium*

Донор электрона	Выделение водорода	Поглощение кислорода	Донор электрона	Выделение водорода	Поглощение кислорода
Без доноров электрона	0	2,3	Аскорбат+дитиотреитол	0	—
Дитиотреитол	3,3	502	Цистеин	1,8	428
Аскорбат	0	—	NADP·H	2,7	542

Примечание: «—» — не измеряли из-за сильного поглощения кислорода без освещения.

дитиотреитол является наиболее эффективным донором электрона в реакции выделения водорода. При использовании аскорбата натрия реакция не идет. В отличие от хлоропластов не наблюдается также фотовыделение водорода при использовании комбинации доноров электрона аскорбат натрия+дитиотреитол. Кинетика фотовыделения водорода хлорофиллом с NADP·H отличается от кинетики выделения водоро-

да хлоропластами с этим же донором электрона (рис. 4). Важно отметить, что со всеми донорами электрона фотопоглощение кислорода в растворе хлорофилла в детергенте идет со скоростью, значительно превышающей скорость фотовыделения водорода (табл. 5). По-видимому, это можно объяснить обратимостью фотовосстановления метилвиологена хлорофиллом в анаэробных условиях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования позволяют лучше понять причины, определяющие эффективность фотовыделения водорода хлоропластами при их сопряжении с бактериальной гидрогеназой.

В отсутствие экзогенного переносчика электронов фотовыделение водорода лимитируется звеном сопряжения хлоропластов с гидрогеназой. Хлоропласты в отличие от растворов хлорофилла способны к фотовыделению водорода без метилвиологена. По-видимому, гидрогеназа в этом случае взаимодействует с эндогенными акцепторами электрона хлоропластов. Однако метилвиологен, осуществляющий перенос электронов от хлоропластов к гидрогеназе, значительно повышает скорость реакции (табл. 1, рис. 1).

Ранее нами было исследовано фотовосстановление метилвиологена хлоропластами в отсутствие экзогенных доноров электрона [11]. Было показано, что оно лимитируется циклическим транспортом электронов через метилвиологен, замыкающим ветвь переноса электрона в фотосистеме 1. Описанные опыты свидетельствуют о тесной связи реакций фотовыделения водорода и фотовосстановления метилвиологена хлоропластами. Фотовыделение водорода, как и фотовосстановление метилвиологена, подавляется диуроном, низкими концентрациями детергента, продуванием инертного газа через суспензию хлоропластов и активируется разобщителями фотофосфорилирования (табл. 1). Поэтому есть основания предполагать, что фотовыделение водорода хлоропластами в отсутствие экзогенных доноров электрона также лимитируется циклическим транспортом электронов в фотосистеме 1.

Гоффман и соавт. [10] предположили, что фотовыделение водорода хлоропластами в присутствии доноров электрона лимитируется циклическим транспортом электрона. Наши исследования фотовыделения водорода хлоропластами в присутствии доноров электрона подтверждают это предположение. Из табл. 3 и 4 видно, что фотопоглощение кислорода и фотовосстановление метилового красного хлоропластами в присутствии дитиотреитола и цистеина — реакции, в которых циклический транспорт электронов невозможен из-за необратимого восстановления акцептора электрона,— идут со значительно большей скоростью, чем фотовыделение водорода и фотовосстановление метилвиологена. О влиянии циклического транспорта электрона на фотовыделение водорода и фотовосстановление метилвиологена хлоропластами в присутствии доноров электрона свидетельствует также подавление этих реакций низкими концентрациями детергента (рис. 7) или продуванием суспензии хлоропластов инертным газом (рис. 6), что увеличивает проницаемость мембран хлоропластов для метилвиологена. Весьма существенно, что эти воздействия не влияют на необратимое фотовосстановление метилового красного хлоропластами. Усилением циклического транспорта электронов можно также объяснить падение фотовыделения водорода при концентрации метилвиологена $>5 \cdot 10^{-5}$ M (рис. 1). При использовании обратимо окисляющихся доноров электрона фотообразование водорода хлоропластами может лимитироваться не только циклическим транспортом электронов, но и обратной реакцией между восстановленным метилвиологеном и окисленным донором электрона; по этой причине фотовыделение водорода с аскорбатом идет с низкой скоростью. При ис-

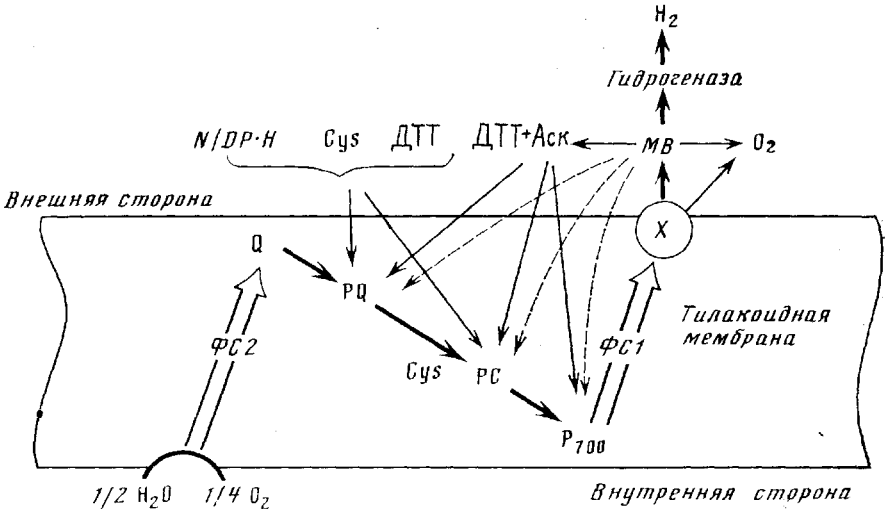


Рис. 8. Гипотетическая схема транспорта электронов при фотообразовании водорода хлоропластами в присутствии бактериальной гидрогеназы. ФС1 и ФС2 — фотосистемы 1 и 2, Q — акцептор ФС2, PQ — пластохинон, Cyt — цитохром *f*, PC — пластоцианин, P700 — фотохимически активная форма хлорофилла ФС1, X — акцептор ФС1, MB — метилвиологен, Cys — цистеин. ДТТ — дитиотреитол, Аск — аскорбат натрия. Пунктир — пути замыкания цепи переноса электрона через метилвиологен

пользовании NADP·H в качестве донора электронов в хлоропластах в отличие от растворов хлорофилла фотовыделение водорода длится значительно меньшее время, чем в присутствии дитиотреитола или цистеина (рис. 4). Это объясняется тем, что образованный на свету $NADP^+$ благодаря функционированию в хлоропластах ферредоксин-NADP-редуктазы окисляет восстановленный метилвиологен.

Эффективность фотовыделения водорода хлоропластами зависит также от структурной целостности мембран хлоропластов. Детергент в концентрации 0,010 или кратковременное продувание суспензии хлоропластов инертным газом значительно снижают скорость реакции (рис. 6, 7). Детергент в концентрации 1% подавляет фотовыделение водорода хлоропластами до уровня солюбилизированного хлорофилла.

Таким образом, следует полагать, что основным фактором, лимитирующим фотовыделение водорода хлоропластами, сопряженными с гидрогеназой с помощью метилвиологена, является циклический транспорт электронов, замыкающий фотосистему 1 через метилвиологен.

В отсутствие экзогенных доноров электрона, т. е. когда донором электронов являются молекулы воды, метилвиологен, по-видимому, замыкает перенос электронов на все переносчики электронов, расположенные между фотосистемами 2 и 1 (рис. 8). В этом случае фотовыделение водорода идет с низкой скоростью (до 1 *мкмоль* H_2 на 1 *мг* хлорофилла в час). При использовании в качестве переносчика электронов от хлоропластов к гидрогеназе ферредоксина фотовыделение водорода идет с гораздо большей скоростью [6—9]. Однако и в этом случае реализуется лишь часть электронно-транспортной способности хлоропластов. Возможно, что циклический транспорт электронов через ферредоксин также лимитирует фотообразование водорода хлоропластами.

Экзогенные доноры электронов восстанавливают переносчики электронов, расположенные между фотосистемами, и тем самым снижают или же полностью подавляют циклический транспорт электронов (рис. 8). Цистеин и дитиотреитол в низкой концентрации, а также NADP·H, по-видимому, восстанавливают пластохинон. Цистеин и дитиотреитол в концентрации $>10^{-2}$ *M* донируют электроны, по-видимому,

на уровне пластоцианина. На это указывает отсутствие активации фотопоглощения кислорода и фотовосстановления метилового красного хлоропластами с этими донорами электрона при добавлении дихлорфенолиндофенола или тетраметилфенилендиамина. При фотовыделении водорода восстановленный метилвиологен, вероятно, конкурирует с цистеином и дитиотреитолом за восстановление пластоцианина или восстанавливает P^+700. Фотовыделение водорода хлоропластами со скоростью 350—400 *мкмоль/мл* хлорофилла в час нам удалось наблюдать, применив комбинацию доноров электрона ($5 \cdot 10^{-2}$ *М* аскорбат натрия и $5 \cdot 10^{-2}$ *М* дитиотреитол) при удалении кислорода из суспензии методом раздельного продувания. Скорость реакции при этом была близка к скорости необратимого фотовосстановления метилового красного (табл. 4), что указывает на практическое отсутствие циклического транспорта электронов. Использованная комбинация доноров электрона, по-видимому, приводит к эффективному восстановлению компонентов цепи переноса электрона между фотосистемами 1 и 2.

Авторы выражают благодарность Л. В. Жуковой за выращивание культуры *Cl. butyricum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gaffron H., Rubin J. (1942) J. Gen. Phys., **26**, 219—240.
2. Arnon D. I., Mitsui A., Paneque A. (1961) Science, **134**, 1425.
3. Ben-Amotz A. Gibbs M. (1975) Biochem. Biophys. Res. Communs, **64**, 355—359.
4. Benemann J. R., Berenson J. A., Kaplan N. O., Kamen M. D. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 2317—2320.
5. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. (1976) Докл. АН СССР, **229**, 94—97.
6. Rao K. K., Rosa L., Hall D. O. (1976) Biochem. Biophys. Res. Communs, **68**, 21—28.
7. Fry I., Papageorgiou G., Tel-Or E., Packer L. (1977) Z. Naturforsch., **32c**, 110—117.
8. Paker L., Cullingford W. (1978) Z. Naturforsch., **33c**, 113—115.
9. Rao K. K., Gogotov I. N., Hall D. O. (1978) Biochimie, **60**, 291—296.
10. Hoffman D., Thauer R., Trebst A. (1977) Z. Naturforsch., **32c**, 257—262.
11. Никандров В. В., Чан Ван Ни, Брин Г. П., Красновский А. А. (1978) Мол. биол., **12**, 1278—1287.
12. Красновский А. А., Никандров В. В., Брин Г. П., Гоготов И. Н., Ощепков В. П. (1975) Докл. АН СССР, **225**, 711—713.
13. Walker D. A. (1971) Methods Enzymol., **23**, 211—220.
14. Азова Л. Г., Гусев М. В., Ивойлов В. С. (1970) Микробиология, **39**, 55—59.
15. Wang R., Healey F. P., Myers J. (1971) Plant Physiol., **48**, 108—110.

Поступила в редакцию
16.II.1979

STUDY OF THE EFFICIENT PHOTOEVOLUTION OF HYDROGEN BY CHLOROPLASTS IN PRESENCE OF BACTERIAL HYDROGENASE

A. A. KRASNOVSKY, CHAN VAN NHI, V. V. NIKANDROV, G. P. BRIN

A. N. Back Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The hydrogen photoevolution was studied to compare the efficiency of chloroplasts or solubilized chlorophyll in the presence of hydrogenase from *Clostridium butyricum* and methylviologen which links the electron transfer from photosystems to the exogeneous enzyme. The hydrogen evolution by chloroplasts in the absence of exogeneous electron donors (or in the presence of irreversibly oxidized dithiotreitol or cysteine) is probably limited by cyclic electron flow shot-circuiting the photosystem 1. Efficiency of hydrogen photoproduction when ascorbate or NADP·H are used as electron donors is probably limited by reverse reaction of photoreduced methylviologen with the oxidized electron donor. The combination of both dithiotreitol and ascorbate prevents the shot-circuiting of photosystem 1 by methylviologen; in this case the maximum efficiency of hydrogen photoevolution was achieved up to 400 *μmol* H_2 per 1 *mg* chlorophyll per hour.

BioSystems, 12 (1980) 181–194
© Elsevier/North-Holland Scientific Publishers Ltd.

SELF-ASSEMBLY OF CHLOROPHYLL AGGREGATED STRUCTURES

A.A. KRASNOVSKY and M.I. BYSTROVA

Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

(Received November 17th, 1979)
(Revision received December 27th, 1979)

A review of the work of our laboratory is presented on the self-assembly (aggregation) of chlorophyll and its analogs. In solid pigment films one can simulate, in the presence of low-molecular addends, the patterns of pigment aggregation in photosynthetic cells. A study was performed on the molecular mechanism for the self-assembly of aggregated forms of chlorophyll *a* and *b*, bacteriochlorophyll *a*, *b*, *c*, photochlorophyll, and the corresponding pheophytins.

Efficient utilization of solar energy in photosynthesis requires a large scale biosynthesis of pigments absorbing the solar radiation. Contemporary photosynthetic organisms possess chlorophyll and analogs in highly concentrated aggregated states incorporated into membranes of chloroplasts and chromatophores.

In the course of evolution the mechanism of self-assembly of chlorophyll structures was developed. It is possible to reproduce the phenomenon in model systems described in the present paper, which reviews mainly the work of our laboratory in this field.

Chlorophyll and its analogs are able to form highly ordered structures, as a result of intermolecular interaction. The pattern of aggregation is determined by the primary chemical structure of chlorophylls, first of all, by a magnesium atom in the centre of the porphyrin ring, the active functional groups (carbonyl etc.), and the system of circular-conjugated double bonds.

The peculiar state of pigments is characterized by their absorption and luminescence spectra. Consider an example of bacteriochlorophyll. The pigment in solution has an absorption maximum at 775 nm, while in the photosynthetic bacterial cells it exists in forms with maxima at 800, 850 and 870–890 nm.

More than 25 years ago (Krasnovsky et al., 1952, 1953; Krasnovsky, 1960, review) we revealed the formation of bacteriochlorophyll structures, having long-wave absorption as in cells of bacteria, as a result of spontaneous self-assembly caused by the pigment solution evaporation on the glass surface. Similar phenomena were observed with other pigments of the photosynthetic organisms.

Since that time we performed comparative investigations on the aggregation of chlorophyll and its analogs to understand the molecular mechanisms for self-assembly of the aggregated structures, and to define the state of pigments in the photosynthetic systems (see review of Krasnovsky, 1974).

Litvin et al. (Litvin and Sineshchekov, 1975) studied the formation of different aggregated forms of chlorophyll in concentrated solutions, compressed monolayers and solid films, which correspond to the system of native pigments in the photosynthetic organisms.

Katz and coworkers (1966, 1976) reviewed principles of the chlorophyll interaction in aggregated structures, and developed molecular models for the antenna and reaction centres of photosynthesis; the role of the magnesium-carbonyl groups interaction was revealed.

Holt et al. (Jacobs et al., 1954) presented the first evidence about the structure of chlorophyll monocrystals and its analogs by

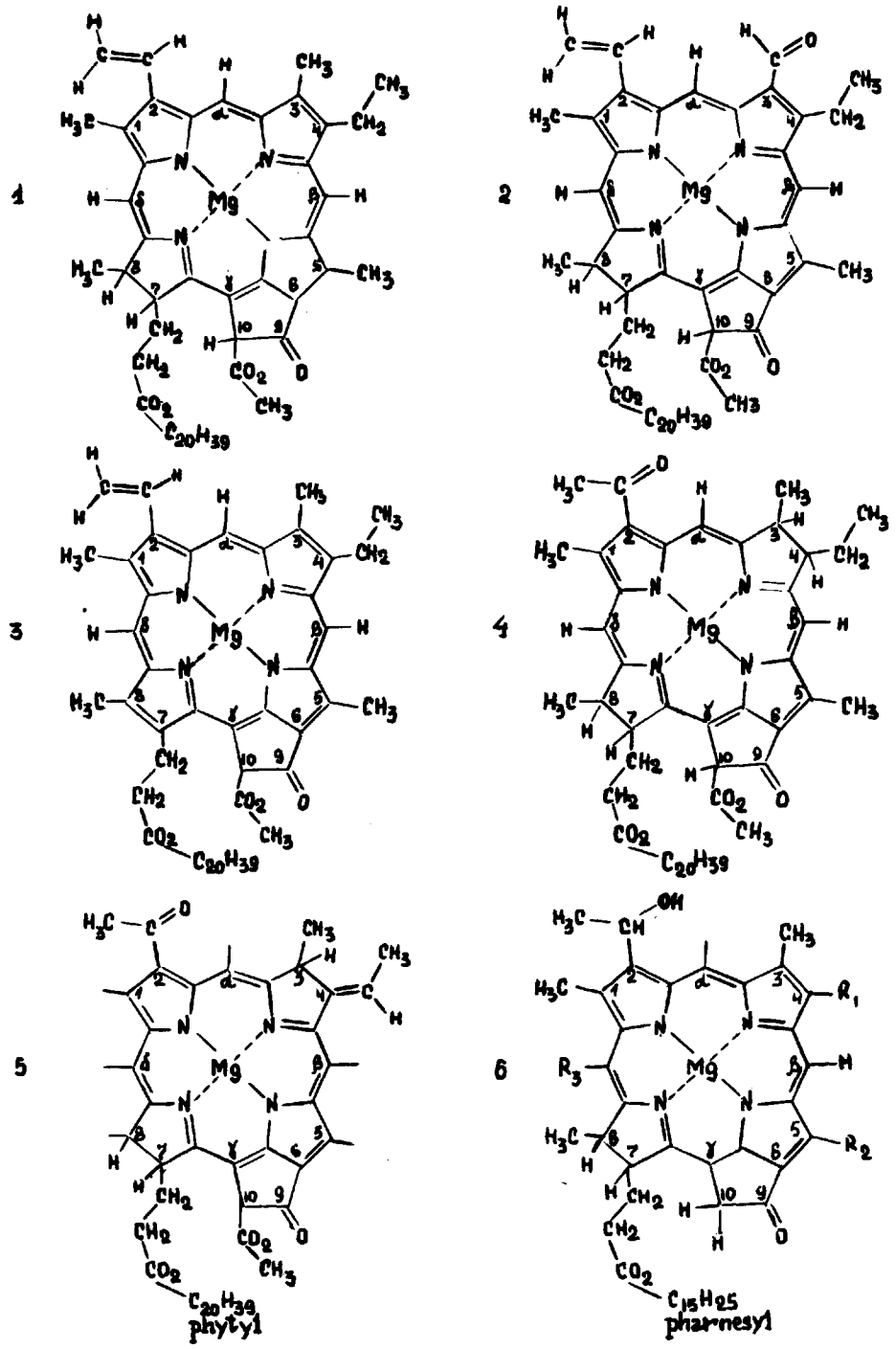


Fig. 1. Structure of pigment molecules. (1) chlorophyll *a*; (2) chlorophyll *b*; (3) protochlorophyll; (4) bacteriochlorophyll *a*; (5) bacteriochlorophyll *b* (Sheer et al., 1974); (6) bacteriochlorophyll *c* (Holt, 1966); R_1, ethyl, propyl, isobuthyl; R_2, methyl, ethyl; R_3, methyl, ethyl.

making use of the X-ray analysis method. In recent years (Kratky and Dunitz, 1977) the three-dimensional models of crystalline chlorophyll *a* structures were developed.

In this paper we report the results of a comparative study of the self-assembly of aggregated structures of chlorophyll *a* and *b*, photochlorophyll, bacteriochlorophylls (Fig. 1), and the corresponding pheophytins. We used mainly solid films produced by vacuum evaporation of pigment solutions. The possibilities of intermolecular interactions are realized in such systems with the aid of a very simple experimental procedure (Bystrova and Krasnovsky, 1967).

Chlorophyll a. When the chlorophyll ether solution is evaporated, a solid film is formed with the main absorption maximum at 677 ± 2 nm (Chl 677) (see Fig. 2), (Krasnovsky et al., 1953; Bystrova and Krasnovsky, 1967). The absorption maximum of this structure coincides with the absorption of the universal form of the chlorophyll *a* in photosynthetic organisms (French et al., 1972; Litvin and Sineshchekov, 1975).

When the films were treated with water vapour, a new form with the maximum at 710–715 nm (Chl 712) was observed (Fig. 2A). This form shows a fluorescence at +20°C with the main maximum at 730 nm (Fig. 2B).

We observed the self-assembly of the Chl 712 structure in water-methanol solutions (5% of methanol) a few hours after their production (Bystrova and Krasnovsky, 1971). The heating to 80°C causes disaggregation with a shortwave shift to 675 nm. Thermolability of the 712 nm form correlates with photosensitivity, which is characterized by a high rate

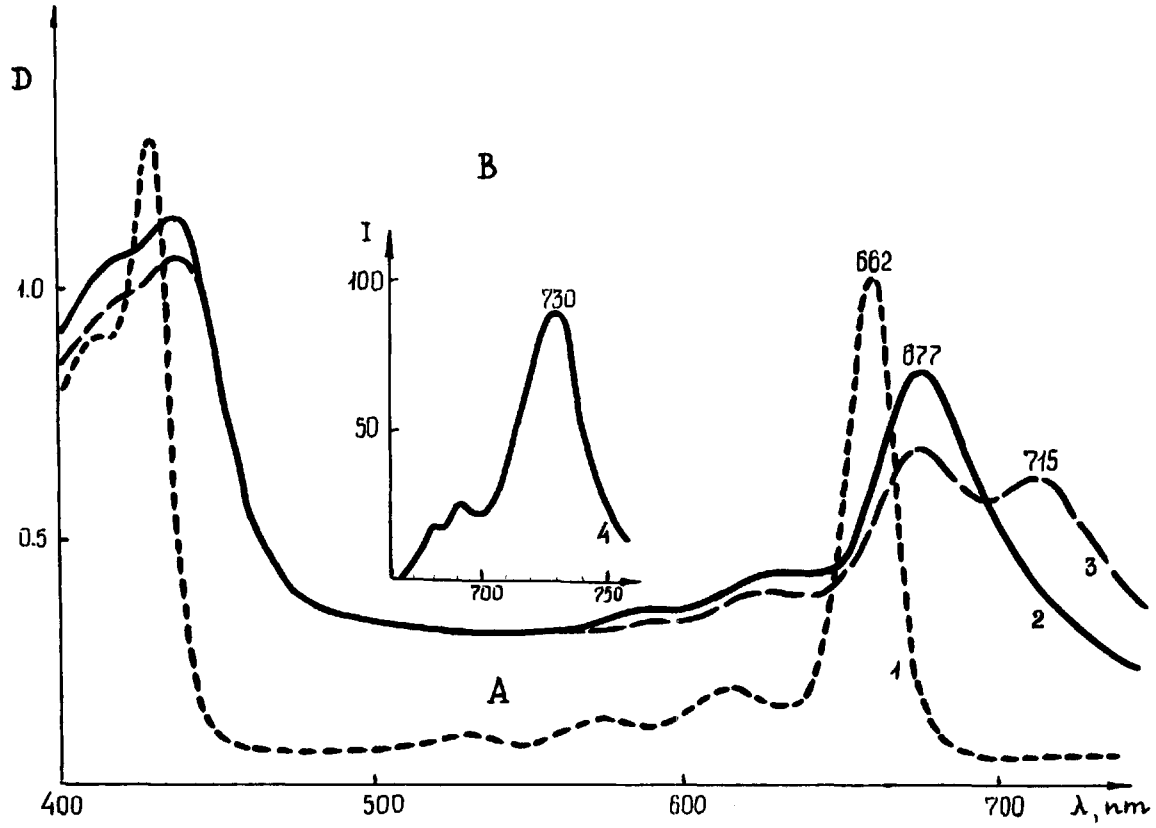


Fig. 2. Absorption (A) and luminescence (B) chlorophyll *a* spectra. (1) solution in diethyl ether; (2) initial film; (3) and (4) after exposure in water vapours (60 min, 20°C).

of photochemical oxidation in comparison with Chl 677.

When the films are treated with dioxane vapours (~10 min, at 20°C) a new structure is formed from Chl 677. The structure has an intensive absorption maximum at 690 nm (Krasnovsky et al., 1954, 1967). Chl 690 has an ordered crystalline structure (Belavtseva et al., 1959). Its self-assembly, as shown by IR spectral measurements (Sherman and Fujumori, 1969; Bystrova et al., 1976), takes place without a participation of carbonyl groups of molecules. Probably, two chlorophyll molecules are linked together by dioxane molecules bound to Mg atoms.

When chlorophyll *a* films were exposed to the vapours of water, methanol, ethanol, ammonia, formaldehyde or acetaldehyde, we observed the appearance of a new form with 735–745 nm absorption (Chl 740) (Krasnovsky et al., 1967). Figure 3 shows the process of self-assembly in the methyl alcohol vapours, which proved to be most active.

Self-assembly of Chl 740 from Chl 677 is revealed in a complete disappearance of the free ketogroup absorption (~1700 cm^{-1}) in IR (see Fig. 4), and the appearance of a new intensive band at 1640 cm^{-1}, which we assigned, according to Katz et al. (Katz et al., 1966; Ballschmiter and Katz, 1969, 1972) to the intermolecular bonds of keto $C{=}O \cdots HO(CH_3) \cdots Mg$ (Krasnovsky et al., 1972; Bystrova et al., 1976). Formation of such intermolecular bonds is an important condition for Chl 740 self-assembly, since it provides a necessary orientation of molecules.

Chl 740 has an ordered crystalline structure (Jacobs et al., 1954; Belavtseva et al., 1959), which seems to be analogous to the structure of chlorophyll *a* microcrystals that had been

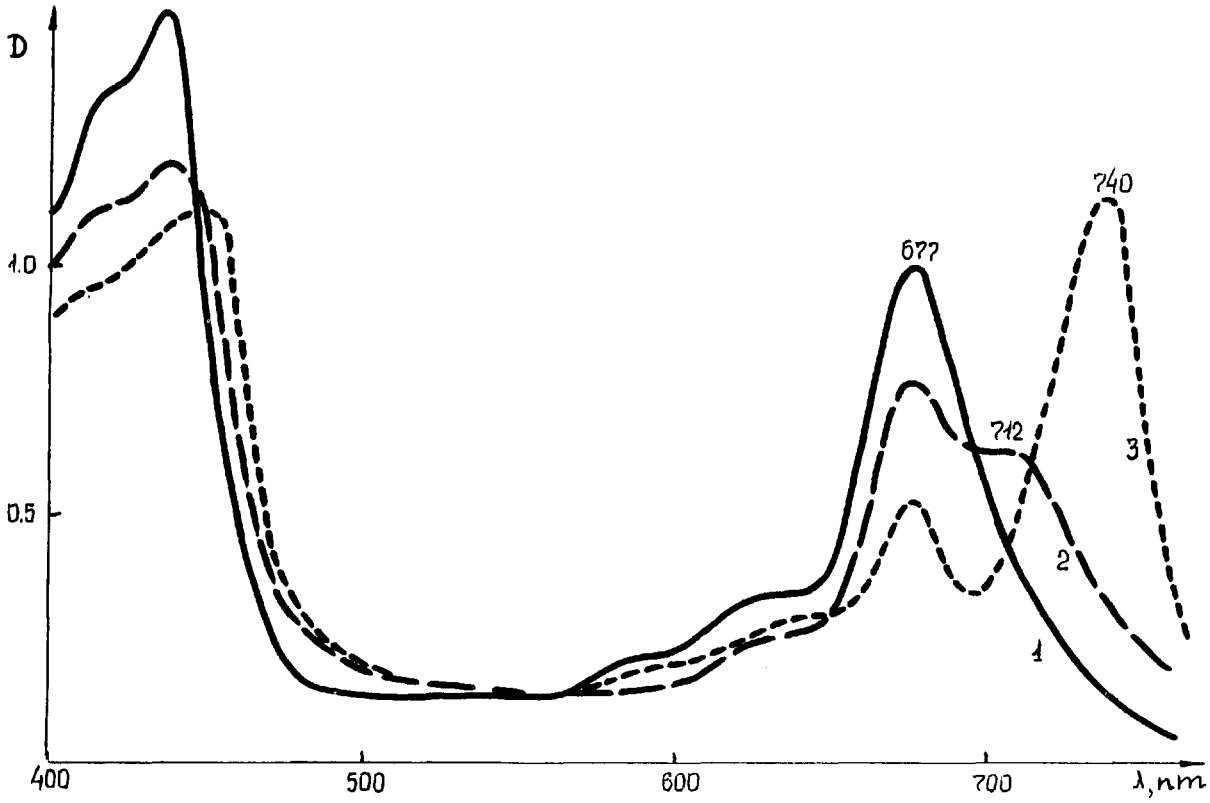


Fig. 3. Chlorophyll *a* absorption spectra. (1) initial film; (2) and (3) after exposure in methanol vapours at 20°C during 10 and 45 min.

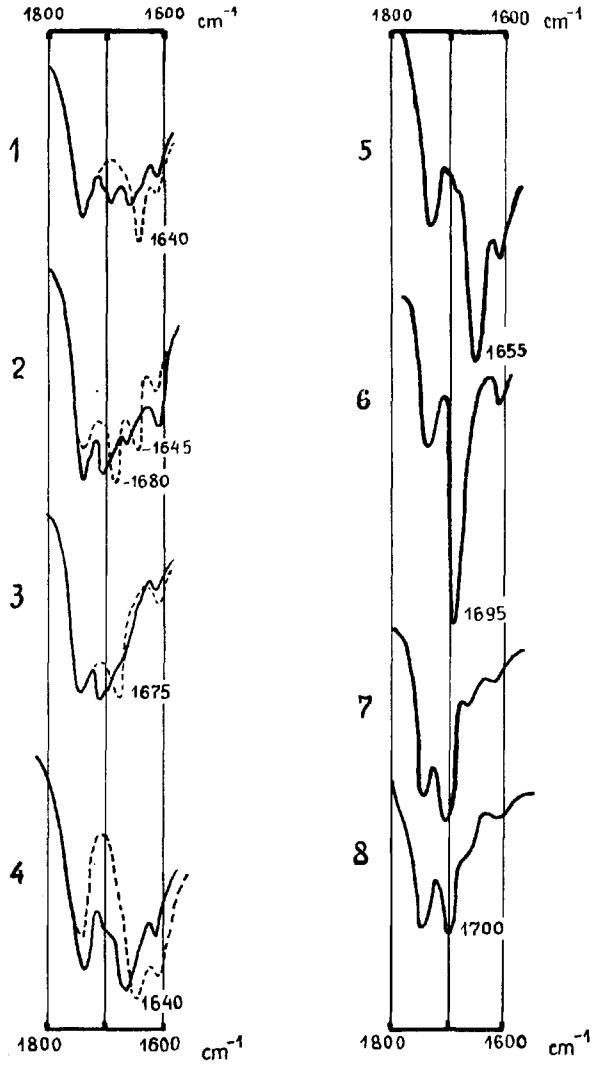


Fig. 4. IR spectra of pigments. (1) chlorophyll *a* film: ——, initial; -----, after treatment by methanol vapours (45 min, 20°C); (2) chlorophyll *b* film: ——, initial; -----, after treatment by methanol vapours (1.5 h, 20°C); (3) vinylprotochlorophyll film: ——, initial; -----, after treatment by methanol vapours (15 h, 10°C); (4) bacteriochlorophyll *a* film: ——, initial; -----, after treatment by water-saturated diethyl ether vapours (30 min, 20°C); (5) bacteriochlorophyll *c* film; (6) solution of bacteriochlorophyll *c* (10^{-2} M) in diethyl ether; (7) bacteriopheophytin *a* film; (8) solution of bacteriopheophytin *a* (0.3×10^{-2} M) in diethyl ether.

investigated in detail by X-ray structural analysis method (Kratky et al., 1977).

Chlorophyll b forms an aggregated structure with the main absorption maximum at 655 ± 2 nm (Chl 655) (Bystrova and Krasnovsky, 1967). This form corresponds to the natural pigment form with the maximum of 650 nm, which is seen in low-temperature absorption spectra of chlorophyll-containing organisms and chloroplast fragments (French et al., 1972), and is one of the universal components of the absorption bands of green plants (Litvin and Sineshchekov, 1975).

The main intermolecular bond in Chl 655 is the coordination bond of an aldehyde (formyl) group of the 1st pyrrole ring of molecules with a central magnesium atom, aldehyde C=O ··· Mg (absorption at 1605–1608 cm^{-1}), (Bystrova et al., 1976), (Fig. 4).

In the methanol vapours the structure Chl 655 is rearranged with an appearance of new forms absorbing at 670–675 nm and 710–720 nm. The bands of free keto- and aldehyde-groups (1705–1695 cm^{-1} and 1665 cm^{-1}, respectively) in IR spectra disappear under the action of methanol. Two new maxima appear, 1685–1680 cm^{-1} and 1645 cm^{-1}. The absorption of 1605–1608 cm^{-1} diminishes (Fig. 4). Based on the data of Katz et al. (1966) and Ballschmiter and Katz (1969, 1972) we suggested that the two maxima of the newly formed structure should be assigned to the intermolecular bonds of two types, i.e. keto C=O ··· HO(CH_3) ··· Mg (~1680 cm^{-1}) and the aldehyde C=O ··· HO(CH_3) ··· Mg (~1645 cm^{-1}). Thus, the methyl alcohol whose hydroxyl group enters the bonds between pigment molecules, promotes the assembly of a highly-aggregated structure with long-wave absorption. Both ketogroups and aldehyde groups of the chlorophyll *b* participate in the formation of this structure, while for the chlorophyll *a* the highly-aggregated structures are formed with the help of bonds pertaining to the ketogroups.

Protochlorophyll and 4-vinylprotochlorophyll form an aggregated structure with the absorption maximum 635 nm (PChl 635) at solvent evaporation (Krasnovsky et al., 1953). We observed (Krasnovsky et al., 1971) that PChl 635 undergoes a fast struc-

tural rearrangement under the action of methyl alcohol vapours. As a result, a new form is produced absorbing at 650 nm (PChl 650), which is dominating in the spectrum (Fig. 5). The same effect was observed in the vapours of ethanol, ammonia, as well as water-saturated acetone and ether.

PChl 650 and PChl 635 in solid films correspond to the natural state of a chlorophyll precursor in plants (Litvin and Krasnovsky, 1957; Shibata, 1957; Sironval et al., 1968). Both forms are a composite part of the protochlorophyllide-protein complex (see review of Boardman, 1966).

At +20°C PChl 650 has a noticeable luminescence with the main maximum at 655 nm, recorded in vacuum at the initial (less than 1 min) exposure. Prolonged exposition causes a sharp decrease of luminescence, probably, due to the photooxydation (Fig. 5B) (Krasnovsky et al., 1971).

The PChl 650 structure is thermolabile. The heating up to 90°C causes its full destruction, while a short-wave form does not change.

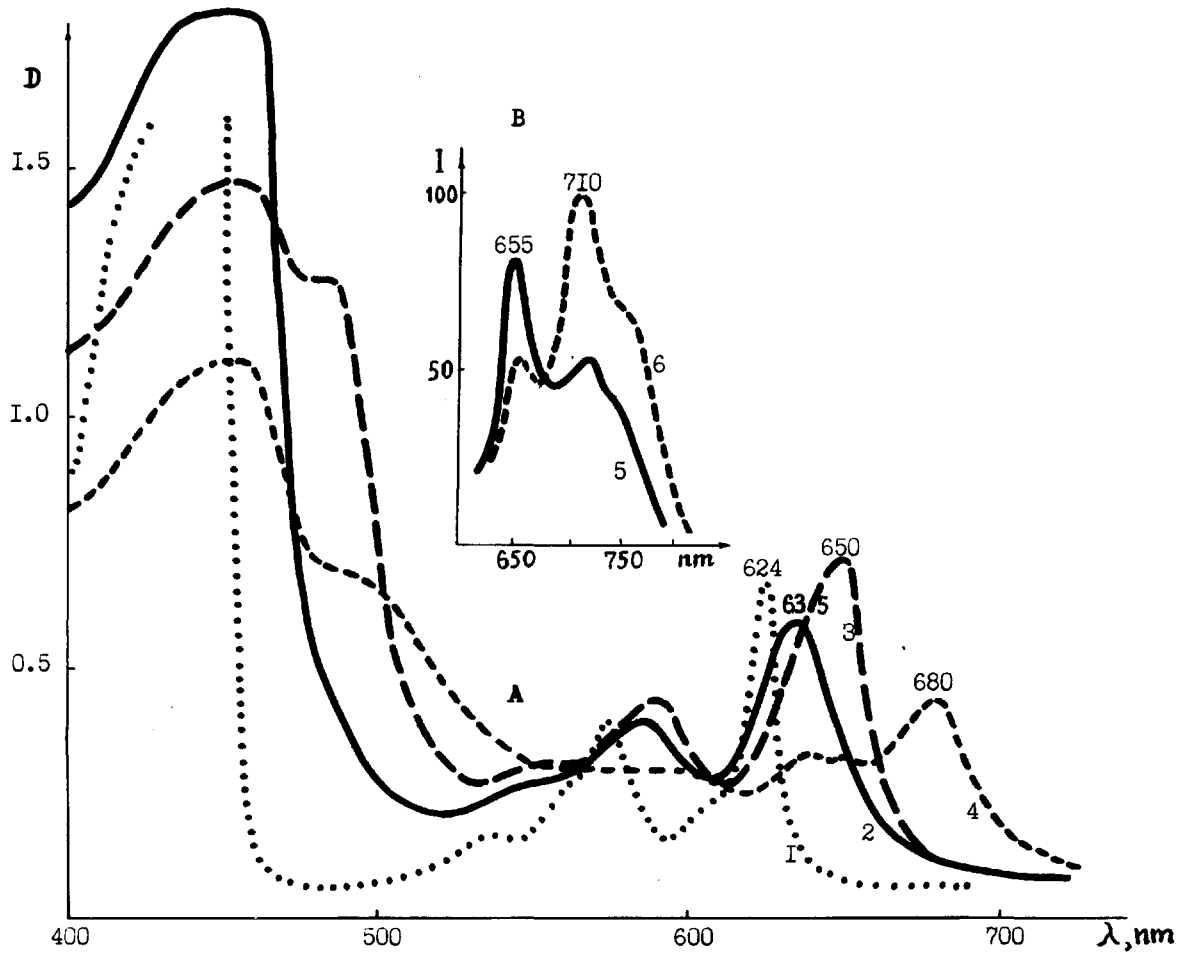


Fig. 5. Spectra of photochlorophyllic pigment absorption (A) and luminescence (B). (1) solution of vinylprotochlorophyll in diethyl ether; (2) initial film of vinylprotochlorophyll; (3) the same film after treatment by methanol vapours (30 min, 20°C); (4) protochlorophyll film after treatment by water-saturated acetone vapours (2 h, 20°C); (5) protochlorophyll film with 650 nm absorption maximum at initial registration in the vacuum (20°C); (6) the same after illumination by the exciting light (SZS-22) 3 min.

Thus, the PChl 650 structure formed in films by means of self-assembly simulates some properties of the main photoactive form of the chlorophyll precursor in plants.

We were able to discover the form with 675–680 nm absorption (Fig. 5A) in the photochlorophyll films treated by acetone and ether vapours in the presence of water (Krasnovsky et al., 1971).

The IR spectrum of PChl 635 (Fig. 4) (Bystrova et al., 1976) does not show distinct aggregation bands, while the absorption of free ketogroups is dominating (~1700 cm^{-1}). When PChl 650 is formed from PChl 635 (under the action of methanol) the absorption of free ketogroups decreases (but does not disappear entirely), and the new maximum appears at 1675 cm^{-1}, which probably indicates the formation of intermolecular bonds keto C=O ··· HO(CH_3) ··· Mg.

Bacteriochlorophyll a in films produced by ether evaporation yields two aggregated forms (Fig. 6A) with the main absorption maxima at 800 nm (BChl 800) and 855–865 nm (BChl 860), (Krasnovsky et al., 1952, 1967, 1972). Under dehydration (vacuum evaporation of

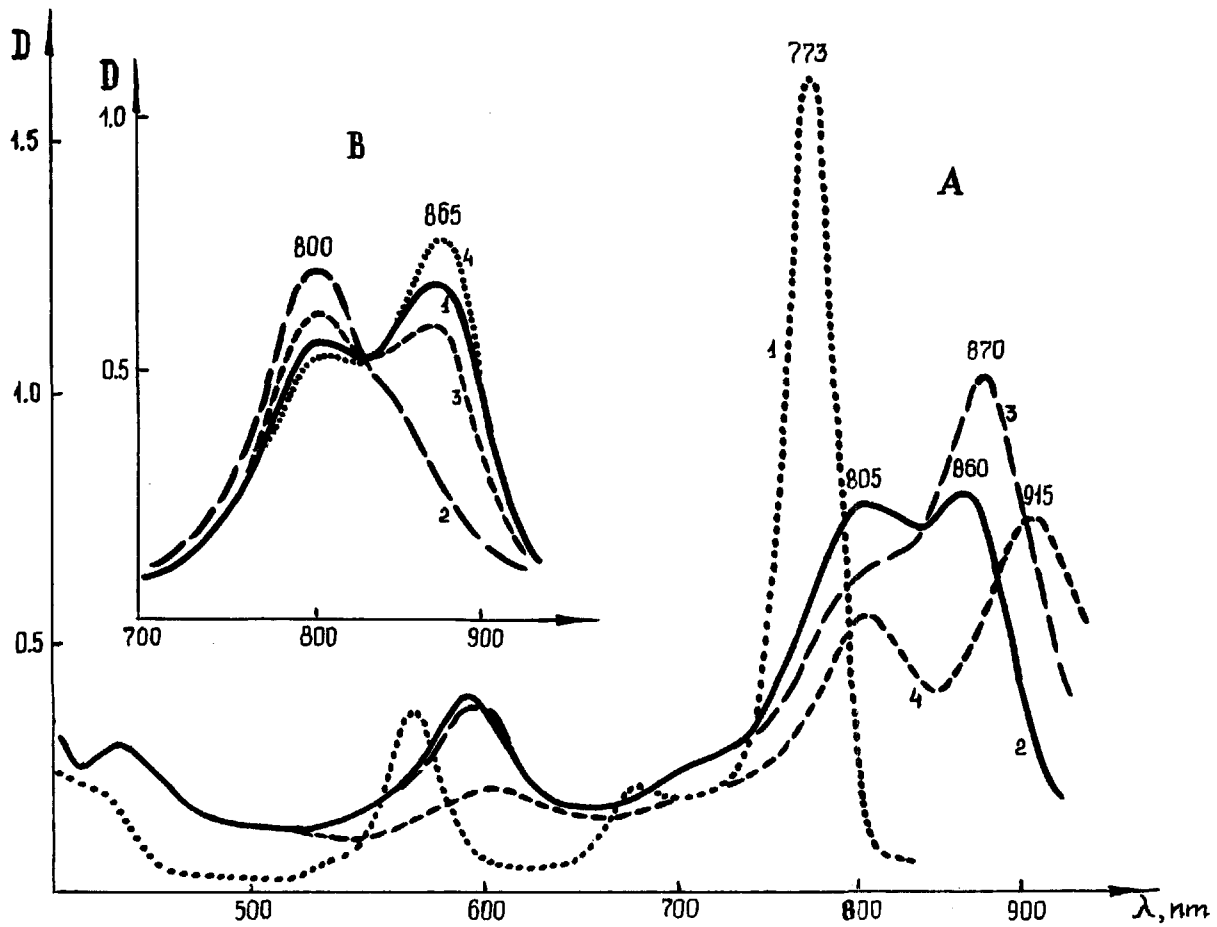


Fig. 6. Absorption spectra of bacteriochlorophyll *a*. A: (1) solution in diethyl ether; (2) initial film; (3) the same film after treatment by water-saturated diethyl ether vapours (20 min, 20°C); (4) the film after the exposure in methanol and ether vapours (~1 h, 20°C). B: (1) the solid film at 20°C; (2) the same film at 38°C; (3) and (4) the same at subsequent cooling to 20°C and 5°C.

pigment solutions in CCl_4) one can observe a primary formation of a structure with an absorption maximum at 800 nm.

BChl 800 and BChl 860 structures correspond to the main natural forms of bacteriochlorophyll *a* (see review by Clayton, 1973; Erokhin et al., 1974), which are universal light-harvesting forms of photosynthetic purple bacteria.

BChl 860 is characterized by extremely high thermolability (Fig. 6B); the films heated up to 30–35°C are converted into a stable short-wave form (Krasnovsky et al., 1977). The subsequent cooling down to 20°C causes a secondary self-assembly of the long-wave form.

Treatment of films by water vapours causes the appearance of a 870–875 nm absorbing form (BChl 870) at decreased amount of BChl 800. The effect of water grows in the presence of ether vapours (Fig. 6A).

An absorption maximum of 860–870 nm coincides with the absorption of photoactive bacteriochlorophyll *P*-870 (Vredenberg and Duysens, 1963), included in the reaction centres of the bacterial photosynthesis (see, for example, reviews by Clayton, 1973; Parson and Cogdell, 1975), which prove to be dimers (see in reviews of Sauer, 1975; Katz et al., 1976).

In water and ether vapours at 50°C we observed self-assembly of the form with 900–920 nm absorption (Krasnovsky et al., 1967), which corresponds to the most long-wave form of the pigment in cells. Such a phenomenon was observed in methanol and acetaldehyde vapours at 20°C in the presence of ether (Fig. 6A). Ether molecules may probably loosen a hydrophobic structure of the film making it accessible for the penetration of a complexing agent.

Self-assembly of BChl 800, as shown by IR measurements, involves bonding of ketogroups with the central Mg atoms (keto C=O ··· Mg), which are evident in 1660 cm^{-1} band for initial films. These bonds combine pigment molecules into low-molecular aggregates.

Self-assembly of BChl 870 is performed by an inclusion of exogenous water molecules into intermolecular bonds of two varieties produced by keto- and acetyl-groups of the pigment molecules: keto C=O ··· HO(H) ··· Mg (~1640 cm^{-1}) and acetyl C=O ··· HO(H) ··· Mg (~1612 cm^{-1}).

Intermolecular bonds formed with the inclusion of exogenous water molecules are unstable, and are destroyed at heating by releasing water, which can be easily removed by vacuum pumping.

Bacteriochlorophyll b is the pigment of purple photosynthetic bacteria of Rhodopseudomonas viridis type. This pigment differs from bacteriochlorophyll *a* by the presence of the unsaturated groups =CH—CH_3 bound to the 4th C atom (Fig. 1) (Sheer et al., 1974).

Bacteriochlorophyll *b* in solid films forms an aggregated structure with the absorption maxima about 830 and 890 nm, having luminescence at low temperature, with the main maximum near 970 nm (Krasnovsky et al., 1974). This structure simulates the state of antenna pigment system in the photosynthetic apparatus of bacteria (Thornber and Olson, 1971). Its self-assembly, as shown by IR measurements of bacteriochlorophyll *b* solid films (Krasnovsky et al., 1974), is realized through a formation of intermolecular bonds between ketogroups of cyclopentanone rings, and central Mg atoms.

Bacteriochlorophyll c, or chlorobium-chlorophyll 660 (see Holt, 1966) is the pigment of green photosynthetic bacteria having, as compared to chlorophyll *a*, a somewhat different chemical structure of molecules (Fig. 1), including the presence of a hydroxyethyl group (instead of vinyl chlorophyll *a* group) in the 2nd C atom; the absence of a carbomethoxyl group in the 10th C atom, which is replaced by a H atom, and the absence of phytyl in the 7th C atom, which is replaced by farnesyl.

It was shown in our laboratory (Krasnovsky et al., 1959, 1966; Bystrova and Krasnovsky, 1968) that bacteriochlorophyll *c* exhibits a highly aggregated structure, as a result of

solvent evaporation with the main absorption maximum at 735–745 nm (BChl 740) (see Fig. 7), and the luminescence at 780 nm. This structure simulates the main form of the pigment in the photosynthetic bacteria, which acts as a light-harvesting antenna in the process of bacterial photosynthesis.

Such a structure is formed in films without any exogenous polar compounds. We observed the same pattern of self-assembly in dry non-polar solvent and solid films under the conditions of dehydration (Bystrova et al., 1979). This allowed us to assume that the process of self-assembly of bacteriochlorophyll *c* is not connected with the exogenous water molecule inclusion in the structure of aggregates.

The BChl 740 structure is rather stable against the disaggregating action of pyridine. In the pyridine vapours it is destroyed (as a result of disaggregation) after more than an hour at 20°C, while the complete disaggregation of the long-wave bacteriochlorophyll *a* form, under the same conditions, takes place within a few minutes (Bystrova et al., 1979).

All these results are indicative of the unusual molecular organization of the highly aggregated bacteriochlorophyll *c* structure, in comparison with other Mg-containing pigments.

IR spectra of films containing BChl 740 have a particular structure in the carbonyl region where the absorption of free keto-groups (1710–1690 cm^{-1}) is not observed, and has a dominating intensive maximum of ~1650 cm^{-1}

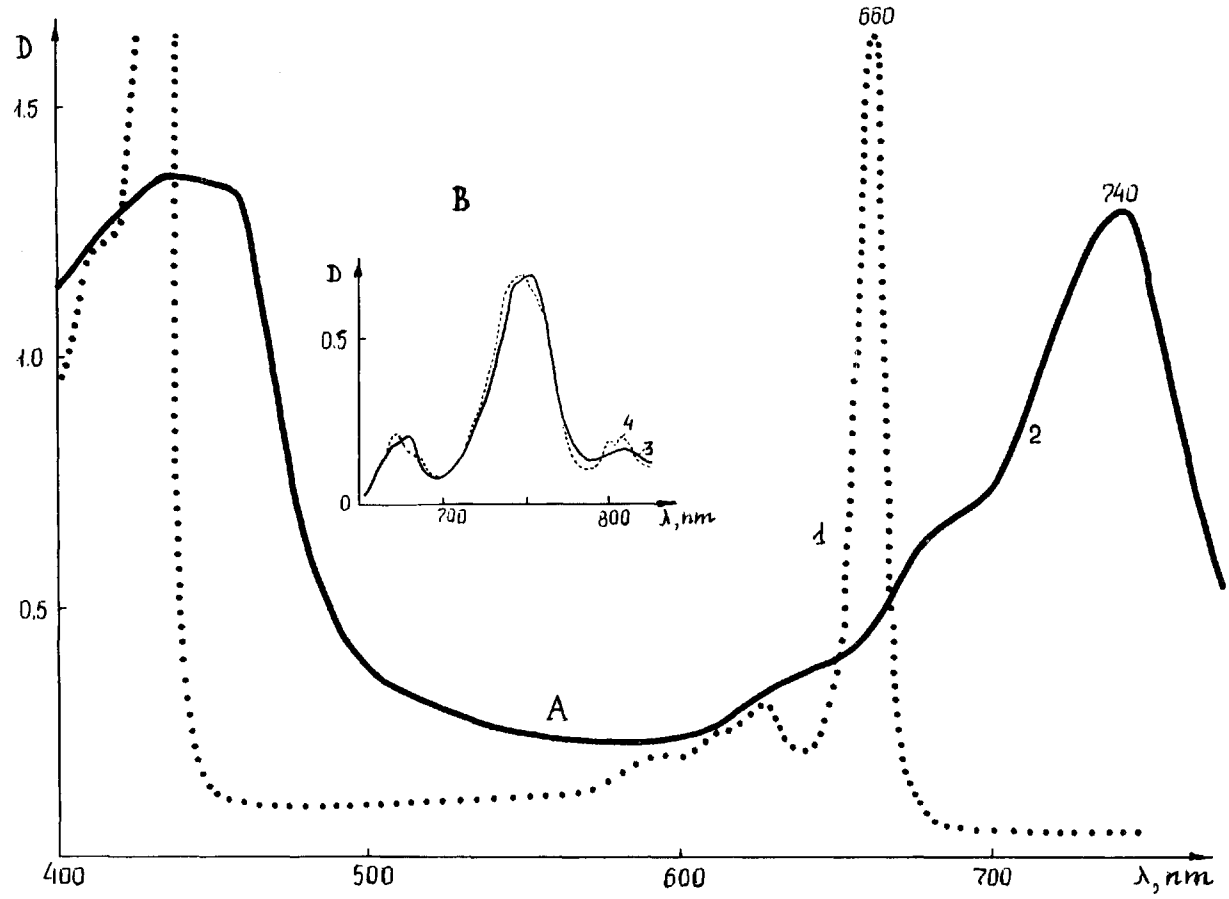
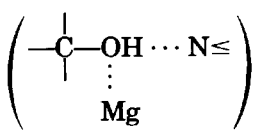


Fig. 7. Spectra of bacteriochlorophyll *c* absorption at 20°C (A) and −196°C (B). (1) solution in diethyl ether; (2) and (3) solid film; (4) chloropseudomonas ethylica cells (spectra 3 and 4 are taken from Litvin and Gulyaev (1970)).

(Fig. 4) (Krasnovsky et al., 1969; Bystrova et al., 1976, 1979). Based on well known results on the chlorophyll *a* aggregation we have assigned that maximum to the intermolecular bonds between ketogroups and a central atom of magnesium (keto C=O ··· Mg). The noted bacteriochlorophyll *c* bonds are very stable. During a prolonged heating (100°C) of films with vacuum pumping (up to 10^{-5} mmHg) the spectrum does not change.

IR spectra of bacteriochlorophyll *c* films in the hydroxyl region reveal a clear band near 3180 cm^{-1}. The intensity of the band does not change in the presence of water, and when water is removed by treatment of films in the vacuum at 100°C for more than 12 h (Bystrova et al., 1976, 1979). We have, therefore, suggested that this band arises due to the formation of intermolecular bonds, where the hydroxyl (ethoxy) groups of the 1st pyrrole rings of pigment molecules participate. In the process of aggregation, the OH groups seem to interact with central Mg atoms, with a simultaneous formation of hydrogen bonds with the pyrrole ring nitrogen



which is revealed in the form of a specific spectral band. Such bonds appear in addition to keto C=O ··· Mg interaction. One can, therefore, admit that self-assembly of a bacteriochlorophyll *c* structure is accompanied by a formation of intermolecular bonds with a participation of ketogroups and hydroxyl groups of molecules.

Particular features of the molecular structure (bonding by three points without labile-bound molecules of complexing agents) determine a thermal stability of the long-wave aggregated forms of bacteriochlorophyll *c* in films, which makes them different from the long-wave forms of other Mg-containing pigments destroyed at heating.

Aggregated forms of bacteriochlorophyll *c* in the photosynthetic apparatus of bacteria have, perhaps, the same structure, as the artificial forms. This structure is most adaptable for the main function of an antenna, namely, transfer of electron excitation energy to the reaction centres.

The reported results evidence a decisive role of ketogroups of cyclopentanone rings and the magnesium atom in the molecular mechanism of self-assembly for the photochlorophyll, chlorophylls *a* and *b*, bacteriochlorophylls.

By studying self-assembly of magnesium-less pigment aggregates, another mechanism of intermolecular interactions was revealed, not involving the participation of carbonyl groups in the formation of bonds between molecules (Bystrova et al., 1976; Krasnovsky et al., 1977).

As an example, we shall consider bacteriopheophytin *a* aggregation. Studying the properties of this pigment is of particular interest, with respect to its observation in reactional centres of the bacterial photosynthesis, and a possible participation in electron transfer reactions (see, for instance, Parson and Cogdell, 1975).

Bacteriopheophytin a in films (Krasnovsky et al., 1953, 1972, 1977) forms an aggregate with the main absorption maximum of 850–860 nm (BPheo 855), which is displaced by more than 100 nm to the long-wave side, as compared to monomeric pigment solutions (755–760 nm).

We observed BPheo 855 self-assembly in solid films of bacteriochlorophyll *a* at their exposure in HCl or CH_3OH vapours (Fig. 8A). The pheophytinization is preceded, under these conditions, by a transformation of initial BChl 860 into BChl 870. BPheo 855 is formed from BChl 800 and BChl 870, the pheophytinization of the latter form being faster.

The BPheo 855 structure is thermostable and does not change at 100°C, unlike BChl 860–870, which is destroyed already at 30–35°C.

For BPheo 855 we observed (Krasnovsky et al., 1977) a narrow EPR signal ($\Delta H = 1.8$–1.6 e) (Fig. 8B), with the value of *g*-factor (2.0027) approaching the *g*-factor of a free

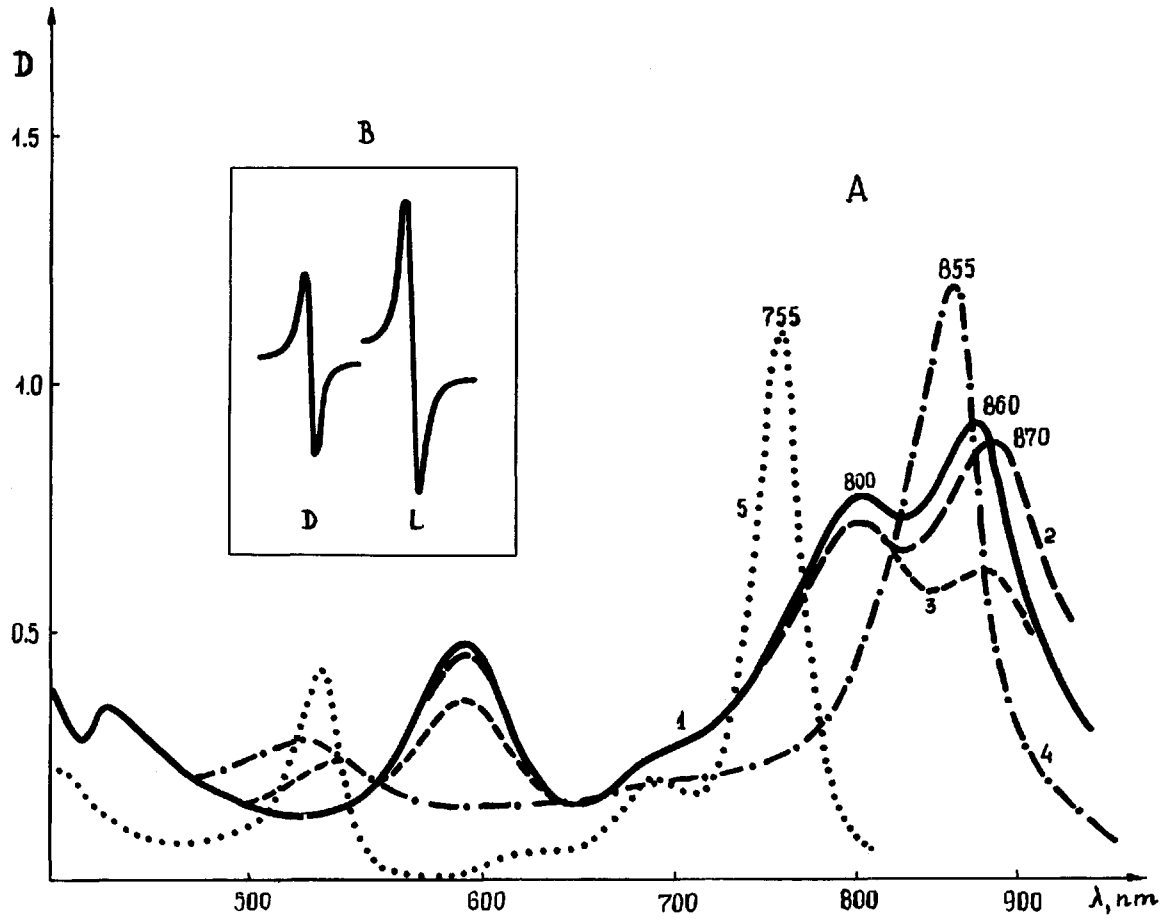


Fig. 8. A: absorption spectra of pigments. (1) bacteriochlorophyll *a* film; (2) and (3) the same film after the action of the acetic acid vapours at 20°C during 10 and 45 min; (4) the same in 1.5–2 h when pheophytinization comes to an end; (5) bacteriopheophytin solution in the diethyl ether. B: EPR spectra of bacteriopheophytin *a* film; D, in darkness; L, after illumination (KS-19) 5 min.

electron. In this structure the electron is delocalized over 40–50 interacting molecules.

The bacteriopheophytin film IR spectra in the carbonyl region reveal a close coincidence with the monomer pigment spectra in the polar solvents (Fig. 4). In both cases the absorption of free ketogroups (~1700 cm^{-1}) is dominating. This means that the carbonyl groups do not participate in the formation of intermolecular bonds, and the molecules are held together in a structure, probably, due to the interaction of their π-electron systems. The same was observed for a magnesiumless chlorophyll *a* derivative forming an aggregate with 700 nm absorption (Bystrova and Krasnovsky, 1967), as well as for other pheophytins. This allows one to suppose that the intermolecular interaction with the participation of ketogroups taking place in the case of Mg-complexes, is not a universal way for the self-assembly of the photosynthetic pigment systems.

Discussion

We have shown that in solid films containing only a pigment and a low-molecular addend, self-assembly of aggregated structures occur, which simulates the properties of the

main patterns of the pigments in the cells of photosynthetic organisms.

This is a striking evidence of the fact that aggregation of the pigment molecules plays an important role in the formation of the native pigment forms. The main regularities in the aggregation process, defined primarily by the chemical structure of pigments, are common for the organisms with different types of photosynthesis.

However, photosynthetic organisms do not contain isolated pigment systems. For the most part, the cell pigments are bound with proteins and lipids, being the main structural and functional units of the photosynthetic membranes. Therefore, a question arises about the role played by a protein-lipid component in the formation and molecular organization of the native pigment forms. The available data allow a suggestion that the state of pigment systems in the photosynthetic membranes may be influenced by a particular structure of a protein-lipid carrier. The change or destruction of the native conformation of the carrier, affects the intermolecular interaction of the pigment, causing the disaggregation of the structure (Erokhin et al., 1970, 1974, 1976). We cannot exclude however that factors, affecting the protein-lipid moiety, influence the pigment-pigment interaction under the conditions of the experiments mentioned.

Our data on the participation of addends in the self-assembly of aggregated forms make it possible to ascertain that during the self-assembly of native pigment-protein complexes, the pigment molecules may interact with amino acid residues of the polypeptide chains of protein compounds, due to the formation of hydrogen (or coordination) pigment-protein bonds.

As for the assembly of the photoactive pigment-protein systems, one can admit that a specific native conformation of the protein in photoactive complexes promotes the interaction of pigment molecules, and their orientation with respect to each other. This provides optimal conditions not only for the formation of ordered molecular compounds, but thereby for the occurrence of efficient photochemical electron-transport reactions.

According to Oparin's hypothesis, the primary organisms were heterotropic, using for their metabolism abiogenic organic substances. The appearance of photoauthotrophy required incorporation into the electron transfer chain pigments capable of being excited by solar radiation. Evolution has proceeded in the direction of improvement of pigment biosynthesis so as to absorb solar energy more efficiently. A mechanism was developed for energy migration from the bulk of the aggregated chlorophyll (antenna) to the reaction centers directly participating in the electron transfer. So the mechanism of chlorophyll self-assembly in the membranes of photosynthetic organisms developed.

It is probable that protein structure had some influence on the molecular arrangement of pigment apparatus in cells, but there is no doubt, that the spectral and photochemical properties of the bulk of the pigments are highly dependent on the self-assembly of aggregated structures.

References

Ballschmiter, K. and J.J. Katz, 1969, An infrared study of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions. J. Am. Chem. Soc. 91, 2661–2677.

Ballschmiter, K. and J.J. Katz, 1972, Chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions in the solid state. Biochim. Biophys. Acta 256, 307–327.

Belavtseva, E.M., L.M. Vorobieva and A.A. Krasnovsky, 1959, Study of the structure of the chlorophyll aggregated forms. Biofizika USSR 4, 521–532.

Boardman, N.K., 1966, Protochlorophyll, in: The Chlorophylls, L.P. Vernon and G.R. Seely (eds.) (Academic Press, New York–London) pp. 437–479.

Bystrova, M.I. and A.A. Krasnovsky, 1967, The study of aggregated forms of chlorophyll and analogs in connection with their chemical structure. Mol. Biol. USSR 1, 362–372.

Bystrova, M.I. and A.A. Krasnovsky, 1968, Comparative investigation of the luminescence of aggregated forms of chlorophyll and its analogs in solid films. Mol. Biol. USSR 2, 847–858.

Bystrova, M.I. and A.A. Krasnovsky, 1971, The photochemical properties of the different aggregated forms of

chlorophyll *a* and bacterioviridin. Mol. Biol. USSR 5, 201–301.

Bystrova, M.I., F. Lang and A.A. Krasnovsky, 1972, Spectral effects of protochlorophyll pigments aggregation. Mol. Biol. USSR 6, 77–86.

Bystrova, M.I., I.N. Mal'gosheva and A.A. Krasnovsky, 1976, The study of molecular arrangement of aggregated forms of chlorophyll and its analogs. Mol. Biol. USSR 10, 193–205.

Bystrova, M.I., I.N. Mal'gosheva and A.A. Krasnovsky, 1979, The study of molecular mechanism of self-assembly of aggregated bacteriochlorophyll *c*. Mol. Biol. USSR 13, 582–594.

Clayton, R.K., 1973, Primary processes in bacterial photosynthesis. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 2, 131–156.

Erokhin, Yu.E., V.A. Chugunov, A.A. Moskalenko, Z.K. Makhneva and I.M. Agrikova, 1976, Molecular organization of pigment system in photosynthetic bacteria. Itogi issledovaniya mekhanizma fotosinteza (Pushchino) 12–15 (in Russian).

Erokhin, Yu.E., A.A. Moskalenko, L.P. Demina and Z.K. Makhneva, 1974, The state of bacteriochlorophyll in purple bacteria, in: Chlorophyll (Nauka i tekhnika, Minsk), pp. 242–248 (in Russian).

Erokhin, Yu.E. and O.A. Sinegub, 1970, Molecular arrangement of pigment system in purple bacteria. Mol. Biol. USSR 4, 401–410.

French, C.S., J.S. Brown and M.C. Lawrence, 1972, Four universal forms of chlorophyll *a*. Plant. Physiol. 49, 421–429.

Holt, A.S., Recently characterized chlorophylls, in: The Chlorophylls, L.P. Vernon and J.R. Seely (eds.) (Academic Press, New York–London) pp. 111–118.

Jacobs, E.E., A.E. Vatter and A.S. Holt, 1954, Crystalline chlorophyll and bacteriochlorophyll. Arch. Biochem. Biophys. 53, 228–238.

Katz, J.J., R.C. Dougherty and L.J. Boucher, 1966, Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll, in: The Chlorophylls, L.P. Vernon and J.R. Seely (eds.) (Academic Press, New York–London), pp. 185–251.

Katz, J.J., W. Oettmeier and J.R. Norris, 1976, Organization of antenna and photoreaction centre chlorophylls on the molecular level. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. 273, 227–253.

Krasnovsky, A.A., 1960, The primary process of photosynthesis in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 363–410.

Krasnovsky, A.A., 1974, Light energy conversion in photosynthesis (Nauka, Moscow), pp. 3–63 (in Russian).

Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin, 1954, On the nature of crystalline chlorophyll formed in ternary system: water-pycolin-dioxan. Dokl. Akad. Nauk. USSR 95, 611–614.

Krasnovsky, A.A. and M.I. Bystrova, 1967, The rearrangement of aggregated forms of chlorophyll and bacteriochlorophyll. Dokl. Akad. Nauk. USSR 174, 480–483.

Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and F. Lang, 1971, Modelling of the different forms of protochlorophyll pigments in solid films and ethiolated leaves treated by δ-ALA. Dokl. Akad. Nauk. USSR 201, 1485–1488.

Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and I.N. Mal'gosheva, 1969, The study of bacterioviridin aggregation by absorption spectra in visible and infrared. Dokl. Akad. Nauk. USSR 189, 885–888.

Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and I.N. Mal'gosheva, 1972, The study of molecular arrangement of aggregated forms of bacteriochlorophyll and analogs in solid films; IR spectra. Dokl. Akad. Nauk. USSR 204, 1473–1476.

Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and E.V. Pakshina, 1966, The influence of magnesium atom in the pigment molecule on the spectral properties of aggregated forms of chlorophyll analogs. Dokl. Akad. Nauk. USSR 167, 691–694.

Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and A.V. Umrikhina, 1977, Spectral effects of bacteriopheophytin aggregation. Dokl. Akad. Nauk. USSR 235, 232–235.

Krasnovsky, A.A., L.M. Kosobutskaya and K.K. Voinovskaya, 1953, Active and inactive forms of protochlorophyll and bacteriochlorophyll in photosynthetic organisms. Dokl. Akad. Nauk. USSR 92, 1201–1204.

Krasnovsky, A.A. and E.V. Pakshina, 1959, Photochemical and spectral properties of bacterioviridin of green sulphur bacteria. Dokl. Akad. Nauk. USSR 127, 913–916.

Krasnovsky, A.A., E.M. Pushkina and N.N. Drozdova, 1974, The spectral effects of bacteriochlorophyll *b* aggregation. Dokl. Akad. Nauk. USSR 219, 748–751.

Krasnovsky, A.A., K.K. Voinovskaya and L.M. Kosobutskaya, 1952, Natural state of bacteriochlorophyll in connection with spectral properties of colloids and solid films. Dokl. Akad. Nauk. USSR 85, 389–392.

Kratky, C. and J.D. Dunitz, 1977, Ordered aggregation states of chlorophyll *a* and some derivatives. J. Mol. Biol. 113, 431–442.

Litvin, F.F. and B.A. Gulyaev, 1970, The system of aggregated forms of bacterial pigments. Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol. USSR N 1, 43–52.

Litvin, F.F. and A.A. Krasnovsky, 1957, The study of chlorophyll intermediates in ethiolated leaves by fluorescence spectra measurement. Dokl. Akad. Nauk. USSR 117, 106–109.

Litvin, F.F. and V.A. Sineshchekov, 1975, Molecular organization of chlorophyll and energetics of the initial stages in photosynthesis, in: Bioenergetics of photosynthesis, Govindjee (ed.) (Academic Press, New York) pp. 619–661.

Parson, W.W. and R.J. Cogdell, 1975, The primary photochemical reaction of bacterial photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 416, 105–149.

Sauer, K., 1975, Primary events and the trapping of energy, in: Bioenergetics of photosynthesis, Govindjee (ed.) (Academic Press, New York) pp. 115–181.

Sheer, H., W.A. Svec, T. Cope Ben, M.H. Studier, R.G. Scott and J.J. Katz, 1974, Structure of bacteriochlorophyll *b*. J. Am. Chem. Soc. 96, 3714–3716.

Sherman, G. and E. Fujimori, 1969, Chlorophyll-dioxane interaction in the solid state. Arch. Biochem. Biophys. 130, 624–628.

Shibata, K., 1957, Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. J. Biochem. 44, 147–173.

Thornber, J. and J. Olson, 1971, Chlorophyll-proteins and reaction center preparations from photosynthetic bacteria, algae and higher plants. Photochem. Photobiol. 14, 329–341.

Sironval, C., M. Brouers, J.M. Michel and Y. Kuiper, 1968, The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. Photosynthetica 2, 268–287.

Vredenberg, W.Y. and L.N.M. Duysens, 1963, Transfer of energy from bacteriochlorophyll to a reaction centre during bacterial photosynthesis. Nature 197, 355–357.

0032-0889/80/66/0925/06/$00.50/0

Efficiency of Hydrogen Photoproduction by Chloroplast-Bacterial Hydrogenase Systems

Received for publication June 21, 1979 and in revised form May 6, 1980

A. A. KRASNOVSKY, CHAN VAN NI, V. V. NIKANDROV, AND G. P. BRIN
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Moscow B71, Union of Soviet Socialist Republics

ABSTRACT

A comparative study of H_2 photoproduction by chloroplasts and solubilized chlorophyll was performed in the presence of hydrogenase preparations of *Clostridium butyricum*. The photoproduction of H_2 by chloroplasts in the absence of exogenous electron donors, and with irreversibly oxidized dithiothreitol and cysteine, is thought to be limited by a cyclic transport of electrons wherein methylviologen short-circuits the electron transport in photosystem I. The efficiency of H_2 photoproduction by chloroplasts with ascorbate and NADPH is limited by a back reaction between light-reduced methylviologen and the oxidized electron donors. The use of a combination of electron donors (dithiothreitol and ascorbate), providing anaerobiosis without damage to chloroplasts, makes it possible to avoid consumption of reduced methylviologen for the reduction of oxidized electron donors and to exclude the short-circuiting of electron transfer. Under these conditions, photoproduction of H_2 was observed to occur with a rate of 350 to 400 micromoles H_2 per milligram chlorophyll per hour. In this case, the full electron-transferring capability of photosystem I (measured by irreversible photoreduction of methyl red or O_2) is used to produce H_2.

After the discovery of H_2 photoproduction by unicellular algae (7), the phenomenon was further investigated in more simple model systems. Arnon *et al.* (1) observed the photoproduction of H_2 when chloroplasts were coupled to bacterial hydrogenase and cysteine was used as electron donor. Ben-Amotz and Gibbs (3) described H_2 photoproduction in a similar system with DTT as the electron donor. Benemann *et al.* (4) observed the photoproduction of H_2 by spinach chloroplasts, bacterial ferredoxin, and hydrogenase in the absence of exogenous electron donors with a rate of 1.7 μmol H_2/mg Chl·h. The low efficiency of the system was thought to be due to the light-produced O_2, which oxidized the light-reduced ferredoxin and inactivated the hydrogenase. Similar results were reported for pea chloroplasts (5). By using O_2 (glucose, glucose oxidase) and H_2O_2 (ethanol, catalase) trapping systems, Rao *et al.* (14) observed H_2 photoproduction by spinach chloroplasts supplemented with spinach ferredoxin and an *Escherichia coli* homogenate (as source of hydrogenase) for about 6 h at the rate of 10 μmol H_2/mg Chl·h. Fry *et al.* (6) observed photoproduction of H_2 by spinach chloroplasts, ferredoxin, and hydrogenase for about 20 h by introducing serum albumin in the reaction mixture. They suggested that H_2 production was inhibited by inactivation of PS II, and the reaction rate was limited by coupling of chloroplasts with hydrogenase. In a later report (12), the reaction rate was shown to diminish due to oxidation of reduced ferredoxin by the O_2 produced. Rao *et al.* (13) described H_2 photoproduction by chloroplasts of *Chenopodium album* with ferredoxin and hydrogenase of *Clostridium pasterianum* at a rate up to 94 μmol H_2/mg Chl·h. Hoffman *et al.* (8) investigated processes affecting H_2 photoproduction by chloroplasts with MV[1], hydrogenase, and electron donors. With sodium ascorbate and TMPD as electron donors, H_2 photoproduction was observed at a rate up to 125 μmol H_2/mg Chl·h. These authors believed that H_2 production and reduction of MV were limited by cyclic electron flow around PS I. We showed (11) that the efficiency of MV photoreduction by chloroplasts was actually related to the efficiency of cyclic electron flow. Previously (9), H_2 photoproduction by pea chloroplasts with hydrogenase and MV in the presence of NADH had been observed, and a possibility of H_2 photoproduction in a simple model system, *e.g.* solubilized Chl in the presence of bacterial hydrogenase, electron donors, and MV (for review, see ref. 10), had been discovered.

To determine the mechanism and the conditions for effective H_2 photoproduction, we undertook a comparative study of H_2 evolution by chloroplasts and solubilized Chl in the presence of hydrogenase preparations from *Clostridium butyricum*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chloroplasts were prepared from 2-week-old pea seedlings of the 'Pobeditel' variety, by the procedure of Walker (15), in the following medium: 0.5 M sucrose, 35 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The chloroplasts were used immediately or after storage in 50% glycerin at −70 C. Before use, the chloroplasts were diluted in the above medium without sucrose.

C. butyricum was grown as described by Azova *et al.* (2). To prepare homogenates, 2 g cells frozen in liquid N_2 were ground in a mortar with quartz sand in 10 ml phosphate buffer (pH 7.0), previously boiled and cooled. The suspension was incubated for 30 min at 4 C under argon, followed by centrifugation at 12,500*g*. The homogenate was frozen and stored at −70 C under H_2. Partially purified preparations of hydrogenase were produced by fractionation with $(NH_4)_2SO_4$ and chromatography on Sephadex G-25.

Rates of H_2 production (16) or of O_2 changes were measured amperometrically with a Teflon-coated platinum electrode. Reaction mixtures were stirred magnetically and illuminated with light wave lengths of 600 to 800 nm. The light intensity was usually about 5×10^5 erg/cm^2·s and was adjusted with a neutral light filter. For H_2 production, anaerobic conditions were provided as described earlier (9). Argon was bubbled through the reacting mixture (4 ml) in a Drechsel bottle and streamed over the concentrated suspension of chloroplasts or solubilized Chl (0.1 ml) in the polarographic cell. Thus, anaerobic conditions were provided without bubbling gas through the chloroplast suspension which causes inactivation. After a 5-min argon streaming, about 0.1 to 0.3 ml hydrogenase preparation was introduced in the cell. Then

[1] Abbreviations: MV, methylviologen; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

the reaction mixture was introduced into the cell under argon and mixed with the chloroplast suspension or, in the case of solubilized Chl, supplemented with 0.3 ml of an O_2-free 10% solution of Triton X-100. The colloidal solution of Chl was prepared as follows: 3 mg solid Chl *a* + *b* was dissolved in 5 ml acetone; then 5 ml phosphate buffer (pH 7.0) was added and, after mixing, the acetone was removed by evacuation.

The photoreduction of MV and methyl red was measured in Thunberg tubes with a side arm; *A* changes were measured at 605 nm (MV) and 525 nm (methyl red). For the chloroplast experiments, anaerobic conditions were provided by a "separate" evacuation procedure (11). During evacuation with a forevacuum pump, 4 ml reaction mixture were in the lower part of the tube, and 0.1 ml concentrated chloroplast suspension, with an equal amount of glycerin, was in the side arm. After a 5-min evacuation, the suspension of chloroplasts was transferred into the reaction mixture.

RESULTS

PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN BY CHLOROPLASTS

Photoproduction of Hydrogen without Exogenous Electron Donors. Under anaerobic conditions provided by the "separate stream" procedure, illumination of pea chloroplasts, together with hydrogenase from *C. butyricum*, resulted in the production of H_2 at low rates up to 4 μl H_2/mg Chl·h, even without adding any chemical electron donors (data not shown). The addition of MV stimulated the reaction to 10.5 μl H_2/mg Chl·h, and the further addition of the uncoupler NH_4Cl stimulated this system additionally to 15 μl H_2/mg Chl·h. DCMU (10 μM) totally inhibited the reaction, which indicates the participation of PS II in the electron transfer to hydrogenase. Previously, it was shown that the photoreduction of MV by chloroplasts was not stimulated by the system used for oxygen absorption (11). In the same way, neither glucose oxidase with glucose nor catalase with ethanol activated the photoproduction of hydrogen by chloroplasts. This finding indicates that the photoproduced O_2 reacts with reduced MV much more effectively than with glucose oxidase.

Photoproduction of Hydrogen with Exogenous Electron Donors. DTT, cysteine, NADPH, and sodium ascorbate were employed as electron donors. In this case, the reaction proceeded only via PS I. To inhibit PS II, 10 μM DCMU was added to the reaction mixture.

The chloroplasts with hydrogenase and electron donors produced H_2 slowly. When MV was added, the reaction rate increased, and reached a maximum at 50 μM MV (Fig. 1). A further increase in MV concentration diminished the rate of H_2 production, but not that of MV reduction which remained constant. Such a dependence of H_2 photoproduction by chloroplasts on MV concentration has been described (8).

H_2 photoproduction with DTT and cysteine was saturated when the light intensity was about 50% of that saturating the Hill reaction with ferricyanide performed under the same conditions (Fig. 2).

The rate of H_2 photoproduction by chloroplasts with DTT was maximal at about pH 7 (Fig. 3). This optimum seems to reflect that of hydrogenase activity since the maximal photoreduction of MV by the chloroplasts with the same electron donor occurs at pH 8.5 (Fig. 3).

The photoproduction of H_2 in the presence of 20 mM DTT or with 50 mM cysteine was activated about 2.5-fold by NH_4Cl or methylamine (data not shown). Photoreduction of MV was also activated by these uncouplers.

Nature of Electron Donors. A prolonged photoproduction of H_2 with DTT and cysteine was observed (Fig. 4). With NADPH, the reaction proceeded only for 3 to 4 min, which seemed to be due to oxidation of reduced MV by $NADP^+$ formed in the presence of ferredoxin-NADPH-reductase of chloroplast preparations (Fig. 4, curve 3). This is confirmed by inhibition of H_2 photoproduction and MV photoreduction by chloroplasts with DTT when adding 1 mM $NADP^+$. Previously, Rao *et al.* (14) noted that the addition of $NADP^+$ inhibited the photoproduction of H_2

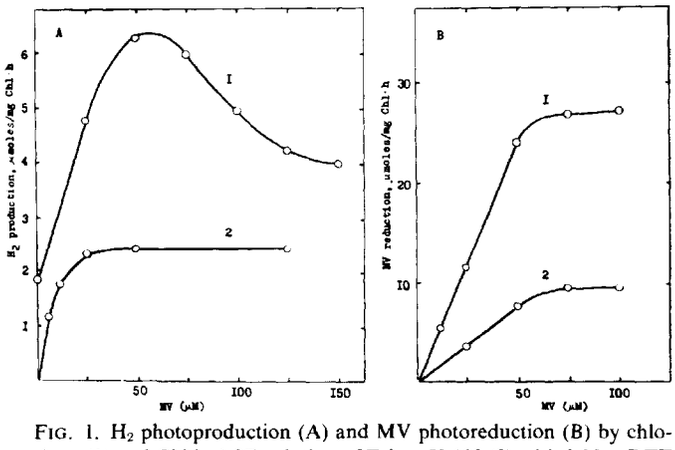


FIG. 1. H_2 photoproduction (A) and MV photoreduction (B) by chloroplasts (1) and Chl in 1.0% solution of Triton X-100 (2) with 0.05 M DTT *versus* MV concentration. The 4-ml chloroplast reaction mixture (1) consisted of 35 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 10 μM PCMU, chloroplasts containing 52 μg Chl (13 μg/ml), and 0.2 ml hydrogenase preparation. The 4-ml Chl reaction mixture (2) consisted of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 80 μg/Chl (20 μg/ml) and 0.2 ml hydrogenase preparation. Anaerobic conditions were provided as described under "Experimental procedures." H_2 production was measured amperometrically.

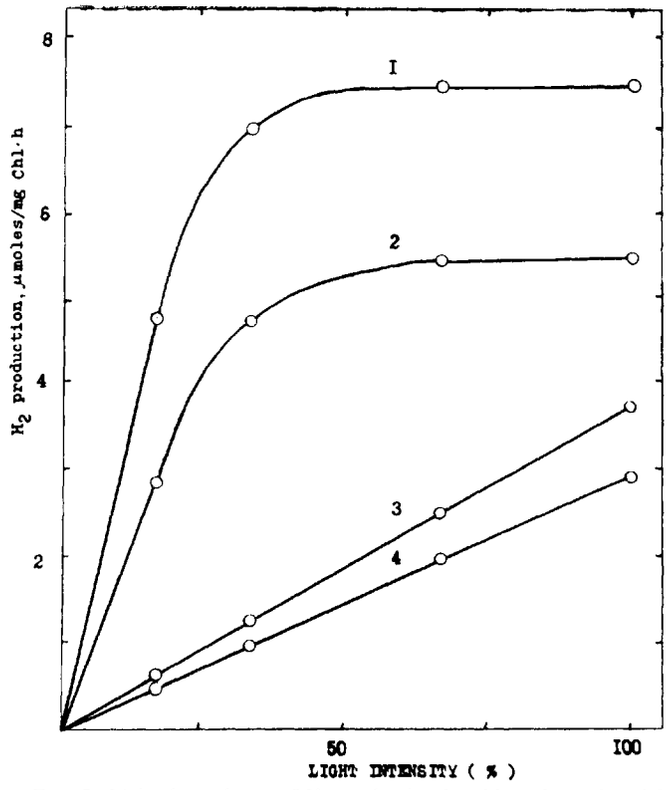


FIG. 2. Light dependence of H_2 production by chloroplasts (1 and 2) and Chl in Triton X-100 solution (3 and 4) with 50 mM DTT (1 and 3) and 0.1 M cysteine (2 and 4). Chl content: 10 μg/ml in chloroplast suspension, 15 μg/ml in Chl solution; 100% light intensity corresponds to 8.10^5 erg/cm^2·s. For other conditions, see under Fig. 1.

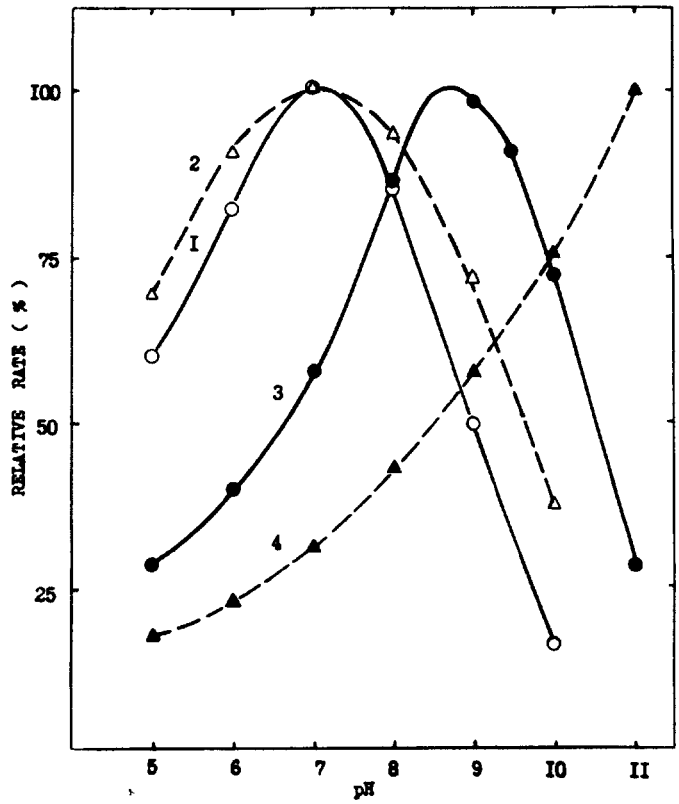


FIG. 3. The influence of pH medium on H_2 photoproduction (1 and 2) and MV photoreduction (3 and 4) by chloroplasts (1 and 3) and Chl in Triton X-100 solution (2 and 4). The rate of H_2 photoproduction by chloroplasts and Chl at pH 7.0, MV photoreduction by chloroplasts at pH 8.5, and MV photoproduction by Chl at pH 11 are taken as 100%. In tests, the minimal amount of homogenate *Clostridium* was used, saturating the H_2 photoproduction by chloroplasts and Chl at pH 7.0. For other conditions, see under Fig. 1.

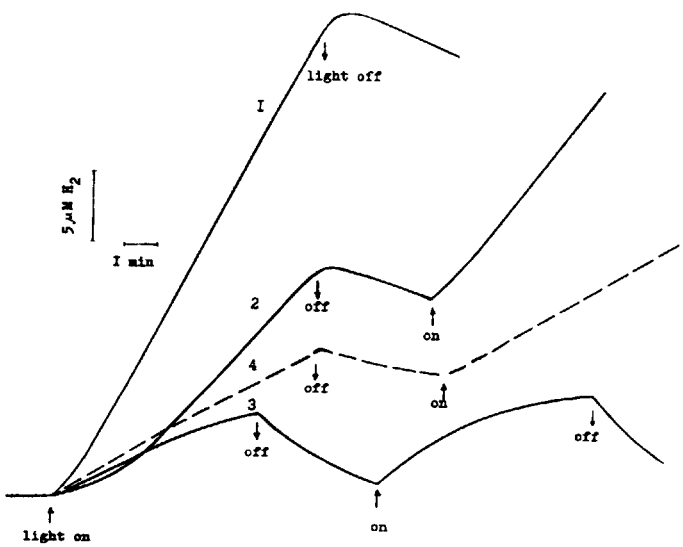


FIG. 4. Kinetics of H_2 photoproduction by chloroplasts (1, 2, and 3) and Chl in Triton X-100 solution (4) with 50 mM DTT (1), 0.1 M cysteine (2), and 2 mM NADPH (3 and 4). Chl content: 29 μg/ml in chloroplast suspension, 36 μg/ml in Chl solution. For other conditions, see under Fig. 1.

by chloroplasts.

The rate of H_2 production showed a steep dependence on the concentration of the electron donor (Fig. 5). With DTT, an increase from 20 to about 50 mM results in a 7-fold increase in the rate of the reaction. Higher levels of cysteine were required than that of DTT (Fig. 5), perhaps due to a lower permeability of chloroplast membranes for cysteine than for DTT. A 5-min preheating of chloroplasts at 50 C considerably activated H_2 production at low cysteine concentrations. This is not connected with the inhibition of O_2 photoproduction (as suggested in ref. 1), because heat treatment activates the reaction even in the presence of DCMU, or after treatment of chloroplasts by 0.8 M Tris buffer. Heating is likely to increase the permeability of chloroplast membranes for cysteine. DCMU had no effect on H_2 photoproduction, regardless of the electron donor used. This is indicative of the fact that the electrons are accepted from donors in PS I.

The rates of H_2 photoproduction, MV photoreduction, and O_2 photoabsorption by chloroplasts using different electron donors have been compared (Table I). The rate of H_2 production by chloroplasts with DTT and cysteine was close to the rate of MV reduction but considerably less than the rate of O_2 absorption with the use of the same electron donors. When using sodium ascorbate with TMPD or DCPIP, lower rates of H_2 production and MV reduction were observed, but the rates of O_2 uptake were close to those using DTT or cysteine. It is known that DTT and cysteine are oxidized irreversibly as a result of disulfide bond formation. So, the low rates of H_2 photoproduction with DTT and cysteine can, perhaps, be explained by the fact that reduced MV is capable of reducing electron transfer components which lie between PS I and II. In the case of the ascorbate, the low efficiency of the reaction may be caused not only by a cyclic transport, but by a back reaction between the reduced MV and oxidized ascorbate as

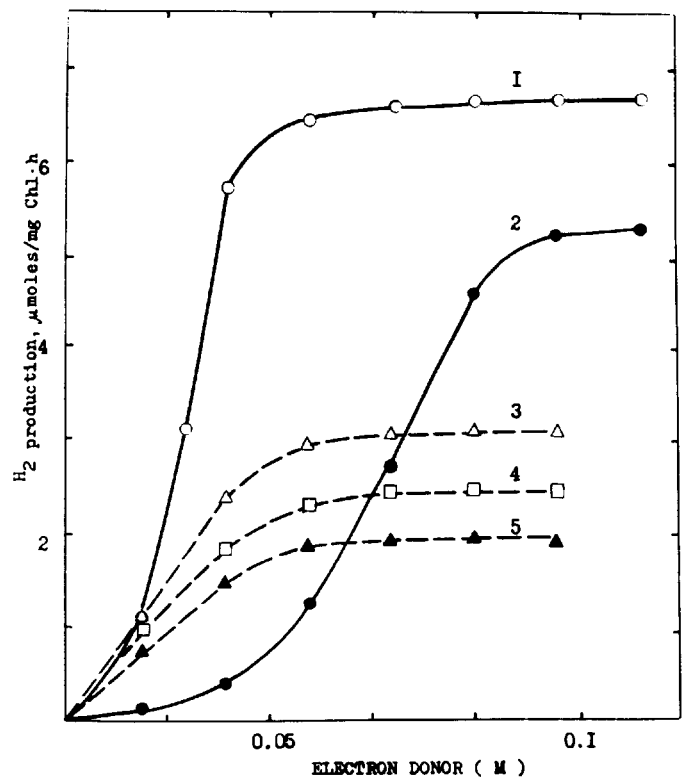


FIG. 5. The rates of H_2 photoproduction by chloroplasts (1 and 2) and Chl in Triton X-100 solution (3, 4, and 5) with DTT (1 and 3) cysteine (2 and 5), and NADPH (4) *versus* the electron donor concentration. Chl content: 16 μg/ml in chloroplast suspension, 24 μg/ml in Chl solution. For other conditions, see under Fig. 1.

Table I. *H_2 Photoproduction, MV Photoreduction, and O_2 Photoabsorption by Chloroplasts in Presence of Electron Donors*

Electron Donors	H_2 Production	MV Reduction[a]	O_2 Absorption[b]
		μ eq/mg Chl·h	
DTT, 50 mM	23.4	24	336
Cysteine, 100 mM	16.4	17.5	224
Ascorbate, 10 mM, + TMPD, 10 μM	5.2	0.2	184
Ascorbate, 1 mM, + DCPIP, 10 μM	3.4	0.1	236

[a] Reaction mixture as for H_2 production without hydrogenase. Anaerobic conditions were provided by separate evacuation as described under "Experimental Procedures." Absorption changes at 605 nm were observed on a spectrophotometer.

[b] Reaction mixture as for MV reduction. O_2 consumption was measured using a Clark-type O_2 electrode.

Table II. *Influence of DTT + Sodium Ascorbate Combination on H_2 Photoproduction, MV Photoreduction, and Methyl Red Photoreduction by Chloroplasts*

Electron Donors	H_2 Production	MV Reduction[a]	Methyl Red Reduction[b]
mM		*μ eq/mg Chl·h*	
DTT, 50	6.4	9.2	524
Ascorbate, 50	0.4	0	536
Ascorbate, 50, + DTT, 50	768	84	540

[a] Reaction mixture as for H_2 production without hydrogenase. Anaerobic conditions were provided by separate evacuation as described under "Experimental Procedures." Absorption changes at 605 nm were observed on a spectrophotometer.

[b] Reaction mixture contained 0.5 mM methyl red, instead of MV. Other conditions as for MV reduction. Absorption changes at 525 nm were observed on a spectrophotometer in vacuum.

well. The O_2 used as the final acceptor of electrons provides high rates of the electron transfer since in this case, the cyclic transport of electrons in PS I is excluded.

Combination of Electron Donors. The photoproduction of H_2 by chloroplasts was reported (8) to proceed at the rate of 125 μmol/mg Chl·h with ascorbate + TMPD as the electron donor. In the experiments reported here, the photoproduction of H_2 by chloroplasts with the use of ascorbate with TMPD or of ascorbate with DCPIP proceeds with a low rate (1–3 μmol/mg Chl·h), which agrees with the data of Benemann *et al.* (4). The effective H_2 production reported in reference 8 might be possibly due to the presence of dithioerythritol added to prevent hydrogenase inactivation. When the ascorbate and DTT (dithioerythritol isomer) were added simultaneously, H_2 was produced at a rate 2 orders of magnitude higher than when each electron donor was used separately (Table II). This cannot be explained by an increase in hydrogenase activity or its protection from inactivation by DTT since DTT was not effective by itself. It is worth noting that, with the ascorbate and DTT together, MV photoreduction is also activated (Table II). In this reaction, the hydrogenase is not used. The irreversible photoreduction of methyl red by chloroplasts proceeded at a high rate no matter whether the ascorbate and DTT are used separately or in a combination (Table II). Using the combination of electron donors, cysteine + DTT or cysteine + ascorbate did not activate the photoproduction of H_2.

Processes Affecting State of Chloroplast Membranes. Previously we reported (11) that photoreduction of MV by chloroplasts in the absence of electron donors was inhibited by bubbling inert gases through the suspension or by a low concentration of Triton X-100.

A 10-min bubbling of argon through the chloroplast suspension diminished H_2 photoproduction by chloroplasts (in the absence of exogenous electron donors) from 15 μl H_2/mg Chl·h down to 3 μl and that by 0.007% Triton X-100 was diminished down to 5.5 μl H_2/mg Chl·h. These treatments inhibited the photoproduction of H_2 and photoreduction of MV by chloroplasts with DTT (Figs. 6 and 7) but did not affect the rate of methyl red reduction (Fig. 6). Previously, it was shown that O_2 photoabsorption by chloroplasts did not actually change after bubbling argon through a chloroplast suspension (11).

To clarify the mechanism of H_2 photoproduction, photoproduction of H_2 by solubilized Chl, *i.e.* in the absence of the organized electron transfer chain, was investigated.

PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN IN CHL SOLUTIONS

Illumination of a colloidal solution of Chl in phosphate buffer with hydrogenase, MV, and DTT without a detergent did not lead to H_2 photoproduction. The addition of Triton X-100 resulted in the photoproduction of H_2. The reaction rate was enhanced with increase in the detergent concentration and was saturated at 0.7% Triton (Fig. 7) in a H_2O solution.

In the absence of MV, H_2 photoproduction in the Chl solution was not observed. The reaction required MV, with maximal rates obtained at 20 μM (Fig. 1) and no inhibition by excess MV.

Unlike the chloroplasts, the photoproduction of H_2 by solubilized Chl with DTT or cysteine does not saturate in the range of light intensities studied (Fig. 2).

The maximal photoproduction of H_2 sensitized by Chl is observed at pH 7 (*cf.* chloroplasts), *i.e.* it depends on the hydrogenase activity. In an alkaline medium, the reaction is inhibited to the same extent as are the chloroplasts and, in the acid medium, the system with Chl is more stable (Fig. 3). For comparison, Figure 3 shows the pH dependence of MV photoreduction on Chl.

With DTT, cysteine, and NADPH, a prolonged H_2 evolution in Chl solutions with 0.7% Triton X-100 was observed. The reaction was saturated at 50 mM electron donors (Fig. 5). The most effective

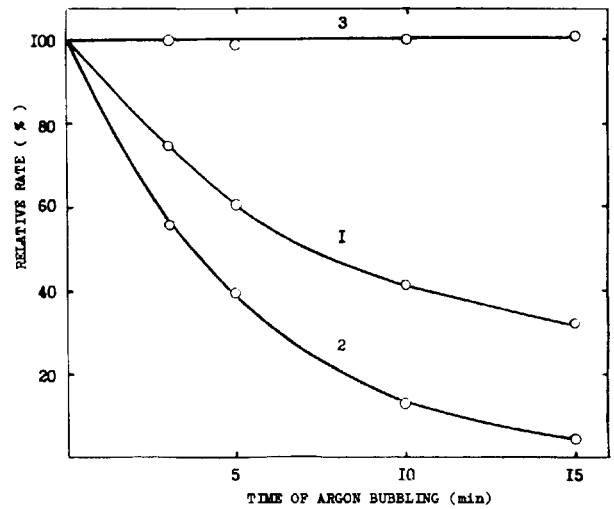


FIG. 6. H_2 photoproduction (1), MV (2) and methyl red photoreduction (3) by chloroplasts with DTT (50 mM) *versus* the time of bubbling with argon. The reaction mixture contained 22 μg/ml Chl 50 μM MV, or 0.5 mM methyl red. The reaction rate, when anaerobic conditions were provided without bubbling argon through the chloroplast suspension (see "Experimental Procedures"), is taken as 100%. The 100% rate for 1 corresponds to 10.4 μmol/mg Chl·h, that for 2 is 11.5 μmol/mg Chl·h, and that for 3 is 528 μmol/mg Chl·h. For other conditions, see under Fig. 1 and Table II.

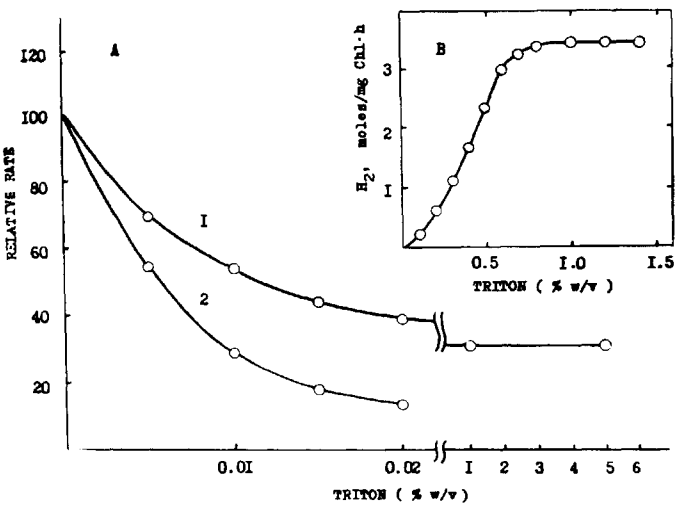


FIG. 7. The influence of Triton X-100 on H_2 photoproduction (1) and MV photoreduction (2) by chloroplasts (A) and Chl (B) with DTT. The concentrations were: MV, 50 μM; DTT, 50 mM; 16 μg/ml Chl in chloroplast suspension; 20 μg/ml Chl in Chl solution. For other conditions, see under Fig. 1.

Table III. *H_2 Photoproduction and O_2 Photoabsorption in Chl solution in 1.0% Triton X-100*

The concentrations of DTT, cysteine, sodium ascorbate, and NADPH were each 50 mM.

Electron Donors	H_2 Production[a]	O_2 Absorption[b]
	μmol/mg Chl·h	
Without electron donors	0	2.3
DTT	3.3	502
Ascorbate	0	—[c]
Ascorbate + DTT	0	—[c]
Cysteine	1.8	428
NADPH	2.7	542

[a] The reaction mixture consisted of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 50 μM MV, 15 μg/ml Chl, and 0.2 ml hydrogenase preparation.

[b] Reaction mixture as for H_2 without hydrogenase. O_2 consumption was measured using a Clark-type O_2 electrode.

[c] —, Not measured due to intensive O_2 absorption without illumination.

electron donor in the reaction of H_2 evolution was DTT (Table III). The reaction did not proceed in the presence of the ascorbate alone. Unlike the case for chloroplasts, H_2 photoproduction by solubilized Chl was not increased when a combination of ascorbate + DTT as electron donors was used. The kinetics of H_2 evolution by Chl with NADPH differed from that of H_2 production by the chloroplasts with the same electron donor (Fig. 4). With all electron donors, O_2 photoabsorption in the chlorophyll solution in the detergent is considerably faster than is H_2 photoproduction (Table III). This seems to be due to the reversibility of MV photoreduction by Chl under anaerobic conditions.

DISCUSSION

The results presented here allow a better understanding of some parameters controlling the efficiency of H_2 photoproduction by chloroplasts coupled to a bacterial hydrogenase.

In the absence of an exogenous electron carrier, the photoproduction of H_2 is limited by a link which coupled chloroplasts to hydrogenase. Unlike the Chl solutions, the chloroplasts are capable of H_2 evolution without MV. Perhaps in this case, the hydrogenase interacts with endogenous ferredoxin. However, MV, which transfers electrons from the chloroplasts to the hydrogenase, considerably increased the reaction rate (Fig. 1).

Previously, the photoreduction of MV by chloroplasts without exogenous electron donors was studied (11). The process was shown to be inhibited by a competing cyclic electron flow through MV around PSI. The photoproduction of H_2, as well as the photoreduction of MV, is inhibited by DCMU, low concentrations of detergent, and bubbling of the inert gas through the suspension of the chloroplasts and is activated by the uncouplers of photophosphorylation. The results presented here indicate the expected similarities between H_2 photoproduction and MV photoreduction by chloroplasts.

Hoffman *et al.* (8) suggested that H_2 evolution by the chloroplasts with electron donors should be limited by the cyclic electron transport. The results presented here confirm that assumption. O_2 photoabsorption or methyl red photoreduction by chloroplasts with DTT or cysteine proceeded without a cyclic transport of electrons due to irreversibility of the reduction of the electron acceptor and so had a considerably higher rate than that of H_2 evolution and MV photoreduction (Tables I and II). The effect of cyclic electron transport is also indicated by inhibition of these reactions by low concentrations of the detergent (Fig. 7) or the bubbling of inert gas through the chloroplast suspension (Fig. 6), which probably increase the permeability of chloroplast membranes for the MV. It should be emphasized that the described processes do not influence the irreversible photoreduction of methyl red by the chloroplasts. The diminishing of H_2 evolution at MV concentrations above 50 μM may be explained by an increase in the cyclic transport of electrons (Fig. 1). When using reversibly oxidized electron donors, H_2 evolution by chloroplasts may be decreased by competition from both cyclic electron transport and a back reaction between reduced MV and the oxidized electron donor. For these reasons, the photoproduction of H_2 with ascorbate as donor proceeds at a low rate. When NADPH is used as electron donor with chloroplasts, but not with the Chl solutions, H_2 evolution stops much sooner than in the case of DTT or the cysteine (Fig. 4). This is probably due to the fact that NADH undergoes reversible oxidation, for the reason already given here.

Thus, we also came to the conclusion that the H_2 photoproduction by the chloroplast-hydrogenase system is limited mainly by a cyclic transport of electrons around PSI and including MV.

Without exogenous electron donors, *i.e.* when H_2O serves as the electron donor, MV evidently short-circuits the electron transport, being able to reduce electron carriers located between PSII and I, *e.g.* plastoquinone, plastocyanine etc. (Fig. 8). In this case, H_2 production occurs at a low rate (~1 μmol H_2/mg Chl·h). When soluble ferredoxin is used as the chloroplast-hydrogenase electron

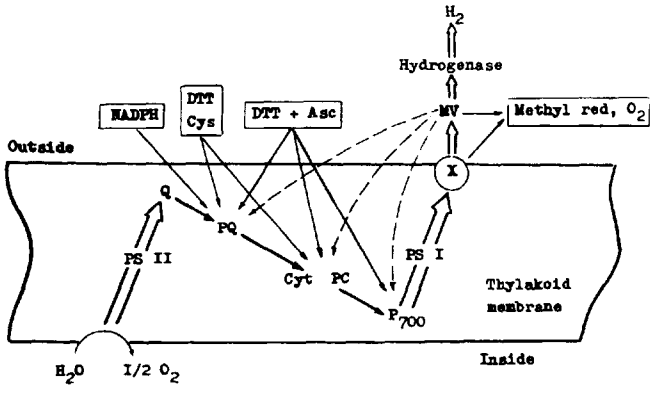


FIG. 8. Hypothetic scheme of electron transport at H_2 photoproduction by chloroplasts in the presence of bacterial hydrogenase. Q, PS II acceptor; PQ, plastoquinone; Cyt, cyt *f*; PC, plastocyanine, P_{700}, photochemically active form of Chl PSI; X, PSI acceptor. Asc, sodium ascorbate; Cys, cysteine. (– – –), short-circuiting of electron transport chain through MV.

carrier, H_2 photoproduction occurs at a much higher rate (6, 12–14). In this case, only a part of the electron-transport capacity of the chloroplasts is realized. Perhaps cyclic transport of electrons through the ferredoxin limits H_2 evolution by chloroplasts.

The exogenous electron donors probably reduce the electron carriers located between the photosystems and, thereby, decrease or totally inhibit the cyclic transport of electrons (Fig. 8). Cysteine DTT, at more than 10 mM concentrations, seem to donate the electrons at the level of plastocyanine. This is indicated by the lack of activation of O_2 photoabsorption and methyl red photoreduction by the chloroplasts with the donors when the system is supplemented with DCPIP or TMPD. In H_2 photoproduction, the reduced MV competes with cysteine and DTT for the reduction of plastocyanine or reduces p_{700}. Here, H_2 photoproduction by chloroplasts with rates of 350 to 400 μmol/mg Chl·h was observed by using the combination of electron donors (50 mM sodium ascorbate and 50 mM DTT), the O_2 being withdrawn from the suspension by a procedure of "separate" argon blowing through. Here, the reaction rate is close to the rate of irreversible photoreduction of the methyl red (Table II), which indicates an actual absence of the cyclic transport of electrons in this case. The cyclic transport of electrons is inhibited, most likely, because the combination of electron donors used causes an efficient reduction of electron transfer chain components located between PSI and PSII.

Acknowledgment—The authors are indebted to L. V. Zhukova for growing the culture of *C. butyricum*.

LITERATURE CITED

1. ARNON DI, A MITSUI, A PANEQUE 1961 Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation. Science 134: 1425
2. AZOVA LG, MV GUSEV, VS IVOILOV 1970 The response of some *Clostridium* bacteria to molecular oxygen. Microbiologia 39: 55–59
3. BEN-AMOTZ A, M GIBBS 1975 H_2 metabolism in photosynthetic organisms. II. Light-dependent H_2 evolution by preparations from *Chlamydomonas, Scenedesmus*, and spinach. Biochem Biophys Res Commun 64: 355–359
4. BENEMANN JR, JA BERENSON, NO KAPLAN, MD KAMEN 1973 Hydrogen evolution by chloroplast—ferredoxin—hydrogenase systems. Proc Natl Acad Sci USA 70: 2317–2320
5. BERESIN IV, SD VARFOLOMEEV, AV ZAITSEV 1976 Biophotolysis of water. Dokl Acad Nauk SSSR 229: 94–97
6. FRY I, G PAPAGEORGIOU, E TEL-OR, L PACKER 1977 Reconstitution of a system for H_2 evolution with chloroplasts, ferredoxin, and hydrogenase. Z Naturforsch 32c: 110–117
7. GAFFRON H, J RUBIN 1942 Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. J Gen Physiol 26: 219–240
8. HOFFMAN D, R THAUER, A TREBST 1977 Photosynthetic hydrogen evolution by spinach chloroplasts coupled to *Clostridium* hydrogenase. Z Naturforsch 32c: 257–262
9. KRASNOVSKY AA, VV NIKANDROV, GP BRIN, IN GOGOTOV, VP OSCHCHEPKOV 1975 Photoproduction of hydrogen in the solutions of chlorophyll, $NADH_2$, and chloroplasts. Dokl Acad Nauk SSSR 225: 711–713
10. KRASNOVSKY AA 1979 Photoproduction of hydrogen in photosynthetic and artificial systems. *In* J Barber, ed, Photosynthesis in relation to model systems, Chap 9. Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp 281–298
11. NIKANDROV VV, CHAN VAN NI, GP BRIN, AA KRASNOVKSY 1978 The study of methylviologen photoreduction by chloroplasts. Mol Biol 12: 1278–1287
12. PACKER L, W CULLINGFORD 1978 Stoichiometry of H_2 production by *in vitro* chloroplast ferredoxin-hydrogenase reconstituted system. Z Naturforsch 33c: 113–115
13. RAO KK, IN GOGOTOV, DO HALL 1978 Hydrogen evolution by chloroplast—hydrogenase systems: improvements and additional observation. Biochimie 60: 291–296
14. RAO KK, L ROSA, DO HALL 1976 Prolonged production of hydrogen gas by a chloroplast biocatalytic system. Biochem Biophys Res Commun 68: 21–28
15. WALKER DA 1972 Chloroplasts. Methods Enzymol 23: 211–220
16. WANG R, FP HEALEY, J MYERS 1971 Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. Plant Physiol 48: 108–110

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 28, вып. 4 1981 г.

УДК 581.192

ВЛИЯНИЕ АНАЭРОБИОЗА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ И ИХ ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, И. Г. НАЗАРОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

При выдерживании этиолированного листа в темноте без воздуха наблюдается постепенное перераспределение относительной высоты максимумов флуоресценции протохлорофилловых пигментов — максимум 655 нм понижается, а 635 нм возрастает. Это явление сопровождается уменьшением количества фотоактивного пигмента и замедлением скорости его фототрансформации, ведущими к постепенному возрастанию у листьев после освещения максимума флуоресценции пигмента около 630 нм. По сравнению с этиолированным листом, освещенным в присутствии воздуха, пребывание листа в вакууме приводит при последующем освещении к возрастанию коротковолнового максимума флуоресценции 675—680 нм. Коротковолновый сдвиг максимумов флуоресценции пигментов в этиолированных и зеленеющих листьях не связан с фитолизацией протохлорофиллида и хлорофиллида, следовательно, без воздуха (кислорода) форма протохлорофиллида 655 нм разрушается, а форма хлорофиллида 690—695 нм не образуется. Полученные данные позволяют предположить важную регулирующую роль кислорода в формировании нормальной структуры пигментного комплекса этиолированных и зеленеющих листьев.

Протохлорофиллид — хлорофиллид — фототрансформация — анаэробиоз.

Известно, что в отсутствие воздуха (кислорода), как и в случае контрольных этиолированных листьев на воздухе, освещение при комнатной температуре приводит к образованию длинноволновой формы пигмента с максимумом флуоресценции 690—695 нм. Однако последующие превращения пигментного комплекса — фитолизация и сопровождающий ее коротковолновый сдвиг максимума флуоресценции до 680 нм — замедляются [1]. Обнаружена фотоактивация этих процессов кратковременным освещением листа после пуска воздуха.

В данной работе изучено влияние удаления воздуха (кислорода) на спектральные свойства пигментов в этиолированных листьях и на фотохимические стадии превращения пигментов при освещении. Для этого было проведено исследование фототрансформации пигментов в этиолированных листьях, выдержанных после удаления воздуха в течение различного времени в темноте при 20°.

МЕТОДИКА

Этиолированные растения фасоли и кукурузы растили в темноте при 20—23°. Все операции с этиолированными листьями производили в полной темноте. Перед опытом листья прикрепляли к влажной фильтровальной бумаге и помещали в вакуумную трубку. Эвакуацию воздуха производили в течение 30 мин вакуумным масляным насосом.

Для выяснения влияния анаэробиоза на спектральные свойства этиолированных листьев их выдерживали различное время в темноте в вакууме и без освещения измеряли спектры флуоресценции при —196°. При

изучении влияния анаэробиоза на фотохимические стадии превращения протохлорофилловых пигментов этиолированные листья после выдерживания в темноте в вакууме освещали, не пуская воздух, при комнатной температуре светом, возбуждающим флуоресценцию ($2{,}6 \cdot 10^{-2}$ Вт·см$^{-2}$), или лампой накаливания ($3 \cdot 10^{-4}$ Вт·см$^{-2}$) и измеряли спектры флуоресценции при +20 и —196°. При освещении листьев возбуждающим светом и измерении флуоресценции при комнатной температуре применяли термостатирование. Спектры флуоресценции измеряли на фотоэлектрическом спектрофлуорометре. Для возбуждения использовали лампу СВД-120А со светофильтрами УФС-2, ЗС-3 и СЗС-14 (линия ртути 365 нм). Запись одного спектра флуоресценции от 620 до 760 нм занимала около 2 мин.

Соотношение фитольных и бесфитольных форм пигментов определяли как в [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектральные свойства этиолированных листьев. Пребывание этиолированных листьев в темноте без воздуха приводило к перераспределению соотношения высоты максимумов в низкотемпературных спектрах флуоресценции. Максимум при 655 нм постепенно понижался, а интенсивность флуоресценции в коротковолновой области 628—635 нм возрастала. Понижение максимума 655 нм сопровождалось его смещением на несколько нанометров в коротковолновую сторону (рис. 1, *А*). После 19 ч пребывания этиолированных листьев в вакууме максимум флуоресценции 650—655 нм отчетливо не обнаруживался и флуоресцирующая форма пигмента была представлена пиком при 634—635 нм.

Пуск воздуха к этиолированным листьям после эвакуации прерывал перераспределение высоты максимумов флуоресценции, обусловленное отсутствием воздуха (рис. 1, *Б*). Следовательно, наблюдаемые спектральные изменения при нахождении этиолированных листьев в вакууме не обусловлены повреждением в процессе эвакуации. Скорость наблюдаемых изменений зависела от вида и возраста растения. Так, этот процесс протекал с большей скоростью в опытах с листьями кукурузы, чем с листьями фасоли. Его скорость была выше при использовании для опытов молодых растений. Можно думать, что скорость перестройки форм

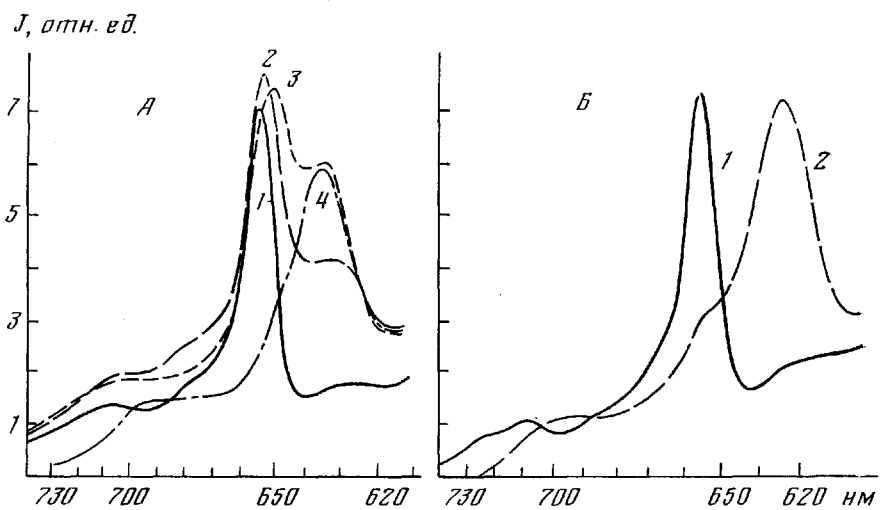


Рис. 1. Влияние удаления воздуха на спектры флуоресценции (—196°) этиолированных листьев фасоли (*А*) и кукурузы (*Б*)

А: *1* — без эвакуации, *2*—4 ч; *3*—6 ч, *4*—19 ч нахождения в вакууме; *Б*: *1* — после эвакуации пущен воздух, 3,5 ч нахождения в темноте в присутствии воздуха; *2* — 3,5 ч нахождения в вакууме. *J* — интенсивность флуоресценции

пигментов в низкотемпературных спектрах флуоресценции этиолированных листьев при их нахождении в вакууме зависит от уровня темновых метаболических процессов, идущих с использованием кислорода.

Максимум флуоресценции 655 нм обнаруживался у этиолированных листьев лишь при —196°, так как освещение возбуждающим светом при 20° приводит к быстрому фотопревращению этой формы пигмента. Флуоресценцию коротковолновых форм протохлорофилловых пигментов в области 630—640 нм возможно было измерить и при комнатной температуре, вероятно, вследствие малой фотохимической активности входящего в них пигмента [3].

Фотохимические превращения пигментов в этиолированных листьях. При освещении этиолированных листьев в присутствии воздуха и измерении спектров флуоресценции при +20 и —196° наблюдались описанные ранее изменения [1, 4], а именно образование формы 688—690 нм, перемещение максимума флуоресценции до 693—695 нм в первые минуты освещения с одновременным падением его интенсивности. Следующая стадия спектральных изменений — смещение максимума флуоресценции в коротковолновую сторону до 680—682 нм, сопровождающееся ростом его интенсивности. Эта стадия у этиолированных листьев в присутствии воздуха коррелирует с фитолизацией хлорофиллида [5] и занимает при данной интенсивности света около 40—60 мин [1].

Освещение этиолированного листа сразу после эвакуации также приводило к образованию максимума флуоресценции 688—690 нм и его сдвигу в длинноволновую сторону до 693—695 нм, однако при длительном освещении в вакууме наблюдалось торможение последующего коротковолнового сдвига до 680 нм [1], и этот процесс требовал около 2,5—3 ч. После сдвига максимума до 680 нм дальнейшее освещение без воздуха не приводило к изменениям положения максимума флуоресценции, длинноволновые агрегированные формы хлорофилла не образовывались.

Для сравнения фотохимических превращений пигментов в зависимости от продолжительности пребывания без воздуха этиолированные листья фасоли после определенного интервала нахождения в вакууме освещали в течение 10 мин без воздуха светом, возбуждающим флуоресценцию. По мере освещения измеряли спектры флуоресценции при 20°. После 10 мин освещения листья замораживали в жидком азоте и измеряли спектры флуоресценции при —196°.

А. Измерение спектров флуоресценции при 20°. Фототрансформация протохлорофилловых пигментов. При освещении этиолированных листьев в присутствии воздуха и после выдерживания их до 2 ч в вакууме в первом спектре флуоресценции, записанном при 20°, обнаруживался низкий размытый максимум в области протохлорофилловых пигментов при 630—640 нм. Последующее освещение в течение 10 мин приводило к понижению длинноволнового склона этого максимума, по-видимому, вследствие превращения оставшейся фотоактивной формы 655 нм (рис. 2, *А*).

При более длительном пребывании этиолированных листьев без воздуха замедлялась скорость падения интенсивности флуоресценции протохлорофилловых пигментов под действием света и сопряженного с ним возрастания интенсивности флуоресценции в области хлорофилловых пигментов 674—695 нм. У этиолированного листа после 19 ч нахождения без воздуха максимум флуоресценции располагался около 635 нм и при освещении понижался лишь незначительно (рис. 2, *Б*, *В*).

Меньшая скорость фотопревращения коротковолнового протохлорофиллового пигмента обнаруживалась и ранее и объяснялась промежуточным превращением коротковолновой формы путем темновой реакции в длинноволновую 655 нм [3]. Как видно из рис. 2, *Б*, в наших опытах бóльшая часть пигмента, составляющего коротковолновую форму после

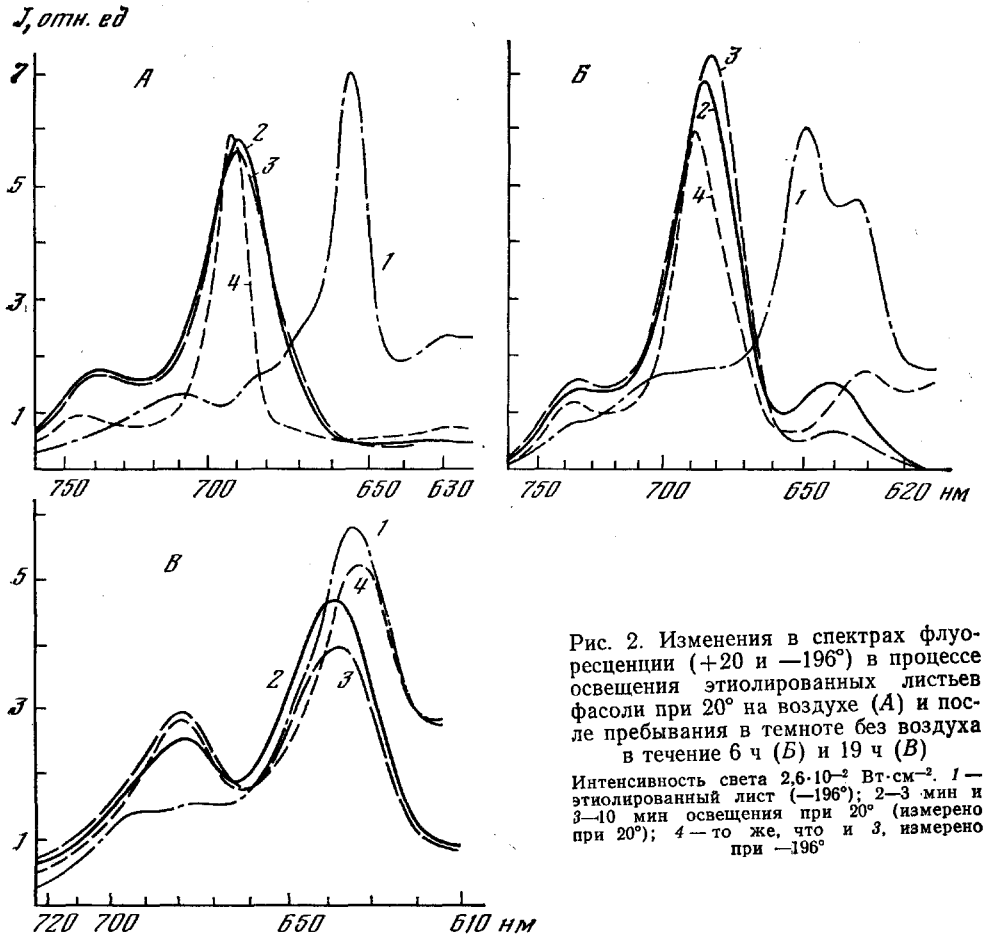


Рис. 2. Изменения в спектрах флуоресценции (+20 и —196°) в процессе освещения этиолированных листьев фасоли при 20° на воздухе (*А*) и после пребывания в темноте без воздуха в течение 6 ч (*Б*) и 19 ч (*В*)

Интенсивность света $2{,}6 \cdot 10^{-2}$ Вт·см$^{-2}$. *1* — этиолированный лист (—196°); 2—3 мин и 3—10 мин освещения при 20° (измерено при 20°); *4* — то же, что и *3*, измерено при —196°

6 ч пребывания этиолированных листьев в вакууме, при последующем освещении претерпевает фототрансформацию, давая начало коротковолновой форме хлорофиллида. Подобное превращение наблюдалось ранее при освещении этиолированных листьев ζ-каротинового мутанта кукурузы, обладающего высоким максимумом флуоресценции в области 630 нм [6].

Результаты опытов, описанные в данной работе, не позволяют судить о том, имеет ли место в процессе освещения промежуточное превращение коротковолновой формы в длинноволновую 655 нм. Пока нет также объяснения причин, почему после 19 ч без воздуха способность коротковолновой формы к фотопревращению почти полностью утрачивается.

Спектральные свойства пигментов, образующихся при освещении. По сравнению с этиолированными листьями, освещенными на воздухе, по мере пребывания в вакууме при последующем освещении этиолированных листьев наблюдалось относительное возрастание флуоресценции (20°) в области 670—680 нм, приводящее к асимметрии максимума флуоресценции при освещении листьев сразу после эвакуации и постепенному сдвигу максимума в коротковолновую сторону при больших интервалах выдерживания этиолированных листьев в темноте без воздуха (рис. 3, *А*).

После 2—4 ч нахождения этиолированного листа без воздуха максимум флуоресценции 688—690 нм, образующийся в результате освещения при 20°, был стабильным по положению в течение 10 мин освещения

или смещался за это время на 1—1,5 нм в коротковолновую сторону. В последнем случае наблюдался небольшой рост его интенсивности.

После 6 ч пребывания этиолированного листа в вакууме коротковолновое смещение максимума флуоресценции под лучом возбуждающего света было еще более отчетливым. Первоначально образующийся максимум при 686 нм смещался за 10 мин до 682 нм и его интенсивность значительно возрастала. Смещение может быть обусловлено действием возбуждающего света на пигментный комплекс, образующийся на свету без воздуха, а также медленной скоростью фототрансформации формы 635 нм, превращающейся при освещении в коротковолновый пигмент (рис. 2, *Б*).

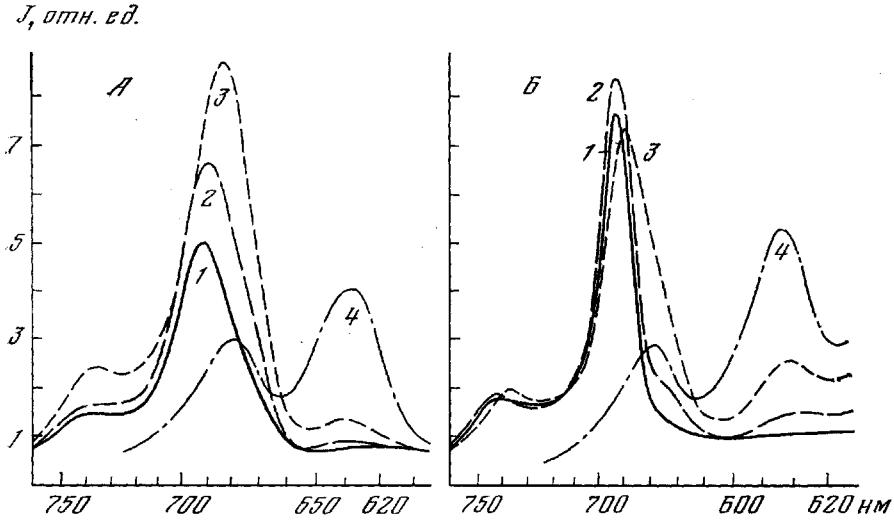


Рис. 3. Спектры флуоресценции при 20° (*А*) и при —196° (*Б*) этиолированных листьев фасоли, освещенных в течение 10 мин при 20° после разных интервалов пребывания в темноте без воздуха

Интенсивность света — $2{,}6 \cdot 10^{-2}$ Вт·см$^{-2}$. *1* — без эвакуации; *2*—4 ч; *3*—6 ч; *4*—19 ч пребывания в темноте в вакууме

После 19 ч выдерживания этиолированного листа фасоли в вакууме освещение приводило к образованию максимума флуоресценции при 680 нм и за 10 мин нахождения на возбуждающем свету при 20° максимум рос, не изменяя положения (рис. 2, *В*).

Б. Измерения спектров флуоресценции при —196°. Вышеописанные изменения спектральных свойств пигментов прослеживались по низкотемпературным спектрам флуоресценции листьев фасоли, освещенных (после выдерживания в вакууме) в течение 10 мин при 20° (рис. 3, *Б*).

Следует отметить различия в положении максимумов флуоресценции пигментов в зеленеющих листьях при +20 и —196°. Пики протохлорофилловых пигментов были сдвинуты при —196° в коротковолновую сторону на 5—7 нм по сравнению со спектрами флуоресценции, измеренными при +20° (рис. 2, 3), тогда как максимумы пигментов после фототрансформации были сдвинуты при —196° на 2—5 нм в длинноволновую сторону спектра. Положение максимума флуоресценции 675—680 нм, образующегося при освещении этиолированных листьев после длительного пребывания в вакууме, не изменялось при измерении флуоресценции в жидком азоте и при комнатной температуре.

Можно полагать, что наблюдающиеся различия положения максимумов могут быть следствием изменения миграции энергии между разными формами пигмента [7]. Так, можно думать, что сдвиг максимумов флуоресценции протохлорофилловых пигментов в коротковолновую сто-

рону может объясняться уменьшением при —196° миграции энергии от коротковолновых форм 628—630 нм. Длинноволновое смещение максимума флуоресценции на первых этапах освещения этиолированных листьев может быть обусловлено уменьшением при —196° миграции энергии от протохлорофилловых пигментов к коротковолновой форме хлорофиллового пигмента 675 нм и (или) увеличением миграции энергии от этой формы к длинноволновым формам 690—695 нм. На последнее указывает значительное уменьшение ширины максимума флуоресценции, образующегося при освещении этиолированных листьев, и заметное понижение его коротковолнового склона при измерении спектров флуоресценции в жидком азоте (рис. 2).

По мере увеличения интервала пребывания этиолированных листьев в темноте без воздуха в спектре флуоресценции, измеренном при —196°,

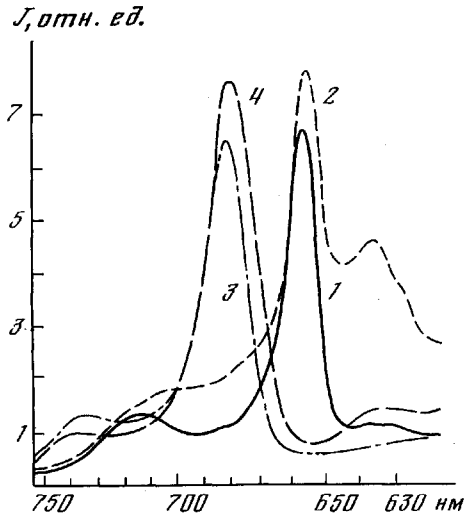


Рис. 4. Спектры флуоресценции (—196°) при длительном освещении при +20° этиолированных листьев фасоли в присутствии и отсутствие воздуха

Интенсивность света $3 \cdot 10^{-4}$ Вт·см$^{-2}$. *1* — этиолированный лист на воздухе без освещения; *2* — этиолированный лист после 4 ч пребывания в темноте без воздуха; *3* — то же, что *1*, после 1 ч освещения; *4* — то же, что *2*, после 1 ч освещения

после освещения листьев при +20° отчетливо видно возрастание интенсивности в максимуме непрореагировавшего на свету протохлорофиллового пигмента в области 630—635 нм и возрастание флуоресценции в области 674—675 нм. При освещении этиолированных листьев на воздухе на присутствие этой формы хлорофиллового пигмента указывает небольшой подъем интенсивности флуоресценции в области 665—680 нм, тогда как при освещении в вакууме количество этой формы пигмента возрастает по мере увеличения времени анаэробиоза и в предельном случае после 19 ч пребывания листа фасоли в вакууме эта форма является единственной, образующейся на свету.

Идентификация пигментов. Определение изменения общего количества пигментов (хлорофилл+хлорофиллид) в интервале 1—10 ч освещения этиолированных листьев без воздуха показало, что за это время содержание пигмента не изменяется [1]. Это объясняется тем, что в отсутствие кислорода не имело места фотоокисление коротковолновой формы пигмента, а накопление пигмента не происходило вследствие отсутствия нормальных метаболических реакций, необходимых для биосинтеза хлорофилла.

Для идентификации пигментов, принимающих участие в наблюдаемой сложной картине взаимопревращения отдельных форм протохлорофилловых и хлорофилловых пигментов, нами было определено соотношение фитольных и бесфитольных форм в этиолированных и освещенных в вакууме листьях в зависимости от продолжительности пребывания этиолированных листьев без воздуха. Результаты показали, что коротковолновое смещение максимумов флуоресценции от 655 до 635 нм в

Содержание бесфитольных пигментов в этиолированных и зеленеющих листьях в зависимости от времени пребывания этиолированных листьев без воздуха

Обработка этиолированного листа	Протохлорофиллид, % от суммы протохлорофиллид+протохлорофилл	Хлорофиллид, % от суммы хлорофиллид+хлорофилл
Без эвакуации	76	—
Без эвакуации, 1 ч освещения ($3 \cdot 10^{-4}$ Вт·см$^{-2}$)	—	0,5
30 мин эвакуации без стояния в темноте, 1 ч освещения ($2{,}6 \cdot 10^{-2}$ Вт·см$^{-2}$)	—	35
4 ч стояния в вакууме в темноте	73	—
4 ч стояния в вакууме в темноте, 1 ч освещения ($3 \cdot 10^{-4}$ Вт·см$^{-2}$)	—	78

этиолированных листьях и от 690—695 до 675—680 нм в зеленеющих листьях, происходящее в отсутствие воздуха (рис. 4), не обусловлено фитолизацией протохлорофиллида и хлорофиллида, так как анаэробиоз не изменял соотношения фитольных и бесфитольных форм (таблица).

Из таблицы видно обнаруженное ранее [1] торможение без воздуха скорости фитолизации хлорофиллида. Следовательно, коротковолновые формы пигмента 630—635 и 675—680 нм являются в основном соответственно протохлорофиллидом и хлорофиллидом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Относительная высота максимумов протохлорофилловых пигментов 628—635 и 655 нм в низкотемпературных спектрах флуоресценции этиолированных листьев зависит от возраста и вида растения. Максимумы флуоресценции в области 630 нм составляют заметную величину в начале прорастания семян и у «старых» этиолированных проростков [8, 9]. У большинства растений основная часть пигмента флуоресцирует при 655 нм, а максимумы коротковолновых форм весьма низки. Однако у некоторых растений в этиолированных листьях максимумы флуоресценции сравнимы по величине [6], у этиолированных листьев липы присутствует в основном коротковолновая форма [10].

Уменьшение флуоресценции при 655 нм с одновременным возрастанием максимумов коротковолновых форм протохлорофилловых пигментов наблюдается в условиях, способствующих дезагрегации пигментного комплекса — нагревании этиолированных листьев [4], действии на них паров органических растворителей [11], замораживании — оттаивании и нарушении целостности структуры этиолированного листа [12, 13]. В данной работе сходные перестройки в низкотемпературных спектрах флуоресценции, приводящие к возрастанию флуоресценции коротковолновой формы протохлорофилловых пигментов, наблюдались при удалении из этиолированных листьев воздуха (кислорода). Эти изменения не являются следствием повреждающего действия эвакуации, так как пуск воздуха тормозил наблюдаемые спектральные изменения.

По мере нахождения этиолированных листьев в вакууме при их последующем освещении без воздуха наблюдается накопление коротковолновой формы пигмента с максимумом флуоресценции 675—680 нм.

Таким образом, без воздуха (кислорода) агрегированные формы протохлорофиллида в этиолированных листьях разрушаются, а агрегированные формы хлорофиллида у освещенных в вакууме листьев не образуются. При этом увеличение флуоресценции коротковолновых форм от-

ражает не химические изменения пигментов, так как оно не связано с фитолизацией протохлорофиллида и хлорофиллида, а лишь структурные перестройки пигментного комплекса, к которым ведет удаление воздуха (кислорода).

Полученные результаты позволяют предполагать важную регулирующую роль кислорода в формировании нормальной структуры пигментного комплекса этиолированных и зеленеющих листьев. Его удаление ведет к перераспределению относительной высоты максимумов флуоресценции, сопровождающемуся дезагрегацией длинноволновых форм, уменьшает скорость фототрансформации протохлорофилловых пигментов, изменяет последовательность смены пигментных форм в низкотемпературных спектрах флуоресценции при освещении этиолированных листьев. Для выяснения природы нарушений структуры пигментного комплекса, обусловленных удалением воздуха (кислорода), и механизма наблюдаемых спектральных изменений необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Влияние кислорода на промежуточные стадии образования хлорофилла в этиолированных листьях.— Докл. АН СССР, 1977, т. 232, № 1, с. 225.
2. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Хлорофиллид в хлоропластах и гомогенатах листьев.— Физиол. растений, 1966, т. 13, вып. 6, с. 929.
3. *Раскин В. И., Акулович Н. К., Годнев Т. Н., Орловская К. И.* Спектр действия превращения протохлорофиллид-голохрома 634 в хлорофиллид-голохром 673.— В кн.: Метаболизм и строение фотосинтетического аппарата. Минск: Наука и техника, 1970, с. 23.
4. *Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Исследование промежуточных стадий образования хлорофилла в хлоропластах по спектрам флуоресценции.— Докл. АН СССР, 1957, т. 117, № 1, с. 106.
5. *Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Образование хлорофилла и формирование хлоропластов в зеленеющих листьях нормальных и мутантных растений кукурузы.— Молек. биол., 1971, т. 5, вып. 3, с. 366.
6. *Ланг Ф., Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Исследование зеленения этиолированных мутантов кукурузы.— Биохимия, 1969, т. 34, вып. 2, с. 257.
7. *Литвин Ф. Ф., Ефимцев Е. И., Игнатов Н. В.* Кинетика фотохимических реакций биосинтеза хлорофилла и миграция энергии между пигментами в этиолированных листьях.— Физиол. растений, 1976, т. 23, вып. 4, с. 653.
8. *Акулович Н. К., Орловская К. И.* Спектральная характеристика протохлорофилл(ид)-голохрома в процессе его образования и превращения в хлорофилл у разных типов этиолированных растений.— В кн.: Метаболизм и строение фотосинтетического аппарата. Минск: Наука и техника, 1970, с. 37.
9. *Shibata K.* Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves.— J. Biochem., 1957, v. 44, № 3, p. 147.
10. *Годнев Т. Н., Раскин В. И., Акулович Н. К., Орловская К. И.* Превращение протохлорофилл-голохрома в монохроматическом свете при начальном преобладании формы 634.— Докл. АН СССР, 1968, т. 182, № 4, с. 709.
11. *Воробьева Л. М., Щербакова И. Ю., Красновский А. А.* Действие паров органических растворителей на протохлорофилловый комплекс этиолированных листьев.— Биохимия, 1979, т. 44, вып. 5, с. 880.
12. *Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Фитольные и бесфитольные формы пигментов в листьях и гомогенатах.— Биохимия, 1963, т. 28, вып. 3, с. 524.
13. *Butler W. L., Briggs W. R.* The relation between structure and pigments during the first stages of proplastid greening.— Biochim. et biophys. acta, 1966, t. 112, № 1, p. 45.

Поступила в редакцию
30.IV.1980

EFFECT OF ANAEROBIOSIS ON THE SPECTRAL PROPERTIES AND LIGHT-INDUCED TRANSFORMATIONS OF PIGMENTS IN ETIOLATED LEAVES

L. M. VOROBIEVA, I. G. NAZAROVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

When etiolated leaves were exposed to air-free conditions in darkness, a gradual redistribution of the relative heights of fluorescence emission maxima of protochlorophyll pigments was observed: the 655 nm maximum decreased while the 635 nm maximum increased. The phenomenon was accompanied by a decrease in the amount of the photoactive pigment and by a decline in the rate of its light-induced transformation, leading to a gradual rise in the fluorescence maximum at about 630 nm upon leaf exposure to light. A leaf exposure to anaerobiosis, as compared with that in the air, brought about a rise in the short wavelength fluorescence maximum at 675—680 nm in response to subsequent illumination. The shift of the short wavelength fluorescence maximum of the pigments in etiolated and greening leaves was not related to the phytolization of either protochlorophyllide or chlorophyllide. Therefore, in the absence of air (oxygen) the 655 nm protochlorophyllide species is being destroyed, but the 690—695 nm chlorophyllide one is not formed. The results obtained allow us to suggest an important regulatory role of oxygen in the formation of natural structure of the pigment complex in etiolated and greening leaves.

ОБРАТИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ПОГЛОЩЕНИЯ ФИКОБИЛИСОМ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Л. Г. ЕРОХИНА, Л. М. ШУБИН, В. В. КЛИМОВ, О. Д. БЕКАСОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Институт фотосинтеза АН СССР, Пущино (Московская область); Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Для изучения участия пигментов в процессах фотосинтеза исследуют фотоиндуцированные изменения поглощения (ΔA) и флуоресценции ($\Delta Ф$). В настоящей работе мы исследовали ΔA и $\Delta Ф$ фикобилисом (ФБС) и индивидуальных пигментов, входящих в их состав, на установке, описанной в работе [1]. Использовали ФБС, выделенные из красной водоросли Porphyridium cruentum и сине-зеленой водоросли Anacystis nidulans [2]. Фикоэритрин (ФЭ), фикоцианин (ФЦ), аллофикоцианин (АФЦ) и фракции, обогащенные аллофикоцианином *B* (АФЦ В), были выделены по методам, описанным ранее [3—6]. Оптическая плотность ФБС и индивидуальных пигментов — ФЭ, ФЦ и АФЦ, в максимумах поглощения не превышала 1,0 (10^{-5} М); концентрация АФЦ В во фракциях, обогащенных этим пигментом, составляла 10^{-7}—10^{-6} М.

Обратимое фотоиндуцированное уменьшение флуоресценции ФБС и фракций, обогащенных АФЦ В, наблюдалось при добавлении восстановителя (дитионита) и окислителей (феррицианида и *n*-бензохинона). В этих же условиях АФЦ, ФЦ и ФЭ по сравнению с ФБС и фракциями, обогащенными АФЦ В, обнаруживали незначительные $\Delta Ф$, составляющие 1—2%. При этом как у ФБС, так и у индивидуальных пигментов наблюдались обратимые изменения поглощения, сходные по кинетике. Кинетика $\Delta Ф$ и ΔA для ФБС и фракций, обогащенных АФЦ В, в присутствии окислителей и восстановителя была одинаковой (рис. 1).

В спектре ΔA ФБС из Anacystis nidulans наблюдались: отрицательный максимум при 671 нм с плечом при 620 нм и положительные в области 530 и 415—420 нм (рис. 1). В спектре ΔA ФБС из Porphyridium cruentum наряду с отрицательным максимумом при 671 нм было обнаружено обратимое уменьшение оптической плотности в максимуме поглощения ФЭ при 565 нм и появление максимума в области 495—500 нм (рис. 2, *а*, кривая *2*). Спектр ΔA ФБС в длинноволновой области (660—700 нм) совпадал со спектром ΔA фракций, обогащенных АФЦ В, в котором также обнаруживались отрицательные ΔA с максимумом при 671 нм (рис. 2, *б*, кривая *3*), соответствующие максимуму поглощения АФЦ В [7]. В отличие от фракций, обогащенных АФЦ В, у которых величина ΔA при 671 нм соответствовала почти полному фотопревращению АФЦ В, в спектре ΔA ФЦ наблюдалось незначительное (до 1% от исходной оптической плотности) уменьшение поглощения при 620 нм с появлением положительных максимумов при 420 и 670 нм (рис. 2, *б*, кривая *4*).

Подобные изменения поглощения АФЦ и ФЦ в окислительных условиях наблюдались и ранее [8]. В спектре ΔA ФЭ обнаруживались положительные максимумы при 495 и 671 нм и отрицательный в области 565 нм (рис. 2, *б*, кривая *5*).

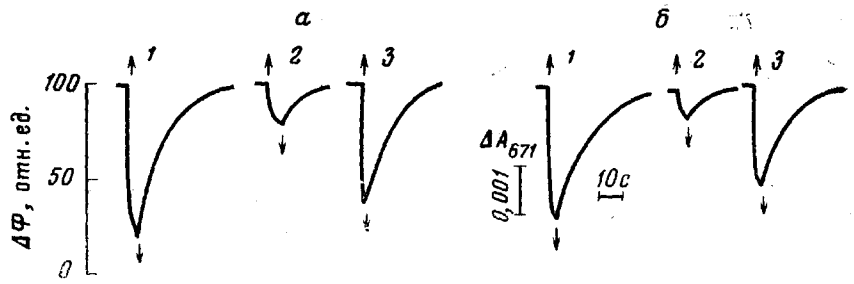


Рис. 1. Кинетика фотоиндуцированных изменений интенсивности флуоресценции ΔΦ ($\lambda > 660$ нм) (*а*) и поглощения ΔA при 671 нм (*б*) ФБС из A. nidulans в присутствии 10^{-2} М дитионита (*1*), 10^{-3} М феррицианида (*2*) и фракций, обогащенных АФЦ В, в присутствии 10^{-2} М дитионита (*3*); флуоресценцию возбуждали светом 590 нм 0,2 Вт/м^2; —↑, ↓ включение и выключение действующего света ($\lambda > 500$ нм, 10^3 Вт/м^2)

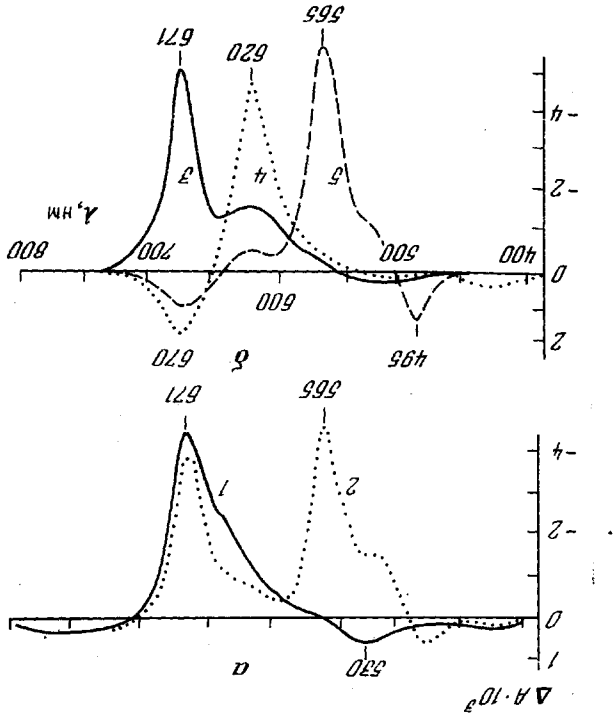


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения «свет — темнота» ФБС (*а*) и фикобилипротеидов (*б*) в присутствии 10^{-2} М дитионита; *а* — ФБС из A. nidulans (*1*), из P. cruentum (*2*); *б* — фракции, обогащенные АФЦ В (*3*), ФЦ (*4*), ФЭ (*5*)

Таким образом, изменение флуоресценции ФБС и соответствующее ему изменение поглощения при 671 нм можно, по-видимому, связать с обратимым фотопревращением АФЦ В, изменения поглощения в области 620 и 565 нм обусловлены превращениями ФЦ и ФЭ соответственно. Сопоставление величины фотоиндуцированных ΔA в максимумах поглощения растворов ФЭ, ФЦ и фракций, обогащенных АФЦ В, в присутствии дитионита с их количественным содержанием в этих образцах указывает на то, что способность АФЦ В к обратимому фотопревращению гораздо выше, чем у других фикобилипротеидов. Обнаруженные обратимые эффекты существенны для выяснения механизма участия ФБС в процессах фотосинтеза красных и сине-зеленых водорослей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Карапетян Н. В., Климов В. В.*, Физиол. раст., *18*, 223, 1971.
2. *Ерохина Л. Г., Шубин Л. М., Красновский А. А.*, Физиол. раст., *4*, 756, 1980.

3. *Ерохина Л. Г., Красновский А. А.*, Мол. биол., *2*, 550, 1968.
4. *Ерохина Л. Г., Красновский А. А.*, Мол. биол., *5*, 399, 1971.
5. *Ерохина Л. Г., Красновский А. А.*, Мол. биол., *8*, 651, 1974.
6. *Ерохина Л. Г., Шубин Л. М., Красновский А. А.*, Физиол. раст., *3*, 483, 1980.
7. *Ley A. C., Butler W. L.*, Plant Physiol., *59*, 974, 1977.
8. *Бекасова О. Д., Евстигнеев В. Б.*, Изв. АН СССР. Сер. биол., *1*, 149, 1976.

Поступила в редакцию 18.VII.1980

REVERSIBLE LIGHT-INDUCED ABSORPTION AND FLUORESCENCE CHANGES IN PHYCOBILISOMES

L. G. ERokhina, L. M. SHUBIN, V. V. KLIMOV, O. D. BEKASOVA, A. A. KRASNOVSKY

Institute of Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region); A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

The reversible light-induced absorption and fluorescence changes in the phycobilisomes were observed in the presence of sodium dithionite, ferricyanide and *p*-benzoquinone. This phenomenon is probably due to the reversible transformation of allophycocyanin B.

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

В.В. НИКАНДРОВ, Г.П. БРИН, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА НА ДВУОКИСИ ТИТАНА. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ДОНОРОВ ЭЛЕКТРОНА И ГИДРОГЕНАЗЫ

Фотокаталитические свойства неорганических полупроводников (TiO_2 и ZnO) делают их удобными объектами для моделирования процессов переноса электрона, идущих в хлоропластах. В нашей лаборатории было обнаружено фотообразование кислорода ([1]) и фотовосстановление метилвиологена ([2]) на таких фотокатализаторах. Мы наблюдали также фотообразование H_2 в водных суспензиях TiO_2 и

Таблица 1

Квантовые выходы фотообразования водорода и фотовосстановления метилвиологена на TiO_2 (молекулы/квант · 100)

Доноры электрона, 0,1 *M*	Образование водорода	Восстановление метилвиологена	
		до катионрадикала	до дигидродипиридила
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,50	10,1	0,29
Триэтаноламин	0,05	5,4	0,05
Этаноламин	0,10	2,3	0,04
Метиламин	0	0,8	0
Глицерин	0,08	3,8	0,03
Глюкоза	0,06	1,2	0,01
Этанол, 10%	0,03	–	–
ЭДТА · NH_4	0,03	0,5	0,01
Глицин	0,01	1,5	0,03
Цистеин	0	0,8	0
Дитиотреитол	0	1,9	0
Без доноров электрона	0	0,3	0

Таблица 2

Влияние гидрогеназы на фотообразование водорода на TiO_2 (мкл H_2/мин · 100)

Доноры электрона, 0,1 *M*	Добавки			
	Без добавок	Метилвиологен, $5 \cdot 10^{-4}$ *M*	Гидрогеназа, 0,1 мл	Метилвиологен, $5 \cdot 10^{-4}$ *M*, гидрогеназа, 0,1 мл
Без доноров	0	0	0,7	23
Глюкоза	6	0,6	4	128
Глицерин	8	1,0	–	73
Цистеин	0	–	12	132
Дитиотреитол	0	–	24	113

Примечание. Активность гидрогеназы – 20 мкл H_2/мл · мин.

ZnO в присутствии бактериальной гидрогеназы ([3]). Другими авторами описано фотообразование H_2 в суспензии платинированной TiO_2 в H_2SO_4 в присутствии метанола ([4]), а также без добавления экзогенных доноров электрона ([5]). Образование следов H_2 при освещении TiO_2 с адсорбированными парами воды наблюдали и в отсутствие катализаторов (гидрогеназы или платины) ([6], [7]). Выход H_2 в этом случае увеличивался при введении в TiO_2 железа ([7]), а также при добавлении RuO_2 и активированного угля ([8]). Недавно было описано фотообразование H_2 на кристаллах $SrTiO_3$ в сильнощелочных водных растворах ([9]).

Целью настоящей работы было исследование способности TiO_2 к фотосенсибилизации образования водорода в присутствии органических доноров электрона. В опытах применялись дисперсные порошки TiO_2 (анатаз). Измерение H_2 осуществляли на газохроматографической установке, описанной ранее ([10]). Суспензию 10 мг TiO_2 в 1 мл дистиллированной воды помещали в стеклянную ячейку, продували органом, после чего при перемешивании освещали линиями ртути 334 нм и 365 нм

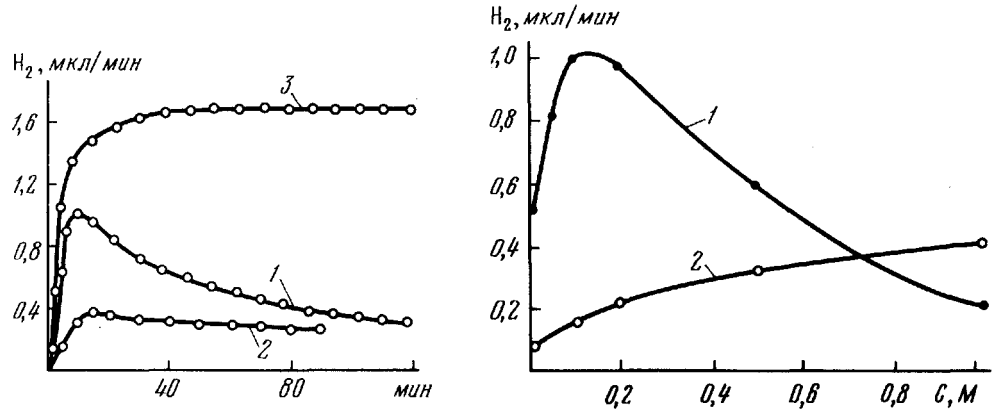


Рис. 1. Зависимость скорости фотообразования водорода на TiO_2 в присутствии: 0,1 *М* трис-(оксиметил)-аминометана (*1*), 1,0 *М* глицерина (*2*), 0,1 *М* цистеина, $5 \cdot 10^{-4}$ *М* метилвиологена и 0,1 мл гидрогеназы, активности 50 мкл H_2/мл · мин (*3*)

Рис. 2. Зависимость скорости фотообразования водорода на TiO_2 от концентрации трис-(оксиметил)-аминометана (*1*) и глицерина (*2*)

(интенсивность $5 \cdot 10^4$ эрг/см^2 · с) лампы ДРШ-250. В процессе освещения через определенные промежутки времени газовую фазу из ячейки подавали на колонку хроматографа. Фотовосстановление метилвиологена проводили в стеклянной вакуумной трубке Тунберга специальной формы (длина оптического пути 0,4 см). В трубку вводили суспензию 4 мг TiO_2 в 5 мл дистиллированной воды, откачивали на форвакуумном насосе и освещали линиями ртути 365 нм ($2 \cdot 10^4$ эрг/см^2 · с). В процессе освещения измеряли оптическую плотность при 605 нм, помещая вакуумную трубку в сферу Ульбрихта спектрофотометра СФ-10. Интенсивность света определяли с помощью ферриоксалатного актинометра. В отдельных опытах использовали гидрогеназу, выделенную из фототрофных пурпурных бактерий.

Фотообразование водорода в системе TiO_2 – донор электрона. В качестве доноров электрона мы использовали органические соединения, которые не вызывали коагуляции водной суспензии TiO_2. Максимальные квантовые выходы фотообразования H_2 в суспензиях TiO_2 в присутствии некоторых доноров электрона представлены в табл. 1. Наиболее эффективными донорами электрона оказались трис-(оксиметил)-аминометан (трис), этаноламин, триэтаноламин, глюкоза и глицерин. Использование метиламина, диэтиламина, тиазинамина, мочевины и тиомочевины не приводило к фотообразованию H_2. Также не активны были цистеин и дитиотреитол, которые являются эффективными донорами электрона при фотообразовании H_2, сенсибилизированного хлорофиллом или хлоропластами в присутствии гидрогеназы ([11]). В контрольном опыте, при освещении органических соединений в отсутствие TiO_2, образования H_2 не наблюдали.

На рис. 1 представлены зависимости скорости фотообразования H_2 с трис и глицерином от $t_{осв}$. Рост скорости образования водорода в начале освещения, по-видимому, связан с восстановлением остатков растворенного и адсорбированного на TiO_2 кислорода. Уменьшение скорости выделения H_2 при длительном освещении наблюдалось со всеми использованными донорами электрона. В большей степени это было выражено в случае применения трис. При длительном освещении TiO_2 в присутствии доноров электрона, эффективных в образовании H_2, наблюдалось потемнение суспензии. Если же после этого ячейку продували воздухом, то исходный цвет суспензии восстанавливался. При дальнейшем продувании суспензии аргоном и освещении скорость выделения H_2 становилась близкой к исходной.

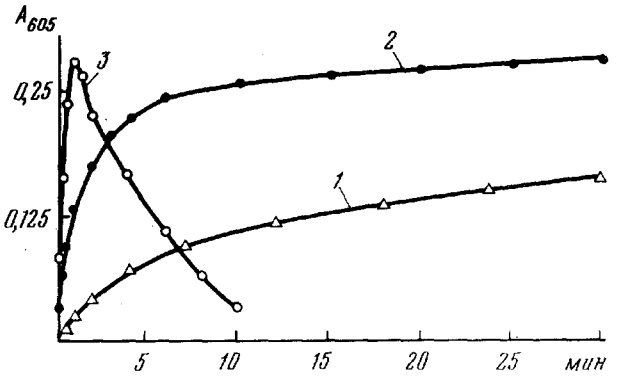


Рис. 3. Кинетические кривые фотовосстановления $6 \cdot 10^{-5}$ *М* метилвиологена на TiO_2 в отсутствие доноров электрона (*1*); в присутствии: 0,1 *М* цистеина (*2*), 0,1 *М* трис-(оксиметил)-аминометана (*3*)

Ранее было показано, что потемнение поверхности TiO_2, возникающее при освещении у.ф. светом в вакууме и исчезающее при пуске кислорода, определяется восстановлением Ti^{4+} до Ti^{3+} ([12]). Можно предположить, что падение скорости выделения водорода в зависимости от времени освещения также связано с восстановлением поверхности полупроводника. По этой же причине, по-видимому, уменьшается скорость образования H_2 при увеличении концентрации трис в суспензии более 0,1 *М* (рис. 2, *1*). В случае использования глицерина, который является менее эффективным донором электронов, этого явления не наблюдается (рис. 2, *1*).

При добавлении к суспензии феррицианида или метилвиологена (табл. 2) фотообразование H_2 подавляется и наблюдается восстановление акцепторов электрона. По-видимому, феррицианид и метилвиологен способны конкурировать с протонами за электроны TiO_2.

С целью выяснения причин, определяющих эффективность образования H_2, мы исследовали фотосенсибилизированное TiO_2 восстановление метилвиологена, обладающего E_0', близким к равновесному потенциалу водородного электрона. Все используемые доноры электрона активировали восстановление метилвиологена до катион-радикала ($MB^{+\cdot}$), что проявлялось в увеличении скорости и глубины реакции, в согласии с нашими предыдущими опытами ([2]). Весьма существенно то, что в присутствии доноров электрона, эффективных для фотообразования H_2, происходило дальнейшее восстановление метилвиологена до дигидроформы дипиридила – MB^0 (пример. трис, рис. 3, *3*). На образование дигидродипиридила указывало исчезновение синей окраски катион-радикала метилвиологена при длительном освещении в соответствии с реакцией $MB^{+\cdot} + e \rightarrow MB^0$. Кроме того, образование дигидродипиридила было подтверждено образованием синего катион-радикала $MB^{+\cdot}$ при добавлении в анаэробных условиях окисленного метилвиологена к обесцвеченной длительным освещением суспензии согласно реакции: $MB^0 + MB^{++} \rightarrow 2MB^{+\cdot}$ ([13]). Известно, что E_0' восстановления метилвиологена до дигидродипиридила составляет –0,8 В ([13]). Известно также, что при потенциалах –0,8 – –1,0 В на TiO_2 становится возможным восстановление поверхностного слоя решетки кристалла и разряд ионов H_3O^+ с образованием H_2 ([14]). Таким образом, в присутствии органических соединений, таких как трис, глицерин, глюкоза, в суспензии TiO_2 генерируется восстановительный потенциал до –0,8 В, что, по-видимому, и определяет их способность быть донорами электрона в реакции фотообразования H_2.

Фотообразование H_2 в системе донор электрона – TiO_2 – гидрогеназа. При добавлении к суспензии TiO_2 гидрогеназы в отсутствие экзогенных доноров электрона мы, как и ранее ([3]), наблюдали активируемое метилвиологеном фотообразование H_2 (табл. 2). При введении глюкозы или глицерина образование H_2 шло эффективней, чем в опытах с одними донорами электрона или с гидрогеназой и метилвиологеном. Существенно то, что в случае применения дитиотреитола и цистеина, с которыми образование H_2 в суспензии TiO_2 не

идет, наблюдается активация выделения H_2 в присутствии гидрогеназы и метилвиологена. Скорость фотообразования H_2 в присутствии цистеина, гидрогеназы и метилвиологена не уменьшалась в течение двух часов освещения (рис. 1, *3*), в отличие от опытов, проводимых без фермента. Квантовый выход образования H_2 в этом случае оказался равным квантовому выходу фотовосстановления метилвиологена до катион-радикала в суспензии TiO_2 с цистеином (табл. 1). В отсутствие же фермента величины квантовых выходов образования H_2 близки величинам квантовых выходов фотовосстановления метилвиологена до дигидроформы (табл. 1). Такие отличия реакций, идущих в присутствии гидрогеназы и без нее, можно объяснить тем, что в присутствии фермента для образования H_2 достаточно генерации потенциала восстановления метилвиологена до катион-радикала, т.е. потенциала, близкого к потенциалу водородного электрода.

Элементарный механизм описанных реакций можно представить следующим образом. При возбуждении светом полупроводника происходит разделение зарядов. Электронные вакансии (дырки) окисляют присутствующие органические доноры электронов или же молекулы воды, продукты окисления которой могут реагировать с органическими соединениями. Электроны используются для восстановления H^+ и ионов Ti^{4+} до Ti^{3+}, которые, по-видимому, также могут включаться в восстановление H^+ с образованием водорода на локальных поверхностных каталитических центрах. Для поддержания поверхности фотокатализатора в восстановленном состоянии и образования H_2 требуется генерация потенциала до –0,8В, что обеспечивается присутствием таких соединений, как трис, глицерин, глюкоза и др. При использовании таких доноров электрона, как цистеин и дитиотреитол, в системе генерируется потенциал, близкий потенциалу водородного электрода. Для образования водорода в таком случае требуется присутствие катализатора—гидрогеназы.

Следует отметить, что система цистеин – TiO_2 – метилвиологен – гидрогеназа хорошо моделирует описанную в опытах Арнона ([15]) систему выделения H_2 хлоропластами в присутствии донора электрона и бактериальной гидрогеназы.

Приносим глубокую благодарность И.Н. Гоготову за предоставление препаратов гидрогеназы.

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

Поступило
30 IX 1980

ЛИТЕРАТУРА

[1] *А.А. Красновский, Г.П. Брин,* ДАН, т. 139, 142 (1961). [2] *А.А. Красновский, Г.П. Брин,* ДАН, т. 213, 1431 (1973). [3] *А.А. Красновский, Г.П. Брин, В.В. Никандров,* ДАН, т. 229, 990 (1976). [4] *В.А. Бендерский, Я.М. Золотовицкий и др.,* ДАН, т. 222, 606 (1975). [5] *А.В. Булатов, М.Л. Хидекель,* Изв. АН СССР, сер. хим., № 8, 1062 (1976). [6] *Л.Л. Басов, Ю.П. Ефимов, Ю.П. Солоницын,* В кн.: Успехи фотоники, в. 4, Л., 1974, стр. 12. [7] *G.N. Schrauzer, T.D. Guth,* J. Am. Chem. Soc., v. 99, № 2, 7189 (1977). [8] *T. Kawai, T. Sakata,* Nature, v. 282, 283 (1979). [9] *F.T. Wagner, G.A. Somotjai,* Nature, v. 282, 559 (1980). [10] *В.П. Ощепков, А.А. Красновский,* Прикл. биохим. и микробиол., т. 10, 760 (1974). [11] *А.А. Красновский, Чан Ван Ни и др.,* Молек. биол., т. 14, 287 (1980). [12] *А. Курбон, М. Форменти и др.,* Кинетика и катализ, т. 14, 110 (1973). [13] *R.M. Elofson, R.L. Edsberg,* Canad. J. Chem. v. 35, 646 (1957). [14] *Е.Н. Палеолог, А.З. Федотова,* Электрохимия, т. 5, 1336 (1969). [15] *D.I. Arnon, A. Mitsui, A. Paneque,* Science v. 134, 1425 (1961).

БИОФИЗИКА

Том XXVI, вып. 3 1981

ФОТОХИМИЧЕСКИЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИНТЕЗА

ШУВАЛОВ В. А., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Введение

Свет, поглощаемый хлорофиллом, преобразуется в растении в потенциальную химическую энергию продуктов фотосинтеза. Изучение первичных превращений хлорофилла под действием света необходимо для понимания механизма преобразования энергии квантов солнечного света при фотосинтезе. В нашей лаборатории много лет изучается способность возбужденного хлорофилла, его аналогов и производных к обратимым окислительно-восстановительным реакциям и переносу электрона (водорода) от молекулы-донора к молекуле-акцептору. Предполагалось, что эти свойства хлорофилла определяют его участие в фотосинтетическом переносе электрона.

Исследования ряда лабораторий показали, что главная масса хорофилла в растениях представляет собой «антенну», улавливающую излучение Солнца. Энергия возбуждения мигрирует от пигментов «антенны» к малому количеству хлорофилла реакционных центров, которые непосредственно участвуют в первичном переносе электрона.

Развитие за последние годы техники препаративного получения реакционных центров (РЦ) и использование методов пикосекундной лазерной спектроскопии позволили выяснить природу первичных стадий фотопереноса электрона. В основе этих процессов, идущих в РЦ, лежит способность хлорофилла и его аналогов к обратимому окислению-восстановлению, т. е. восприятию или отдаче электрона, изученному ранее в нашей лаборатории в опытах с изолированными пигментами.

Задачей настоящего обзора является преимущественное изложение работ наших лабораторий в связи с современными представлениями о механизме переноса электрона в РЦ. Так как предыдущие работы лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР по фотохимии хлорофилла были предметом сотен опубликованных работ, то мы считаем целесообразным ограничиться здесь лишь кратким изложением результатов этих работ со ссылкой на некоторые обзорные статьи [1—5].

Как известно, поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в возбужденное синглетное состояние, которое может самопроизвольно перейти в триплетное состояние. В растворах хлорофилла квантовый выход образования триплетных состояний достигает 70% и фотохимическим превращениям подвергаются преимущественно триплетные возбужденные состояния. В отличие от этого в димерах и других агрегированных формах (в том числе и в РЦ) квантовый выход образования триплетных состояний невелик, и фотохимическим превращениям подвергаются в этом случае синглетные возбужденные состояния. В растворах хлорофилла и его аналогов удалось наблюдать следующие главные типы фотохимических реакций:

1) взаимодействие возбужденного пигмента (Хл*) с донором электрона (Д), ведущее к обратимому фотовосстановлению:

$$Хл^* + Д \rightleftarrows \cdot Хл^- + \cdot Д^+;$$

2) взаимодействие Хл* с акцептором электрона (А), ведущее к обратимому фотоокислению:

$$Хл^* + А \rightleftarrows \cdot Хл^+ + \cdot А^-.$$

В результате отдачи или восприятия электрона возбужденным хлорофиллом образуется пара ион-радикалов [6]. Первично воспринимаемый электрон или образуемая электронная вакансия («дырка») делокализованы в системе двойных сопряженных связей молекулы пигмента (рис. 1). В более долгоживущих фотопродуктах воспринимается протон, и водородный атом локализуется в определенном месте структуры пигмента.

В тройной системе, содержащей хлорофилл, донор и акцептор электрона, наблюдается фотосенсибилизированный хлорофиллом пернос электрона от молекулы донора к акцептору

$$Д \rightarrow \overset{h\nu}{\underset{\downarrow}{Хл}} \rightarrow А,$$

в основе которого лежит способность хлорофилла к обратимому фотоокислению и фотовосстановлению [1—5].

Совокупность имеющихся данных по первичным процессам фотосинтеза свидетельствует о том, что в зеленых растениях осуществляются две фотореакции, в которых происходит первичное фотоокисление пигментов хлорофилловой природы — P700 в первой фотосистеме (ФС-1) и P680 во второй фотосистеме (ФС-2) [7, 8]. Фотоокисленный пигмент P680, имеющий по оценкам окислительно-восстановительный потенциал $E_0 = 1{,}0 \div 1{,}3$ В [9, 10], принимает участие в разложении воды. Электрон от P680 передается в результате фотореакции на пластохинон и далее, через цепь переносчиков электрона, таких, как цитохром и пластоцианин, на фотоокисленный P700, у которого

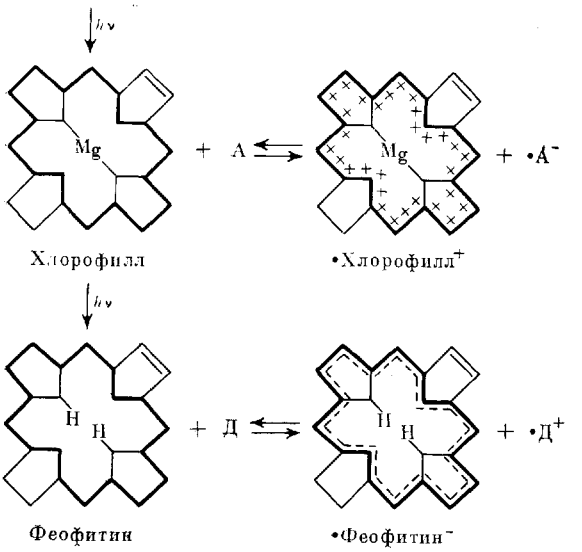


Рис. 1. Схема обратимого фотоокисления хлорофилла и фотовосстановления феофитина

$E_0 \approx 0{,}5$ В [11, 12]. Фотоокисление последнего сопровождается восстановлением железосерных белков A и B [13] или P430 [12, 14], имеющих $E_0 \approx -550$ мВ [12] и способных восстанавливать ферредоксин. В результате совместного действия двух фотосистем происходит разложение воды с выделением кислорода и восстановление НАДФ, а также образование градиента концентраций протона на двух сторонах мембраны хлоропласта, приводящего к последующему синтезу АТФ. Образованные НАДФН и АТФ принимают участие в ассимиляции CO_2 и синтезе сахаров.

При бактериальном фотосинтезе свет вызывает фотоокисление димера бактериохлорофилла *a* (Бхл a) P870 (или P960 в организмах, содержащих Бхл в) с переносом электрона на комплекс железо — хинон (убихинон [15] или меанахинон [16]) с генерацией потенциалов +0,5 и —0,15 В соответственно [17]. Разность потенциалов, генерированная в первичных процессах фотосинтеза, используется как в нециклическом переносе электрона, так и в циклическом фотофосфорилировании.

При естественных интенсивностях солнечного света вероятность возбуждения одной молекулы хлорофилла составляет менее одного раза в секунду. В то же время скорость прохождения электрона по электронтранспортной цепи (ЭТЦ) хлоропласта составляет $\sim 10^{-2}$ с. Таким образом, для обеспечения полной загрузки ЭТЦ необходим светосбор со 100—1000 молекул хлорофилла на одну фотохимически активную молекулу хлорофилла. Этот механизм реализуется в фотосинтетических мембранах, в которых содержатся как фотохимически активные комплексы хлорофилла (реакционные центры), так и светособирающие комплексы [18—20].

Цель настоящего обзора — сосредоточить внимание на тех процессах переноса электрона, которые происходят непосредственно после поглощения кванта света в реакционных центрах фотосинтеза. Значительная часть работ, сделанных на хлоропластах и для частиц, содержащих фотосистемы, а также на бактериальных РЦ, уже отражена в обзорах [17, 21—23]. Последовательность переноса электрона в двух фотореакциях зеленых растений и в реакционных центрах бактерий имеет некоторые общие черты и может быть схематически представлена следующим образом:

$$P \xrightarrow{e} I \xrightarrow{e} A_1 \left(\xrightarrow{e} A_2\right).$$

где P — это P700, P680 или P870, I — промежуточный акцептор электрона хлорофилловой природы, A_1 и A_2 — последующие акцепторы электрона нехлорофилловой природы (A_1 функционирует при криогенных температурах вплоть до 1—2 К).

Выделение. Реакционные центры (РЦ) в достаточно очищенном виде удалось пока выделить только из фотосинтезирующих бактерий. Наиболее изученные РЦ получены из безкаротиноидного мутанта Rhodopseudomonas spheroides R-26. Впервые изоляция РЦ была описана в работе Рида и Клейтона [24] с применением детергента тритона Х-100 как солюбилизирующего агента. Впоследствии было найдено, что предпочтительным для выделения РЦ является детергент лаурилдиметиламиноксид (ЛДАО) [16, 25—27]. Обычно после солюбилизации хроматофоров бактерий с помощью ЛДАО и осаждения фрагментов мембран относительно большого размера РЦ выделяют с помощью дробного осаждения сульфатом аммония [25, 26]. Фракция РЦ может быть далее очищена путем хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе [26, 27] или на гидроксилапатите [28]. Достаточно хорошая степень очистки достигается также при центрифугировании солюбилизированных хроматофоров в растворе сахарозы с градиентом плотности [18]. В качестве индекса чистоты РЦ используется соотношение величин поглощения белков при 280 нм и поглощения Бхл при 800 нм. Это отношение в чистых образцах достигает 1,2—1,3 [26].

Состав. Очищенные РЦ Rhodopseudomonas spheroides R-26 содержат только три белковые субъединицы с молекулярной массой 21 (*L* — легкая), 24 (*M* — средняя) и 28 (*H* — тяжелая) килодальтон [25, 26]. В субъединицах *L* и *M* находятся четыре молекулы Бхл и две молекулы бактериофеофитина (Бф) [29]. В РЦ содержатся также две молекулы убихинона-10 и один атом железа [15, 25]. Общая молекулярная масса РЦ достигает ~80 килодальтон.

Аминокислотный состав белков РЦ показывает большое количество неполярных аминокислот (~70%) [28], что является причиной нерастворимости РЦ в водных растворах без детергентов и связано, вероятно, с локализацией РЦ внутри мембран хроматофоров. Спектр поглощения бактериальных пигментов и фотохимическая активность РЦ сохраняется при отщеплении H-субъединицы [30]. Удаление атома железа также существенно не влияет на первичные фотопроцессы в РЦ [31].

Спектральные свойства. Поглощение света хлорофиллом сопровождается осцилляцией заряда вдоль длинной или короткой осей сопряженной системы связей молекулы. В мономере Бхл (или Бф) осцилляция вдоль длинной оси связана с поглощением света при 770 нм (или 750 нм) (*Qy*-переход), а вдоль короткой оси — с поглощением света при 600 (или 530) нм (*Qx*-переход) [17]. При агрегации хлорофилла наблюдаются сдвиги полос поглощения, связанные с пигмент-пигментным взаимодействием [5]. В РЦ четыре молекулы Бхл а поглощают при 870 и 800 нм (или 960 и 830 нм у организмов, содержащих Бхл в) (*Qy*-переходы) и при 600 нм (*Qx*-переходы), а две молекулы БФ а—при 760 нм (или 790 нм в организмах, содержащих Бф в) (*Qy*-переходы) и 536 и 545 нм (*Qx*-переходы) [17]. При экстракции пигментов из РЦ их спектральные свойства соответствуют мономерным молекулам Бхл и Бф [32].

Фотоокисление первичного донора электрона (Р) приводит к выцветанию полосы поглощения при 870 нм (или 960 нм в организмах, содержащих Бхл в) [17, 33, 34]. Выцветающая полоса по дипольной силе соответствует сумме дипольных сил двух молекул Бхл [34, 42], что указывает на димерную природу Р. Образование $P^{+\cdot}$ сопровождается увеличением поглощения в области 1250—1300 нм [17, 28] и появлением сигнала ЭПР с $g=2{,}0025$ и $\Delta H=9{,}6\cdot10^{-4}$ Тл [35]. Этот сигнал уже, чем сигнал ЭПР катион-радикала Бхл в $\sqrt{2}$ раз, что свидетельствует о делокализации неспаренного электрона в Р между двумя молекулами Бхл [36]. Аналогичный вывод получен при изучении спектров ENDOR окисленного $P^{+\cdot}$ [37]. Таким образом, оптические и данные ЭПР показывают, что Р является димером бактериохлорофилла.

Полоса поглощения Бхл а при 800 нм (или 830 нм для Бхл в) по дипольной силе также соответствует поглощению двух молекул Бхл [34, 42]. Эта полоса расщепляется на две полосы с противоположными знаками в спектре кругового дихроизма (КД) при 795 и 810 нм (или 830 и 850 нм для Бхл в) [32, 34]. Многие авторы [38—40] приписывают полосе при 810 (850) нм принадлежность к запрещенному переходу Р, так как полоса КД при 810 (850) нм значительно уменьшается при окислении Р [32, 41]. В то же время данные фотодихроизма показывают, что полоса поглощения при 810 (850) нм не исчезает, а лишь частично уменьшается при окислении Р [34, 42], а ее полуширина скорее указывает на ее принадлежность к мономеру Бхл.

Если полоса при 810 (850) нм является экситонным переходом в Р, то ее исчезновение можно также ожидать при образовании триплетного состояния ^3P. Однако измерения триплетного состояния в РЦ R. spheroides и R. viridis показали, что выцветания при 810 (850) нм не происходит [43, 44]. Наблюдается лишь очень небольшой коротковолновый сдвиг полосы при 850 нм в РЦ R. viridis. Это указывает на принадлежность полосы при 810 (850) нм к переходу в молекуле Бхл, не входящего в специальную пару Р. Этот вывод важен при исследовании процессов переноса электрона, так как Бхл-810 (850) может принимать в нем участие.

Способность Бф к обратимому фотовосстановлению была открыта и изучена в нашей лаборатории [45, 46]. Оказалось, что Бф способен к обратимому фотовосстановлению и в РЦ, содержащих цитохром *c* [33, 34, 47, 48]. Восстановление Бф приводит лишь к 50%-ному выцветанию полосы при 760 нм, указывая на восстановление только одной молекулы Бф [49]. Это согласуется с сигналом ЭПР $Бф^{-\cdot}$ в РЦ, полуширина ко-

горого соответствует полуширине сигнала ЭПР мономера Бф$^{\cdot-}$ [47, 48]. Далее будут приведены факты, указывающие на функцию Бф как промежуточного акцептора электрона в РЦ.

Конечным акцептором электрона в РЦ является комплекс железа и хинона (убихинона или менахинона [15, 16]), способный к фотовосстановлению при криогенных температурах [37]. Восстановление комплекса Q—Fe сопровождается выцветанием полосы при 290 нм и появлением структурированной полосы в области 300—450 нм, которая соответствует полосе анион-радикала Q$^{\cdot-}$ [50, 51]. Восстановление комплекса сопровождается также появлением сигнала ЭПР железа с $g=1{,}82$ [37]. Однако, как показывают спектры эффекта Мессбауэра [52], железо не меняет валентности при восстановлении

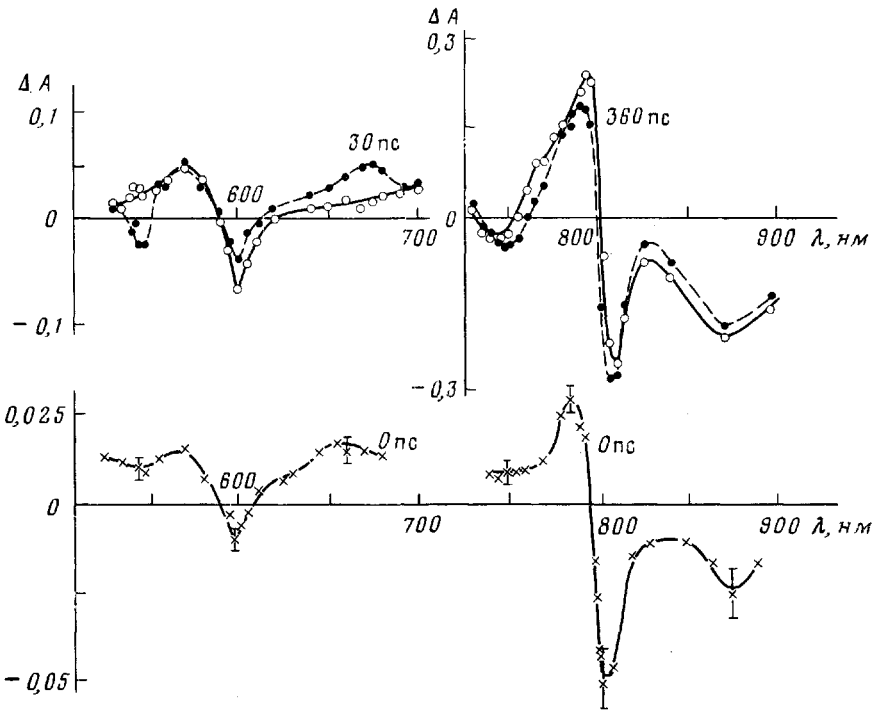


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения (свет — темнота) реакционных центров Rhodospirillum rubrum, измеренные через 360, 30 и 0 пс после возбуждения импульсом света с длиной волны 880 нм и длительностью 25 пс [57]

комплекса, сигнал ЭПР которого соответствует анион-радикалу хинона при удалении железа [31, 53]. Таким образом, в этом комплексе хинон служит акцептором электрона.

Оценки времен переноса электрона в РЦ на основе флуоресцентных данных указали на возможность пикосекундной скорости разделения зарядов в РЦ [54]

Последовательность переноса электрона в РЦ. С помощью пикосекундной спектрофотометрии было найдено, что образование катион-радикала Р870 (или Р960 [40]) происходит в течение первых пикосекунд после поглощения кванта света [55—58]. Из рис. 2 видно, что электрон, вероятно, в первый момент акцептируется бактериохлорофиллом-800, так как наблюдается выцветание полосы поглощения этого пигмента даже при селективном возбуждении Р870, когда переход в возбужденное состояние Бхл Р800 исключен [57]. Далее электрон в течение 5—7 пс передается на Бф [59, 60], выцветание полос которого надежно зарегистрировано через 20—30 пс после импульса света в работах многих авторов [55—57, 60]. Образованный радикальный анион Бф передает электрон на комплекс хинон — железо в течение 200 пс с образованием анион-радикала хинона [56, 57]. В реакционных центрах, в которых отсутствует цитохром, состояние [Р$^{\cdot+}$ хинон$^{\cdot-}$] имеет время жизни ~80 мс. Это время достаточно для того, чтобы разделенные заряды в РЦ могли быть использованы в биохимических реакциях транспорта электрона в фотосинтетических мембранах. В тех центрах, где присутствует цитохром, последний восстанавливает Р$^{\cdot+}$ в течение 2—4 мкс [61, 62].

Если комплекс хинон — железо предварительно восстановлен в темноте или изолирован из РЦ, ион-радикальная пара [Р$^{\cdot+}$Бф$^{\cdot-}$] рекомбинирует в течение 6—10 нс [63] с излучением флуоресценции [47] или с образованием триплетного состояния Р [63]. С рекомбинацией Р$^{\cdot+}$ и Бф$^{\cdot-}$ может конкурировать процесс восстановления Р$^{\cdot+}$ в течение 2 мкс от цитохрома *с*. Квантовый выход этой фотореакции низок (0,002), однако

достаточен для накопления Бф в форме анион-радикала во всех РЦ, присутствующих в образце [47, 64]. Сумма спектров $P^{\cdot+}$ и $Бф^{\cdot-}$, раздельно полученных для РЦ, соответствует спектру ион-радикальной пары $[P^{\cdot+}Бф^{\cdot-}]$, измеренному через 20—30 пс после возбуждающего импульса света. Это является существенным аргументом в пользу того, что квант света вызывает в РЦ в течение 20—30 пс разделение зарядов между Р и Бф.

Участие Бф в промежуточном акцептировании электрона доказывается также следующими фактами. Реакция фотовосстановления Бф наблюдается также при криогенных температурах [47], при которых функционируют РЦ. Реакция образования $Бф^{\cdot-}$ сенсибилизируется светом, поглощаемым длинноволновой полосой поглощения Р [33], и, таким образом, исключает возможность независимой реакции Бф. Фотовосстановление Бф изменяет полосу КД молекул Бхл в РЦ [34], указывая на взаимодействие Бф с молекулами бактериохлорофилла в РЦ. Восстановление Бф приводит к резкому уменьшению выхода триплетных состояний Р или каротиноидов [47, 48], поляризация спина которых [65, 66] указывает на их происхождение из триплетного состояния ион-радикальной пары $[P^{\cdot+}Бф^{\cdot-}]$ [44]. Образование $Бф^{\cdot-}$ сопровождается уменьшением выхода люминесценции, обладающей энергией активации 0,12 эВ и временем жизни $t \leqslant 6$ нс [47], которая возникает, вероятно, в результате рекомбинации в ион-радикальной паре $[P^{\cdot+}Бф^{\cdot-}]$. Восстановление Бф приводит к подавлению реакции фотообразования катион-радикала $P^{\cdot+}$ [67] и, таким образом, к подавлению фотохимической активности в РЦ.

Взаимодействие пигментов в РЦ и взаимное расположение переносчиков электрона в РЦ. Геометрия расположения пигментов друг относительно друга в РЦ, так же как и свойства пигментов обратимо воспринимать и отдавать электрон [1—6], вероятно, полностью определяет процесс разделения зарядов в РЦ, происходящий за несколько пикосекунд [55—57, 59, 60, 67] и приводящий к стабилизации разделенных зарядов в пигментной матрице на время до 10 нс [63], достаточное для эффективного переноса электрона на акцепторы нехлорофилловой природы.

Взаимная ориентация и взаимодействие пигментов между собой, а также с хиноном и атомом железа исследуются магнитными и рядом оптических методов, такими, как КД, фотодихроизм и линейный дихроизм ориентированных РЦ.

В ближней инфракрасной области спектр КД мономеров бактериохлорофилла (Бхл) или бактериофеофитина (Бф) представлен очень слабой полосой положительного знака [18]. В РЦ полосам поглощения пигментов соответствуют интенсивные полосы КД положительного и отрицательного знака [18, 32, 34, 41]. Так, полосе поглощения Р соответствует положительная полоса КД при 870 нм (или 960 нм для Бхл в). Полоса поглощения Бхл при 800 нм (или при 830 нм для Бхл в) расщепляется на две полосы: отрицательную при 810 (или 850) нм и положительную при 795 (или 829) нм. Полосе поглощения Бф соответствует отрицательная полоса КД при 750 нм (или 790 нм для Бхл в). Большие величины вращательных сил переходов в РЦ указывают на пигмент-пигментное взаимодействие и могут быть использованы для оценки энергии этого взаимодействия.

Окисление Р сопровождается уходом двух полос КД противоположного знака при 870 и 810 нм (или 960 и 850 нм для Бхл в) [18, 32, 34, 41]. Восстановление фотохимически активного Бф вызывает также уменьшение двух полос КД противоположного знака при 790 и 830 нм (данные получены для Бхл в-содержащих РЦ [34]). В то же время окисление Р не вызывает изменения вращательных сил перехода Бф [18, 32, 34, 41], а восстановление Бф не вызывает изменения вращательных сил перехода Р [34].

Эти данные с точки зрения квантовомеханической теории взаимодействия осцилляторов поглощения [68] указывают на отсутствие взаимодействия Р и Бф. В то же время Р взаимодействует с Бхл, поглощающим при 810 нм (или 850 нм для Бхл в), а Бф взаимодействует с Бхл, поглощающим при 800 (или 830) нм.

Эти данные находятся в согласии с данными по исследованию фотодихроизма изменений поглощения в РЦ, связанных с восстановлением Бф и окислением Р. Так, на Бхл в-содержащих организмах было найдено, что окисление Р приводит к уменьшению дипольной силы переходов Бхл при 830 и 850 нм и не изменяет дипольной силы перехода Бф при 790 нм. Фотовосстановление Бф сопровождается только изменением дипольной силы перехода Бхл при 830 нм [34].

Применение квантовомеханических выражений [68] к данным, полученным для РЦ, дает возможность оценить энергию взаимодействия между хромофорами, а также расстояния между центрами хромофоров. Угол между дипольными моментами переходов в РЦ определяется также из данных по фотодихроизму и линейному дихроизму ориентированных РЦ [39, 34, 69], полученные результаты [34] суммированы на рис. 3. Так как энергия взаимодействия переходов Бф и Р меньше, чем 10 $см^{-1}$, то расстояние между Р и Бф может достигать более 15 Å. Однако Р и Бф оба взаимодействуют с Бхл, поглощающими при 800 нм (или при 830 нм для Бхл в), который, вероятно, расположен пространственно между Р и Бф и может участвовать в переносе электрона с Р на Бф.

Взаимодействие Бхл-800 (далее мы будем обозначать этот пигмент как В) и Бф с Р было изучено при измерении спектров синглетных и триплетных радикальных пар в РЦ R. spheroides [44]. Было найдено, что энергия пары $^1[P^+B^-]$ выше на 0,02 эВ энергии пары $^1[P^+Бф^-]$ и ниже на 0,03—0,1 эВ энергии синглетно-возбужденного состояния ^1P. Триплетное состояние реакционных центров показывает наличие смешивания двух состояний ^3P и $^3[P^+B^-]$, причем энергия первого на 0,03 эВ ниже энергии второго состояния. При исследовании замедленной флуоресценции, возникающей при тепловой

активации ^{3}P, было найдено, что синглет-триплетное расщепление в Р равно 0,4 эВ и близко к синглет-триплетному расщеплению Бхл в растворе [44, 70]. Исходя из этих данных, синглет-триплетное расщепление в [Р+В−] оценивается в 0,35—0,3 эВ. Это значение столь велико, что может указывать на наличие комплекса с переносом заряда РВ, в котором расстояние между Р и В составляет ~3,5 Å [44].

Синглет-триплетное расщепление в паре Р+Бф− оценивается в 10^{-7} эВ (или 10 Гс= $=10^{-3}$ Тл) [23], исходя из влияния магнитного поля на выход триплетных состояний ^{3}P. Это согласуется со спиновой поляризацией сигнала ЭПР состояния ^{3}P [66, 67], которое образуется из синглетной пары Р+Бф− при низких температурах [44]. Сигнал ЭПР ^{3}P показывает заселенность преимущественно нулевого подуровня, что связано с малым синглет-триплетным расщеплением в [Р+Бф−].

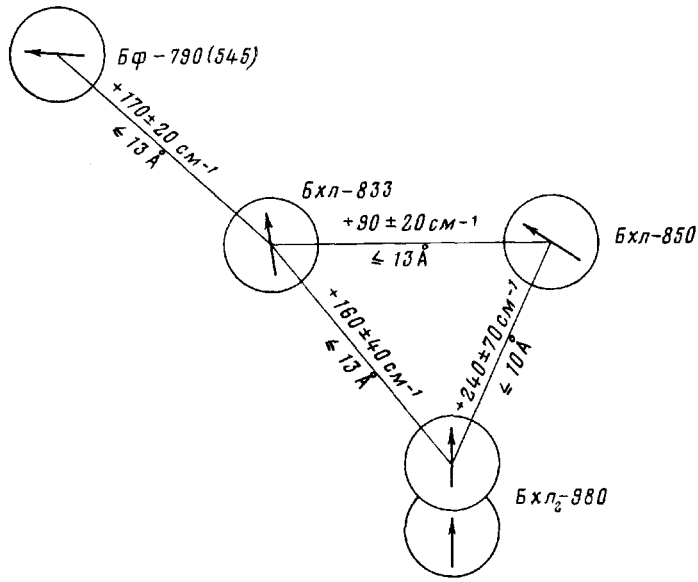


Рис. 3. Взаимное расположение молекул Бхл и Бф в реакционных центрах Rhodopseudomonas viridis. Стрелки указывают одну из возможных ориентаций дипольных моментов переходов. Экспериментально найденные значения углов между дипольными векторами перехода при 980 нм и переходов при 850, 833, 790 и 545 нм составляют 70±10, 23±3, 71±10 и 42±6° соответственно. Числа, выраженные в см$^{-1}$, указывают энергии взаимодействия осцилляторов поглощения молекул, а выраженные в Å — расстояния между центрами хромофоров [34]

Таким образом, можно ожидать, что первичный процесс фотосинтеза должен заключаться в очень быстром ($<10^{-13}$ с) разделении зарядов между Р и В с небольшой потерей энергии поглощенного Р кванта света. Далее электрон может переноситься на Бф также с небольшой потерей энергии. Образование ион-радикальной пары Р+Бф− сопровождается резким уменьшением синглет-триплетного расщепления, а следовательно, уменьшением обменного взаимодействия между катион- и анион-радикалами. Эти процессы возможны при том условии, что молекула В расположена пространственно между Р и Бф.

Выводы о взаимодействии и взаимном расположении пигментов находятся в хорошем согласии с недавними пикосекундными и субпикосекундными измерениями переноса электрона в РЦ. Как уже указывалось, в течение первых пикосекунд возбуждения РЦ при 880 нм наблюдается образование состояния [Р+В−] без выцветания полос поглощения Бф [57]. Измерение кинетики образования этого состояния показало, что оно формируется за время короче, чем 1—2 пс [59, 60]. Далее происходит релаксация полосы при 800 нм в течение 5—7 пс с одновременным образованием состояния [Р+Бф−] [59, 60]. Кинетическая и энергетическая схема разделения зарядов представлена на рис. 4, данные для которого взяты из работ [34, 43, 44, 59, 60, 64].

Было найдено, что Бф$^{*-}$ обнаруживает магнитное взаимодействие с комплексом хинон — железо и величина этого взаимодействия составляет для РЦ $\sim 6\cdot10^{-7}$ эВ [48]. Это указывает, что расстояние между данными переносчиками электрона равно примерно 10 Å [23]. Эти данные находятся в соответствии со временем переноса электрона от Бф− на хинон, которое составляет 200 пс. Отсутствие магнитного взаимодействия между Р и хиноном ($<10^{-8}$ эВ) указывает на расстояние между переносчиками больше, чем 19 Å [23].

Согласие данных о взаимодействии переносчиков электрона и их взаимном расположении в РЦ с экспериментами по переносу электрона в РЦ подтверждает предполо-

жение о том, что способность пигментов воспринимать и отдавать электрон, а также взаимное расположение пигментов в РЦ практически полностью определяют процесс фоторазделения зарядов, приводящий к стабилизации зарядов в РЦ на времена, доступные для их использования в биохимических окислительно-восстановительных реакциях. Стабилизация зарядов осуществляется за счет пространственного удаления электрона от окисленного первичного донора по цепи акцепторов электрона с потерей определенной порции энергии на каждом этапе. Последний процесс препятствует возврату

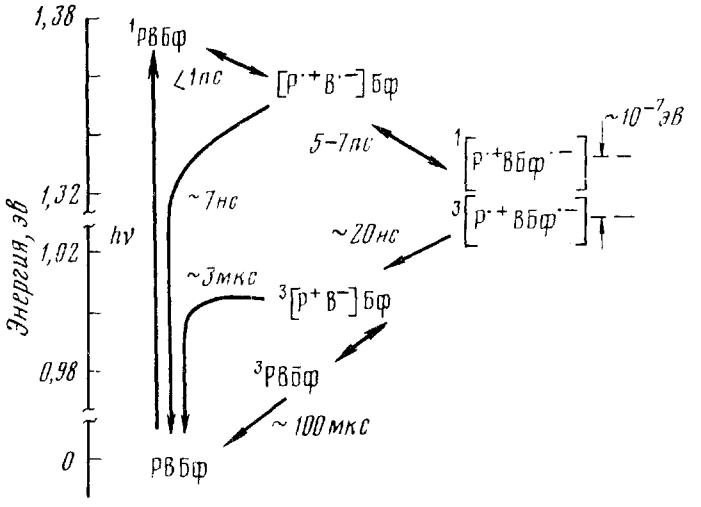


Рис. 4. Энергетика и времена переноса электрона в РЦ бактерий Р — первичный донор электрона (донор бактериохлорофилла), В — форма бактериохлорофилла с поглощением 800 нм, Бф — бактериофеофитин

электрона на окисленный первичный донор по синглетно-возбужденным уровням пигментов. Так, потеря энергии ~0,45 эВ при переносе электрона от $Бф^-$ на хинон делает обратный процесс менее эффективным, чем прямой, в 10^8 раз. Это обеспечивает стабилизацию заряда на хиноне в течение ~1 с при времени рекомбинации $Бф^-$ и $Р^+$, равном 10 нс.

Аминокислотные остатки белка также рассматриваются как возможные переносчики электрона в РЦ [71].

Реакционные центры фотосистем зеленых растений

В связи с тем, что РЦ ФС-1 и ФС-2 не удается выделить в чистом виде, затруднительно использовать многие оптические методы, такие, как КД, фотодихроизм, а также методы биохимического анализа для исследования РЦ. О переносе электрона в РЦ этих фотосистем судят главным образом с помощью лазерного флеш-фотолиза, а также по кинетике фотопревращений хлорофиллов в РЦ при низких температурах, при которых не происходит перенос электрона за пределы РЦ.

Имеющиеся в настоящее время методы очистки, так же как и в случае РЦ бактерий, основаны на применении детергентов, таких, как дигитонин, тритон, SDS и LDAO [19]. После солюбилизации мембран хлоропластов выделение комплексов или фрагментов, обогащенных ФС-1 или ФС-2, производится с помощью дифференциального центрифугирования [72], электрофореза [19, 73], хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе [74] и другими методами. Обычно в комплексах ФС-1, полученных с помощью тритона Х-100, отношение содержаний светособирающего хлорофилла к содержанию Р700 составляет 20—30 [74], а в комплексах ФС-2 отношение Хл/Р680 достигает 20—70 [75]. Наибольшее обогащение по РЦ ФС-1 получено при обработке диэтиловым эфиром фрагментов ФС-1, выделенных с помощью дигитонина: Хл/Р700=5÷9 [76].

Фотосистема 1. Применение оптических методов и метода ЭПР выявило последовательность переноса электрона в РЦ ФС-1, в которых первичным донором является Р700. Было высказано предположение о том, что до Р430 в РЦ ФС-1 функционируют два акцептора: A_1 и A_2 [77]. Исследования с помощью пикосекундной спектроскопии подтвердили это предположение и позволили показать, что в качестве A_1 может функционировать другая молекула хлорофилла — Хл-695 [78]. Пикосекундная спектроскопия комплексов ФС-1 показала, что первичный фотоакт в РЦ ФС-1 приводит к переносу электрона от Р700 на димер хлорофилла-695 за время короче 40 пс (рис. 5) [78]. Далее электрон в течение 200 пс переносится на железо-серные центры [78, 79], которые служат в ФС-1 конечными акцепторами электрона. Если эти акцепторы восстановлены в

темноте, то наблюдается рекомбинация P700·+ и Хл-695·− с временами 10 нс и 3 мкс. Последний компонент при низкой температуре (5 К) имеет время жизни ~1 мс [80], что соответствует временам жизни триплетного состояния хлорофилла в растворе [81] и в ФС-1 [82]. Таким образом, можно предполагать, что медленный компонент рекомбинации отражает затухание смеси триплетного состояния хлорофилла и триплетного состояния ион-радикальной пары.

Железо-серные центры в ФС-1 представлены тремя типами: X [83, 84], A и B [13]. Центр A имеет при 15 К значение g-факторов 1,86; 1,94 и 2,05 и окислительно-восстановительный потенциал E_0=—540 мВ [85]. Когда центр A восстанавливается предварительно в темноте, свет вызывает восстановление центра B с g-фактором, равным 1,89; 1,92 и 2,05 (E_0 его составляет —580 мВ [85]). Фотовосстановление центров A и B при криогенных температурах приводит к необратимому отрыву электрона от P700 [12, 21].

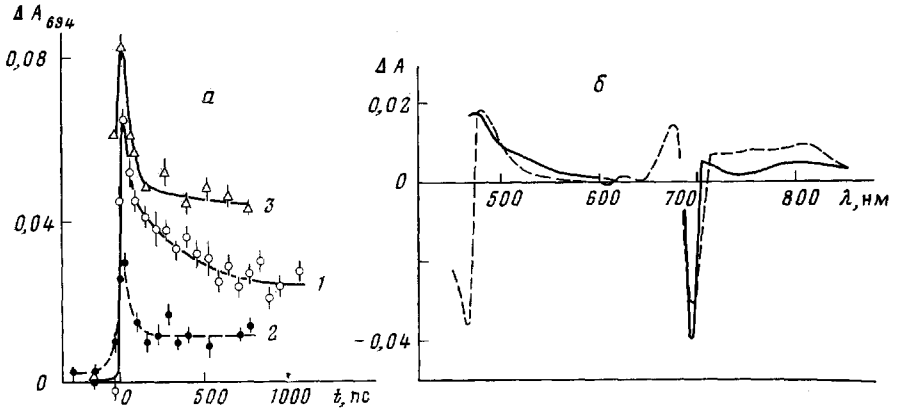


Рис. 5. Кинетика изменений поглощения в ФС-1 при 694 нм, возбуждаемой импульсом света при 708 нм и длительностью 30 пс (*а*), а также дифференциальный спектр поглощения для компонента изменений поглощения с $\tau_{1/2}$ =200 пс (*б*, сплошная кривая) [78] *а*: *1* — окислительно-восстановительный потенциал среды E_h=0; *2* — то же при дополнительном подсвете, вызывающем окисление P700; *3* — то же, что и *1*, но после температурной дезактивации P430; *б*: штриховая кривая — спектр образования анион-радикала хлорофилла *а* в растворе, сдвинутый в красную область на 30 нм

Если оба центра A и B химически восстанавливаются в темноте, то свет вызывает обратимое восстановление третьего железо-серного центра X с g=1,78; 1,88 и 2,08 [83, 84] (E_0=—730 мВ [21]). По своим спектральным характеристикам центр X отличается от железо-серных белков, полученных в чистом виде, что вызывает сомнение в правильности его идентификации. Кроме того, восстановление центров A и B приводит к существенному изменению времени жизни анион-радикала Хл-695·−, который является промежуточным акцептором в переносе электрона от P700 на железо-серные центры [79]. При этом кинетика Хл-695·− мало зависит от восстановленности центра X [79], что оставляет неопределенным участие этого центра в переносе электрона в РЦ ФС-1.

На принадлежность центров A, B и X железо-серным центрам указывают также данные оптических измерений. Фотовосстановление этих центров приводит к выцветанию широкой полосы поглощения в области 430 нм [12, 14, 80], что является характерным для восстановления железо-серных белков [86].

Сложная кинетика темнового восстановления P700+ при низких температурах была приписана переносу электрона с разных типов акцепторов: наиболее быстрая компонента — перенос с A_1 (Хл-695), медленная — с X и самая медленная — с P430. Постоянство константы скоростей этих компонентов в кинетике восстановления P700+ в определенных областях низких температур интерпретируется как указание на перенос электрона с A_1, X и P430 по туннельному механизму. Эти данные были установлены для СДС-фрагментов [87], дигитониновых фрагментов [88, 89] и тритоновых фрагментов [21, 80, 90]. Энергетическая схема переноса электрона в ФС-1 представлена на рис. 6, *а*.

Фотосистема 2. Спектральные исследования ФС-2 показали, что первичным донором электрона является димер хлорофилла P680 с максимумом поглощения при 680 и 430 нм [8] и дающим сигнал ЭПР с g-фактором, равным 2,0025, и $\Delta H=8\cdot10^{-4}$ Тл при образовании катион-радикала [91—93]. Окислительно-восстановительный потенциал для образования катион-радикала лежит в области 1,0—1,2 В [9, 10]. Конечным акцептором электрона в РЦ ФС-2 является пластохинон [94, 95] с E_0=—130 мВ [96]. В препаратах ФС-2, в которых пластохинон восстановлен в темноте, наблюдается реакция обратимого фотовосстановления феофитина (Фф) [97, 98]. Восстановленный феофитин дает сигнал ЭПР с $g=2{,}0035\pm0{,}0004$ и $\Delta H=(12{,}5\pm5)\cdot10^{-4}$ Тл [99], который хорошо соответствует сигналу ЭПР мономерной формы феофитина в растворе [6, 100]. Дифференциальный

спектр и E_m-потенциал восстановления Фф (—610 мВ) [10, 97, 98] согласуются со спектром образования и E_0 анион-радикала Фф в растворе [100]. Таким образом, можно предполагать, что в ФС-2 при низких окислительно-восстановительных потенциалах среды происходит на свету образование анион-радикала мономерного Фф.

Восстановление пластохинона в ФС-2 сопровождается увеличением квантового выхода люминесценции хлорофилла [101]. Если далее на свету происходит восстановление Фф, то выход падает до первоначальной величины [97, 98], как это ранее было обна-

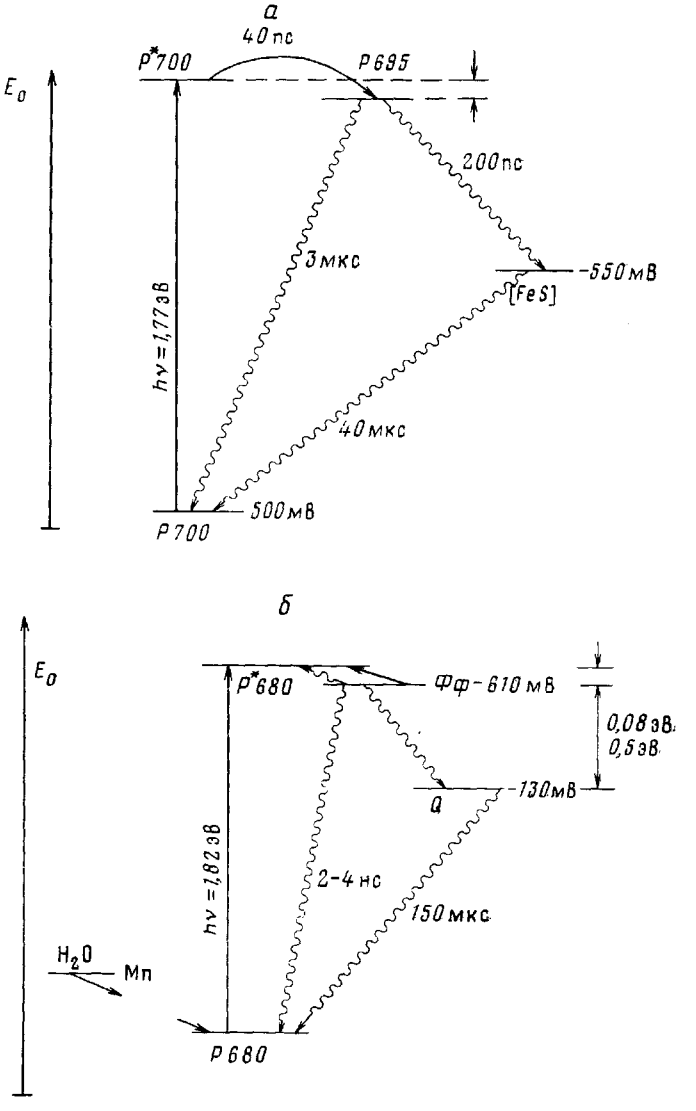


Рис. 6. Энергетика и времена переноса электрона в РЦ ФС-1 (*а*) и ФС-2 (*б*)

ружено у хроматофоров пурпурных бактерий, у которых убихинон был предварительно восстановлен [47, 102]. Температурная зависимость люминесценции, возникающей при восстановлении пластохинона, дает энергию активации для люминесценции равную 0,08 эВ [103].

Время жизни этой люминесценции составляет 2—4 нс [103, 104]. Наличие энергии активации не свойственно для обычной флуоресценции и, вероятно, указывает на рекомбинационную природу свечения. Зависимость выхода этой люминесценции хлорофилла от состояния Фф [97, 98, 103, 104] может указывать на участие Фф в образовании совместно с хлорофиллом ион-радикальной пары, энергетический уровень которой ниже на 0,08 эВ, чем уровень возбужденного хлорофилла.

Наложение внешнего магнитного поля на ФС-2 приводит к увеличению выхода данной люминесценции, что не наблюдается в случае, когда пластохинон окислен или Фф

восстановлен [105]. Эти результаты находятся в соответствии с представлением об образовании ион-радикальной пары с участием Фф, которая может находиться в синглетном и триплетном состояниях.

Проводя аналогию с бактериальным фотосинтезом, можно предположить, что Фф является промежуточным акцептором электрона в ФС-2. В пользу этого предположения говорят следующие факты: 1) Фф восстанавливается в ФС-2 в стехиометрическом соотношении с первичным донором электрона Р680 [106]; 2) реакция наблюдается при температуре 100 К; 3) восстановление Фф сопровождается изменением квантового выхода люминесценции хлорофилла [97, 98, 103, 104]; 4) реакция восстановления Фф существенным образом зависит от состояния кислород-выделяющей системы, содержащей ионы Mn^{2+} [106]; 5) восстановление феофитина сопровождается сдвигом полосы поглощения хлорофилла при 680 нм [97, 98].

Прямое измерение образования ион-радикальной пары $P680^{\cdot+}Фф^{\cdot-}$ было осуществлено в работе [104], в которой было показано, что при восстановлении пластохинона (ПХ) наблюдаются изменения поглощения со временем жизни ~4 нс и со спектром, соответствующим образованию $[P680^{\cdot+}Фф^{\cdot-}]$. Окисление ПХ приводит к резкому уменьшению времени жизни этой радикальной пары, что может отражать перенос электрона от $Фф^{-}$ на ПХ. Близкое расстояние между Фф и ПХ демонстрируется в опытах по магнитному взаимодействию $Фф^{\cdot-}$ и $ПХ^{\cdot-}$, проявляющемуся в спектрах ЭПР [107]. Так же как и в случае бактериальных РЦ, наблюдается взаимодействие с энергией $\sim 6 \cdot 10^{-7}$ эВ в присутствии атомов железа.

Можно представить себе следующую последовательность переноса электрона в РЦ ФС-2 после поглощения кванта света, которая очень сходна с процессом разделения зарядов в бактериальных РЦ. Квант света вызывает перенос электрона от Р680 на Фф с образованием ион-радикальной пары $[P680^{\cdot+}Фф^{\cdot-}]$ и потерей энергии поглощенного кванта на 0,08 эВ. Это состояние живет ~4 нс в присутствии восстановленного пластохинона и не более 400 пс, когда последний окислен, так как эффект магнитного поля на рекомбинационную люминесценцию уменьшается в этом случае более чем на порядок [103]. Переход электрона на пластохинон (E_0=—130 мВ [96]) сопровождается потерей энергии на 0,5 эВ, что, однако, стабилизирует состояние разделенных зарядов ($P680^{\cdot+}Q^{\cdot-}$) до 150 мкс [108]. Рекомбинация зарядов в этом случае предотвращается передачей электрона на $P680^{\cdot+}$ за время 1—2 мкс [109] от вторичного донора электрона, который далее окисляет H_2O. Энергетика процесса разделения зарядов в РЦ ФС-2 отражена на рис. 6, *б*.

Заключение

Исследование функционирования РЦ показывает, что механизм конверсии энергии кванта света в энергию разделенных зарядов полностью определяется способностью хлорофилла, отдавать и воспринимать электрон, что было обнаружено и исследовано в опытах с изолированными пигментами (см. введение). Установление спектральных свойств окисленных или восстановленных форм хлорофилла и его аналогов дало возможность установить природу реакции переноса электрона между хлорофильными пигментами в РЦ бактерий, ФС-1 и ФС-2. Таким образом, достаточно уверенно можно говорить об образовании катион- и анион-радикалов того или другого аналога хлорофилла в РЦ под действием светового импульса.

Однако имеется существенная разница в механизме протекания реакций с образованием ион-радикальных форм хлорофилла и его аналогов в растворах и в РЦ. Так, в РЦ фотохимическая реакция переноса электрона происходит весьма быстро (10^{-12} с) с участием синглетно-возбужденных молекул и включает в себя несколько стадий последовательного переноса электрона, сопровождающегося потерей части энергии поглощенного кванта в тепло. Это приводит к пространственному разделению зарядов. Медленная рекомбинация зарядов в этом случае связана, с одной стороны, с тем, что для рекомбинации зарядов по квантовым синглетным уровням молекул пигментов требуется существенная (что поэтому маловероятно) тепловая активация электрона (0,6—0,7 эВ), соответствующая энергии, которая была растрачена в тепло в результате первичного акта, а с другой стороны, с тем, что пространственное удаление катион- и анион-радикалов конечных продуктов реакции в РЦ приводит к образованию широких энергетических барьеров и, следовательно, очень низкой вероятности их туннелирования.

Указано [110] на возможность конформационных превращений белков в РЦ в процессе переноса электрона, что может препятствовать быстрому обращению первичных фотореакций. Экспериментально показана возможность конформационных изменений при реакции переноса электрона от первичного ко вторичному хинону [111].

В отличие от этого в растворах хлорофилла фотохимические реакции, как правило, идут при диффузном столкновении синглетно- и триплетно-возбужденных молекул пигмента и молекул доноров и акцепторов электрона. При этом наблюдается образование ион-радикальных пар синглетного или триплетного характера [22]. В первом случае рекомбинация зарядов происходит в очень короткий промежуток времени — 10^{-12} с, тогда как во втором случае время жизни ион-радикальной пары может быть достаточным для разделения ион-радикалов, особенно в полярных растворителях [22]. Имеющийся экспериментальный материал указывает на то, что фотохимические реакции в растворах с образованием восстановленных или окисленных форм хлорофилла и его

аналогов происходят, как правило, при участии триплетно-возбужденных молекул хлорофилла.

Вероятно, для моделирования фотохимических процессов, происходящих в РЦ, нужно перейти от мономеров хлорофилла к агрегированным формам, в которых молекулы пигментов соединены так, чтобы энергетическое положение вакантных орбиталей незначительно изменялось в одну сторону при переходе электрона от одной молекулы к другой вдоль цепи. В этом случае можно ожидать быстрое фотохимическое разделение зарядов с их стабилизацией на противоположных участках цепи. Такие модели возможно строить с использованием ковалентно-связанных молекул пигментов [112, 113] или агрегированных форм, образованных с помощью самосборки [114].

Нет сомнения в том, что для построения таких систем, запасающих энергию квантов солнечного света, необходимо выяснить механизм фотохимических окислительно-восстановительных превращений хлорофилла и его аналогов в модельных системах, в реакционных центрах фотосистем и в мембранах фотосинтезирующих организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Krasnovsky A. A.* Ann. Rev. Plant Physiol., 1960, v. 11, p. 363—410.
2. *Krasnovsky A. A.* Biophys. J., 1972, v. 12, p. 749—763.
3. *Красновский А. А.* В кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.— Л.: Наука, 1966, с. 213—242.
4. *Евстигнеев В. Б.* Там же, с. 243—266.
5. *Красновский А. А.* Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы. М.: Наука, 1974.
6. *Красновский А. А., Умрихина А. В., Бубличенко Н. В.* В кн.: Спектроскопия фотопревращений в молекулах. Л.: Наука, 1977, с. 106—132.
7. *Kok B.* Biochim. Biophys. Acta, 1956, v. 22, p. 339—401.
8. *Döring G., Renger G., Vater J., Witt H. T.* Z. Naturforsch., 1967, 22b, p. 639.
9. *Jursinic P.,* Govindjee. Photochem. Photobiol., 1977, v. 26, p. 617—628.
10. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Деметр Ш., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1979, т. 249, с. 227—230.
11. *Rumberg B. Z.* Naturforsch., 1964, Bd. 19b, p. 707—716.
12. *Шувалов В. А., Климов В. В., Красновский А. А.* Мол. биол., 1976, т. 10, с. 326—339.
13. *Malkin R., Bearden A. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 16—19.
14. *Hiyama T., Ke B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 1010—1013.
15. *Okamura M. Y., Isaacson R. A., Feher G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 4391—4395.
16. *Pucheu N. L., Kerber N. L., Garcia A. E.* Arch. Microbiol., 1976, v. 109, p. 301—305.
17. *Parson W. W., Cogdell R. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 416, p. 105—149.
18. *Sauer K., Austin L. A.* Biochemistry, 1978, v. 17, p. 2011—2019.
19. *Thornber J. P., Markwell J. P., Reinmann S.* Photochem. Photobiol., 1979, v. 29, p. 1199—1204.
20. *Ерохин Ю. Е., Чугунов В. А., Махнева З. К.* и др. Биохимия, 1977, т. 42, с. 1817—1824.
21. *Ke B.* In: Current Topics in Bioenergetics, 1978, v. 7, p. 75—138.
22. *Blankenship R. E., Parson W. W.* In: Photosynthesis in relation to model systems/Ed. J. Barker. Elsevier: North-Holl. Biomed. Press, 1979, p. 71—114.
23. *Hoff A. J.* In: Light Reaction in Photosynthesis/Ed. F. K. Fong. Berlin: Springer-Verlag, 1979, p. 96.
24. *Reed D. W., Clayton R. K.* Biochem. Biophys. Res. Communs, 1968, v. 30, p. 471—475.
25. *Feher G.* Photochem. Photobiol., 1971, v. 14, p. 373—387.
26. *Feher G., Okamura M. Y.* In: The Photosynthetic Bacteria/R. K. Clayton, W. R. Sistrom Eds., N. Y.: Plenum Press, 1977, p. 432.
27. *Clayton R. K., Wang R. T.* Methods Enzymol., 1971, v. 23, p. 696—704.
28. *Thornber J. P., Dutton P. L., Fajer J.* et al. Proc. 4th Int. Cong. Photosynth., Reading, England, 1977, p. 55—70.
29. *Straley S. C., Parson W. W., Mauzerall D. C., Clayton R. K.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 305, p. 597—609.
30. *Okamura M. Y., Steiner L. A., Feher G.* Biochemistry, 1974, v. 13, p. 1394—1403.
31. *Loach P. A., Hall R. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 768—790.
32. *Reed D. W., Ke B.* J. Biol. Chem., 1973, v. 248, p. 3041—3045.
33. *Shuvalov V. A., Krakhmaleva I. N., Klimov V. V.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 597—601.
34. *Shuvalov V. A., Asadov A. A.* Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 545, p. 296—308.
35. *Bolton J. R., Olovton R. K., Reed D. W.* Photochem. Photobiol., 1969, v. 9, p. 209—218.
36. *Norris J. R., Uphaus R. A., Crespi H. L., Katz J. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 625—628.
37. *Feher G., Okamura M. Y.* Brookhaven Symp. Biol., 1977, v. 28, p. 183—194.
38. *Vermeglio A., Clayton R. K.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 500—525.

39. *Rafferty C. N., Clayton R. K.* Biochim. Biophys. Acta 1979, v. 545, p. 106—121.
40. *Thornber J. P., Dutton P. L., Fajer J.* et al. In: Proc. 4th Int. Congr. Photosynthesis. England, 1977.
41. *Phillipson K. D., Sauer K.* Biochemistry, 1973, v. 12, p. 535—539.
42. *Shuvalov V. A., Asadov A. A., Krakhmaleva I. N.* FEBS Lett., 1977, v. 76, p. 240—245.
43. *Shuvalov V. A., Parson W. W.* Biochim. Biophys. Acta, 1981 (in press).
44. *Shuvalov V. A., Parson W. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981 (in press).
45. *Красновский А. А., Войновская К. К.* Докл. АН СССР, 1951, т. 81, с. 879—882.
46. *Пакшина Е. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1974, т. 19, с. 238—243.
47. *Shuvalov V. A., Klimov V. V.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 440, p. 587—599.
48. *Tiede D. M., Prince R. C., Dutton P. L.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 447—467.
49. *Van Grondelle R., Romijn J. C., Holmes N. G.* FEBS Lett., 1976, v. 72, p. 187—192.
50. *Clayton R. K., Straley S. C.* Biophys. J. 1972, v. 12, p. 1221—1234.
51. *Шувалов В. А., Климов В. В., Крахмалева И. Н.* и др. Докл. АН СССР, 1976, т. 227, с. 984—987.
52. *Debrunner P. G., Schulz C. E., Feher G., Okamura M. Y.,* Biophys. J., 1975, v. 15, p. 226a (Abstr. TH-PM-L12).
53. *Feher G., Okamura M. Y., McEbroy J. D.* Biochim. Biophys. Acta, 1972, v. 267, p. 222—226.
54. *Borisov A. Yu. and Godik V. I.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 301, p. 227.
55. *Kaufmann K. J., Dutton P. L., Netzel T. L.* et al. Science, 1975, v. 188, p. 1301—1304.
56. *Rockley M. G., Windsor M., Cogdell R. J., Parson W. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 2251—2255.
57. *Shuvalov V. A., Klevaik A. V., Sharkov A. V.* et al. FEBS Lett., 1978, v. 91, p. 135—139.
58. *Akhmanov S. A., Borisov A. Ju., Danielius R. V.* et al., FEBS Lett., 1980, v. 114, p. 149—152.
59. *Клеваник А. В., Крюков П. Г., Матвеец Ю. А.* и др. Письма в ЖЭТФ, 1980, т. 32, с. 107—110.
60. *Holten D., Hoganson C., Windsor M. W.* et al. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 592, p. 461—477.
61. *Kihara T., Chance B.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 189, p. 116—124.
62. *Parson W. W., Case G. D.* Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 205, p. 232—245.
63. *Parson W. W., Clayton R. K., Cogdell R. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 387, p. 268—278.
64. *Климов В. В., Шувалов В. А., Крахмалева И. Н.* и др. Биохимия, 1977, т. 42, с. 519—530.
65. *Dutton P. L., Leigh J. S., Seibert M.* Biochem. Biophys. Res. Communs, 1972, v. 46, p. 406—413.
66. *Leigh J. S., Dutton P. L.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 357, p. 67—77.
67. *Holten D., Windsor M. W., Parson W. W., Thornber J. P.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 501, p. 112—126.
68. *Tinoco I.* (Jr.). Advan. Chem. Phys., 1962, v. 4, p. 113—160.
69. *Abdourakhmanov I. A., Ganago A. O., Erokhin Ju. E.* et al., Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 546, p. 183—186.
70. *Krasnovsky A. A., Jr.* Photochem. Photobiol., 1979, v. 29, p. 29—36.
71. *Кухтин В. В., Петров Э. Г., Харкянен В. Н., Христофоров Л. Н.* Мол. биол., 1978, т. 12, с. 1246—1255.
72. *Anderson J. M., Boardman N. K.* Biochim. Biophys. Acta, 1966, v. 112, p. 403—421.
73. *Thornber J. P., Smith C. A., Bailey J. L.* Biochem. J., 1966, v. 100, p. 14,
74. *Шутилова Н. И., Кутюрин В. М.* Физиол. раст., 1976, т. 23, с. 41.
75. *Van Gorkom H. J., Pulles M. P. L., Wessels J. S. C.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 408, p. 331—339.
76. *Ikegami I., Katoh S.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 376, p. 588—592.
77. *Sauer K., Mathis P., Acker S., Van Best J.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 503, p. 120—134.
78. *Shuvalov V. A., Klevanik A. V., Sharkov A. V.* et al., FEBS Lett., 1979, v. 107, p. 313—316.
79. *Shuvalov V. A., Ke B., Dolan E.* FEBS Lett., 1979, v. 100, p. 5—8.
80. *Shuvalov V. A., Dolan E., Ke B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 770—773.
81. *Красновский А. А. (мл.), Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.* Докл. АН СССР, 1975, т. 225, с. 207—210.
82. *Shuvalov V. A.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 430, p. 113—121.
83. *McIntosh A. R., Chu M., Bolton J. R.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 396, p. 308—314.
84. *Evans M. C. W., Shira C. K., Bolton J. R., Cammack R.* Nature (London), 1975, v. 256, p. 668—670.
85. *Bearden A. J., Malkin R.* Brookhaven Symp. Biol., 1977, v. 28, p. 247—266.

86. *Ke B.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 301, p. 1—33.
87. *Mathis P., Sauer K., Remy R.* FEBS Lett., 1978, v. 88, p. 275—278.
88. *Бухов Н. Г., Карапетян Н. В.* Мол. биол., 1978, т. 12, с. 868—878.
89. *Бухов Н. Г., Карапетян Н. В.* Биофизика, 1979, т. 24, с. 806—810.
90. *Ke B., Demeter S., Zamaraev K., Khairutdinov R. F.* Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 545, p. 265—284.
91. *Malkin R., Bearden A. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, p. 294—297.
92. *Bearden A. J., Malkin R.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 325, p. 266—274.
93. *Van Gorkom H. J., Tamminga J. J., Haveman J.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 347, p. 417—438.
94. *Bensasson R., Land E. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 325, p. 175—181.
95. *Van Gorkom H. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 347, p. 439—442.
96. *Knaff D. B.* Photochem. Photobiol., 1977, v. 26, p. 327.
97. *Клеваник А. В., Климов В. В., Шувалов В. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 241—244.
98. *Klimov V. V., Klevanik A. V., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A.* FEBS Lett., 1977, v. 82, p. 183—186.
99. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1979, т. 249, с. 485—488.
100. *Fujita I., Davis M. S., Fajer J.* J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 6280.
101. *Duysens L. N. M., Sweers H. E.* In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria/Ed. J. Ashida. Tokyo: University of Tokyo Press, 1963, p. 353—372.
102. *Климов В. В., Шувалов В. А., Крахмалева И. Н.* и др. Биохимия, 1979, т. 41, с. 1435—1441.
103. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Пащенко В. З.* Докл. АН СССР, 1978, т. 242, с. 1204—1207.
104. *Shuvalov V. A., Klimov V. V., Dolan E., Parson W. W. and Ke B.* FEBS Lett., 1980, v. 118, p. 279—282.
105. *Клеваник А. В., Шувалов В. А., Горюшкин Г. П. Докл.* АН СССР, 1980, т. 249, с. 1238—1241.
106. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Шутилова Н. И., Красновский А. А.* Физиол. раст., 1980, т. 27, с. 315.
107. *Klimov V. V., Dolan E., Shaw E., Ke B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980 (in press).
108. *Haveman J., Mathis P.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 440, p. 346.
109. *Van Best J. A., Duysens L. M. N.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 459, p. 187—206.
110. *Рубин А. Б.* Успехи соврем. биол., 1980, т. 90, с. 163—178.
111. *Нокс П. П., Кононенко А. А. и Рубин А. Б.* Биоорганическая химия, 1979, т. 5, с. 879—885.
112. *Wasielewski M. R., Smith U. H., Cope B. T., Katz J. J.* J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 4172—4173.
113. *Bozer S. G., Closs G. L.* J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, p. 5406—5408.
114. *Krasnovsky A. A., Bystrova M. I.* Biosystems, 1980, т. 12, с. 181—194.

Академия наук СССР
Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Москва; Институт фотосинтеза АН СССР,
Пущино (Московская область)

Поступила в редакцию
11.XI.1980

PHOTOCHEMICAL ELECTRON TRANSFER IN REACTION CENTERS OF PHOTOSYNTHESIS

SHUVALOV V. A., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow;
Institute of Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region)

Recent works of the Laboratory are reviewed in terms of modern concepts on the nature of primary photoprocesses in reaction centers of photosynthesis. The main feature of the primary charge separation in reaction centers is the fast (within several picoseconds) electron transfer between the pigments of chlorophyllous nature followed by electron transfer stage to nonchlorophyllous electron carriers for several hundreds of picoseconds. The primary charge separation is determined by the ability of excited chlorophyll and its analogues to be reversibely oxidized or reduced as well as by peculiar molecular arrangement of pigment system in reaction centers. The stabilization of photochemically generated electron and the hole is realized at the expence of its spatial separation and some loss of energy in the course of electron transfer

PHOTOSYNTHETICA 15 (4): 592–609, 1981

REVIEW

Pheophytin as the Primary Electron Acceptor in Photosystem 2 Reaction Centres*

V. V. KLIMOV** and A. A. KRASNOVSKIĬ***

*Institute of Photosynthesis, U.S.S.R. Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, U.S.S.R.***
*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.****

Abstract

Reversible photoreduction of pheophytin has been detected in photosystem 2 (PS 2) preparations when Q, the "stable" electron acceptor of PS 2, is reduced in the dark. The review shows that investigations of this photoreaction have allowed: (*1*) to establish that pheophytin in reaction centres (RC) of PS 2 functions as the primary electron acceptor between the primary electron donor P_{680} and Q; (*2*) to clarify the nature and properties of other components of the RC; (*3*) to reveal similarity in organization of RC in PS 2 and in purple photosynthetic bacteria.

Chlorophylls (Chl) and their pheophytins (Ph) excited by light are known to be capable of reversible photochemical reduction and oxidation in the presence of electron donors and acceptors, respectively, and the assumption has been made that this capability determines the participation of Chl in the primary photoreactions that convert the radiant energy into chemical energy in photosynthesis (for reviews see Evstigneev 1966, Krasnovskiĭ 1966, 1974, Krasnovsky 1972). Later it was shown that excited Chl or bacteriochlorophyll (BChl) play the role of the primary electron donor (P) in all known reaction centres (RC) of photosynthesis, whereas quinones or iron-sulphur proteins were believed to be the primary electron acceptors (for review see Sauer 1979). However, during recent years evidence has been obtained that additional (in fact, primary) electron acceptors, bacteriopheophytin (BPh), Ph or Chl, function between P and "stable" acceptors (quinones or Fe-S-proteins); in other words, the primary charge separation in RC occurs between chlorophyllous molecules (for review see Sauer 1979, Shuvalov and Krasnovskiĭ 1981).

While participation of Chl in photosynthesis is without doubt, the role of its metal-free derivative, Ph, in photosynthetic processes was not clear for a long time. Many authors described Ph as a grey band in sucrose chromatography pattern of pigments isolated from plants. The question arose: whether Ph was a natural constituent of leaves or an artefact appearing during isolation and analysis of Chl? A procedure of fluorimetric determination of Ph in leaves, free of possible causes inducing the loss of Mg from Chl molecules, has been worked out; however, in this case Ph also has been found in leaves (1.5–2.3 % of total Chl content) (Krasnovskiĭ and Shaposhnikova 1970). The ability of Chl and Ph for reversible photoreduction has been discovered earlier (for reviews see Krasnovsky 1960, Krasnovskiĭ 1960).

This review presents the results of experiments showing the possible function of pheophytin *a* (Ph *a*) as the primary electron acceptor in PS 2 of green plants.

* *Received* 29 May 1981.

The Primary Electron Donor and Acceptor in PS 2 Reaction Centre

According to the present view, a form of Chl (referred to as P_{680}) acts as the primary electron donor in PS 2 (for review see Knaff 1977). The question still open now is whether this pigment is a monomeric or a dimeric Chl form. Self-assembling of aggregates Chl molecules is accompanied with an absorption maximum near 680 nm (for review see Krasnovsky and Bystrova 1980). Photooxidation of P_{680} to $P_{680}^{+\cdot}$ is revealed by the bleaching of Chl absorption bands at 435 and 680—690 nm and by the appearance of an EPR signal with $g = 2.0025$ and $\Delta H = 7-8$ G (Döring *et al.* 1969, Malkin and Bearden 1975, Van Gorkom *et al.* 1975). $P_{680}^{+\cdot}$ is a quencher of Chl fluorescence (Okayama and Butler 1972, Klimov *et al.* 1980a). The primary electron acceptor (referred to as Q) in PS 2 is probably a special form of plastoquinone (PQ); its reduction is accompanied by characteristic absorbance changes in the UV spectral region as well as by the shift of absorption bands in the visible spectral region (interpreted earlier as photoreduction of some pigment C_{550}) (Stiehl and Witt 1969, Van Gorkom *et al.* 1975, Knaff 1977). As a result of the primary photoreaction, Q accepts only one electron; however, no EPR signal of $PQ^{-\cdot}$ has been found in PS 2 so far; redox potential (E_0') for the couple $Q/Q^{-\cdot}$ equals about -130 mV; the state of the RC with separated charges ($P_{680}^{+\cdot}Q^{-\cdot}$) decays during $\sim$150 μs and its recombination is accompanied by Chl luminescence (for review see Knaff 1977).

The transition of RC to the state ($P_{680}\,Q^{-\cdot}$) due to photochemical or dark reduction of Q is accompanied by a 3- to 4-fold increase of Chl fluorescence yield (Duysens and Sweers 1963, Karapetayn *et al.* 1971, Karapetyan and Klimov 1973, Klimov 1973). According to the hypothesis proposed by Duysens and Sweers (1963), the effect is related to the inability of RC to be in the state ($P_{680}\,Q^{-\cdot}$) to use the excitation energy for photochemical reaction. Such an increase in Chl fluorescence, called "variable fluorescence" (by contrast with the so-called "constant fluorescence" independent of the state of RC) is also observed in photosynthetic bacteria under reduction of the "stable" electron acceptor, quinone, and it is widely used as an indicator of RC transition to a photochemically inactive state (Karapetyan 1977).

Discovery of Photochemical Activity of PS 2 in the State ($P_{680}\,Q^{-\cdot}$)

Karapetyan *et al.* (1971), Karapetyan and Klimov (1973) and Klimov (1973) showed that RC of PS 2 after transition to the state ($P_{680}\,Q^{-\cdot}$) due to dark reduction of Q with dithionite (monitored by the corresponding fluorescence increase) still retained photochemical activity. It was revealed by the effect of photoinduced 3- to 4-fold decrease of Chl fluorescence yield (*i.e.* practically to the level registered with oxidized Q). The same effect of photoinduced decrease of Chl fluorescence yield was found (Karapetyan *et al.* 1971) in the bacterium *Chromatium minutissimum* after dark reduction of electron acceptor, menaquinone (MQ). In *Chromatium* as well as in PS 2 this photoreaction was observed only in the samples containing functionally active RC and it was practically irreversible in the dark. Therefore, it was ascribed to "reductive photoinactivation of RC" (Karapetyan *et al.* 1971, Karapetyan and Klimov 1973, Klimov 1973). However, in later works (Shuvalov and Klimov 1976, Klimov et *al.* 1976, 1977b), reversible photoinduced absorbance changes and BChl fluorescence decrease were found in *Chromatium* at redox potentials of medium (E_h) below -200 mV. These effects revealed photoreduction of BPh in RC. Taken together with the study of very fast ($10^{-11}-10^{-8}$ s) processes in bacterial RC (for review see Parson and Cogdell 1975), these data have led to the idea of BPh functioning as the primary ("intermediary") electron acceptor between the primary electron donor P_{890} and MQ (Fajer *et al.* 1975, Klimov *et al.* 1976, 1977a,b, Shuvalov and Klimov 1976, Prince *et al.* 1977). Irreversibility of the photoinduced decrease of Chl fluorescence yield,

discovered earlier (Karapetyan *et al.* 1971, Karapetyan and Klimov 1973, Klimov 1973), was observed probably due to the use of unbroken chromatophores and cells at $E_h \approx -450$ mV in these experiments, when dark oxidation of BPh^- is considerably slowed down (Klimov *et al.* 1976, 1977b, Shuvalov and Klimov 1976).

Reversible Photoreduction of Ph in PS 2

Detailed investigation of the origin of the photoinduced decrease of Chl fluorescence yield in PS 2 at E_h below -200 mV (when Q is reduced) has allowed to find reversible photoinduced absorbance changes coinciding, by their kinetics, with the negative changes of Chl fluorescence yield (Klevanik *et al.* 1977, Klimov *et al.* 1977a). Dark relaxation of these spectral changes was efficiently slowed down upon lowering E_h from -200 to -400 mV (Fig. 1) indicating the reductive nature of the photoprocess.

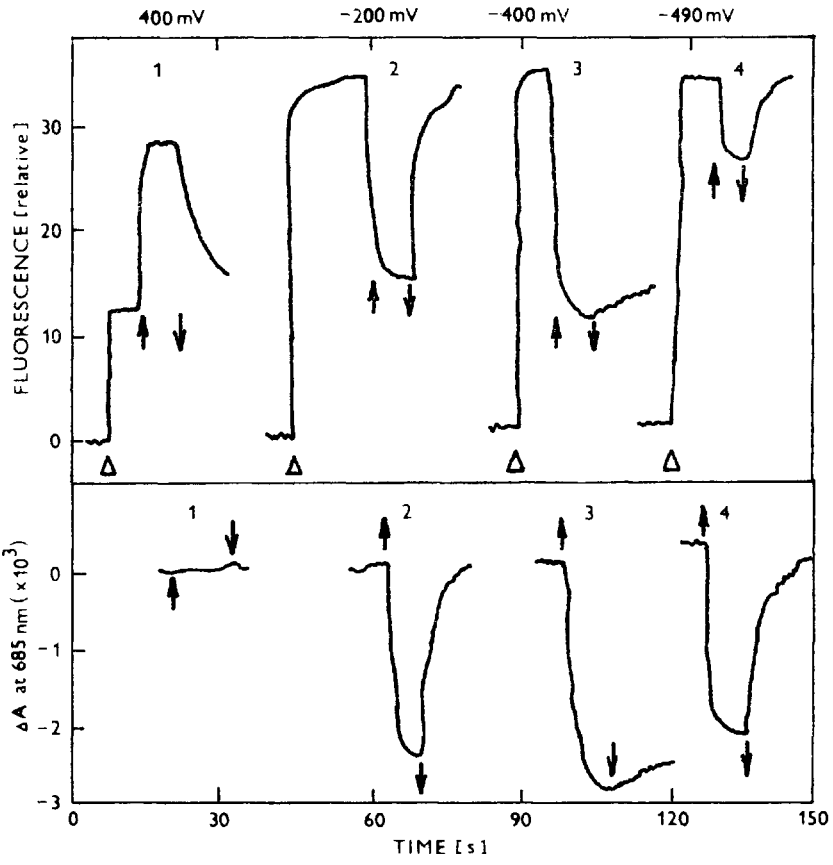


Fig. 1. Light-induced changes in Chl fluorescence yield (*top*) and absorbance changes (ΔA) at 685 nm (*bottom*) in DT-20 fragments enriched in PS 2 (*1—3*) as well as in Chl-protein complexes of PS 2 from pea chloroplasts (*4*) at indicated redox poise, 20 °C. Δ — measuring radiation exciting the Chl fluorescence, on; ↑ and ↓ — actinic light on and off, respectively. Chl concentration: 20 μg cm^{-3} for traces *1—3* and 7 μg cm^{-3} for trace *4*. (From Klimov *et al.* 1977a.)

The differential absorption spectrum of this photoprocess (Fig. 2*B*) is characterized by the bleaching of absorption bands at 685 and 545 nm (which are shifted to shorter wavelengths at photoreduction of Q (Fig. 2*A*)), and at 518, 422—428 and 408 nm, and by the development of broad absorption bands at 450, 658, and beyond 695 nm, and a narrow band at 676 nm. The spectrum can be interpreted as the result of photoreduction of Ph *a* to Ph^{-} accompanied

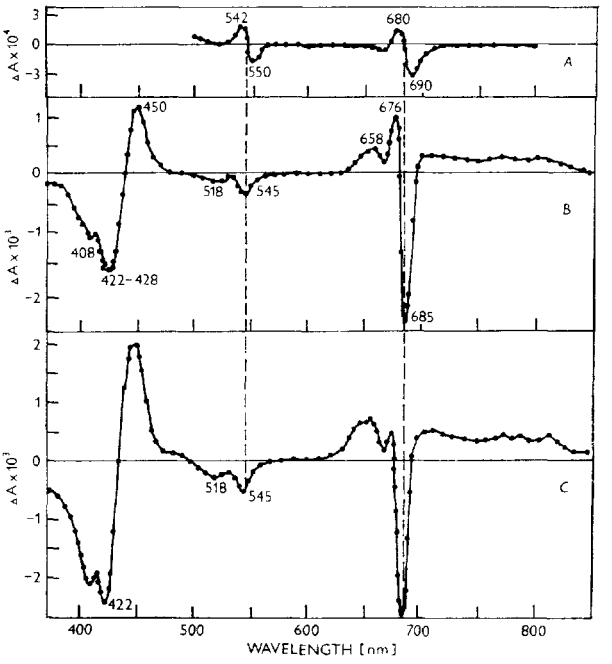


Fig. 2. Differential "light-minus-dark" absorption spectra upon photoreduction of both Q (at $E_h \approx +400$ mV), (*A*), and Ph (at $E_h \leqq -200$ mV), (*B*), in DT-20 fragments and upon photoreduction of Ph in Chl-protein complexes of PS 2 at $E_h \approx -490$ mV (*C*). (From Klimov *et al.* 1977a.)

by a short-wavelength shift of an absorption band near 680 nm. Formation of anion-radical Ph^{-} in the photoreaction is confirmed by the appearance of an EPR signal with $g \approx 2.0033$ and $\Delta H \approx 13$ G (Klimov *et al.* 1979b). Similar differential absorption spectrum and the EPR signal are observed upon reduction of Ph to Ph^{-} *in vitro* (Krasnovskiĭ 1960, Fujita *et al.* 1978); however, the main absorption bands of Ph in PS 2 are shifted to longer wavelengths by 15—20 nm (Klimov *et al.* 1977a, Fujita *et al.* 1978).

Thus the Ph photoreduction may occur in RC of PS 2 and Ph (like BPh in bacterial RC) may function as the primary ("intermediary") electron acceptor between P_{680} and Q (Klimov *et al.* 1977a). This suggestion is confirmed by a number of experimental data:

(*1*) Photoreduction of Ph is observed in various preparations containing active RC of PS 2: "heavy" fragments and Chl-protein complexes of PS 2 from pea chloroplasts as well as from mutants of *Chlamydomonas reinhardii* lacking photosystem 1 (PS 1); it is not seen in PS 1 preparations from pea, in *Chlamydomonas reinhardii* lacking PS 2, in light-harvesting complexes (Klimov *et al.* 1980a).

(*2*) The photoreaction is also observed in fresh-isolated chloroplasts (Klimov *et al.* 1979a,

1980a) showing that the "photoactive" Ph is not the result of Chl pheophytinization during isolation of PS 2 from chloroplasts by means of detergents. Besides, treatment of PS 2 preparations by detergent *Triton X-100* leads to a decrease (not increase) of the signal related to the Ph photoreduction (Klimov *et al.* 1980a). The "photoactive" Ph is also not the result of reversible or irreversible photopheophytinization of P_{680} or of antenna Chl under each cycle of illumination by actinic radiation. This conclusion follows from the data on bleaching of characteristic absorption bands of Ph upon the first (as well as the following) illumination cycle of the sample (Klimov *et al.* 1979a, 1980a).

(*3*) In various PS 2 preparations concentration of the "photoactive" Ph, determined by the use of differential extinction coefficient 32 mM^{-1} cm^{-1} at 685 nm (taken from the long-wavelength absorption maximum of Ph *in vitro* (Fujita *et al.* 1978)) is close to that of P_{680} and other components of PS reaction centres (Klimov *et al.* 1980a,b,c).

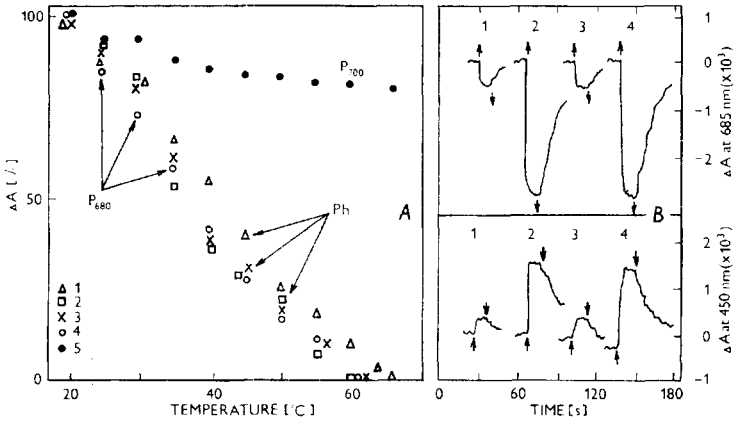


Fig. 3. Effect of both heat treatment and Mn^{++} addition on photoreduction of Ph in PS 2 preparations. (*A*) Absorbance changes as a function of the temperature used for preliminary 5 min incubation of Chl-protein complexes of PS 2: ΔA at 685 nm (*1*), 675 nm (*2*) and 655 nm (*3*), related to photoreduction of Ph at $E_h = -450$ mV; ΔA at 678 nm (*4*), related to photooxidation of P_{680} in the presence of 1 mM ferricyanide, and ΔA at 700 nm (*5*), related to photooxidation of P_{700} at $E_h = +50$ mV. — (*B*) Kinetics of ΔA at 685 nm and 450 nm, related to photoreduction of Ph in DT-20 fragments (after 1 h incubation with 0.8 M Tris-HCl at 2 °C) at $E_h = -300$ mV in the absence of additions (*1*) and in the presence of 50 μM $MnCl_2$ (*2*); 50 μM $MgCl_2$ (*3*), or 50 μM $MnCl_2$ plus 50 μM $MgCl_2$ (*4*). (From Klimov *et al.* 1980a.)

The photoreduction of Ph (as well as the reaction of photooxidation of P_{680}) is inhibited two-fold as the result of heating (for 5 min) of the samples at 40 °C and completely inhibited by heating to 55—60 °C (Fig. 3*A*). This is characteristic for photoreactions of PS 2; photooxidation of P_{700} in PS 1 remains after the treatment (Fig. 3*A*).

(*4*) In PS 2 preparations treated preliminarily with 0.8 M Tris-HCl (which inhibits the donor side of PS 2 due to extraction of Mn^{++} — Cheniae and Martin 1970), addition of exogenic Mn^{++} (capable to serve as an artificial electron donor to PS 2 and to restore the function of oxygen evolution in Tris-treated chloroplasts—Yamashita *et al.* 1969) drastically activates the reaction of Ph photoreduction whereas the addition of Mg^{++} has no effect (Fig. 3*B*).

(*5*) The photoreduction of Ph is observed only after prior reduction of Q, the "primary" electron acceptor of PS 2; it is accompanied by a 3- to 4-fold change of PS 2 chlorophyll fluores-

cence yield thcugh less than 1% of all pigment molecules bleach; this photoreaction can occur at temperatures as low as 100 K (Klimov *et al.* 1977a). The photoreduction of Ph is completely reversible in the dark, and the formed anion-radical Ph^{-} is very stable in spite of "aggressive" water environment. All these properties are characteristic of photoconversions of photosynthetic reaction centre components.

It is also noteworthy that a principal possibility of electron transfer from excited chlorophyll P_{680} to Ph follows from the comparison of the E_0' values for the couples Chl/Chl^{-} and Ph/Ph^{-} ($-0.84 \div -0.88$ V and $-0.61 \div -0.64$ V, respectively — Kiselev *et al.* 1976, Fujita *et al.* 1978) as well as of the capacity of the pigments to photoreduction (Evstigneev 1966, Krasnovskiĭ 1966, 1974, Pakshina and Krasnovsky 1974, Stolovitsky and Evstigneev 1975).

Photoinduced electron transfer from excited Chl to Ph has been recently shown both in cofacially linked dimers (Pellin *et al.* 1979) and in solution (Fedotova *et al.* 1980) of the pigments.

Nanosecond Chl Luminescence in PS 2 Accompanying Charge Recombination in $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^{-}]$

The experiments showing that Ph functions in PS 2 reaction centres have modified the view on the origin of the "variable Chl fluorescence" in this photosystem. In fact, if Ph, not Q, is the primary electron acceptor in PS 2 reaction centres then the reduction of Q would not be accompanied by increase in the fluorescence yield since RC remain in the photochemically active form $[P_{680}\ Ph]\ Q^{-}$. Experimental evidence has been obtained (Klimov *et al.* 1978) that the increase in Chl fluorescence accompanying reduction of Q is actually the appearance of luminescence resulting from charge recombination in $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^{-}]$ after charge separation in the primary photoreaction. Unlike the ordinary Chl fluorescence, this emission decreases upon lowering temperature from 0 to -100 °C (activation energy is about 0.04—0.08 eV), and it disappears completely as the result of the Ph photoreduction, indicating that Ph takes part in the formation of an ion-radical pair with a Chl (probably with P_{680}) (Klimov *et al.* 1978). These data also show that the return of the electron from Ph^{-} to the excited level of P_{680} requires an activation energy equal just to 0.04—0.08 eV. The low activation energy can account for a high quantum yield of this recombination luminescence, comparable with that of fluorescence (Klimov *et al.* 1978). Luminescence lifetime measurements showed that the $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^{-}]\ Q^{-}$ state decays to $[P_{680}\ Ph]\ Q^{-}$ during 2—4 ns (Klimov *et al.* 1978) or 4.3 ns according to a more accurate recent study (Shuvalov *et al.* 1980).

Besides the disappearance of recombination luminescence, the transition of RC to the photochemically inert state $[P_{680}\ Ph^{-}]\ Q^{-}$ should also induce an increase of Chl fluorescence yield. However, the latter effect is not observed probably due to quenching of excited singlet state of Chl by effective energy transfer to non-fluorescent anion-radical Ph^{-} which has broad absorption bands in the red and far-red spectral regions (Fig. 2*B*). A similar decrease of BChl fluorescence is observed upon photoreduction of BPh *a* in RC of *Chromatium* (Klimov *et al.* 1976, Shuvalov and Klimov 1976) while photoreduction of BPh *b* in *Rhodopseudomonas viridis* is accompanied by increase in fluorescence of antenna BChl (Klimov *et al.* 1977b).

The idea of the formation of an ion-radical pair including Ph in PS 2 reaction centres is also confirmed by the data on magnetic field-induced changes of PS 2 fluorescence which are inhibited by photoreduction of Ph (Klevanik *et al.* 1979).

Direct Detection of Charge Separation between P_{680} and Ph by Means of Nanosecond Flash Spectroscopy

As follows from the measurements of the recombination luminescence (Klimov *et al.* 1978, Shuvalov *et al.* 1980), the photoreaction $[P_{680}\ \mathrm{Ph}]\ Q^- \underset{\sim 4\ \mathrm{ns}}{\overset{+h\upsilon}{\rightleftharpoons}} [P_{680}^{+\cdot}\ \mathrm{Ph}^-]\ Q^-$ should be accompanied by absorbance changes with a life-time of about 4 ns and with a spectrum including absorbance changes of both P_{680} and Ph (Klimov *et al.* 1980a). Shuvalov *et al.* (1980) really found that irradiation of PS 2 (with Q pre-reduced in the dark) with a nanosecond laser pulse ($\lambda =$ $= 694.3$ nm) induces absorbance changes in the region 400—600 nm which appear during $\leqq 1$ ns and decay during ~4 ns (Fig. 4). These absorbance changes, as well as the nanosecond recombination luminescence, are not seen after preliminary photoreduction of Ph or after oxidation of Q. The spectrum of the absorbance changes decaying in ~4 ns is characterized by both bleaching in absorption bands at 415, 430, 515 and 540 nm and the development of absorption at 450—500 nm and at ~570 nm (Fig. 4). That is very close to the expected spectrum calculated as the sum of the differential absorption spectra for photooxidation of P_{680} and photoreduction of Ph (Fig. 4).

These data allow to conclude that, in fact, the primary photoreaction of PS 2 results in electron transfer from P_{680} to Ph with the formation of the ion-radical pair $[P_{680}^{+\cdot}\ \mathrm{Ph}^-]$ which decays during ~4 ns if Q is pre-reduced. When Q is oxidized, the electron from Ph^- is transferred to Q at least 10 times faster than back to $P_{680}^{+\cdot}$, *i.e.* in <400 ps. The conclusion follows from the experiments showing that oxidation of Q results in the decrease of both nanosecond recombination luminescence and the corresponding absorbance changes at least 10-fold (Klimov *et al.* 1978, Shuvalov *et al.* 1980).

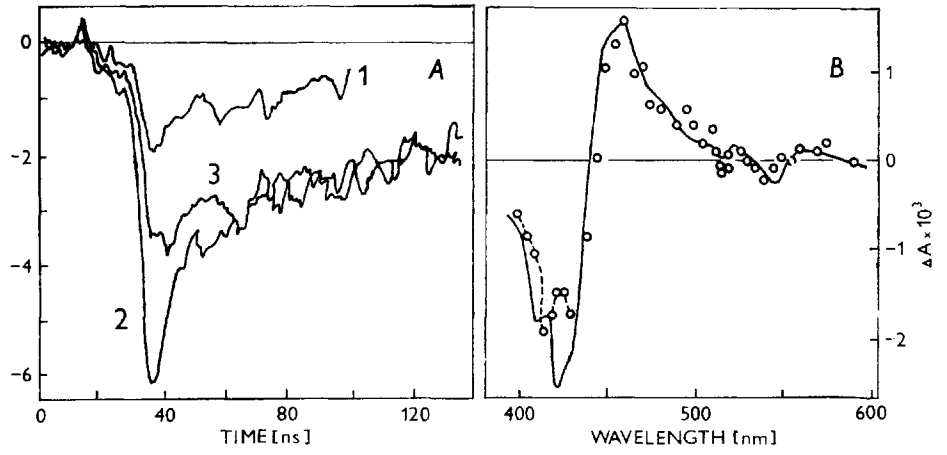


Fig. 4. Photoinduced absorbance changes, related to the formation of the state $[P_{680}^{+\cdot}\mathrm{Ph}^-]$ in PS 2 reaction centres: (*A*) Kinetics of absorbance changes at 415 nm, induced in TSF-IIa particles by 3 ns laser pulses at 694.3 nm, in the presence of 50 μM ferricyanide (*1*); at $E_h \approx$ ≈ -450 mV before (*2*) and after (*3*) preliminary irradiation with continuous actinic beam inducing photoreduction of Ph; 20 °C. Ordinate: ΔA at 415 nm ($\times 10^3$). (*B*) The spectrum of absorbance changes (o) with the life-time of ~4 ns for the case *2* on Fig. 4*A*. Solid curve shows the sum of spectra for $P_{680}^{+\cdot}$ and Ph^- formation measured earlier (Van Gorkom *et al.* 1975, Klimov *et al.* 1977a, 1980a). (From Shuvalov *et al.* 1980.)

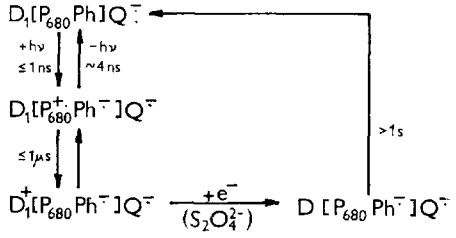
A suggestion for the existence of an electron acceptor (W) which has E'_0 lower than that of Q and acts between P_{680} and Q has been also put forward recently (Van Best and Duysens 1977) from the measurements of a 0.6 μs component of Chl delayed fluorescence in the presence of reduced Q. It is obvious that W is not identical with Ph since the ion-radical pair involving Ph recombines in the nanosecond time scale (not in the microsecond one). It is not excluded, however, that the microsecond delayed fluorescence is related to the formation of triplet states in PS 2 reaction centres or to charge recombination between Ph^- and an oxidized secondary electron donor of PS 2, D_1^+.

Photoaccumulation of the Long-Lived State $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^-$

Nanosecond spectroscopy shows that Ph remains in the reduced state during a time less than 400 ps after the charge separation if Q is oxidized, and during about 4 ns if Q is reduced. On the other hand, under continuous irradiation at $E_h \leqq -200$ mV the spectral effects related to the Ph photoreduction have a life-time longer than 1 s (Fig. 1). This appears to be related to the transition of RC from the state $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^-]\ Q^-$ (living ~4 ns) to the long-lived state $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^-$ due to fast electron transfer from D_1 to $P_{680}^{+\cdot}$ which competes with the charge recombination in $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^-]$ (Klimov *et al.* 1977a, 1980a). Requirement of the fast electron donation to $P_{680}^{+\cdot}$ for photoaccumulation of long-lived Ph^- is confirmed by the data on activation of this photoprocess upon addition of Mn^{++} acting on the donor side of PS 2 (Fig. 3).

Since the electron donation to $P_{680}^{+\cdot}$ occurs in $\leqq 1$ μs (Gläser *et al.* 1976, Van Best and Mathis 1978) and the charge recombination needs ≈ 4 ns (Klimov *et al.* 1978, Shuvalov *et al.* 1980), then the quantum yield for photoaccumulation of the state $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^-$ is expected to be equal to $\geqq 0.004$. An experimental estimation of the quantum yield based on the comparison of rates of photoinduced "fluorescence" changes related to photoreduction of both Ph and Q (Klimov *et al.* 1977a, 1980a), has given a close value (0.002—0.005).

Thus, it is possible to suggest the following scheme for photoaccumulation of the state $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^-$ at $E_h \leqq -200$ mV.



Since D_1 is reduced by electrons transferred from the medium (dithionite), only the effects related to photoreduction of Ph are observed under continuous irradiation.

EPR properties of PS 2 reaction centres with reduced Ph (Klimov *et al.* 1980b,c, 1981) indicated that the state $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^-$ is accumulated only under irradiation at 200—220 K. Continuous irradiation at room temperature probably results in electron transfer from Ph^- to Q^- with the formation of $[P_{680}\ Ph]\ Q^{--}$; and the state $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^{--}$ is accumulated as a result of a following cycle of Ph photoreduction. Similar processes have been described earlier in bacterial RC (Okamura *et al.* 1979).

Interaction of Ph with the Main Components of RC

Accumulation of long-lived states of PS 2 reaction centres with reduced Ph made it possible to study interaction of Ph^{-} with other components of the RC.

Photoreduction of Ph in PS 2 preparations at 220 K (favourable for photoaccumulation of the state $[P_{680}\, Ph^{-}]\, Q^{-}$) produces a broad "doublet" EPR signal centred at g = 2.00 with a splitting of 52 G at 7 K, in addition to a "narrow" EPR signal (g = 2.0033, ΔH = 13 G) attributed to anion-radical Ph^{-} (Fig. 5). Saturation of the doublet signal occurs at much higher values of microwave power ($\geqq$10 mW) than that of the narrow signal ($\leqq$5 μW); and the doublet signal is detectable only below 15 K (Klimov *et al.* 1980b,c, 1981). The doublet is observed also in spinach chloroplasts (Fig. 5), and its amplitude in various preparations is consistent with the content of PS 2 reaction centres (Klimov *et al.* 1980c, 1981).

Analysis of the characteristics of the EPR doublet in PS 2, made in accordance with the work of Schepler *et al.* (1975) shows that the signal may result from an exchange interaction between Ph^{-} and a paramagnetic centre with g-value of 1.8 (Klimov *et al.* 1980c, 1981). Thus, interaction of Ph^{-} with PQ^{-} (which has $g \approx 2.00$ *in vitro*) cannot produce the doublet. In bacterial RC a similar EPR doublet signal has been ascribed to an interaction of BPh^{-} with the reduced electron acceptor, a menaquinone-iron complex ($MQ^{-}-Fe^{++}$) possessing an EPR signal with $g \approx 1.8$ (Prince *et al.* 1977, Okamura *et al.* 1979). It has been suggested (Klimov *et al.* 1980b)

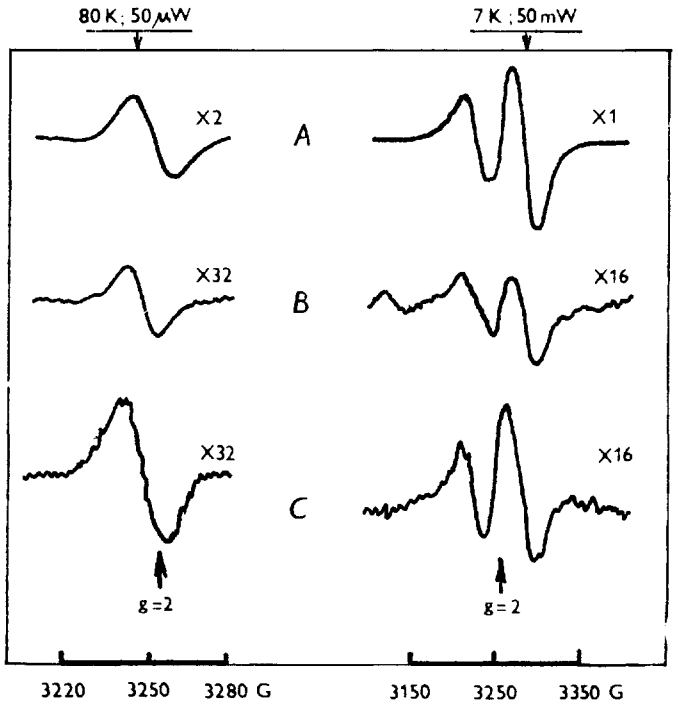


Fig. 5. EPR signal formed by photoreduction of Ph in PS 2 preparations at 220 K at $E_h \approx$ ≈ -450 mV: (*A*) TSF-II a; (*B*) chloroplasts; (*C*) TSF-II. The spectra show the difference between signals of separate, irradiated and unirradiated samples. Chl concentration 1.4 mg cm^{-3}. (From Klimov *et al.* 1980c, 1981.)

that the acceptor Q in PS 2 is also a complex of PQ with Fe^{++} (or with some other transition metal) and that an exchange interaction of Ph^{-} with $PQ^{-}-Fe^{++}$ is responsible for the EPR doublet. The suggestion is confirmed by the following data:

(*1*) The EPR doublet is absent after photoreduction of Ph in PS 2 at 300 K, *i.e.* at conditions which are favourable for photoaccumulation of the RC state with the twice-reduced, diamagnetic Q: $[P_{680}\ Ph^{-}]\ Q^{--}$ (Klimov *et al.* 1980b,c,).

(*2*) The EPR doublet is eliminated after extraction of PQ from lyophilized PS 2 preparations with hexane containing 0.13—0.16% methanol (though photoreduction of Ph remains); and it is restored by reconstitution of the samples with plastoquinone *A* (alone or with *β*-carotene) although not with vitamin K_1 (Klimov *et al.* 1980c, 1981).

(*3*) Photosystem-II preparations are found to contain ~2 non-heme atoms of iron (which are also not in the form of Fe-S proteins) per RC (Klimov *et al.* 1980c, 1981). Extraction of Fe with *o*-phenanthroline (2.5 mM) in the presence of $LiClO_4$ (0.5 M) decreases this value to $\leqq 0.6$ (Table 1) and completely eliminates the EPR doublet (Fig. 6). Partial restoration (to about 25% of the initial magnitude) of the doublet signal was achieved by subsequent incubation with 0.2 mM Fe^{++}, but not with either Mn^{++} (Fig. 6) or Mg^{++}.

Table 1

Effect of $LiClO_4$ treatment on iron content and EPR signal amplitudes.

Treatment	Fe/RC	Amplitude [%]	
		Doublet signal	Narrow signal
Untreated	1.8 ± 0.2	100	100
0.5 M $LiClO_4$	1.5 ± 0.2	100	100
0.5 M $LiClO_4$ + *o*-phenanthroline	0.6 ± 0.2	0	120
0.75 M $LiClO_4$ + *o*-phenanthroline	$\leqq 0.2$	0	110

The number of non-heme iron atoms per PS 2 reaction centre (Fe/RC) and the amplitudes of the EPR doublet at 7 K and the narrow EPR signal of Ph^{-} at 90 K in TSF-II fragments were determined before and after treatment with $LiClO_4$, alone or with 2.5 M *o*-phenanthroline. For details on the measuring and treatment conditions see the caption to Fig. 5. (From Klimov *et al.* 1980c, 1981.)

(*4*) The extraction of Fe from PS 2 results also in the development of a new photoinduced EPR signal at $E_h \approx +50$ mV with characteristics ($g \cong 2.0044$, $\Delta H \approx 9$ G) which correspond to anion-radical PQ^{-} (Klimov *et al.* 1980c, 1981). A similar EPR signal of semiquinone in bacterial RC is also seen only after removal of Fe (Prince *et al.* 1977, Okamura *et al.* 1979).

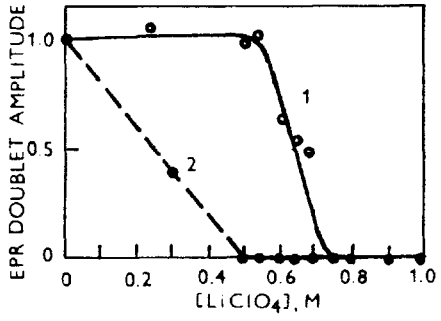
On the basis of these data the following conclusions have been made:

(*a*) The electron acceptor of PS 2, Q, is a $PQ-Fe^{++}$ complex. Reduction of PQ in this complex is not accompanied by the appearance of an EPR signal of PQ^{-} (with $g \approx 2.00$) due to interaction of PQ^{-} with Fe^{++}. An EPR signal of the complex $PQ^{-}-Fe^{++}$ appears to be located in the region $g \approx 1.8$.

(*b*) After photoaccumulation of the state $[P_{680}\ Ph^{-}]\ Q^{-}$ the anion-radical Ph^{-} is involved into an exchange interaction with the complex $PQ^{-}-Fe^{++}$ (resulting in the appearance of the

doublet EPR signal). It shows that Ph and Q are located closely together and gives a convincing argument for the view that Ph acts as the primary electron acceptor between P_{680} and Q.

If the EPR doublet in PS 2 is really a result of an exchange interaction of Ph^{-} with $PQ^{-} - Fe^{++}$,



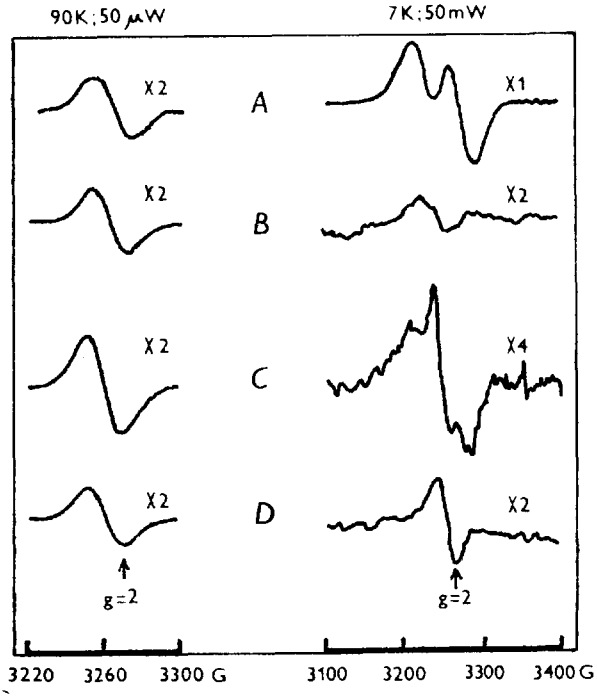


Fig. 6. Effect of $LiClO_4$ and *o*-phenanthroline on light-induced EPR signals of TSF-II fragments after phototrapping of Ph^{-} at 220 K (see Fig. 5). *Top*: magnitude of the doublet EPR signal as a function of treatment with various concentrations of $LiClO_4$ in the presence (– – – –) and absence (———) of 2.5 mM *o*-phenanthroline. *Bottom*: Spectra after treatment with 0.5 M $LiClO_4$ (*A*), and with 0.5 M $LiClO_4$ plus 2.5 mM *o*-phenanthroline (*B*); spectra *C* and *D* are the same as *B* but with additional 12 h incubation with 0.2 mM Fe^{2+} (*C*) or Mn^{2+} (*D*). Chl 1.5 mg cm^{-3}. (From Klimov *et al.* 1980c, 1981.)

then from the splitting of the signal (~52 G), it is possible to estimate the energy of the exchange interaction (~26 G) and the spin-exchange rate (~$4.5 \cdot 10^8$ s^{-1}) and thus, using the approximate relation (1) from the work of Likhtenstein *et al.* (1979), to evaluate the distance between Ph and $PQ-Fe^{++}$. Calculations show that the distance is about 0.8—0.9 r.m. A close value (0.75 to 1.0 nm) has been found earlier for the distance between BPh and $MQ-Fe^{++}$ in bacterial RC (Okamura *et al.* 1979).

(*c*) Disruption of the $PQ-Fe^{++}$ complex upon extraction of Fe^{++} results in the appearance of the photoinduced EPR signal of PQ^{-}, while the doublet EPR signal disappears because an interaction between Ph^{-} and PQ^{-} probably cannot give an EPR signal with such a splitting. It is also not excluded that in the absence of Fe^{++} dithionite reduces PQ to PQ^{--} even in the dark (Klimov *et al.* 1980c).

The conclusion about interaction of Ph and Q follows also from the data (Fig. 2*A*) showing that photoreduction of Q results in the shift of absorption bands of Ph at 545 nm (ascribed earlier (for review see Knaff 1977) to photoreduction of a pigment C_{550}) and at 685 nm (Van Gorkom *et al.* 1975, Klevanik *et al.* 1977, Klimov *et al.* 1977a).

Interaction of Ph^{-} with the other component of RC, P_{680}, is probably responsible for the short-wavelength shift of an absorption band near 680 nm observed upon photoreduction of Ph (Fig. 2*B*).

Effect of Photoreduction of Ph in PS 2 Reaction Centres on Triplet State of Carotenoids

In bacterial RC, charge recombination in the pair $[P_{890}^{+\cdot}\ Bph^{-}]$ leads to the formation of a triplet state of P_{890} and, subsequently, of carotenoids (Car) incorporated in the RC (due to the triplet-triplet energy transfer) (Monger *et al.* 1976, Shuvalov and Klimov 1976). Reaction centres of PS 2 probably also contain Car. That is indirectly confirmed by the data showing that after treatment of PS 2 with organic solvents restoration of the photoinduced signal of C_{550} needs both PQ and β-carotene (for review see Knaff 1977). Besides, the restoration of the doublet EPR signal in PS 2 by PQ is stimulated by an addition of β-carotene (Klimov *et al.* 1980c, 1981).

Excitation of Chl in chloroplasts, in preparations of PS 2, PS 1 and even in the light-harvesting complex leads to the formation of a triplet state of Car (^{3}Car) which, however, does not depend on the redox state of RC in both PS 1 and PS 2 and is ascribed to the formation of a triplet excited state in antenna Chl and subsequent energy migration from ^{3}Chl to Car (Mathis *et al.* 1979). However, it has been shown recently (Klimov *et al.* 1980d, 1981) that at least a part of the ^{3}Car in PS 2 depends on the redox state of RC: the formation of ^{3}Car increases several times upon reduction of Q and decreases 2-3-fold upon photoreduction of Ph. These data are in a good agreement with the idea that the triplet excitation is formed in RC as a result of charge recombination in the pair $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^{-}]$ (Klimov *et al.* 1980d, 1981). Triplet excitation arising from charge recombination in the ion-radical pair can be probably located on either P_{680} or Ph (since the difference between the levels of ^{3}Chl and ^{3}Ph *in vitro* is very small (Krasnovskiĭ jr. *et al.* 1974) and then it is transferred to the lower level of ^{3}Car. A functional significance of the energy transfer to Car may be the protection of Chl in RC from the long-lived triplet excited state capable of causing destructive photodynamic processes in the RC (Klimov *et al.* 1981).

Estimation of E_0' for Ph/Ph^{-} and $P_{680}^{+\cdot}/P_{680}$

Redox titration of the reversible photoinduced absorbance changes related to photoreduction of Ph in PS 2 has shown that their magnitude is maximal in the E_h region from —480 to —500 mV

and decreases considerably upon lowering E_h to $-600 \div -650$ mV, this dependence being in a good agreement with the theoretical curve obtained from the Nernst equation for one-electron dark reduction of a substance with $E'_0 = -610$ mV (Klimov *et al.* 1979a). E_h lower than -600 mV were achieved in these experiments by raising pH up to 10–11, which might cause inactivation of the sample. However, the decrease of the absorbance changes, obtained at low E_h, was obviously related to dark reduction of Ph, rather than to an inactivation effect of high pH, since these absorbance changes recovered to 90–95% of their initial value upon raising E_h from -620 mV to -500 mV (with ferricyanide) at pH 10.5, *i.e.* the titration was reversible.

The value of E'_0 for Ph/Ph^- in PS 2 estimated from these data is about -610 ± -30 mV (Klimov *et al.* 1979a). This value practically coincides with E'_0 of Ph in solutions ($-610 \div -640$ mV) while E'_0 of Chl/Chl^- is equal to $-840 \div -880$ mV (Kiselev *et al.* 1976, Fujita *et al.* 1978). The data obtained (Klimov *et al.* 1979a) confirm, on the one hand, that it is Ph which undergoes the photoreduction and, on the other hand, they allow to estimate other energetic characteristics of PS 2 reaction centres. In fact, since the energy of a quantum absorbed by P_{680} is equal to 1.8–1.82 eV, the energy barrier between the level of $[P^{+\cdot}_{680}\, Ph^-]$ and that of excited P_{680} ($^1P_{680}$) is about 0.04–0.08 eV (Klimov *et al.* 1978) and E'_0 for Ph/Ph^- is equal to $-610 \pm \pm 30$ mV, then E'_0 for $P^{+\cdot}_{680}/P_{680}$ should be equal to $+1.12 \pm 0.05$ V (Klimov *et al.* 1979a). This value is quite reasonable for E'_0 of P_{680}, since $P^{+\cdot}_{680}$ should be able to oxidize H_2O to O_2 ($E'_0 = +0.81$ V) and, thus, the difference of about 0.3 eV can provide an effective course of the process.

Electron-Nuclear Double Resonance (ENDOR) of Ph^- in PS 2

Characteristics of the EPR signal of Ph^- along with the value of E'_0 of Ph has allowed to make the conclusion on the function of a monometric form of Ph in PS 2 (Klimov *et al.* 1979b). The most convincing confirmation of this view has been provided recently (Fajer *et al.* 1980) in ENDOR experiments which show that constants of hyperfine proton splitting for the anion-radical of Ph in PS 2 correspond to those of a monomeric (not oligomeric) form of Ph^- or Chl^-. (The choice of Ph is based on the bleaching of the absorption bands at 545 and 515 nm, characteristic of Ph only (Fig. 2), and on the estimation of E'_0 for Ph/Ph^- (Klimov *et al.* 1979a).

A Scheme of Charge Separation and Stabilization in PS 2 Reaction Centres

From available data, the sequence, kinetic and energetic characteristics of early reactions in PS 2 reaction centres may be summarized in the following scheme.

Singlet excitation of P_{680} ($E'_0 \approx 1.12$ V) leads to electron transfer from $^1P_{680}$ to Ph ($E'_0 \approx \approx -0.61$ V) in less than 1 ns. The process is accompanied by an energy loss of $\sim$0.06 eV and results in the formation of the ion-radical pair $[P^{+\cdot}_{680}\, Ph^-]$. Charge recombination in this pair (which could occur during 4 ns) is prevented by faster ($<$400 ps) electron transfer from Ph^- to the "stable" electron acceptor Q ($E'_0 \approx -130$ mV), which appears to be a PQ-Fe^{++} complex. This electron transfer is accompanied by a loss of $\sim$0.5 eV leading to the formation of the state $[P^{+\cdot}_{680}\, Ph]\, Q^-$ which recombines much slower ($\sim$150 μs) than the pair $[P^{+\cdot}_{680}\, Ph^-]\, Q^-$. Recombination of the state $[P^{+\cdot}_{680}\, Ph]\, Q^-$ is prevented by faster ($\leqq$1 μs) reduction of $P^{+\cdot}_{680}$ with electrons from a secondary donor D_1. The latter reaction leads to further stabilization of the separated charges. Reduction of D_1^+ leads ultimately to oxidation of H_2O and electron from PQ^--Fe^{++} goes to the electron transport chain between two photosystems.

If Q has been reduced before the photoinduced separation of charges, the donation of an electron from D_1 to $P^{+\cdot}_{680}$ results in the formation of the long-lived state $[P_{680}\, Ph^-]\, Q^-$, otherwise the

electron from Ph^- returns to $P_{680}^{+\cdot}$ in ~4 ns. The latter process is accompanied (with a certain probability) by either luminescence or formation of triplet excitation in the RC; transfer of the triplet excitation from P_{680} or Ph to Car prevents photoinactivation of the RC.

The scheme in Fig. 7 shows that PS 2 reaction centres, especially their acceptor system, have a number of properties which are similar to those of RC of purple photosynthetic bacteria. They

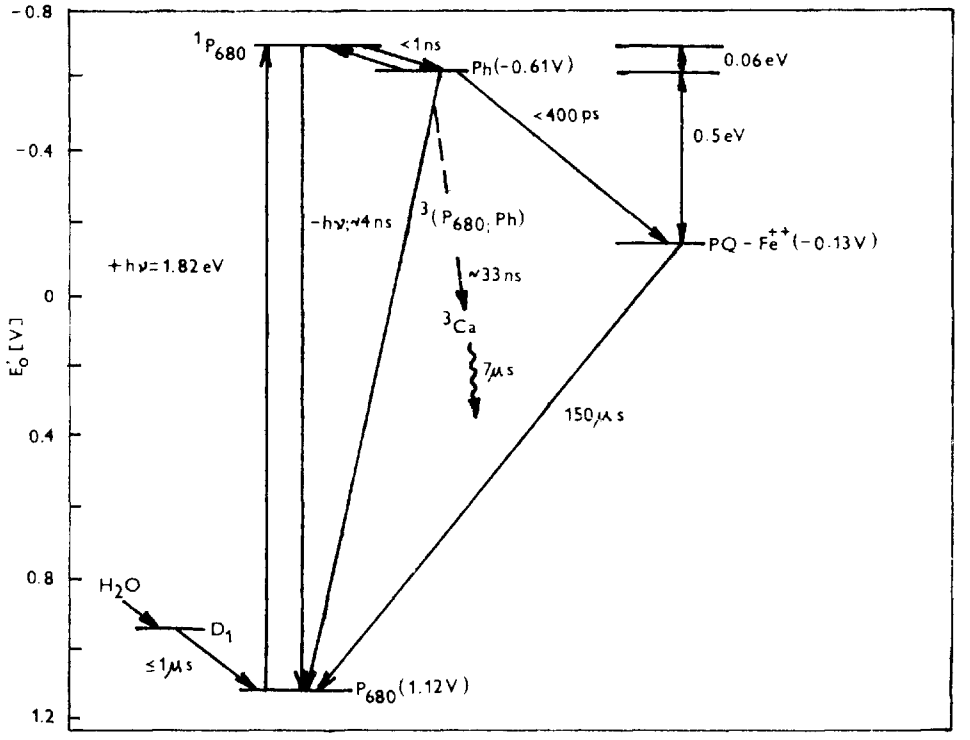


Fig. 7. A proposed scheme of electron phototransfer in PS 2 reaction centres.

are: (*1*) participation of Ph, not Chl as in PS 1 (Shuvalov *et al.* 1979), as the primary and a PQ-Fe^{++} complex as the "stable" electron acceptors; (*2*) interaction between Ph and PQ-Fe^{++} revealed both by the doublet EPR signal at $T < 15$ K and by a shift of absorption bands of Ph under photoreduction of Q; (*3*) the appearance of nanosecond recombination luminescence of Chl with activation energy about 0.1 eV upon reduction of Q; (*4*) the formation of a triplet excited state in RC resulting probably from recombination of the ion-radical pair $[P_{680}^{+\cdot}\ Ph^-]$ and its transfer to carotenoids (Ca); (*5*) photoaccumulation of a long-lived state $[P_{680}\ Ph^-]\ Q^-$ after prior reduction of Q which occurs due to fast reduction of $P_{680}^{+\cdot}$ from D_1.

Suggestion on the community in the origin of PS 2 and photosystem of purple photosynthetic bacteria throughout the evolution of photosynthesis can be made from this comparison.

REFERENCES

Cheniae, G. M., Martin, I. F.: Sites of function of manganese within photosystem II. Roles in O_2 evolution and system II. — Biochim. biophys. Acta **197**: 219—239, 1970.

Döring, G., Renger, G., Vater, J., Witt, H. T.: Properties of the photoactive chlorophyll-a_{II} in photosynthesis. — Z. Naturforsch. **24***B*: 1139—1143, 1969.

Duysens, L. N. M., Sweers, H. E.: Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. — In: Miyachi, S. (ed.): Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria. Pp. 253—372. Univ. Tokyo Press, Tokyo 1963.

Evstigneev, V. B.: Issledovanie fotosensibilizatsii okislitel'no-vosstanovitel'nykh khlorofillom i ego analogami èlektrometricheskimi metodami. [Study of photosensibilization of oxido-reduction reactions by chlorophyll and its analogues by means of electrometric methods .]— In: Èlementarnye Fotoprotsessy v Molekulakh. Pp. 243—266. Nauka, Moskva—Leningrad 1966.

Fajer, J., Brune, D. C., Davis, M. S., Forman, A., Spaulding, L. D.: Primary charge separation in bacterial photosynthesis: Oxidized chlorophylls and reduced pheophytin. — Proc. nat. Acad. Sci. USA **72**: 4956—4960, 1975.

Fajer, J., Davis, M. S., Forman, A., Klimov, V. V., Dolan, E., Ke, B.: Primary electron acceptors in plant photosynthesis. — J. amer. chem. Soc. **102**: 7143—7145, 1980.

Fedotova, E. Ya., Stolovitskiĭ, Yu. M., Frankevich, E. L.: Vliyanie magnitnogo polya na obrazovanie razdelennykh zaryadov v fotoreaktsiyakh s uchastiem khlorofilla *a*. [Effect of magnetic field on the formation of separated charges in photoreactions involving chlorophyll *a*.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **254**: 423—427, 1980.

Fujita, I., Davis, M. S., Fajer, J.: Anion radicals of pheophytin and chlorophyll *a*: their role in the primary charge separations of plant photosynthesis. — J. amer. chem. Soc. **100**: 6280 to 6282, 1978.

Gläser, M., Wolff, C., Renger, G.: Indirect evidence for a very fast recovery kinetics of chlorophyll-a_{II} in spinach chloroplasts. — Z. Naturforsch. **31***C*: 712—721, 1976.

Karapetyan, N. V.: Peremennaya fluorestsentsiya khlorofilla pri fotosinteze. [Variable fluorescence of chlorophyll in photosynthesis.] — Uspekhi sovrem. Biol. **82**: 370—386, 1977.

Karapetyan, N. V., Klimov, V. V.: Priroda obratimogo i neobratimogo umen'sheniya fluorestsentsii pri osveshchenii khloroplastov v vosstanovitel'nykh usloviyakh. [Nature of reversible and irreversible decrease of fluorescence during illumination of the chloroplasts under reductive conditions.] — Fiziol. Rast. **20**: 545—553, 1973.

Karapetyan, N. V., Klimov, V. V., Krakhmaleva, I. N., Krasnovskiĭ, A. A.: Induktsiya fluorestsentsii khloroplastov i khromatoforov v vosstanovitel'nykh usloviyakh. [Induction of fluorescence in chloroplasts and chromatophores under reductive conditions.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **201**: 1244—1247, 1971.

Kiselev, B. A., Kozlov, Yu. N., Evstigneev, V. B.: Ob okislitel'no-vosstanovitel'nykh potentsialakh vozbuzhdennogo sostoyaniya khlorofilla. [Oxidation-reduction potentials of the excited state of chlorophyll.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **266**: 210—213, 1976.

Klevanik, A. V., Klimov, V. V., Shuvalov, V. A., Krasnovskiĭ, A. A.: Vosstanovlenie feofitina v svetovoĭ reaktsii fotosistemy II vysshikh rasteniĭ. [Reduction of pheophytin in the light reaction of the photosystem II of higher plant..] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **236**: 241—244, 1977.

Klevanik, A. V., Shuvalov, V. A., Goryushkin, G. E.: Sostoyanie feofitina i vliyanie magnitnogo polya na vykhod lyuminestsentsii *Chromatium minutissimum* i fotosistemy 2 zelenykh rasteniĭ. [State of pheophytin and effect of magnetic field on the luminescence yield in *Chromatium minutissimum* and photosystem 2 of green plants.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **249**: 1238—1241, 1979.

Klimov, V. V.: Issledovanie Fotoindutsirovannykh Izmenenii Fluorestsentsii Khlorofilla pri Fotosinteze. [Investigation of Photoinduced Changes of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis.] — Thesis. Moskva 1973.

Klimov, V. V., Allakhverdiev, S. I., Demeter, Sh., Krasnovskiĭ, A. A.: Fotovosstanovlenie feofitina v fotosisteme 2 khloroplastov v zavisimosti ot okislitel'no-vosstanovitel'nogo potentsiala sredy. [Photoreduction of pheophytin in photosystem 2 of chloroplasts with respect to the redox potential of the medium.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **249**: 227—230, 1979a.

Klimov, V. V., Allakhverdiev, S. I., Krasnovskiĭ, A. A.: Signal Ė.P.R. pri fotovosstanovlenii feofitina v reaktsionnykh tsentrakh fotosistemy 2 khloroplastov. [EPR signal at the photoreduction of pheophytin in photosystem-2 reaction centres of chloroplasts.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **249**: 485—488, 1979b.

Klimov, V. V., Allakhverdiev, S. I., Pashchenko, V. Z.: Izmerenie ėnergii aktivatsii i vremeni zhizni fluorestsentsii khlorofilla fotosistemy 2. [Measurement of the activation energy and lifetime of fluorescence of photosystem 2 chlorophyll.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **242**: 1204 to 1207, 1978.

Klimov, V. V., Allakhverdiev, S. I., Shutilova, N. I., Krasnovskiĭ, A. A.: Issledovanie fotovosstanovleniya feofitina i fotookisleniya khlorofilla P_{680} na preparatakh fotosistemy II iz khloroplastov gorokha i *Chlamydomonas reinhardii*. [Investigation of pheophyt in photoreduction and chlorophyll P_{680} photooxidation with preparations of photosystem II from pea and *Chlamydomonas reinhardii* chloroplasts.] — Fiziol. Rast. **27**: 315—326, 1980a.

Klimov, V. V., Dolan, E., Ke, B.: EPR properties of an intermediary electron acceptor (pheophytin) in Photosystem II reaction centers at cryogenic temperatures. — FEBS Lett. **112**: 97—100, 1980b.

Klimov, V. V., Dolan, E., Ke, B.: Issledovanie funktsii feofitina, plastokhinona, zheleza i karotinoidov v reaktsionnykh tsentrakh fotosistemy 2 rastenii. [Investigation of the function of pheophytin, plastoquinone, iron and carotenoids in photosystem 2 reaction centres of plants.] — Biofizika **26**: 802—808, 1981.

Klimov, V. V., Dolan, E., Shaw, E. R., Ke, B.: Interaction between the intermediary electron acceptor (pheophytin) and a possible plastoquinone-iron complex in photosystem-II reaction centers. — Proc. nat. Acad. Sci. USA — biol. Sci. **77**: 7227—7231, 1980c.

Klimov, V. V., Ke, B., Dolan, E.: Effect of photoreduction of the Photosystem II intermediary electron acceptor (pheophytin) on triplet state of carotenoids. — FEBS Lett. **118**: 123—126, 1980d.

Klimov, V. V., Klevanik, A. V., Shuvalov, V. A., Krasnovsky, A. A.: Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosystem II. — FEBS Lett. **82**: 183—186, 1977a.

Klimov, V. V., Shuvalov, V. A., Krakhmaleva, I. N., Karapetyan, N. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Izmeneniya vykhoda fluorestsentsii bakteriokhlorofilla pri fotovosstanovlenii bakteriofeofitina v khromatoforakh purpurnykh sernykh bakterii. [Bacteriochlorophyll fluorescence changes related to the bacteriopheophytin photoreduction in the chromatophores of purple sulfur bacteria.] — Biokhimiya **41**: 1435—1441, 1976.

Klimov, V. V., Shuvalov, V. A., Krakhmaleva, I. N., Klevanik, A. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Fotovosstanovlenie bakteriofeofitina *b* v pervichnoĭ svetovoĭ reaktsii khromatoforov *Rhodopseudomonas viridis*. [Photoreduction of bacteriopheophytin *b* in the primary light reaction of *Rhodopseudomonas viridis* chromatophores.] — Biokhimiya **42**: 519—530, 1977b.

Knaff, D. B.: The primary reaction of plant photosystem II. — Photochem. Photobiol. **26**: 327—340, 1977.

Krasnovskiĭ, A. A.: Fotokhimiya khlorofilla i ego analogov. [Photochemistry of chlorophyll and its analogues.] — In: Ėlementarnye Fotoprotsessy v Molekulakh. Pp. 213—242. Nauka, Moskva—Leningrad 1966.

Krasnovskiĭ, A. A.: Preobrazovanie Ėnergii Sveta pri Fotosinteze. Molekulyarnye Mekhanizmy.

[Transformation of Light Energy in Photosynthesis. Molecular Mechanisms.] — 29-e Bakhovskoe Chtenie. Nauka, Moskva 1974.

Krasnovskiĭ, A. A.: Reaktsiya obratimogo fotokhimicheskogo vosstanovleniya khlorofilla, ego analogov i proizvodnykh. [Reaction of reversible photochemical reduction of chlorophyll, its analogues and derivatives.] — Uspekhi Khim. **26**: 736—759, 1960.

Krasnovskiĭ, A. A., Shaposhnikova, M. G.: Fluorometricheskiĭ metod opredeleniya feofitina v list'yakh rasteniĭ. [Fluorimetric method of pheophytin determination in plant leaves.]— Fiziol. Rast. **17**: 436—439, 1970.

Krasnovskiĭ, A. A., jr., Lebedev, N. N., Litvin, F. F.: Spektral'nye kharakteristiki fosforestsentsii khlorofillov i feofitinov *a* i *b*. [Spectral characteristics of phosphorescence of chlorophylls and pheophytins *a* and *b*.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **216**: 1406—1409, 1974.

Krasnovsky, A. A.: The primary processes of photosynthesis in plants. — Annu. Rev. Plant Physiol. **11**: 363—408, 1960.

Krasnovsky, A.A.: The fragments of the photosynthetic electron transfer chain in model systems. — Biophys. J. **12**: 749—763, 1972.

Krasnovsky, A. A., Bystrova, M. I.: Self-assembly of chlorophyll aggregated structures. — BioSystems **12**: 181—194, 1980.

Likhtenstein, G. I., Kotelnikov, A. I., Kulikov, A. V., Syrtsova, L. A., Bogatyrenko, V. R., Melnikov, A. I., Frolov, E. N., Berg, A. I.: Some peculiarities of the electron transfer in redox systems. — Int. J. Quantum Chem. **16**: 419—435, 1979.

Malkin, R., Bearden, A. J.: Laser-flash-activated electron paramagnetic resonance studies of primary photochemical reactions in chloroplasts. — Biochim. biophys. Acta **396**: 250—259, 1975.

Mathis, P., Butler, W. L., Satoh, K.: Carotenoid triplet state and chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts and subchloroplast particles. — Photochem. Photobiol. **30**: 603—614, 1979.

Monger, T. G., Cogdell, R. J., Parson, W. W.: Triplet states of bacteriochlorophyll and carotenoids in chromatophores of photosynthetic bacteria. — Biochim. biophys. Acta **449**: 136—153, 1976.

Okamura, M. Y., Issacson, R. A., Feher, G.: Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. — Biochim. biophys. Acta **546**: 394—417, 1979.

Okayama, S., Butler, W. L.: The influence of cytochrome b_{559} on the fluorescence yield of chloroplasts at low temperature. — Biochim. biophys. Acta **267**: 523—529, 1972.

Pakshina, E. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Issledovanie fotovosstanovleniya bakteriokhlorofilla, khlorofilla i ikh bezmagnievykh proizvodnykh sul'fidom natriya i serovodorodom. [Photoreduction of bacteriochlorophyll, chlorophyll and their magnesium-free derivatives with sodium sulphide and hydrogen sulphide.] — Biofizika **19**: 238—243, 1974.

Parson, W. W., Cogdell, R. J.: The primary photochemical reaction of bacterial photosynthesis. — Biochim. biophys. Acta **416**: 105—149, 1975.

Pellin, M. J., Kaufmann, K. J., Wasilevski, M.: *In vitro* duplication of the primary light-induced charge separation in purple photosynthetic bacteria. — Nature **278**: 54—55, 1979.

Prince, R. C., Tiede, D. M., Thornber, J. P., Dutton, P. L.: Spectroscopic properties of the intermediary electron carrier in the reaction center of *Rhodopseudomonas viridis*. Evidence for its interaction with the primary acceptor. — Biochim. biophys. Acta **462**: 467—490, 1977.

Sauer, K.: Photosynthesis — the light reactions. — Annu. Rev. Phys. Chem. **30**: 155—178, 1979.

Schepler, K. L., Dunham, W. R., Sands, R. H., Fee, J. A., Abeles, R. H.: A physical explanation of the EPR spectra observed during catalysis by enzymes utilizing coenzyme B_{12}. — Biochim. biophys. Acta **397**: 510—518, 1975.

Shuvalov, V. A., Ke, B., Dolan, E.: Kinetic and spectral properties of the intermediary electron

acceptor A_1 in photosystem I. Subnanosecond spectroscopy. — FEBS Lett. **100**: 5—8, 1979.

Shuvalov, V. A., Klimov, V. V.: The primary photoreactions in the complex cytochrome-*P*-890. *P*-760 (bacteriopheophytin$_{760}$) of *Chromatium minutissimum* at low redox potentials. — Biochim. biophys. Acta **440**: 587—599, 1976.

Shuvalov, V. A., Klimov, V. V., Dolan, E., Parson, W. W., Ke, B.: Nanosecond fluorescence and absorbance changes in photosystem II at low redox potential. Pheophytin as an intermediary electron acceptor. — FEBS Lett. **118**: 279—282, 1980.

Shuvalov, V. A., Krasnovskiĭ, A. A.: Fotokhimicheskiĭ perenos ėlektrona v reaktsionnykh tsentrakh fotosinteza. [Photochemical electron transfer in reaction centres of photosynthesis.] — Biofizika **26**: 544—556, 1981.

Stiehl, H. H., Witt, H. T.: Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. — Z. Naturforsch. **24***b*: 1588—1598, 1969.

Stolovitskiĭ, Yu. M., Evstigneev, V. B.: Issledovanie pervichnykh fotoprotsessov v molekulakh pigmentov ėlektrometricheskimi metodami. [Studying of primary photoprocesses in pigment molecules by electrometric methods.] — In: Metody Issledovaniya Fotokhimicheskikh Reaktsiĭ Fotosinteza *in Vitro* i *in Vivo*. Pp. 124—137. Pushchino 1975.

Van Best, J. A., Duysens, L. N. M.: A one microsecond component of chlorophyll luminescence suggesting a primary acceptor of System II of photosynthesis different from Q. — Biochim. biophys. Acta **459**: 187—206, 1977.

Van Best, J. A., Mathis, P.: Kinetics of reduction of the oxidized primary electron donor of Photosystem II in spinach chloroplasts and in *Chlorella* cells in the microsecond and nanosecond time ranges following flash excitation. — Biochim. biophys. Acta **503**: 178—188, 1978.

Van Gorkom, H. J., Pulles, M. P. J., Wessels, J. S. C.: Light-induced changes of absorbance and electron spin resonance in small photosystem II particles. — Biochim. biophys. Acta **408**: 331—339, 1975.

Yamashita, K., Itoh, M., Shibata, K.: Activation by manganese of photochemical oxygen evolution and $NADP^+$ photoreduction in chloroplasts. — Biochim. biophys. Acta **189**: 133—135, 1969.

BioSystems, 14 (1981) 81–87
© Elsevier/North-Holland Scientific Publishers Ltd.

EVOLUTION OF UPHILL ELECTRON TRANSFER

A.A. KRASNOVSKY

A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, USSR

(Received July 14th, 1980)
(Revision received January 14th, 1981)

The evolution of photosynthetic energy storage is considered. The primary event in primordial inorganic or organic photoreceptors was charge separation at the expense of light quantum energy. The subsequent improvement of energy storage was attained by separately channeling electrons and "holes" to prevent back reactions. The anisotropic arrangement of photoreceptors in the primary membrane caused a coupling of photochemical charge separation to subsequent ion dislocation and was a prerequisite of primary photophosphorylation. The gradual improvement of the molecular organization of photoreceptor units resulted in antenna and reaction center development. The "hole" was primary located on a peculiar photoreceptor form and the electron passed by tunneling through the chain of intermediate carriers (chlorophylls and pheophytins); thus long-lived charge separation was achieved. The use of the electrons and the "holes" stored in reaction centers for the functioning of the photosynthetic electron transfer chain was realized by cyclic and non-cyclic pathways when the coupling of two photochemical events became the more perfect mechanism to use water molecule as an ultimate electron donor. The appearance of primitive cells inevitably required the coupling of the solar energy conversion mechanism to the reproduction mechanism which used stored solar energy.

Introduction

Stable long-lived organic compounds, as well as molecular oxygen produced by plant photosynthesis, are used in metabolism by all organisms living on our planet. Therefore, the practical problems of photosynthesis include not only quantum energy conversion into potential chemical energy, but the long-term storage of that energy, which is a prerequisite for its further utilization by various organisms.

During evolution an efficient mechanism has been worked out for the conversion of solar radiation in the chain of uphill electron transfer reactions. In the contemporary photosynthetic cell, the energy of light quanta absorbed by the bulk of the chlorophyll migrates to reaction centers which directly participate in the electron transfer. The study of reaction centers has revealed that the primary conversion of quantum energy results in the charge separation. In the chain of fast electron transfer processes occurring in the picosecond range, electrons and holes are stabilized at the ultimate molecular points of reaction center.

The evolution of uphill electron transfer in photosynthesis seems to follow the way of the most effective utilization of separated charges (electrons and holes) produced under the action of light quanta on the photoreceptors. This required the development of membrane structures, which separate spatially the metabolic pathways of electrons and holes. We present here a brief outline of this concept. The pathways of the evolution of photosynthesis were considered recently by several authors (see, for example, Broda, 1978; Krasnovsky, 1959–1976; Olson, 1978; etc.).

Sources of information

The question arises: does the origin of life

depend on photosynthetic conversion of solar energy? A.I. Oparin (1957) presented convincing arguments that photosynthesis developed after the primary heterotrophic organisms originated their metabolism based on the use of abiogenic organic matter. But an experimental approach is needed to solve the problem. Let us consider the sources of information available.

Investigation of space and planets, geology and paleontology, comparative evolutionary biology, and model experiments are the main approaches to experimental exploration of the problem.

The study of interstellar space reveals each year new organic molecules, and even possible ways of their polymerization following the tunnel mechanism (Goldansky, 1979). Although planetary exploration has not yet revealed the presence of life, such research may do so in the future. Studies of the chemical composition and the fine structure of Precambrian rocks have shown a great many organic compounds probably resulting from the decomposition of biogenic organic matter. Extremely important has been the discovery of microfossils resembling contemporary blue-green algae in the oldest Precambrian rocks dated more than 3 billion years. These organisms are the most ancient species ever found by geologists.

Evolutionary and comparative biochemistry have been studying the possible ways of biological evolution and its many-fold branches. But among the organisms now existing on our planet are none filling the gap between chemical and biological evolution. The most primitive cells existing now are complex, having a reproductive apparatus based on the principle of the DNA double helix, and a great number of proteins and enzymes. There is a possibility to observe ancient metabolic patterns in the metabolism of contemporary cells. As far back as in 1939 Gaffron discovered that unicellular green algae are capable of bacterial type photosynthesis as a result of anaerobic adaptation, using hydrogen as an electron donor, and they can also evolve hydrogen under the action of light (see for review, Gaffron, 1972).

The most impressive experiments are the models created to simulate the photo- and radiochemical reactions in the anaerobic atmosphere of the primitive Earth. The action of different kinds of radiation or electric discharges on mixtures of simple inorganic compounds (ammonia, water, carbon dioxide, methane) produces a vast number of organic compounds (see reviews by Pasynsky and Pavlovskaya, 1964; Ponnamperuma, 1972; etc.). Polymeric molecules were probably formed, by the catalytic actions of inorganic constituents of the Earth's crust.

Using polymeric substances, macroscopic heterogenous structures were constructed in the laboratory and considered as models of primitive cells, e.g. Oparin's coacervates, Fox's microspheres, Egami's marisomes. Unfortunately, in the model experiments, it has not yet been possible to construct the simplest self-reproducing systems which may be considered a working model of the primary cell. We know rather definitely that for self-reproduction the principle of the DNA double helix won the competition, but probably along the way there were blind alleys of evolution that may be based on the use of inorganic matrices.

Is it possible to obtain knowledge of the jump from prebiological chemical development to the primary appearance of the self-reproducing cell? Perhaps the high-risk science of planetary exploration will reveal the missing link, but the avenues of Precambrian geology, evolutionary biology and creation of models in the laboratory also look hopeful.

Prebiological photochemistry

Let us consider the variety of photochemical processes which may proceed on the primitive Earth.

Most investigators are of the opinion

that the atmo- and hydrosphere of the primitive Earth contained water, carbon dioxide, methane, ammonia and hydrogen, apart from inorganic components of the Earth's crust. The primary atmosphere was transparent for ultraviolet solar radiation, unlike the contemporary atmosphere which contains ozone which absorbs shortwave ultraviolet up to 280—300 nm. At that ancient time the Earth had no oxygen atmosphere created by green plant photosynthesis. Even though the oxygen could have been produced from inefficient water photolysis under the action of shortwave UV radiation, it was immediately bound by reduced products from the atmosphere and the primary ocean (Rutten, 1971).

In that case the primary process of quantum energy conversion meant the cleavage of chemical bonds of simple molecules, and a subsequent formation of more complex organic substances storing a part of the quantum energy. Under the action of radiation the covalent bonds in H_2O, NH_3 and CH_4 were broken, and free radicals and ions were formed with a subsequent interaction of highly active compounds producing stable organic molecules. In Terenin's experiments (1959) amino acids were produced by shortwave UV irradiation of the vapors of water, ammonia and methane. It is interesting to note that under the action of shortwave UV these organic compounds could be accumulated without decomposition. Inorganic constituents of the Earth's crust could have played an important role by adsorbing initially formed free radicals and thus extracting them from the reaction sphere. It was found that the photodissociation of water and ammonia absorbed on alumina may proceed at longer wavelengths of UV (up to 350 nm), than are needed to decompose non-adsorbed molecules (Vilesov et al., 1970). The photochemical decomposition of ammonia forming molecular nitrogen, was probably more efficient on inorganic matrices.

We proposed that inorganic components of the Earth's crust could act as photosensitizers. In this case the inorganic matrix would be the photoreceptor absorbing the light quanta for use of energy in photochemical reactions. Most effective are the semiconductor photocatalysts. In this case an electron is transferred by light quantum to the conductivity band followed by a charge separation. The Electron and the hole can either be trapped, or can migrate by reaching the phase boundary, where the primary redox reactions may take place. Using titanium dioxide, zink oxide and tungsten trioxide we succeeded in modelling some processes occurring in plant chloroplasts (Krasnovsky and Brin, 1962; review by Krasnovsky and Brin, 1978). They were models of Hill reaction — photochemical evolution of oxygen coupled to a reduction of such electron acceptors as ferric compounds, quinone, and oxygen. We have also observed photoreduction of methyl viologen having the redox potential of the hydrogen electrode (Krasnovsky and Brin, 1973). In the presence of bacterial hydrogenase the molecular hydrogen is formed (Krasnovsky et al., 1976); review by Krasnovsky, 1979). Such model reactions in some cases proceed with an uphill electron transfer (Fig. 1).

In contemporary photosynthesis, probably, no inorganic photocatalysis is used, so perhaps this represents a blind alley of evolution. Synthesis of cyclic compounds containing a conjugated system of double bonds has been a prerequisite for the construction of extremely efficient photochemical systems, where $\pi \rightarrow \pi$ transitions might occur with the formation of excited singlet and triplet states.

Stable organic molecules produced abiogenically turned out to be more suitable as photoreceptors and photosensitizers. Among them such molecules as the porphyrins won the competition, being chemically stable and capable of complexing with metals.

In the gas mixture imitating the primary atmosphere, Hodgson and Ponnamperuma (1968) observed porphyrin formation. In our laboratory we observed the formation of porphyrins, chlorines and bacteriochlorines during pyrrol-formaldehyde interaction. The

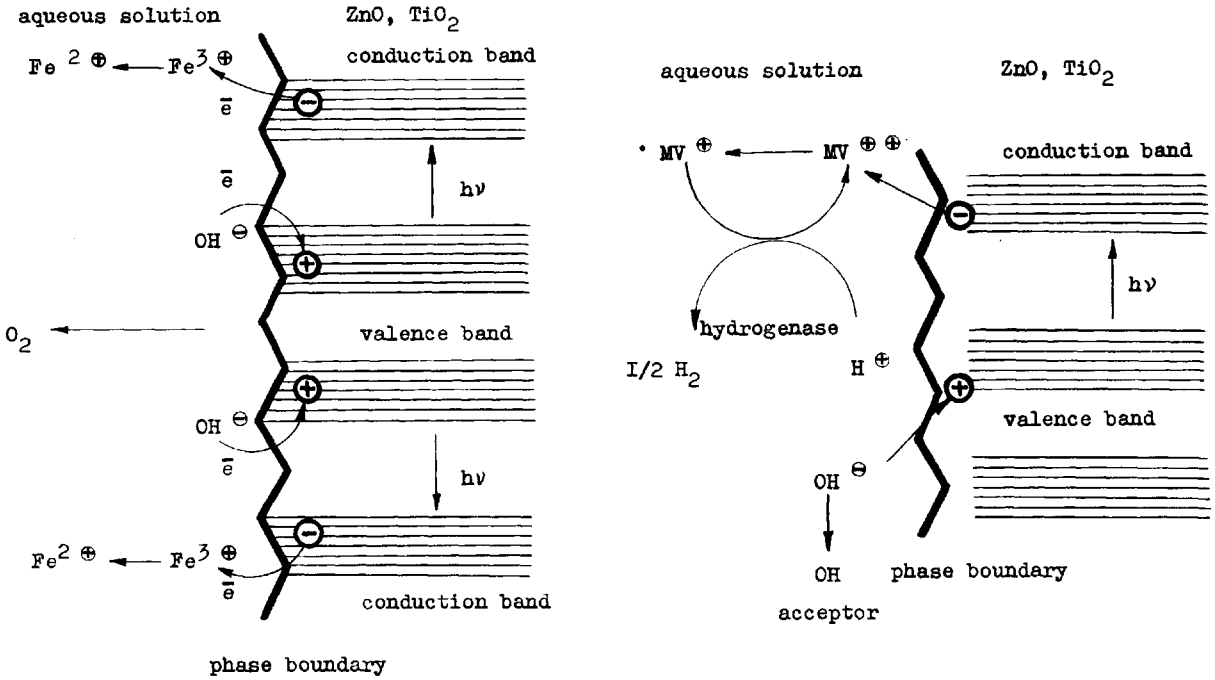


Fig. 1. Photoinduced charge separation in the case of inorganic photocatalysts (titanium dioxide and zink oxide). Hypothetic scheme of oxygen (A) and hydrogen (B) evolution.

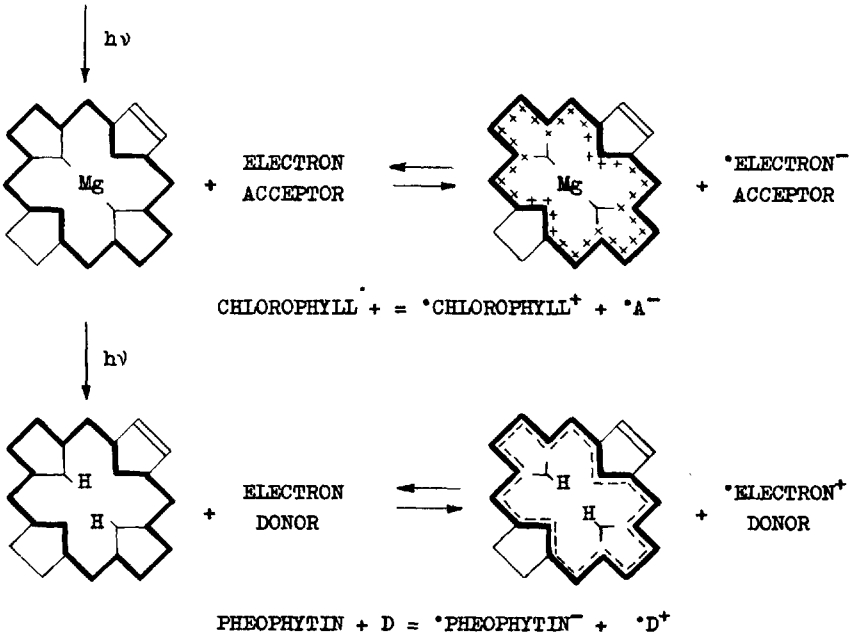


Fig. 2. Photoinduced charge separation in reversible photooxidation or photoreduction of chlorophyll and analogs.

catalytic action of inorganic components of the Earth's crust was observed (Krasnovsky and Umrikhina, 1972).

The ability of excited chlorophylls and porphyrins to undergo reversible photooxidation and photoreduction was studied in our laboratory for many years. As a result of electron transfer a pair of ion-radicals is primary formed and an electron or a hole is probably delocalized in the π-electron system of conjugated double bonds (Fig. 2).

Thus, there is no doubt that during the prebiological period solar energy could be converted into potential chemical energy in a variety of reactions. The question is how this energy could be utilized by primary cells (probionts).

Photochemistry of probionts

We can propose that among the primary cells there were heterotrophic and photoautotrophic variations. We accept Baltscheffsky's hypothesis (1974) that primary biological electron transfer might take place at the oxidoreduction level of the hydrogen electrode and further evolution led to an increase of the redox potential of electron transferring metabolic systems up to the potential of the oxygen electrode. We would like to emphasize that during this long period of evolution the use of excited photoreceptive molecules drastically increased oxidoreductive capability. Excitation of photoreceptive molecule increased both reductive and oxidative ability, i.e. the ability to be an efficient donor or acceptor of an electron. Realization of the process depends on the redox properties of partner non-excited molecules.

We have already suggested that activation by light of some biocatalysts in heterotrophic cells could be a kind of transition to photoautotrophy (Krasnovsky, 1959). So we have studied the light activation of NADH and NADPH acquiring the ability to reduce methyl viologen, ferredoxin and to evolve hydrogen (Nikandrov et al., 1978). Recently in our laboratory it was revealed that light affects the hydrogen evolution of Clostridium butyricum, considered as a possible model of a primary heterotrophic cell. Probably flavins are the photoreceptors in this case (Zhukova et al., 1980).

Very peculiar is the ability to produce ATP by purple membranes of heterotrophic halobacteria. In these organelles the light driven proton translocation takes place but no primary photochemical charge separation has been ever seen. May there nevertheless be an intramolecular-charge separation (the shift of electron density) inside the bacteriorhodopsin molecule leading to long-lived proton translocation?

One may question the role of this type of ATP formation in the pattern of evolution. We may consider that case as one of the possible variations of the mode of activation by light of heterotrophic organisms, probably being a blind alley branch of the tree of evolution.

The incorporation of porphyrins in the primary cells increased their oxidoreductive capability, being a prerequisite of efficient excitation by light and subsequent charge separation, and a crucial event in the evolution of photoauthotrophy.

The concept is plausible that the entire evolution of photosynthesis proceeded to find out the most effective mode of charge separation and the efficient utilization of the stored energy by the metabolic pathways.

The study of isolated reaction centers from photosynthetic bacteria revealed that as a result of light quanta action the hole is localized at the bacteriochlorophyll dimer (Dutton et al., 1975) and the electron passes through phenophytin to ubiquinone. The separated charges are long-lived (up to 0.1 s) in the reaction center (Fig. 3). The electron and the hole should be channeled by separate metabolic pathways. When the photoreceptor is incorporated into a membrane the positive and negative charges may be localized on the different sides of the membrane. This phenomena may

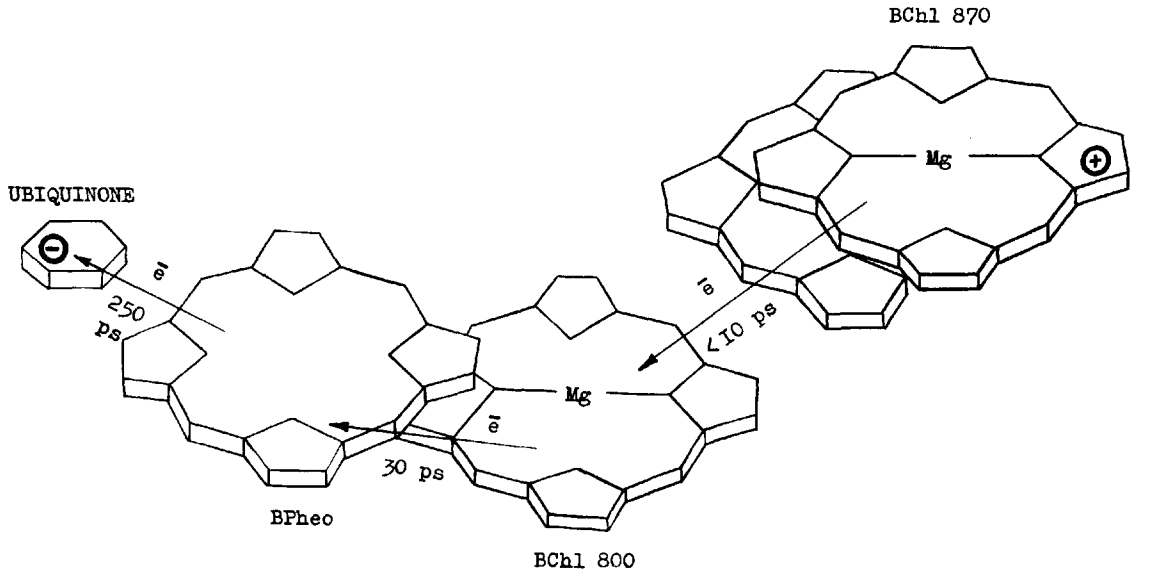


Fig. 3. Photoinduced charge separation in reaction centers of photosynthetic bacteria (see review by Shuralov and Krasnovsky, 1981).

lead to a coupling of electron transfer with the proton translocation and subsequent ATP formation. In this case the charge separation energy is used for the cyclic process when an electron passing some intermediate carriers comes back to the hole, performing synthesis of ATP.

Another possibility is non-cyclic uphill electron transfer leading to ferredoxin or NADP reduction; the reduced NADH or NADPH are used in carbon dioxide reductive cycle. Both types of electron transfer are probably efficient in photosynthetic bacteria.

The non-cyclic branch of electron transfer when water was used as an electron donor and quinones as an electron acceptor was a great evolutionary achievement as widespread water was used as a source of electrons.

Most advanced was the coupling of two charge separation processes when the energy of two quanta was used to extract an electron from a water molecule to reduce ferredoxin. Here two stages of charge separation proceeded, occurring at different redox potential values. The ATP was synthesized by passage of an electron through these two photosystems. As a result of molecular oxygen evolution, an explosion of aerobic life occurred on our planet.

The appearance of primitive cells inevitably required the coupling of the energy conversion mechanism to the reproduction mechanism which used stored solar energy, probably in the form of ATP.

So the evolution of bioenergetic metabolism was closely connected with the evolution of nucleic acid reproduction cycles. The suggestion is plausible that in primary photoautotrophic cells the primary charge separation resulted in the synthesis of ATP used for cell reproduction. Probably this situation may be preserved in the contemporary photosynthetic bacteria or blue-green algae considered as the most ancient photosynthetic organisms.

The appearance of an efficient self-reproduction mechanism in combination with effective mechanisms of electron phototransfer seems to be the main condition which determined the development of life based on the conversion of solar energy. If the construction of photochemical systems transferring an electron uphill can be realized in vitro, the creation of model self-reproducing systems would be a problem awaiting its solution.

References

Baltscheffsky, H., 1974, A new hypothesis for the evolution of biological electron transport. Origins Life 5, 387–395.

Broda, E., 1978, The Evolution of the Bioenergetic Processes (Pergamon Press).

Dutton, P.L., K.J. Kaufmann, B. Chance and P.M. Rentzepis, 1975, Picosecond kinetics of reaction centers. FEBS Lett. 60, 275—280.

Gaffron, H., 1972, Horizons of Bioenergetics (Academic Press, New York).

Goldansky, V., 1979, Facts and hypotheses of molecular chemical tunnelling. Nature 279, 109.

Hodgson, G.W. and C. Ponnamperuma, 1968, Prebiotic porphyrin genesis – porphyrins from electric discharge in methane, ammonia and water vapour. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 22–28.

Krasnovsky, A.A., 1959, Development of the mode of action of the photocatalytic system in organisms, in: The Origin of Life on the Earth, A.I. Oparin et al. (eds.) (Pergamon Press, New York) pp. 606–618.

Krasnovsky, A.A., 1974, Chemical evolution of photosynthesis: models and hypotheses, in: The Origin of Life and Evolutionary Biochemistry, K. Dose et al. (eds) (Plenum Press) pp. 233–244.

Krasnovsky, A.A., 1976, Chemical evolution of photosynthesis. Origins Life 7, 133–143.

Krasnovsky, A.A., 1979, Photoproduction of hydrogen in photosynthetic and artificial systems, in: Topics in Photosynthesis, J. Barber (ed.) (Elsevier, Amsterdam) pp. 281–298.

Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin, 1962, Inorganic models of Hill reaction. Dokl. AN SSSR 147, 656–659.

Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin, 1973, Photoreduction of methyl viologen sensitized with inorganic semiconductors. Dokl. AN SSSR 213, 1431–1434.

Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin, 1978, Photosensitization by titanium dioxide and zink oxide: oxygen and hydrogen evolution, in: Photosynthetic Oxygen Evolution, H. Metzner (ed.) (Academic Press) pp. 405–410.

Krasnovsky, A.A., G.P. Brin and V.V. Nikandrov, 1976, Photoreduction of oxygen and photoevolution of hydrogen with inorganic photocatalysts. Dokl. AN SSSR 229, 290–293.

Krasnovsky, A.A. and A.V. Umrikhina, 1972, Abiogenic formation of porphin, chlorin and bacteriochlorin, in: Molecular Evolution: Prebiological and Biological, D.L. Rohlfing and A.I. Oparin (eds.) (Plenum Press, New York) pp. 141–150.

Nikandzov, V.V., G.P. Brin and A.A. Krasnovsky, 1978, Light induced activation of NADH. Biokhimiya 43, 636—645 (in Russian).

Olson, J.M., 1978, The evolution of photosynthesis, in: Evolutionary Biology, Vol. II, M.K. Hecht (ed.) (Plenum Press, New York) pp. 45–68.

Oparin, A.I., 1957, Origin of Life on the Earth (in Russian, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow).

Pasynsky, A.G. and T.E. Pavlovskaya, 1964, Formation of biochemicals on the primitive Earth. Usp. Khim. 33, 1198–1215.

Ponnamperuma, C., 1972, The Origin of Life (Dutton Publ., New York).

Rutten, M.G., 1971, The Origin of Life (Elsevier, Amsterdam).

Shuvalov, V.A. and A.A. Krasnovsky, 1981, Primary photochemistry in reaction centers. Biofizika 26, 43 (in Russian).

Terenin, A.N., 1959, Photosynthesis in the shortest ultraviolet, in: The Origin of Life on the Earth, A.I. Oparin et al. (eds.) (Pergamon Press, New York) pp. 136–139.

Vilesov, F.I., V.A. Kotelnikov and A.A. Lisachenko, 1970, The study of some photocatalytic reactions of simple molecules absorbed on aluminium, zink and magnesium oxides, in: Molecular Photonics (in Russian, Nauka, Leningrad) pp. 318–334.

Zhukova, L.V., V.V. Nikandrov and A.A. Krasnovsky, 1980, Reversible action of light on hydrogen evolution by Clostridium butyricum. Biofizika 25, 1095 (in Russian).

Photosynthesis III. Structure and Molecular Organisation of the Photosynthetic Apparatus
Edited by George Akoyunoglou
© 1981 Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa.

PRIMARY PHOTOCHEMISTRY IN REACTION CENTERS

A.A.Krasnovsky
A.N.Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, USSR

A concise outline is presented on the electron phototransfer in reaction centers, as compared to photochemical reactions of chlorophyll and analogs. The fundamental property of excited chlorophylls is their ability to give up or to accept an electron, i.e. to undergo reversible photooxidation or photoreduction. The ability to phototransfer underlies the function of pigments in reaction centers, where the excited chlorophylls (Chl P700 or P680, Bchl 870 or 960) give up an electron to acceptor molecules, and the electron vacancy (the hole) is filled by suitable electron donor. There is an increasing evidence that in the case of photosynthetic bacteria and photosystem II the primary electron acceptor is pheophytin, and then the electron is transferred to quinones. So the reversible photooxidation of chlorophyll is coupled to the reversible reduction of pheophytin leading to the final charge separation. The use of picosecond laser technique revealed the sequence of electron transfer in the reaction centers. Peculiar molecular arrangement of reaction centers prevents the reverse reaction being prerequisite of efficient charge separation having the quantum yield near to unity. It is possible to simulate the spectral properties of pigments in antenna and reaction center in aggregates formed by selfassembly of pigment molecules in solid films and colloid particles. Some models of photochemical charge separation coupled to methylviologen photoreduction and hydrogen evolution are created using the micelle solutions of chlorophylls.

Dear colleagues, Ladies and Gentlemen! Opening this session I wish to express my deep gratitude to the Organizing Committee for the honour to be invited as a chairman.

As you know, the primary conversion of solar energy takes place in the pigment system of plants, which consists of light harvesting antenna and reaction centers. The light quanta energy migrates from the bulk of antenna pigments to reaction center, when the primary charge separation takes place. The primary action of light is to remove an electron from a donor to acceptor, which leads to a subsequent for-

mation of long-lived products atoring the light quanta energy.

Chlorophyll is the main primary light energy convertor. As it absorbs a light quantum, the chlorophyll is converted into the singlet excited state and then, with some loss of energy, into long-lived triplet excited state. The fundamental property of excited chlorophylls (Chl*) studied in our laboratory is their capacity to accept an electron from a suitable donor (D), or to give up an electron to a suitable acceptor (A):

$$Chl^* + D \dashrightarrow . Chl^- + . D^+$$
$$Chl^* + A \dashrightarrow . Chl^+ + . A^-$$

I have outlined this problem at the first International Congress on Photosynthesis (1). The direction of electron transfer depends on redox potential of pigment molecule, light quantum energy, and electron affinity of the partner molecules. Reversible oxidation of excited pigment is most pronounced in the case of bacteriochlorophylls, the reversible photoreduction - in the case of pheophytins. In the triple system: electron donor - excited chlorophyll - electron acceptor it is easy to observe photosensitized electron transfer from donor to acceptor when excited chlorophyll acts as an intermediate electron carrier (see review 2).

In solutions of chlorophyll the triplet excited state is the most active. In living cells the phosphorescence of chlorophyll was discovered (3,4) presenting evidence of the triplet state formation in the membranes of chloroplasts. But in reaction centers chlorophylls are active in singlet excited state. The triplet state observed may be used for energy transfer (to carotenoids etc.)and may appear in the course of reverse electron flow when reaction centers are blocked.

Reversible photooxidation of reaction center chlorophyll P700 in green cells has been discovered by Bessel Kok, who passed away last year, and our knowledge in this field greatly depends on his discovery.

A gradual solubilization of membranes of photosynthetic structures by the detergents made it possible to separate the pigments of antenna and reaction centers. R. Clayton group (5) was the first to prepare reaction centers from chromatophores of carotenoidless mutant Rhodopseudomonas spheroides (R-26).

The study of reaction center composition in several laboratories (see, for instance, (6)) revealed three protein subunits, 4 mol of bacteriochlorophyll, 2 mol bacteriopheophytin, 2 mol uniquinone, and one Fe atom.

The picosecond laser spectroscopy revealed the cation radical of P870 occuring during the first picosecond after photon absorption (7,8). When the picosecond laser spectrophotometry technique was employed in studying the sequence of primary events, it was possible to measure the timescale of electron transfer in reaction centers (7,8,9).

The ability of isolated bacteriopheophytin to undergo reversible photoreduction was revealed in our laboratory (10, 11). In reducing media it was possible to observe bacteriopheophytin photoreduction in reaction centers (12).

The following scheme presents the results of studying the reaction centers from photosynthetic bacteria. Bacteriochlorophyll 800 and bacteriopheophytin are functioning here as intermediate electron centers (9)

$$\text{BChl 870} \xrightarrow[e]{10ps} \text{BChl 800} \xrightarrow[e]{30ps} \text{BPheO} \xrightarrow[e]{250ps} \text{ubiquinone.}$$

The investigation of reaction centers from photosynthetic bacteria led to a plausible idea that in green plants pheophytin may function in reaction centers as well. When studying the pheophytin content in green leaves by fluorometric technique (13) we have found not less than 1% of pheophytin in every preparation of leaves. But it was not clear whether it had been an artifact formed during the extraction procedure, or an inevitable natural constituent of the pigment system.

Up to now it was not possible to obtain rather pure preparations of reaction centers from photosystems I and II. The most enriched preparation of photosystem I contains not

less than 10-20 mole of antenna chlorophyll per mole of P700. But it was not possible to observe any pheophytin photoreduction in these preparations in the reducing media.

Shuvalov et al. (14) presented evidence of an intermediate chlorophyll P695, which takes part in electron transfer from P700 to the final electron acceptors. The tentative sequence of steps in photosystem I is presented by the following scheme:

$$\text{Chl 700} \xrightarrow[e]{40ps} \text{Chl 695} \xrightarrow[e]{200ps} \text{P 430}$$

An attempt to reveal pheophytin photoreduction in particles enriched in the photosystem II was quite successful: when measuring the differential absorption spectra in reducing media (where Q is chemically reduced) it was possible to reveal the spectrum resembling that of photoreduced pheophytin (15). By studying this phenomenon, Klimov et al. (15,16,17) have drawn a conclusion that the anion radical of monomeric pheophytin is formed as a result of chlorophyll P680 excitation: in the primary charge separation between chlorophyll and pheophytin an ion-radical pair appeared. It was suggested that the variable fluorescence of PSII, which appeared upon the reduction of Q, but disappeared upon the photoreduction of pheophytin, might be the recombination luminescence arising from $P680^{+}.Phe0^{-}$. Reduced pheophytin has in the reaction center the ESR signal, which fairly corresponds to ESR signal of monomeric pheophytin in the solution. It is important to note that pheophytin is reduced stoichiometrically (as compared to chlorophyll P680), and the pheophytin photoreduction depends on the state of the Mn-oxygen-evolving system. New data were obtained recently by Klimov, Dolan and Ke. The scheme of the electron transfer is presented here:

$$\text{Chl 680} \xrightarrow{e} \text{Pheophytin} \xrightarrow{e} \text{Plastoquinone}$$

The timescale of electron transfer has not been measured yet.

Now we can draw some general conclusions. The mechanism of light quantum energy conversion in reaction centers

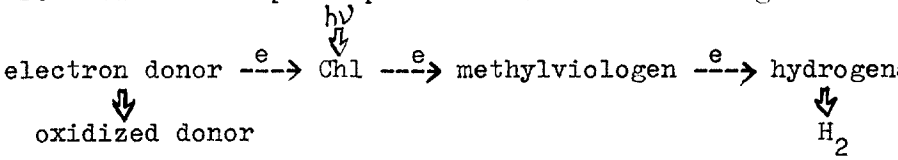
fully depends on the ability of chlorophyllous pigments to give up or to accept an electron, discovered in the study of chlorophyll photochemistry.

Efficient long-lived charge separation (up to 0.1 sec) in reaction centers probably depends on its peculiar molecular architechture. In the course of evolution there was developed a close arrangement of chlorophyll and pheophytin forms which facilitate electron tunnelling through the chain of intermediate carriers. Circular and linear dischroism measurements gave useful information about the mutual orientation of pigment molecules there. But the question is not solved yet: why there is such an efficient electron transfer in reaction centers having quantum yield near the unity, and why reverse reactions are hampered there. The following reasons on the low efficiency of back reactions may be considered. The recombination of charges requires the activation energy, whose value is close to that dissipated as a result of electron transfer. The final charge separation leads, probably, to the appearance of rather broad energy barriers preventing efficient tunnelling in the course of reverse reactions. The peculiar molecular arrangement of reaction center constituents is important to ensure the conservation of energy.

It is attractive to create artificial models of reaction centers. The construction of model systems requires, in some cases, the use of chlorophyll aggregated forms (dimers) which function in the reaction centers. Many years ago we revealed the phenomenon of self-assembly of chlorophyll aggregates in solid films in the presence of low-molecular addends simulating the state of pigments in cells (see our recent review (18)).

The question of modelling is to incorporate into the system suitable electron donors and electron acceptors in proper molecular arrangements to prevent the back reactions. For instance, in the micelles of a detergent, which contains chlorophyll, bacterial hydrogenase, methylviologen and electron donor, it was possible to reproduce (19) the electron transfer sequence resembling the functions of photosystems I

leading to the hydrogen gas evolution under the action of red light absorbed by the chlorophyll. The sequence of electron transfer steps is presented on the following scheme:



The problem of hydrogen evolution in photosynthetic and artificial systems has been outlined in my recent review(20).

The knowledge of molecular organization of electron transfer mechanism in reaction centers will create new ideas to be introduced into the field of construction of efficient solar energy convertors. Another important problem is to control the function of reaction centers in organisms closely coupled with the action of photosynthetic electron transfer chain and the subsequent biochemical events.

There is no doubt that our Symposium will greatly improve our knowledge of the molecular mechanisms of solar energy conversion in the reaction centers. So I wish you every success.

References

1. A.A.Krasnovsky. In: Progress in Photosynthesis Research, ed. by H.Metzner, vol.II,p.709, Tübingenm 1969.
2. A.A.Krasnovsky. Transformation of Light Energy in Photosynthesis (Nauka Publishing House, Moscow, 1974).
3. A.A.Krasnovsky Jr.Yu.Kovalev. Biofisika, 23,920(1978).
4. A.A.Krasnovsky Jr. Yu.V.Kovalev, A.Fqludi-Daniel. Doklady AN SSSR, 251, 1264 (1980).
5. D.W.Reed, R.K.Clayton. Biochem.Biophys.Res.Comm.30,471 (1968).
6. G.Feher. Photochem.Photobiol. 14, 373 (1971).
7. K.J.Kaufmann, P.L.Dutton, T.L.Netzel, Y.S.Leigh,P.M.Rentzepis. Science, 188, 1301 (1975).
8. M.G.Rocklay, M.Windsor, R.V.Cogdell, W.W.Parson. Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 72, 2251 (1975).
9. V.V.Shuvalov, A.V.Klevanik, A.V.Sharkov, Yu.A.Matveets, P.G.Kyukov. FEBS Letters 91, 135 (1978).
10. A.A.Krasnovsky and K.K.Voinovskaya. Dokl.AN SSSR, 81, 879 (1952).

11. E.V.Pakshina, A.A.Krasnovsky. Biofisika, 19, 238 (1974).

12. V.A.Shuvalov, I.N.Krakhmaleva, V.V.Klimov. Biochim. Biophys. Acta, 449, 597 (1976).

13. A.A.Krasnovsky, M.G.Shaposhnikova. Plant Physiol.(USSR), 17, 436 (1970).

14. V.A.Shuvalov, B.Ke, E.Dolan. FEBS Letters, 100,5 (1979).
15. V.V.Klimov, A.V.Klevanik, V.A.Shuvalov, A.A.Krasnovsky. FEBS Letters, 82, 183 (1977).

16. V.V.Klimov, S.I.Allakhverdiev, Sh.Demeter, A.A.Krasnovsky. Doklady AN SSSR, 249, 227 (1979).

17. V.V.Klimov, S.I.Allakhverdiev, A.A.Krasnovsky. Doklady AN SSSR, 249, 485 (1979).

18. A.A.Krasnovsky, M.I.Bystrova. BioSystems, 12, 181 (1980).
19. A.A.Krasnovsky, V.V.Nikandrov, G.P.Brin, I.N.Gogotov, V.P.Oshchepkov, Doklady AN SSSR, 225, 711 (1975).

20. A.A.Krasnovsky. In: Topics in Photosynthesis, ed. by J.Barber, v. III, p. 281, Elsevier Amsterdam, 1979.

Photobiochemistry and Photobiophysics, 3 (1981) 11—18
Elsevier/North-Holland Biomedical Press

PARAMETERS OF THE TRIPLET STATE AND SPECTRAL PROPERTIES OF THE MONOMERIC CHLOROPHYLL IN LIPOSOMES AT —196°C

A.A. KRASNOVSKY Jr. and A.N. SEMENOVA

Department of Biology, Moscow State University and Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

Received June 3, 1981
Accepted June 25, 1981

SUMMARY

Phosphorescence and delayed fluorescence accompanying deactivation of chlorophyll triplet state has been studied in chlorophyll containing liposomes at —196°C. Liposomes with a molar ratio of chlorophyll to lecithine 1 : 1000 have been used. The data are compared with that on the chlorophyll-delayed luminescence in solutions and chloroplasts, and with the absorption, fluorescence and circular dichroism spectra of the pigment. It is shown that in the liposomes studied the pigment is in a form of Mg-monosolvated monomers, the polar groups of the lipid being the solvating agent. At —196°C additional solvation of magnesium probably takes place. The spectra and lifetime of the chlorophyll phosphorescence in the liposomes are similar to that of chlorophyll solutions being higher than in leaves by the factor of 2000. The delayed fluorescence of chlorophyll in the liposomes is more intensive than in solutions. A tentative mechanism of the delayed fluorescence is proposed.

INTRODUCTION

It was shown in a series of our earlier works [1—6] that deactivation of the chlorophyll triplet states in solutions and photosynthesizing organisms at —196°C is accompanied by two types of delayed luminescence: phosphorescence and delayed fluorescence. The phosphorescence results from radiative triplet—singlet transitions in chlorophyll molecules, the mechanism of the delayed fluorescence is not clear yet. The phosphorescence recorded in the photosynthesizing organisms is emitted mainly by the short wavelength forms of the antenna chlorophyll with the absorption maxima at 670—674 nm. The quantum yield of the phosphorescence in mature leaves of normal plants is approximately 2000 times lower than in solutions of monomeric chloro-

0165-8646/81/0000—0000/$02.75 © 1981 Elsevier/North-Holland Biomedical Press

phyll. The evidence obtained [2—4] suggests that phosphorescence quenching in leaves can be attributed to two different energy transfer processes: singlet—singlet energy transfer from the short wavelength chlorophyll to the non-phosphorescent long wavelength pigment forms, and triplet—triplet energy transfer from chlorophyll to carotenoids. To check the validity of this suggestion, we attempted to reproduce these phenomena in a model system, i.e. aqueous suspensions of chlorophyll-containing liposomes. Although this model was used in a number of works [7,8,13,14], no information on the low-temperature parameters was available so far. Therefore as a first step of the analysis we aimed to obtain liposomes containing only monomeric chlorophyll and to determine the parameters of delayed luminescence and fluorescence of these liposomes at —196°C. It should be noted that the ability of chlorophyll to generate triplet states in liposomes was described elsewhere [7,8].

MATERIALS AND METHODS

Liposomes were prepared using egg lecithin (phosphatidylcholine) and chlorophyll *a*, isolated by the standard methods and finally purified by chromatography [9,10]. Liposomes were prepared by two different procedures. The first was as follows [11]: 0.25 ml of alcohol solution containing 5 mg of lipid and chlorophyll were injected with a fine-needle syringe into a buffer solution (v/v 1 : 20) consisting of 50 mM Tris—HCl, 0.1 M KCl, pH 7.0 (liposomes 1). According to the second procedure [12] a round-bottom beaker with a film containing 5 mg lipid and pigment and also 5 ml buffer solution was placed into an ice bath and sonicated on an ultrasonic desintegrator MSE-500. The treatment was performed in an argon atmosphere for 5 min at 250 W and 20 kHz. The suspension obtained was centrifuged at 17,000 × *g* for 10 min, the supernatant used in the experiments (liposomes 2). In order to reduce the probability of aggregation of pigment molecules, most of the measurements were made on the liposomes with the minimal chlorophyll content permitting reliable spectral measurements. Under our experimental conditions it corresponded to a molar chlorophyll—lipid ratio 1 : 1000.

Afterglow and fluorescence were measured in the apparatus with a mechanical phosphoroscope described elsewhere [1—6]; absorption spectra were measured in a spectrophotometer SF-18; circular dichroism in a spectropolarimeter Jasco-J-40. Measurements at —196°C were made on the suspensions frozen without glycerol in special 5 mm thick cuvettes. The optical density in the red band of chlorophyll absorption at —196°C was 0.15.

RESULTS AND DISCUSSION

Absorption and fluorescence spectra

We found that, consistent to the data of Hurley et al. [8], absorption and fluorescence spectra of liposomes at +20°C were practically independent of

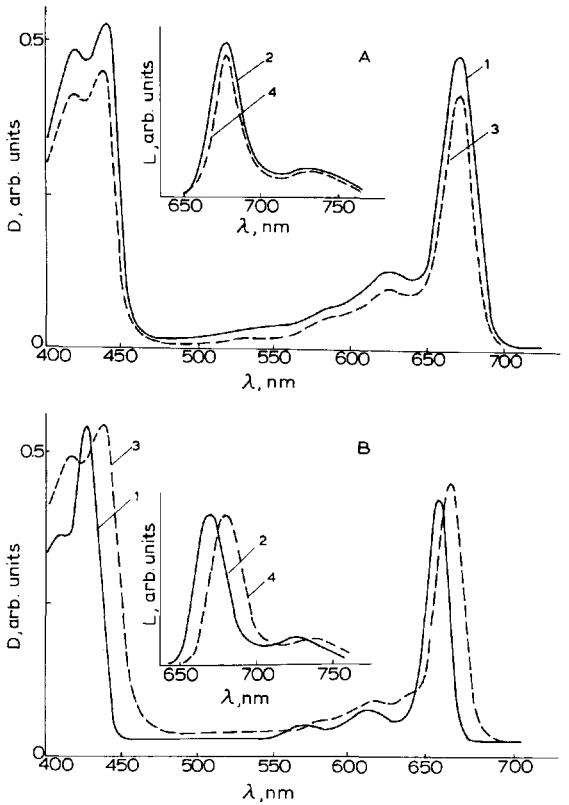


Fig. 1. A) Chlorophyll *a* absorption (1, 3) and fluorescence (2, 4) spectra in liposomes (1, 2) and lecithin films (3, 4) at +20°C. B) Chlorophyll *a* absorption (1, 3) and fluorescence (2, 4) spectra in diethyl ether (1, 2) and pyridine (3, 4) at +20°C.

TABLE I

CHLOROPHYLL *a* ABSORPTION AND FLUORESCENCE PARAMETERS IN LIPOSOMES AND SOLUTIONS AT +20°C

	Absorption	Fluorescence		Circular dichroism at 660—670 nm (arb. units)
	Maxima (nm)	Maxima (nm)	Quantum yield (arb. units)	
Liposomes 1, 2	437, 670	676, 734	0.75	1
Lecithin (film)	438, 670	678, 735	—	—
Diethyl ether	429, 660	668, 725	1 [a]	0.8
Pyridine	440, 669	679, 736	1 [a]	0.1

[a] According to the data of ref. [15], the absolute quantum yield is 35%.

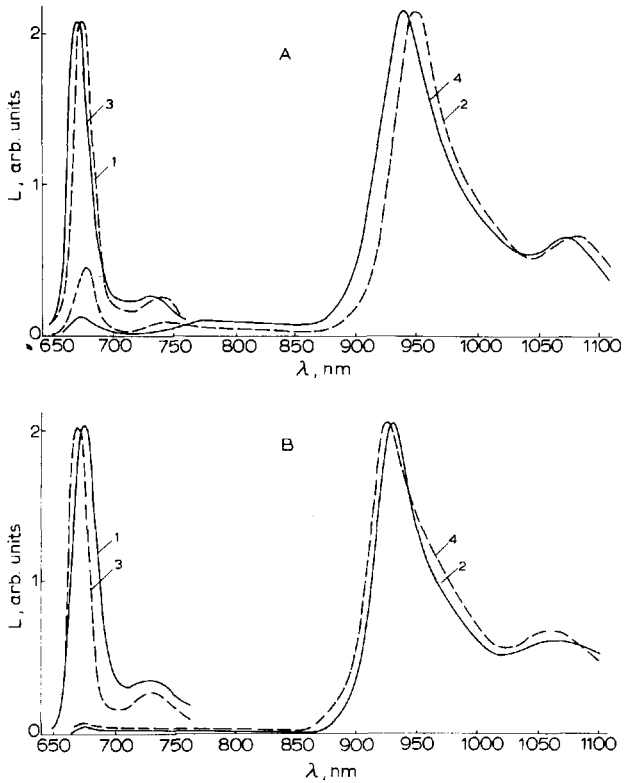


Fig. 2. A) Chlorophyll *a* fluorescence (1, 3) and delayed luminescence (2, 4) in liposomes 1 (1, 2) and liposomes 2 (3, 4) at −196°C. The monochromator slit width was 1 and 6 nm during fluorescence and phosphorescence measurements, respectively. Fluorescence excitation was produced by monochromatic light, 440 nm; afterglow was excited through a cut-off filter transmitting light with $\lambda \geq 640$ nm. B) Chlorophyll *a* fluorescence (1, 3) and delayed luminescence (2, 4) spectra in Triton X-100 (1, 2) and diethyl ether (3, 4) at −196°C.

the way of preparation and actually coincide with the spectra of chlorophyll dissolved in lecithin (Fig. 1A; Table I). Cooling to −196°C caused only slight changes in the spectra. Absorption spectra of the frozen suspensions could not be measured with sufficient accuracy due to strong light scattering, but the estimation has shown that the positions of the major maxima changed by not more than ±2 nm. Upon cooling fluorescence maxima were shifted by 1−3 nm towards shorter wavelengths (Fig. 2A). The half-width of the major band decreased by 10%, the ratio of amplitudes of the maxima changed from 5 : 1 at +20°C to 6.9 : 1 at −196°C, the quantum yield from 26 to 35% (Tables I and II). The results obtained suggest that no marked change of the chlorophyll state occurs with cooling from +20 to −196°C. The high quantum yield and ratio of band amplitudes indicate the lack of long wavelength pigment aggregates in the liposomes. Hence, we may conclude that the pigment in the liposomes is in a monomeric form both at +20 and −196°C.

TABLE II

PARAMETERS OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE, PHOSPHORESCENCE AND DELAYED FLUORESCENCE IN LIPOSOME SOLUTIONS AND LEAVES AT −196°C

	Fluorescence		Phosphorescence		Delayed fluorescence →		
	Maxima (nm ±1 nm)	Quantum yield (arb. units)	Maxima (nm ±2 nm)	τ (ms)	Quantum yield (arb. units)	Maxima (nm ± 2 nm)	τ (ms)
Liposomes 1	676, 737	1	949, 1085	2.6	1	677	2.0
Liposomes 2	674, 733	0.9	939, 1075	2.6	1	674	2.3
Diethyl ether	670, 727	1.6 [a]	929, 1060	2.7	1.3 [a]	670	—
Pyridine	677, 737	1.7 [a]	970, 1100	2.0	1.1 [a]	680	1.5
Bean leaves	687, 739	0.4	960—970	1.9	5×10^{-4}	740	—

[a] The absolute quantum yields of chlorophyll fluorescence in ether and pyridine are 0.55 [16] and that of phosphorescence $(1—3) \times 10^{-5}$ [3,16]. The relative values of the quantum yields and τ were determined with a ±10% accuracy.

It is well known that in polar media chlorophyll forms two kinds of monomers: Mg monosolvates (Mg-L) and Mg disolvates ($Mg\text{-}L_2$). A comparison of the chlorophyll absorption and fluorescence spectra in the liposomes at +20°C with those of the pigment in pyridine with prevailing $Mg\text{-}L_2$ and in diethyl ether with Mg-L alone is given in Table I and Fig. 1. It can be seen that, although the positions of the spectral maxima in liposomes and pyridine are rather similar, the band at 640—650 nm characteristic of $Mg\text{-}L_2$ is absent in the liposome absorption spectra. The 670 nm band of the circular dichroism spectra of liposomes is 10 times more intensive than that of $Mg\text{-}L_2$, but it is equal in intensity to that of circular dichroism of Mg-L in ether. It may be concluded that at +20° C the bulk of the pigment is in a form of Mg-L, and the polar groups of the lipid are a solvating agent. This assumption agrees with the data given in [13]. No significant change of the pigment state seems to occur at the low temperature. Yet, as Table II shows, there is some difference between fluorescence and phosphorescence spectra of liposomes 1 and 2 at —196°C, hence, slight changes take place.

Phosphorescence

Fig. 2A shows that frozen suspensions of liposomes emit delayed luminescence with major maxima at ~675 and ~945 nm (Table II). The first one corresponds to the delayed fluorescence, the second to the phosphorescence. Analysis of the phosphorescence has shown that its intensity is linearly dependent on that of exciting light, and the quantum yield, lifetime (τ_{ph}) and positions of the maxima are similar to those of pigment solutions. Excitation spectra of the phosphorescence are similar to the absorption spectra, but some small differences still exist. Major phosphorescence excitation maxima (440, 671 nm) of liposomes 1 are shifted by 1—2 nm towards longer

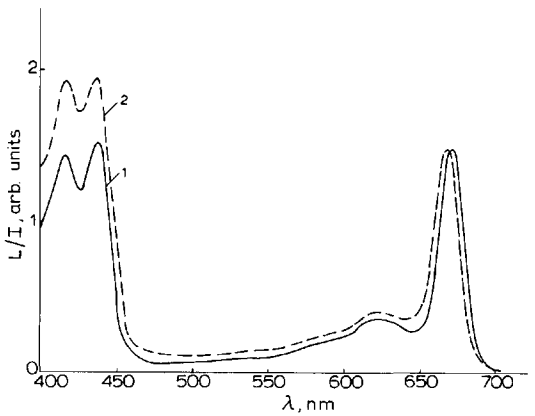


Fig. 3. Phosphorescence excitation spectra of liposomes 1 (1) and liposomes 2 (2) at —196°C. The monochromator slit width was 5 nm; emission was measured through a cut-off filter transmitting light with $\lambda \geqslant 900$ nm. L, luminescence intensity; I, exciting light intensity.

wavelengths as compared to absorption maxima at +20°C. The emission maxima have an intermediate position between the phosphorescence maximum of Mg-L_2 in pyridine and Mg-L in ether; τ_{ph} is approximately equal to that in ether. Taking into account that liposomes 1 contain a considerable amount of ethanol capable of forming Mg-L_2 at —196°C [1—3], we may suggest that in frozen suspensions of liposomes 1 chlorophyll is in the form of disolvates with a mixed structure, i.e. one coordination vacancy of magnesium is occupied by lecithin, the other by ethanol.

Measurements of chlorophyll phosphorescence in liposomes 2 were hampered by the presence of the phosphorescent products of pigment degradation appearing during sonication. Phosphorescence maxima of these products lie at 750—900 nm, major excitation at 400—450 nm. The relative intensity of the product phosphorescence decreased with increasing chlorophyll concentration in the liposomes becoming negligible at excitation in the wavelength region corresponding to $\geqslant$650 nm. The results of our measurements show that phosphorescence and fluorescence maxima and also the long wavelength maximum of phosphorescence excitation (668 nm) are shifted towards shorter wavelengths as compared with the same parameters obtained for liposomes 1 (Table II, Figs. 2, 3). It may be supposed, therefore, that the pigment in liposomes 2 is in a state similar to Mg-L, i.e. additional magnesium hydration at —196°C does not occur or it has less effect on the spectral properties of the pigment than solvation with ethanol.

Low-temperature delayed fluorescence

Besides phosphorescence, a delayed fluorescence of the liposomes has been observed (Fig. 2A). It was 3—10 times as intense as that in pigment solutions. The intensity of this emission was proportional to the square of the exciting light intensity; the lifetime (τ_{dl}) was close to τ_{ph} (Table II). Upon heating to —70°C the emission increased significantly, while τ_{dl} decreased. Only two formal schemes of the luminescence fit the above parameters. According to the first one the luminescence accompanies deactivation of a long-lived (2 ms) photoproduct appearing as a result of two-photon absorption by one chlorophyll molecule. According to the second scheme, the luminescence accompanies recombination of triplet pigment molecules with a long-lived ($\geqslant$10 ms) product of a one-photon photoprocess. Thus in both cases it is necessary to assume that a photoproduct is formed. At —196° C it can appear only during an elementary photoprocess, probably due to charge separation between the pigment and the media, namely the lipid, water or oxygen. In our experiments removal of oxygen did not affect delayed fluorescence whereas lecithin replacement by Triton X-100 caused a tenfold decrease of the emission. This indicates the important role of the lipid in the photoprocess. Although the information available is insufficient for a final choice between the two schemes to be made, the recombination mechanism fits the experimental findings more satisfactorily. Its validity is supported by almost equal τ_{ph} and τ_{dl}, and also by the data obtained for the

liposomes at +20° C [8]. In this case, however, it must be admitted that chlorophyll triplet molecules or the "photoproduct" are capable of slow diffusion even at −196° C.

Thus, inclusion into artificial membranes in the absence of pigment–pigment interactions does not lead to quenching of the chlorophyll phosphorescence and causes relatively small changes of the phosphorescence parameters as compared to the pigment solutions. At the same time delayed fluorescence increases significantly and the ratio of delayed fluorescence and phosphorescence intensities approaches that characteristic of photosynthesizing organisms [2–6].

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been started by one of us, A.A. Krasnovsky Jr., during the work in the Biophysical Institute of Atilla József University and in the Biological Center of the Hungarian Academy of Sciences in Szeged. Here I would like to express my gratitude to Prof. Szalay, Prof. A. Fáludi-Dániel and to the staffs of the institutes for generous help and support. We also thank Prof. A.A. Krasnovsky and Prof. F.F. Litvin for constructive criticism and discussion.

REFERENCES

1 Krasnovsky Jr., A.A., N.N. Lebedev and F.F. Litvin (1974) Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. *216*, 1406–1409.
2 Krasnovsky Jr., A.A., N.N. Lebedev and F.F. Litvin (1975) Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. *225*, 207–210.
3 Krasnovsky Jr., A.A., N.N. Lebedev and F.F. Litvin (1977) Srudia Biophys. *65*, 81–89.
4 Krasnovsky Jr., A.A. and Yu.V. Kovalev (1978) Biophysika *23*, 920–922.
5 Krasnovsky Jr., A.A., Yu.V. Kovalev and A. Fáludi-Dániel (1980) Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. *251*, 1264–1267.
6 Krasnovsky Jr., A.A., Yu.V. Kovalev and E. Lehotzki (1981) Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. *256*, 726–730.
7 Trosper, T., D. Raveed and B. Ke (1970) Biochim. Biophys. Acta *223*, 463–465.
8 Hurley, J.K., F. Castelli and G. Tollin (1980) Photochem. Photobiol. *32*, 79–86.
9 Singlton, W.S., M.S. Gray, M.L. Brown and J.L. White (1965) J. Am. Oil Chem. Soc. *42*, 53–60.
10 Zscheile, F.P. and C.L. Comar (1941) Bot. Gaz. *102*, 463–481.
11 Batzari, S. and E.D. Korn (1973) Biochim. Biophys. Acta *298*, 1015–1019.
12 Huang, C.H. (1969) Biochemistry *8*, 344–351.
13 Oettmeier, W., J.R. Norris and J.J. Katz (1976) Z. Naturforsch. *31c*, 163–168.
14 Tomkiewicz, M. and G.A. Corker (1975) Photochem. Photobiol. *22*, 249–256.
15 Latimer, P., T.T. Bannister and E. Rabinowitch (1956) Science *124*, 585–586.
16 Dvornikov, S.S., V.N. Knyukshto, K.N. Solovyev and M.P. Tzvirko (1979) Optika Spektr. *46*, 689–695.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 16 1982 Вып. 2

УДК 541.144.7

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА В ТВЕРДЫХ ПЛЕНКАХ

М. И. БЫСТРОВА, И. А. САФРОНОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Найдены условия последовательной самосборки в твердых пленках протохлорофилла двух агрегированных форм с максимумами поглощения при 647±1 нм (ПХл 647) и 651±1 нм (ПХл 651) и максимумами флуоресценции соответственно при 653—655 и 654—657 нм. Указанные формы моделируют нативную фотохимически активную форму предшественника хлорофилла в растениях (Р650). Исследование ИК-спектров в области 1800—1600 $см^{-1}$, спектров КД и флуоресценции позволило установить различие между двумя формами по типу молекулярной организации агрегированных структур. Предполагается, что ПХл 647 состоит из димеров, в образовании которых кетогруппы циклопентаноновых колец молекул участия не принимают, тогда как в состав ПХл 651 входят димеры, более прочно связанные межмолекулярными связями, образованными с участием кетогрупп.

Интерес к проблеме агрегации протохлорофилловых пигментов, определивший направление ряда исследований последних лет, вызван надеждой на глубокое и всестороннее познание природы естественного состояния предшественника хлорофилла. Круг исследований указанного направления охватывает изучение агрегации протохлорофилла и протохлорофиллида в неполярных растворителях, твердых пленках, водных коллоидных растворах при помощи разнообразных методов.

Твердые пленки хлорофилла и его аналогов привлекают внимание в связи с тем, что в таких системах легко и просто могут быть реализованы возможности межмолекулярного взаимодействия пигментов и имитировано их состояние в клетках фотосинтезирующих организмов [1].

В твердых пленках протохлорофилла, выделенного из оболочек семян тыквы, нам удалось наблюдать самосборку агрегированной формы с поглощением при 645—647 нм под действием паров аммиака [2] и самосборку формы с поглощением при 650 нм в тех же системах под действием паров метанола и других органических растворителей [3, 4]. Спектры поглощения обеих форм сходны с поглощением основной фотоактивной формы протохлорофиллида в интактных этиолированных листьях высших растений (Р650). Это позволяет рассматривать каждую из форм в качестве модели естественной нативной формы предшественника хлорофилла (хлорофиллида). Вопрос о молекулярной структуре указанных форм определил постановку нашей работы.

В данной работе мы нашли условия, в которых происходит последовательная самосборка агрегированных форм протохлорофилла с максимумами поглощения 647 и 651 нм, и провели сравнительное исследование спектров поглощения и флуоресценции, ИК-спектров в карбонильной области и спектров КД этих форм.

МЕТОДИКА

Использовали протохлорофилл, выделенный из семян тыквы (сорта Столовая) по методу, близкому к описанному ранее [5]. Возможное присутствие в препаратах малой примеси 4-винилпротохлорофилла не должно было сказываться на результатах, так как оба пигмента не различаются по агрегационным свойствам [5, 6].

Для измерений спектров поглощения, флуоресценции и КД пленки получали в вакуумных трубках Тунберга при испарении эфира из эфирных растворов ($5 \cdot 10^{-5}$ М). На каждый опыт расходовали 0,5—0,7 мл раствора с таким расчетом, чтобы оптическая плотность исходной пленки (поглощение 630—635 нм) не превышала 0,15—0,2 ед. Такие пленки довольно равномерны по толщине, легче подвергаются структурной перестройке, чем более плотные, и обнаруживают гораздо меньшую чувствительность к возбуждающему свету при измерении флуоресценции (см. ниже).

При обработке пленок парами аммиака, воды, ацетона или другого растворителя нужное соединение помещали в боковой отвод трубки Тунберга и спектры поглощения регистрировали в процессе экспозиции при 20° [4].

Для измерения ИК-спектров (на приборе UR-20, «Carl Zeiss», ГДР) пленки получали на пластинках из NaCl [7].

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-14, их вторые производные — на спектрофотометре UV-VIS-554 («Perkin Elmer», США), спектры флуоресценции регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре MPF-4 («Hitachi», Япония), спектры КД — на спектрополяриметре «Jasco 40-AS» (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения. Согласно нашим более ранним данным [2], в пленках протохлорофилла под действием паров аммиака на исходную структуру с поглощением 630—635 нм за 30—60 мин образуется форма с поглощением 646—648 нм (ПХл 647). Эта форма в синей области имеет максимум поглощения 475—477 нм, который появляется с исчезновением первоначального максимума 440 нм (рис. 1, *а*, *2*).

Самосборку ПХл 647 можно наблюдать и в парах воды (при многочасовом действии на пленки). Однако только аммиак как комплексообразователь ПХл 647 безотказно действует на пленки разных образцов независимо от их толщины и структуры. Под действием аммиака ПХл 647 формируется как отдельная дискретная структура, доминирующая в пленках, о чем свидетельствуют производные спектров поглощения (рис. 1, *б*, *2′*). Указанной форме сопутствует другая форма — с максимумом поглощения 630 нм, который всегда проявляется в производных спектрах пленок как минорный, но отчетливо заметный компонент.

В присутствии паров ацетона ПХл 647 довольно быстро (за 15—30 мин) перестраивается в новую форму с поглощением при 650—652 нм (ПХл 651), которая в синей области имеет максимум 480—482 нм (рис. 1, *а*, *3*). Следует отметить, что ранее образование агрегированной формы с поглощением при 652—655 нм наблюдалось у протохлорофиллида в неполярных растворителях [8, 9].

У ПХл 651 обращает на себя внимание узкая форма красного максимума и резко выраженный гиперхромизм, свидетельствующие о сильном межмолекулярном взаимодействии пигмента.

ПХл 651, как и ПХл 647, существует в структуре пленки вместе с коротковолновой формой с максимумом поглощения 630 нм (рис. 1, *б*, *3′*). Эта форма всегда сопутствует ПХл 651, хотя ее относительное содержание варьирует у пленок разных образцов и зависит от их плотности.

Образование ПХл 651 из ПХл 647 можно наблюдать не только в парах ацетона, но и в парах других растворителей — серного эфира и метанола. Быстрая (в течение нескольких минут) самосборка ПХл 651 происходит и при нагревании до 80—90° пленок, содержащих ПХл 647 (рис. 1, *в*). По всей вероятности, высокая температура, как и органические растворители, в самосборке ПХл 651 из ПХл 647 действуют неспецифично, увеличивая подвижность структуры и изменяя взаимоориентацию составляющих ее элементов.

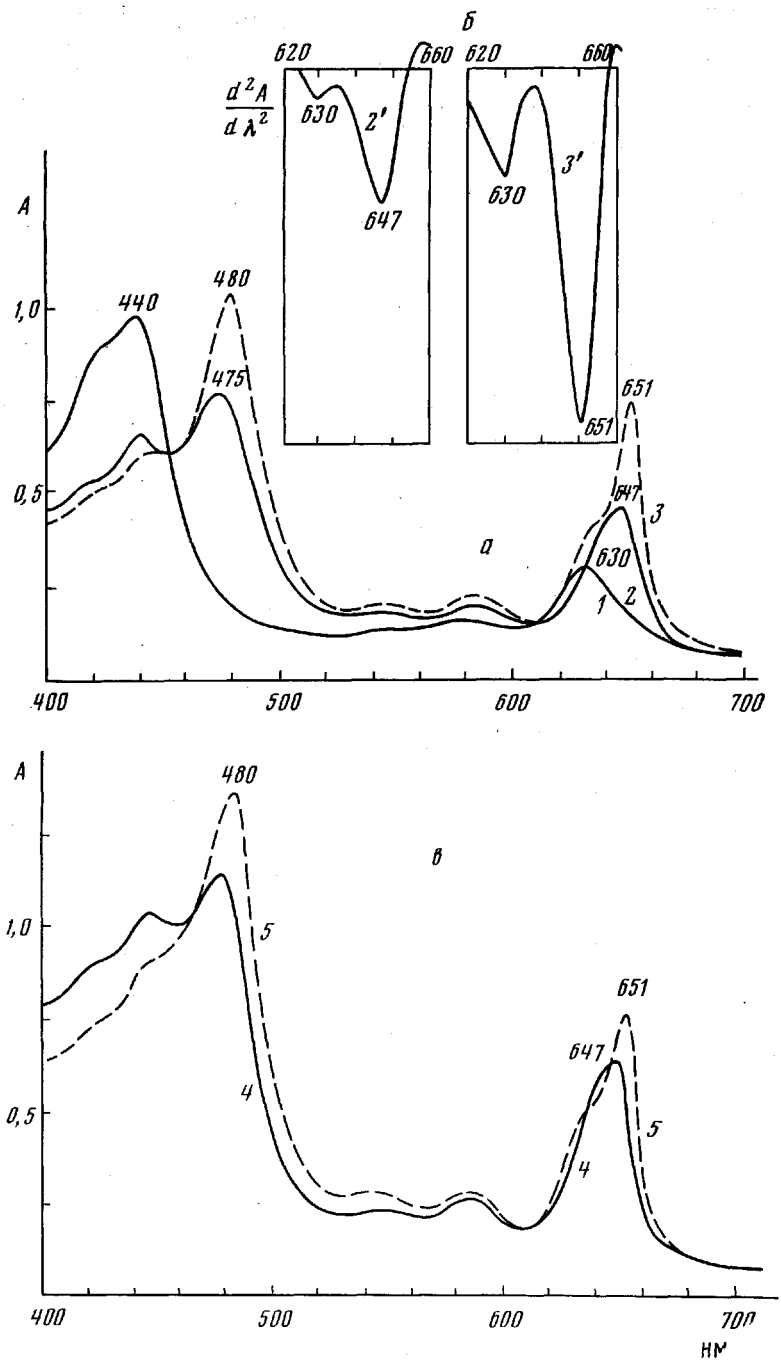


Рис. 1. Спектры поглощения (*а*, *в*) и вторые производные спектров поглощения (*б*) твердых пленок протохлорофилла. *1* — исходная пленка; *2*, *2'* — после обработки парами аммиака при 20° в течение 45 мин; *3*, *3'* — после последующей обработки парами ацетона при 20° в течение 30 мин; *4* — пленка (другой образец), обработанная аммиаком; *5* — то же после нагревания (85°) в течение 10 мин

Для получения структурной характеристики ПХл 647 и ПХл 651 мы измеряли ИК-спектры в карбонильной области и спектры КД пленок, последовательно обработанных парами аммиака и ацетона.

ИК-спектры. Самосборка ПХл 647 под действием аммиака сопровождается появлением в ИК-спектрах пленок (рис. 2, *1*, *2*) полосы 1685—1680 см $^{-1}$, а также менее интенсивной полосы 1585 см$^{-1}$, которую, по-видимому, можно связать с сольватацией молекул пигмента аммиаком.

У разных пленок поглощение в области 1685—1680 см$^{-1}$ проявляется с разной отчетливостью, а у некоторых образцов с относительно невысокой плотностью его можно наблюдать в виде отдельного, довольно четко заметного максимума (рис. 2, *3*). Появлению полосы 1685—1680 см$^{-1}$ всегда сопутствует уменьшение интенсивности полос 1740 см$^{-1}$ (колебания карбонилов сложноэфирных групп у C(7) и C(10)) и 1705—1695 см$^{-1}$ (колебания кетогрупп циклопентаноновых колец). Поэтому появление максимума 1685—1680 см$^{-1}$ у пленок, обработанных аммиаком, мы склонны объяснять присоединением аммиака (координационными связями) к части кетогрупп и эфирных карбонилов. Кетогруппы, присоединяя аммиак, не включаются в образование пигмент-пигментных связей (у хлорофилловых пигментов поглощение кетогрупп, связанных межмолекулярным взаимодействием, лежит в более низкочастотной области [7, 10, 11]).

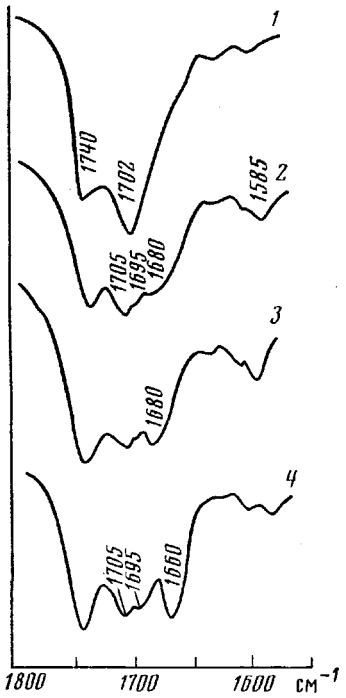


Рис. 2. ИК-спектры пленок протохлорофилла. *1* — исходная пленка; *2* — после обработки парами аммиака при 20° в течение 1,5 ч; *3* — другой образец пленки, обработанной аммиаком; *4* — то же, что *2*, после обработки парами ацетона в течение 45 мин

Что касается эфирных карбонильных группировок, то можно допустить возможность включения части их (скорее всего карбонильных групп пропионовокислых заместителей у C(7)) в образование межмолекулярных связей с центральными атомами магния через посредство аминогрупп (или гидроксильных групп) аммиака: эфир C=O...HN(R)...Mg (или эфир C=O...HO(NH_4)...Mg). Наше предположение находится в согласии с предположением об участии указанных группировок в межмолекулярных связях, формирующих структуру димеров в неполярных растворителях [12].

Самосборка ПХл 651 из ПХл 647 (в присутствии паров органических растворителей) характеризуется появлением четко выраженного максимума 1665—1660 см$^{-1}$ в ИК-спектрах пленок, которое сопровождается уменьшением относительной интенсивности поглощения свободных кетогрупп (полосы 1695 и 1705 см$^{-1}$) (рис. 2, *4*). Отмеченные изменения объясняются, по всей вероятности, образованием межмолекулярных связей с участием кетогрупп, которые, как можно полагать, вступают во взаимодействие с центральными атомами магния через посредство аминогрупп (или гидроксильных групп) аммония, присоединенного к атомам магния и карбонилам в исходной структуре ПХл 647 (кето-C=O...HN(R)...Mg или кето-C=O...HO(NH_4)...Mg).

Таким образом, измерение ИК-спектров показало, что структуры ПХл 647 и ПХл 651 различаются по межмолекулярным связям, возникающим при их формировании. Разные межмолекулярные связи создают различие во взаиморасположении молекул в структурных ячейках той и другой формы, о чем свидетельствуют спектры КД.

Спектры КД. *ПХл 647.* В отличие от формы с поглощением 630—635 нм со слабо выраженным круговым дихроизмом (рис. 3, *1*) ПХл 647 обладает довольно высокой оптической активностью с характерными особенностями структуры спектров КД (рис. 3, *2*). В спектрах КД пленок, содержащих ПХл 647, в области красного максимума поглощения проявляется интенсивный отрицательный компонент при 651÷652 нм, которому сопутствует менее резко выраженный положительный компонент с поглощением при ~635 нм меньшей интенсивности. Формы и

амплитуды обеих полос обнаруживают некоторую изменчивость в разных опытах, связанную с непостоянством толщины и светорассеяния пленок, но общий характер спектральных кривых не изменяется. Указанные компоненты у большинства спектров пересекают нулевую линию при 642—643 нм, и их, по-видимому, можно рассматривать в качестве основных компонентов расщепления максимума поглощения ПХл 647.

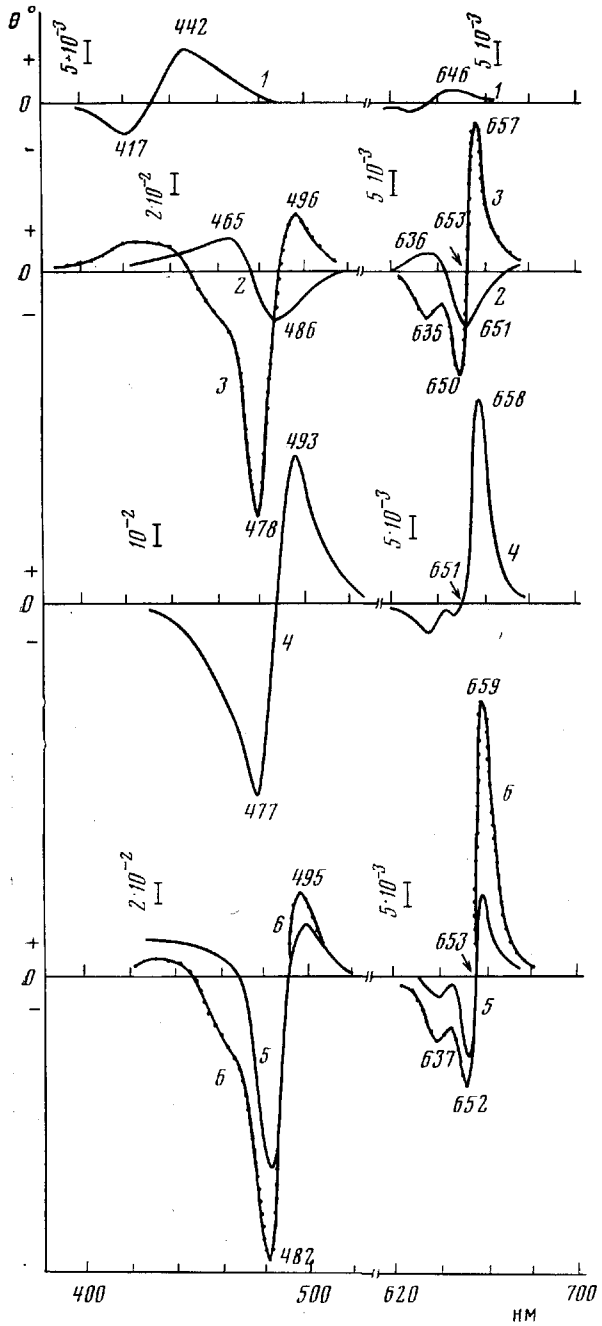


Рис. 3. Спектры КД пленок протохлорофилла. *1* — исходная пленка (максимум поглощения 632 нм); *2* — после обработки парами аммиака при 20° в течение 45 мин (максимум поглощения 647 нм); *3* — после последующей обработки парами ацетона при 20° в течение 30 мин (максимум поглощения 652 нм); *4* — образец пленки после последовательной обработки парами аммиака и диэтилового эфира (максимум поглощения 651 нм); *5* — другой образец пленки с максимумом поглощения 651 нм; *6* — то же после нагревания (85°, 10 мин)

Можно установить определенную степень сходства спектров КД пленок, содержащих ПХл 647, со спектрами протохлорофиллид-голохрома и гомогенатов этиолированных листьев [13, 14], что может свидетельствовать о сходстве молекулярной организации пигментных агрегатов в обоих случаях.

В области основного синего максимума у ПХл 647 обнаруживаются две отчетливые, близкие к симметричным полосы — отрицательная (~485 нм) и положительная (~465 нм), которые пересекают нулевую линию в максимуме поглощения (рис. 3, *2*).

Следовательно, у ПХл 647 оба основных максимума поглощения (соответствующие дипольным переходам Q_y и B_y [12]) расщепляются на два компонента с противоположными знаками, что, по всей вероятности, связано с экситонным взаимодействием молекул, развивающимся при агрегации. Одинаковая знаковая направленность длинноволнового и коротковолнового компонентов расщепления у синей и красной полос свойственна не только ПХл 647, но и ПХл 651 (см. ниже). Эта особенность спектров КД отличает также растворы протохлорофилловых пигментов в полярных и неполярных растворителях [6, 12, 15, 16], как и коллоидные растворы [17]. Она обусловлена одинаковым (параллельным) направлением поляризации дипольных переходов, ответственных за основные полосы, что характерно для протохлорофилловых пигментов [15] и отличает их от хлорофилла, у которого соответствующие переходы взаимно перпендикулярны.

ПХл 651. Образование ПХл 651 из ПХл 647 сопровождается полной перестройкой спектров КД пленок (рис. 3, *3*), что выражается в появлении новых компонентов, имеющих гораздо бóльшие амплитуды по сравнению с исходными (ср. спектры *2* и *3* на рис. 3). У ПХл 651 самая длинноволновая в спектре полоса (657—660 нм) — положительная, тогда как у ПХл 647 наибóлее длинноволновая полоса (~651 нм) — отрицательная. Полоса при 658 (±1) нм проявляется в виде узкого очень интенсивного положительного сигнала вместе с более или менее симметричным отрицательным сигналом при 651 (±2) нм. Эти сигналы пересекаются с нулевой линией вблизи максимума поглощения (при 652÷÷653 нм) и являются, по всей вероятности, двумя основными компонентами его расщепления. Соотношение их амплитуд меняется от опыта к опыту. У некоторых образцов пленок с ПХл 651 длинноволновый положительный сигнал сильно преобладал над отрицательным, что создавало асимметричность спектров (рис. 3, *4*). Подобные спектры КД у формы протохлорофилла с поглощением при 650 нм в твердых пленках наблюдали Беди и соавт. [18], исследовавшие более плотные образцы по сравнению с нашими, судя по приведенным ими спектрам поглощения.

Нагревание до 80÷90° пленок, содержащих ПХл 651, приводило к заметному увеличению оптической активности с особенно значительным возрастанием положительного сигнала при 659 нм (рис. 3, *5*, *6*).

У всех исследованных образцов в спектрах КД наряду с основным отрицательным сигналом 650—655 нм всегда обнаруживался одиночный отрицательный сигнал гораздо меньшей интенсивности в области 635—638 нм. Относительная интенсивность этого сигнала в разных вариантах опытов непостоянна. Его можно приписать коротковолновой форме пигмента, всегда сопутствующей ПХл 651. Наблюдаемая изменчивость относительной интенсивности сигнала у разных пленок объясняется, повидимому, непостоянством структурного соотношения обеих форм протохлорофилла.

Спектры КД дают представление о структурных особенностях ПХл 647 и ПХл 651. Наличие двойных компонентов расщепления в области основных максимумов поглощения (и их высокая интенсивность) позволяют считать обе формы состоящими из димеров пигмента [19], что, однако, не исключает вероятности присутствия в структуре каждой из них более крупных молекулярных соединений, составленных из димерных молекул в качестве основных структурных единиц. Вместе с тем

отмеченные различия в характере спектров КД приводят к выводу о существенном различии молекулярной организации агрегированных структур в составе вышеупомянутых форм.

Структурное различие достигается, по всей вероятности, в результате изменения (увеличения) углов наклона плоскостей составляющих молекул, которое происходит при превращении ПХл 647.

Можно предположить, что процесс структурной перестройки ПХл 647 в ПХл 651 (в присутствии паров органических растворителей и при нагревании) сопровождается поворотом молекул на 180°, о чем свидетельствует противоположная знаковая зависимость компонентов расщепления у указанных форм. Зенькевич и соавт. [17] наблюдали обращение знаков сигналов КД у формы протохлорофилла с поглощением при 640 нм в водно-диоксановых растворах при хранении, что было приписано повороту молекул в структурных ячейках (димерах) друг относительно друга на 180°.

Характер межмолекулярных связей у структурных элементов ПХл 647 (скорее всего это одинарные связи, образованные с участием карбонильных групп пропионовокислых остатков) допускает, по-видимому, относительно бо́льшую свободу движения составляющих молекул — как вращательного (вокруг межмолекулярных связей), так и колебательного (по направлению связей). Благодаря этому видоизменяется конформация димеров (в рамках одной структуры) за счет изменения межмолекулярного расстояния и взаимной ориентации молекул. Подвижность и неустойчивость структуры ПХл 647 обусловливают легкость его превращения в ПХл 651, отличающийся неизмеримо большей стабильностью.

Можно думать, что в сформировавшейся структуре ПХл 651 молекулы связаны более прочно, чем у ПХл 647, и жестко зафиксированы (возможно, двойными межмолекулярными связями, образованными с участием карбонилов циклопентаноновых колец и пропионовокислых остатков), что исключает конформационную изменчивость. Поэтому основные максимумы в спектрах поглощения, КД, а также флуоресценции (см. ниже) у ПХл 651 отличаются узостью и остротой, что особенно наглядно при сравнении со спектрами ПХл 647, имеющим более широкие спектральные полосы.

Спектры флуоресценции. *ПХл 647.* Пленки, содержащие ПХл 647, при 20° интенсивно люминесцируют. При монохроматическом возбуждении светом с длиной волны 475 нм (соответствует синей полосе поглощения ПХл 647) в спектрах флуоресценции доминирует отчетливый максимум ~655 нм, вместе с которым проявляются менее четко выраженные полосы при 690—700 нм гораздо меньшей интенсивности, а также малозаметный компонент ~760 нм (рис. 4, *А*, кривая *1*).

Максимум 655 нм имеет полуширину 21÷25 нм, его положение у разных образцов варьирует в пределах 652÷656 нм. Он соответствует флуоресценции ПХл 647. Однако не исключено, что определенный вклад в свечение при 655 нм вносит флуоресценция ПХл 651 (см. ниже). Последний может присутствовать в структуре пленок, обработанных аммиаком, как примесь, которая не обнаруживается по поглощению, но является эффективной ловушкой энергии электронного возбуждения, мигрирующей от ПХл 647.

Свечение при 690÷700 нм обязано колебательному подуровню основной полосы, а также люминесценции форм с поглощением в области 670—680 нм, которые в малых количествах, по всей вероятности, всегда присутствуют в разного типа пленках протохлорофилла, как и в других системах с агрегированным пигментом [20], и могут быть результатом фотоокисления (см. ниже).

При возбуждении монохроматическим светом 440 нм, по-видимому, более поглощаемым указанными длинноволновыми формами, относительная доля свечения в области 680—690 нм заметно возрастает (рис. 4, *а*, *2*).

При возбуждении светом 440 или 420 нм в спектрах некоторых образцов пленок с ПХл 647 можно было видеть (рис. 4, *а*, *3*) максимум

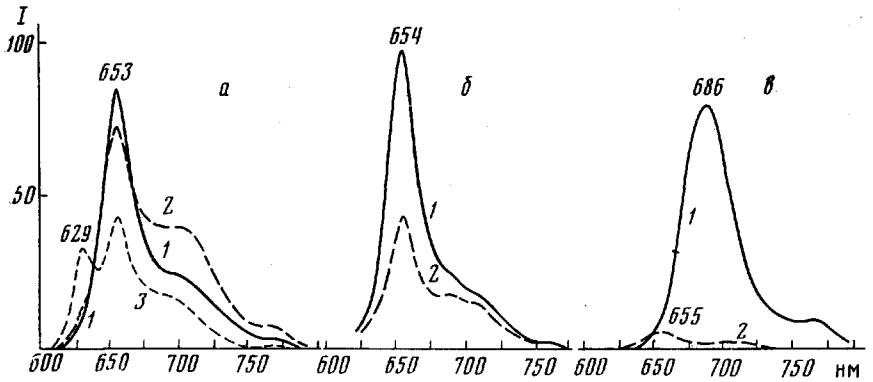


Рис. 4. Спектры флуоресценции пленок протохлорофилла с максимумом поглощения 647 нм. *а*: *1* — исходная пленка при 20°, возбуждение 475 нм; *2* — то же, возбуждение 440 нм; *3* — другой образец при 20°, возбуждение 420 нм; *б*: *1* — исходная пленка при 20°, возбуждение 475 нм; *2* — то же после освещения возбуждающим светом в течение 15 мин в вакууме; *в*: *1* — пленка при —196° (возбуждение 475 нм); *2* — то же после нагревания до 20°

628—630 нм, соответствующий флуоресценции коротковолновой формы. Интенсивность свечения при 655 нм уменьшается под действием возбуждающего света (приблизительно в 1,5÷2 раза через 10÷15 мин световой экспозиции в наиболее типичных вариантах опытов), тогда как длинноволновая люминесценция после 30÷40 мин освещения меняется незначительно (рис. 4, *б*).

В присутствии кислорода воздуха, а также при увеличении концентрации пигмента (т. е. у плотных образцов) фоточувствительность максимума 655 нм значительно возрастает, что является общим свойством ПХл 647 и ПХл 651.

Охлаждение до температуры жидкого азота, почти не сказываясь на интенсивности максимума 655 нм, приводит к увеличению длинноволновой люминесценции более чем на порядок (основной максимум в низкотемпературных спектрах ~685 нм, см. рис. 4, *в*).

ПХл 651 флуоресцирует при 20° более интенсивно, чем ПХл 647. Спектры флуоресценции, регистрируемые при монохроматическом возбуждении 480 нм (в полосу поглощения пленок), очень характерны, имеют основной максимум при 655 нм (рис. 5, *а*) и, как и спектры ПХл

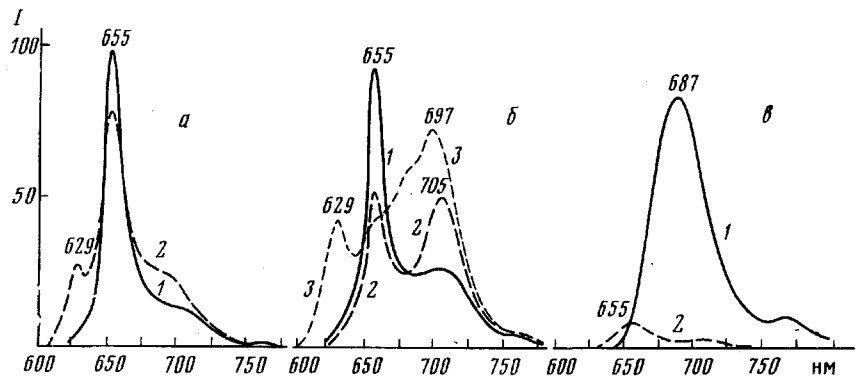


Рис. 5. Спектры флуоресценции пленок протохлорофилла с максимумом поглощения 651 нм. *а*: *1* — исходная пленка при 20°, возбуждение 480 нм; *2* — то же, возбуждение 440 нм; *б*: *1* — исходная пленка при 20°, возбуждение 480 нм; *2* — то же после освещения возбуждающим светом в течение 15 мин в присутствии воздуха; *3* — другой образец после освещения (условия те же), возбуждение 440 нм; *в*: *1* — пленка при —196° (возбуждение 480 нм); *2* — то же после нагревания до 20°

647, аналогичны спектрам интактных этиолированных листьев при —196°.

Максимум 655 (653—657) нм доминирует в спектрах, резко выражен и имеет полуширину, как правило, в пределах 15÷17 нм, т. е. он на 5÷÷7 нм уже по сравнению с тем же максимумом ПХл 647, что соответствует более узкой форме основных полос в спектрах поглощения и КД у ПХл 651.

В спектрах люминесценции ПХл 651, как и ПХл 647, при возбуждении светом с длиной волны 440 нм наряду с максимумами 655 и 705 нм (колебательный подуровень) обнаруживается полоса 630 нм, а также полосы в спектральной области хлорофилла (680—695 нм) (рис. 5, *а*, *2*). Эти особенности спектров объединяют ПХл 651 и ПХл 647 с пигментной системой этиолированных листьев, спектры люминесценции которых, как известно [21, 22], кроме основного максимума ~655 нм с его колебательным сателлитом (705÷710 нм) содержат коротковолновый компонент (625÷630 нм) и полосы относительно низкой интенсивности в области 675÷690 нм.

Действие света. Люминесценция при 655 нм у ПХл 651, как и у ПХл 647, чувствительна к действию света. В наиболее типичных опытах 10÷÷15-минутное освещение возбуждающим лучом (480 нм) в вакууме приводило к уменьшению интенсивности максимума 655 нм на ~50%. Длинноволновая люминесценция (~705 нм) при таком освещении не только не уменьшалась, но даже заметно увеличивалась, что показано многими опытами. Скорость и уровень отмеченных световых изменений люминесценции, варьирующие в разных опытах, всегда значительно (часто во много раз) больше в присутствии кислорода, чем без него, а также у более плотных образцов по сравнению с менее плотными.

Более резкие световые изменения люминесценции у «метаноловой формы протохлорофилла, наблюдавшиеся нами ранее [4], в значительной мере обусловлены более высокой плотностью исследовавшихся тогда образцов.

На рис. 5, *б*, *1*, *2* показано типичное изменение люминесценции ПХл 651, наблюдаемое при освещении на воздухе; уменьшение максимума 655 нм сопровождается двукратным увеличением длинноволновой люминесценции. Интересно, что при возбуждении люминесценции «засвеченных» пленок светом с длиной волны 440 нм в спектрах проявляется интенсивная полоса 690÷695 нм как доминирующий компонент при почти полном отсутствии максимума 655 нм (рис. 5, *б*, *3*).

Следует отметить, что в наших опытах по действию света на ПХл 651, как и на ПХл 647, значительное (в ряде опытов — многократное) падение интенсивности флуоресценции при 655 нм не сопровождалось сколько-нибудь существенным уменьшением соответствующих максимумов поглощения. Так, в крайних случаях, когда под действием света (минуты) на достаточно плотные образцы ($A>0{,}3$) в присутствии кислорода флуоресценция при 655 нм падала в 3÷10 раз по сравнению с исходным уровнем, уменьшение поглощения не достигало и 10%.

Эти результаты свидетельствуют о высокоэффективной миграции энергии возбуждения с ПХл 651 (как и с ПХл 647) на длинноволновые (может быть, хлорофиллоподобные) продукты, образующиеся при освещении. Аналогичный процесс происходит на начальных этапах образования хлорофилла (хлорофиллида) в этиолированных листьях, когда фотохимически активная форма предшественника (Р650) значительную часть поглощенной световой энергии передает образующемуся продукту фотопревращения (хлорофиллиду) [23—25], что обусловливает несоответствие изменений флуоресценции и поглощения у протохлорофиллида 650 нм [24, 25].

ПХл 651 по действию глубокого охлаждения на люминесценцию не отличается от ПХл 647. В его низкотемпературных спектрах также преобладает широкая полоса ~685 нм (рис. 5, *в*). Ее происхождение, как можно предположить, обусловлено, с одной стороны, усилением под действием низкой температуры люминесценции соответствующих длинно-

волновых агрегированных форм (или формы), присутствующих в пленках, а с другой — возрастанием эффективности миграции энергии электронного возбуждения при низкой температуре к этим формам (или форме) от ПХл 651. Последнее обстоятельство и объясняет, по всей вероятности, тот факт, что люминесценция при 655 нм у ПХл 651, как и у ПХл 647, не обнаруживает увеличения интенсивности в условиях глубокого охлаждения.

Итак, в твердых пленках протохлорофилла в присутствии аммиака происходит последовательная самосборка двух форм — ПХл 647 и ПХл 651, каждая из которых обладает люминесценцией с максимумом ~655 нм.

ПХл 647 и ПХл 651, моделируемые в пленках, можно рассматривать как структурные аналоги естественной фотохимически активной формы протохлорофиллида (Р650); основанием для такого предположения является большое сходство основных спектральных свойств этих форм и интактных этиолированных листьев.

Проведенное изучение спектров КД в дополнение к спектрам поглощения не оставляет сомнений в том, что они являются агрегированными формами. Основу агрегированной структуры у той и другой формы, вероятно, составляют димеры молекул, которые различаются по взаимоориентации плоскостей молекул и углам наклона их друг к другу.

Из анализа спектров КД следует, что углы наклона плоскостей молекул больше у димеров ПХл 651, конфигурация которых, возможно, близка к ортогональной. Этот вывод, как и другие результаты, хорошо совместим с предположением о том, что в структуре ПХл 651 димеры связаны в более сложные молекулярные образования, по всей вероятности, в небольшие олигомеры (может быть, тетра- и гексамеры), с упорядоченным и жестко фиксированным расположением молекул по отношению друг к другу. Такая структура создается в процессе самосборки ПХл 651 из ПХл 647, когда образуются межмолекулярные связи с участием кетогрупп циклопентаноновых колец в дополнение к связям, образованным с участием карбонилов пропионовокислых заместителей у С(7).

В отношении димеров ПХл 647 можно предположить, что они являются несвязанными димерами с постоянно меняющейся, подвижной конформацией, которая создается одиночными связями между карбонилами пропионовокислых заместителей и центральными атомами магния.

Из наших данных следует, что протохлорофилл в твердых пленках может путем самосборки образовывать агрегированные структуры двух типов — ПХл 647 и ПХл 651, которые, несмотря на близость максимумов поглощения, различаются всей совокупностью исследованных спектральных свойств, что свидетельствует о существенном различии их молекулярной организации. Недавно [18] наблюдалось образование в твердых пленках протохлорофилла двух разновидностей формы с поглощением при 650 нм, которые совершенно идентичны по спектрам поглощения и низкотемпературной люминесценции (максимум 705 нм), но различаются знаками сигналов КД, что свидетельствует о различии во взаимоориентации молекул. Следовательно, протохлорофилл в искусственных условиях способен к существованию по меньшей мере в трех агрегированных формах, которые моделируют особенности структуры Р650. Это наводит на мысль о неоднородности состояния Р650 в мембранах этиопластов и возможности его существования в нескольких структурных модификациях, которые к тому же могут различаться и функционально [26]. Особенности молекулярной организации каждой структуры определяются модификациями специфической нативной конформации белковых компонентов естественных протохлорофилл(протохлорофиллид)-белковых комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Krasnovsky A. A., Bystrova M. I.* Biosystems, 1980, *12*, 181—194.
2. *Быстрова М. И., Красновский А. А.* Мол. биол., 1967, *1*, 362—372.
3. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Ланг Ф.* Докл. АН СССР, 1971, *201*, 1485—1488.

4. *Быстрова М. И., Ланг Ф., Красновский А. А.* Мол. биол., 1972, *6*, 77—86.
5. *Houssier C., Sauer K.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, *172*, 476—491.
6. *Rasquain A., Houssier C., Sironval C.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, 462, 622—641.
7. *Быстрова М. И., Мальгошева И. Н., Красновский А. А.* Мол. биол., 1976, *10*, 193—205.
8. *Seliskar C. J., Ke B.* Biochim. Biophys. Acta, 1968, *153*, 685—691.
9. *Brouers M.* Photosynthetica, 1972, *6* (4), 415—423.
10. *Katz J. J., Dougherty R. C., Boucher L. J.* In:The Chlorophylls/Eds. L. P. Vernon, J. R. Seely. New York — London: Acad. Press, 1966, p. 185—251.
11. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Мальгошева И. Н.* Докл. АН СССР, 1972, *204*, 1473—1476.
12. *Houssier C., Sauer K.* J. Amer. Chem. Soc., 1970, *92*, 779—791.
13. *Schultz A., Sauer K.* Biochim. Biophys. Acta, 1972, *267*, 320—340.
14. *Mathis P., Sauer K.* Biochim. Biophys. Acta, 1972, *267*, 498—511.
15. *Houssier C., Sauer K.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, *172*, 492—502.
16. Brouers M., Photosynthetica,1975, 9 (3), 304—310.
17. *Зенькевич Э. И., Кочубеев Г. А., Лосев А. П., Гуринович Г. П.* Мол. биол., 1978, *12*, 1002—1011.
18. *Böddi B., Soos J., Lang F.* Biochim. Biophys. Acta, 1980, *593*, 158—165.
19. *Tinoco I.* Radiation. Res., 1963, *20*, 135—139.
20. *Зенькевич Э. И., Лосев А. П.* Мол. биол., 1976, *20*, 133—139.
21. *Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1957, *117*, 106—109.
22. *Литвин Ф. Ф., Беляева О. Б.* Биохимия, 1968, *33*, 928—936.
23. *Kahn A., Boardman N. K., Thorne S. W.* J. Mol. Biol., 1970, *48*, 85—101.
24. *Vaughan G. D., Sauer K.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, *347*, 383—394.
25. *Литвин Ф. Ф., Ефимцев Е. И., Игнатов Н. В.* Физиол. растений, 1976, *23*, 653—659.
26. *Беляева О. Б., Литвин Ф. Ф.* Биофизика, 1980, *25*, 617—623.

Поступила в редакцию
8.IV.1981

THE STUDY OF MOLECULAR ARRANGEMENT OF PROTOCHLOROPHYLL AGGREGATED FORMS IN SOLID FILMS

M. I. BYSTROVA, I. A. SAFRONOVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The conditions were found for the successive self-assembly of two protochlorophyll aggregated forms in solid films with absorption maxima at 647 (±1) nm (PChl 647) and 651(±1)nm (PChl 651) and fluorescence maxima at 653—655 nm and 654—657 nm, respectively. These forms model the native photochemically active form of the precursor of chlorophyll (chlorophyllide) in plants (P650). The investigation of infrared spectra (in the region 1800—1600 cm^{-1}), CD-spectra and fluorescence, carried out in this study, permitted in between the indicated forms to distinguish the type of the molecular arrangement of aggregated structures, PChl 647 is supposed to consist of unstable dimers formed without the participation of ketogroups of the cyclopentanone rings, while the structure of PChl 651 includes the dimers to bind more firmly by the intermolecular bonds formed at the expense of ketogroups and a central magnesium atom.

Том XXVII, вып. 1 1982

УЧАСТИЕ ФЕОФИТИНА В ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССАХ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМЫ II

КЛИМОВ В. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Обратимое фотовосстановление феофитина *а* обнаружено в препаратах фотосистемы II (ФС-II) зеленых растений в условиях, когда так называемый первичный акцептор электрона ФС-II (Q) восстановлен в темноте. Установлено, что феофитин в реакционных центрах (РЦ) ФС-II функционирует в качестве первичного акцептора электрона между первичным донором электрона ($П_{680}$) и Q. Уточнены природа и свойства других компонентов РЦ, выявлено сходство в организации РЦ ФС-II и РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий.

Ранее было установлено, что возбужденные светом хлорофиллы (Хл) и их феофитины (Фф) способны к обратимому фотохимическому восстановлению и окислению в присутствии доноров или акцепторов электрона соответственно (см. обзоры [1—4]). Было предположено, что эта способность лежит в основе участия Хл в первичных фотореакциях преобразования энергии света в химическую энергию при фотосинтезе. Впоследствии было показано, что возбужденный Хл или бактериохлорофилл (Бхл) выполняет роль первичного донора электрона во всех известных реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза, тогда как первичными акцепторами электрона являются хиноны или железо-серные белки (см., например, обзор [5]). Однако в последние годы получены данные о том, что между первичным донором электрона (Хл) и акцептором типа хинона или железо-серного белка в РЦ, вероятно, функционируют дополнительные (действительно первичные) акцепторы электрона, такие, как бактериофеофитин (Бфф), Фф или Хл, т. е. первичное разделение зарядов при фотосинтезе происходит между молекулами хлорофилловой природы (см. обзор [6], [7—27]).

Если участие Хл в фотосинтезе зеленых растений не вызывает сомнений, то роль его безмагниевого производного — Фф в фотосинтетических процессах долгое время оставалось неясной. При выделении Хл из растений многие исследователи давно находили Фф при хроматографии пигментов на сахарозе. Возникает вопрос о происхождении Фф: является ли этот пигмент естественным компонентом листьев или артефактом, возникающим в процессе извлечения и анализа хлорофиллов. Была разработана процедура флуорометрического определения Фф в листьях с исключением возможных причин, приводящих к удалению магния из молекул Хл; однако и в этом случае количество Фф во всех пробах листьев составляло 1,5—2,3% [28]. Способность Бфф и Фф к обратимому фотовосстановлению была изучена ранее [29].

Настоящая работа посвящена обзору данных, свидетельствующих о функционировании феофитина *а* (Фф *а*) в качестве первичного акцептора электрона фотосистемы 2 (ФС-II) зеленых растений.

Первичные донор и акцептор электрона в РЦ ФС-II. По современным представлениям роль первичного донора электрона ФС-II выполняет форма Хл с максимумом поглощения при ~680 нм, получившая название $П_{680}$. (В настоящее время обсуждается вопрос о том, является ли этот пигмент мономерной или димерной формой Хл. Во всяком случае, при самосборке агрегированных форм Хл отчетливо наблюдаются формы с максимумом поглощения при 680 нм [30].) Фотоокисление $П_{680}$ до $П_{680}^{+\cdot}$ регистрируется по выцветанию характерных для Хл полос поглощения при 435 и 680—690 нм и по появлению сигнала ЭПР с $g=2{,}0025$ и $\Delta H \approx 7$ Гс [31, 32]. Первичным акцептором электрона (получившим обозначение Q) в ФС-II, вероятно, является особая форма пластохинона (Пх); его восстановление сопровождается характерными изменениями поглощения в УФ-области, а также сдвигом полос поглощения в видимой области спектра, интерпретируемым одно время как фотовосстановление пигмента $С_{550}$ [32—34]. В результате первичной световой реакции ФС-II акцептор Q принимает только один электрон и восстанавливается до $Q^{-\cdot}$, однако сигнал ЭПР анион-радикала $Пх^{-\cdot}$ не был описан; окислительно-восстановительный потенциал (E_0') для пары $Q/Q^{-\cdot}$ лежит в области — 130 мВ; состояние РЦ с разделенными зарядами ($П_{680}^{+\cdot}Q^{-\cdot}$) рекомбинирует за ~150 мкс, что сопровождается люминесценцией Хл [34].

Переход РЦ в состояние [$П_{680}$ $Q^{-\cdot}$] вследствие фотохимического или темнового восстановления Q сопровождается возрастанием выхода флуоресценции Хл в несколько раз [35—39], что, согласно гипотезе Дейзенса и Свирса [35], обусловлено неспособностью этого состояния использовать энергию возбуждения для фотохимической реакции. Такое изменение выхода флуоресценции, получившее название «переменной флуоресценции» (в отличие от так называемой «постоянной» компоненты флуоресценции, не зависящей от состояния РЦ), наблюдается также у бактерий при темновом

восстановлении акцептора электрона — хинона и широко применяется в качестве индикатора перехода РЦ в фотохимически неактивное состояние [39].

Обнаружение фотохимической активности ФС-2 в состоянии [$П_{680}Q^-$]. В работах [36—38] было показано, что РЦ ФС-II после перехода в состояние [$П_{680}Q^-$] вследствие темного восстановления Q дитионитом (что контролировалось по соответствующему возрастанию флуоресценции), вероятно, остаются фотохимически активными, что выражается в эффекте фотоиндуцированного уменьшения выхода флуоресценции Хл в 3—4 раза (т. е. практически до уровня, регистрируемого в условиях, когда Q окислен). Такой же эффект фотоиндуцированного уменьшения выхода флуоресценции Бхл был обнаружен у бактерий Chromatium minutissimum после темнового восстановления акцептора электрона — менахинона (Мх) [36]. И у Chromatium, и у ФС-II эта фотореакция наблюдалась только на объектах, содержащих функционально активные РЦ и была практически необратимой после выключения света, вследствие чего она была

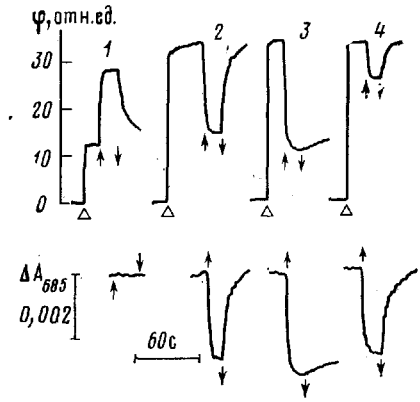


Рис. 1. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции Хл (φ) и изменений поглощения (ΔA) при 685 нм в частицах ДТ-20, обогащенных ФС-II (при E_h среды: +400 (*1*), —200 (*2*) и —400 мВ (*3*), и в Хл-белковых комплексах ФС-II из хлоропластов гороха при $E_h \approx$ $\approx$ —490 мВ (*4*); 20° С; Δ — включение измерительного света, возбуждающего флуоресценцию Хл; ↑ и ↓— включение и выключение действующего света. Концентрация Хл: *1—3*— 20, *4* — 7 мкг/мл; остальные условия см. в [14]

приписана восстановительной фотоинактивации РЦ [36—38]. Впоследствии [8, 10, 11], однако, удалось показать, что при окислительно-восстановительном потенциале среды (E_h) ниже — 200 мВ в препаратах из Chromatium наблюдаются обратимые фотоиндуцированные изменения поглощения, сопровождающиеся уменьшением выхода флуоресценции Бхл и связанные с фотовосстановлением БФф в бактериальных РЦ. Эти данные вместе с результатами исследования быстропротекающих (10^{-11}—10^{-8} с) фотопроцессов в бактериальных РЦ [6] привели к представлениям о функционировании БФф в качестве первичного («промежуточного») акцептора электрона (между первичным донором электрона $П_{890}$ и Мх) [6—12]. Вероятно, необратимость фотоиндуцированного уменьшения выхода флуоресценции Бхл, обнаруженная ранее [36—38], была частично связана с использованием в этих опытах целых хроматофоров и клеток при E_h среды ниже —450 мВ, когда темновое окисление $БФф^-$ значительно замедляется [8, 10, 11].

Обратимое фотовосстановление Фф в ФС-II. Подробное исследование природы эффекта фотоиндуцированного уменьшения выхода флуоресценции Хл ФС-II при E_h ниже —200 мВ (когда Q восстановлен в темноте) позволило обнаружить обратимые фотоиндуцированные изменения поглощения, кинетика которых совпадает с изменениями выхода флуоресценции Хл [14, 15]. Темновая релаксация этих спектральных изменений значительно замедлялась при понижении E_h от —200 до —400 мВ (рис. 1), что свидетельствовало о восстановительной природе светового процесса [14—17].

Дифференциальный спектр поглощения для данного фотопроцесса (рис. 2, *б*) характеризуется «выцветанием» полос поглощения при 685 и 545 нм (которые сдвигаются в коротковолновую область при фотовосстановлении Q (рис. 2, *а*)), а также полос при 518, 422—428 и 408 нм и появлением широких полос поглощения с максимумами при 450, 655 и с $\lambda > 695$ нм и узкой полосы при 676 нм. Этот спектр может быть интерпретирован как результат фотовосстановления Фф *а* до $Фф^-$, сопровождающегося коротковолновым сдвигом полосы поглощения с максимумом при ~680 нм. Образование при этом анион-радикала $Фф^-$ подтверждается появлением сигнала ЭПР с $g=2{,}0033$ и $\Delta H \simeq 13$ Гс [18]. Подобные дифференциальный спектр поглощения и спектр ЭПР наблюдаются при восстановлении Фф до $Фф^-$ in vitro [27], причем в ФС-II основные полосы поглощения Фф сдвинуты в длинноволновую область спектра на 15—20 нм [14, 27].

Было предположено [14—20], что фотовосстановление Фф происходит в РЦ ФС-II и что Фф (подобно БФф в бактериальных РЦ) функционирует в ФС-II в качестве первичного («промежуточного») акцептора электрона между $П_{680}$ и Q. Справедливость данного предположения подтверждается рядом экспериментальных данных, которые перечислены ниже.

1. Фотовосстановление Фф наблюдается в различных препаратах, содержащих активные РЦ ФС-2 («тяжелые» фрагменты и хлорофилл-белковые комплексы ФС-II из хлоропластов гороха и мутантов Chlamydomonas reinhardii, лишенных фотосистемы I), и не наблюдается в препаратах фотосистемы I (ФС-I) из гороха и у мутанта Chl. reinhardii, не содержащего ФС-II, а также у светособирающего хлорофилл-белкового комплекса [20].

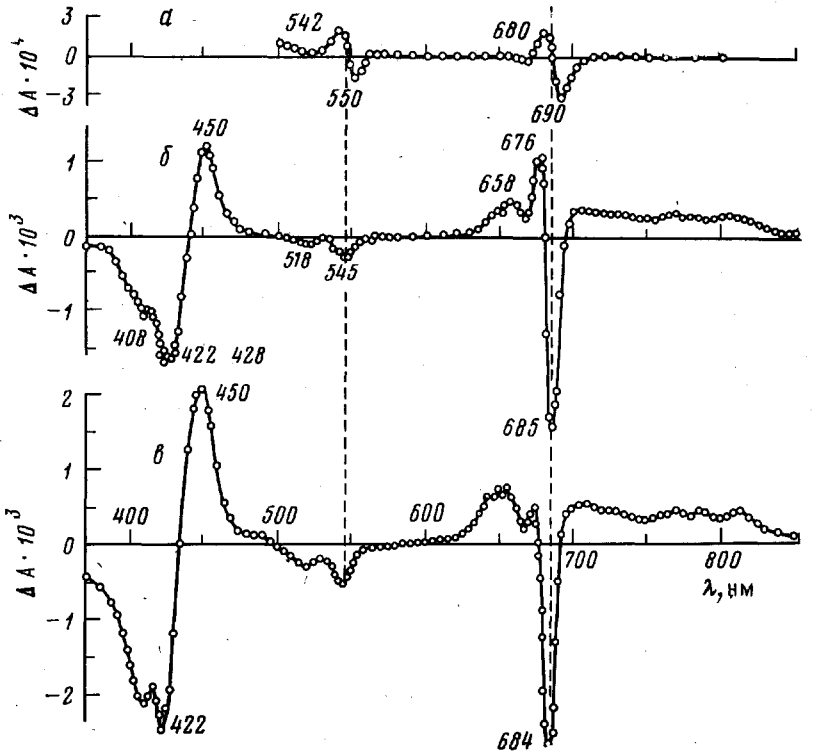


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения «свет минус темнота» при фотовосстановлении Q при $E_h = +400$ мВ (*а*) и феофитина при $E_h \approx$ ≈ -200 мВ (*б*) в частицах ДТ-20 и при фотовосстановлении Фф ($E_h \approx$ ≈ -490 мВ) в Хл-белковых комплексах ФС-II (*в*). Условия см. рис. 1 и в [14]

2. Фотовосстановление Фф, наблюдаемое также у свежевыделенных хлоропластов гороха [17, 20], свидетельствует о том, что «фотоактивный» Фф не возникает в результате феофитинизации Хл в процессе выделения ФС-II из хлоропластов с помощью детергентов. Кроме того, обработка препаратов ФС-II детергентом тритон Х-100 приводит к уменьшению, а не к возрастанию изменений поглощения, связанных с фотовосстановлением Фф [20]. «Фотоактивный» Фф не является также результатом обратимой или необратимой фотофеофитинизации $П_{680}$ или Хл антенны при каждом освещении действующим светом, что следует из данных о «фотовыцветании» характерных полос поглощения Фф (рис. 2, *б*) как при первом, так и при последующем освещениях [17, 20].

3. В различных препаратах фотосистемы II концентрация «фотоактивного» Фф (определенная с использованием дифференциального коэффициента экстинкции при 685 нм, равного $0{,}32 \cdot 10^5$ $М^{-1} \cdot см^{-1}$ [21], как для красного максимума поглощения Фф в растворе [27]) находится в близком к стехиометрическому соотношении с концентрацией $П_{680}$ и других компонентов ФС-II [20—22]. Фотовосстановление Фф, так же как и реакция фотоокисления $П_{680}$, ингибируется в два раза после пятиминутного прогревания препаратов при 40° С и почти полностью — при 55—60° С (рис. 3, *а*), что характерно для реакции ФС-II, тогда как реакция фотоокисления $П_{700}$ в ФС-I сохраняется [20].

4. У препаратов ФС-II, предварительно обработанных 0,8 М трис-HCl (в результате чего инактивируется донорный участок ФС-II вследствие экстракции Mn^{2+} [40]), добавление экзогенного Mn^{2+} (способного служить искусственным донором электрона для ФС-II и реактивировать функцию фотоокисления воды у обработанных трис-буфером хлоропластов [41]) активирует реакцию фотовосстановления Фф в несколько раз, тогда как добавление Mg^{2+} не вызывает такого эффекта (рис. 3, *б*).

5. Фотовосстановление Фф наблюдается лишь после того, как «первичный» акцептор электрона ФС-II (Q) предварительно восстановлен в темноте; оно сопровождается двух-четырехкратным изменением выхода флуоресценции Хл ФС-II, хотя при этом «выцветает» менее 1% от всего хлорофиллового пигмента; данная фотореакция наблюдается при понижении температуры вплоть до —170° С [14]; реакция фотовосстановления Фф полностью обратима в темноте, и образующийся анион-радикал $Фф^-$ обладает очень высокой стабильностью несмотря на водное окружение. Все это характерно для фотопревращений компонентов РЦ фотосинтеза.

Необходимо также отметить, что принципиальная возможность акцептирования электрона феофитином от хлорофилла $П_{680}$ следует из сопоставления величин E_0 для

пар Хл/Хл$^-$ и Фф/Фф$^-$ (—0,84÷—0,88 В и —0,61÷—0,64 В соответственно [27, 42]) и способности Хл и Фф к фотовосстановлению [1—4, 29, 43]. Фотоперенос электрона от Хл к Фф зарегистрирован недавно для ковалентно связанных димеров [44] и в смеси растворов этих пигментов [45].

Наносекундная люминесценция хлорофилла ФС-II при рекомбинации зарядов в паре [$П^{+\cdot}_{680}Фф^-$]. Эксперименты, свидетельствующие о возможности функционирования Фф в РЦ ФС-II, привели к изменению представлений о происхождении Фф в РЦ ФС-II, привели к изменению представлений о происхождении «переменной флуоресценции» Хл данной фотосистемы. Действительно, если Фф, а не Q, является первичным акцептором электрона, то восстановление Q не должно сопровождаться увеличением выхода флуоресценции Хл, поскольку РЦ в состоянии [$П_{680}$ Фф]Q^- остается фотохимически активным. Были получены экспериментальные доказательства в пользу того, что возрастание флуоресценции при восстановлении Q представляет собой в

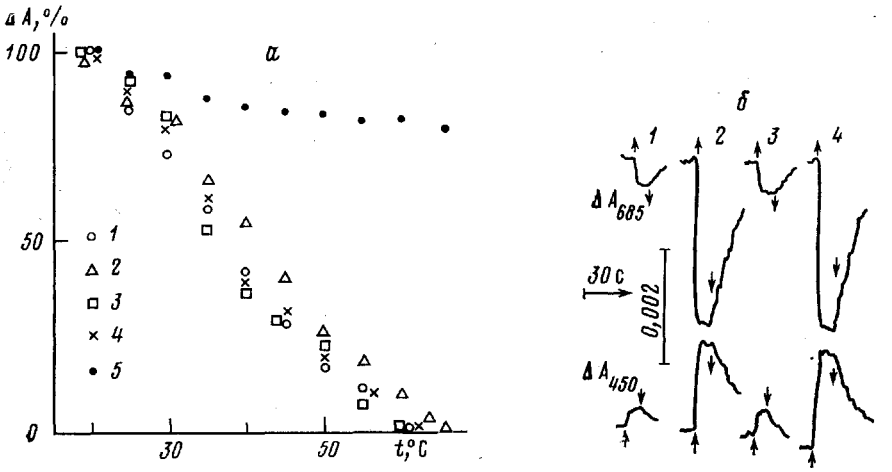


Рис. 3. Влияние повышенных температур и ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} на фотовосстановление Фф в препаратах ФС-II; *а* — изменения поглощения: *1* — при 685, *2* — 675, *3* — 655, *4* — 678, *5* — 700 нм, связанные с фотовосстановлением Фф при E_h = —450 мВ (*1—3*), с фотоокислением $П_{680}$ в присутствии 1 мМ феррицианида (*4*) и $П_{700}$ при $E_h \approx$ = +50 мВ, в зависимости от температуры, при которой проводилась пятимунутная обработка препаратов; *б* — кинетика изменений поглощения при 685 и 450 нм, связанных с фотовосстановлением Фф в частицах ДТ-20 (подвергнутых одночасовой инкубации в 0,8 М трис-HCl при 2° С) при $E_h \approx$ —300 мВ в отсутствие добавок (*1*) и в присутствии 50 мкМ $MnCl_2$ (*2*), 50 мкМ $MgCl_2$ (*3*), 50 мкМ $MnCl_2$ и 50 мкМ $MgCl_2$ (*4*). Условия см. в [20]

действительности возгорание люминесценции, возникающей при рекомбинации зарядов в паре [$П^{+\cdot}_{680}Фф^-$ после их разделения в первичной фотореакции [16]. Так, в отличие от обычной флуоресценции, это свечение уменьшается при понижении температуры от 0 до —100° С (энергия активации составляет 0,04—0,08 эВ) и полностью исчезает при восстановлении Фф, что подтверждает участие Фф в образовании ион-радикальной пары с Хл (вероятно, с $П_{680}$) [16]. Из приведенных данных можно заключить, что для возбуждения $П_{680}$ электрону, возвращающемуся от Фф$^-$ на $П^{+\cdot}_{680}$, необходимо преодолеть барьер, равный лишь 0,04—0,08 эВ. Это, вероятно, и определяет относительно высокий квантовый выход рекомбинационной люминесценции (сравнимый с таковым для флуоресценции). Из определения временных характеристик рекомбинационной люминесценции следует, что время жизни состояния [$П^{+\cdot}_{680}Фф^-$], составляет 2—4 нс [16], а по более точным недавним данным ~4,3 нс [24].

Следует отметить, что при переходе РЦ в фотохимически неактивное состояние [$П_{680}Фф^-$] вместе с исчезновением рекомбинационной люминесценции (рис. 1) можно ожидать возрастание флуоресценции Хл. Однако этого не наблюдается, что, вероятно, обусловлено тушением синглетного возбужденного состояния Хл вследствие эффективной миграции энергии на нефлуоресцирующий анион-радикал Фф$^-$, обладающий интенсивным поглощением в далекой красной области спектра (рис. 2, *б*). Такое же явление наблюдается при фотовосстановлении Бфф *а* в РЦ Chromatium minutissimum [8, 10], тогда как при фотовосстановлении Бфф *b* у Rhodopseudomonas viridis происходит возрастание флуоресценции Бхл антенны [11].

Представление об образовании ион-радикальной пары с участием Фф в РЦ ФС-II подтверждается также данными об эффекте магнитного поля на флуоресценцию ФС-II, который уменьшается после фотовосстановления Фф [19].

Прямая регистрация разделения зарядов между $П_{680}$ и Фф с помощью импульсной спектрофотометрии. Как следует из измерения рекомбинационной люминесценции

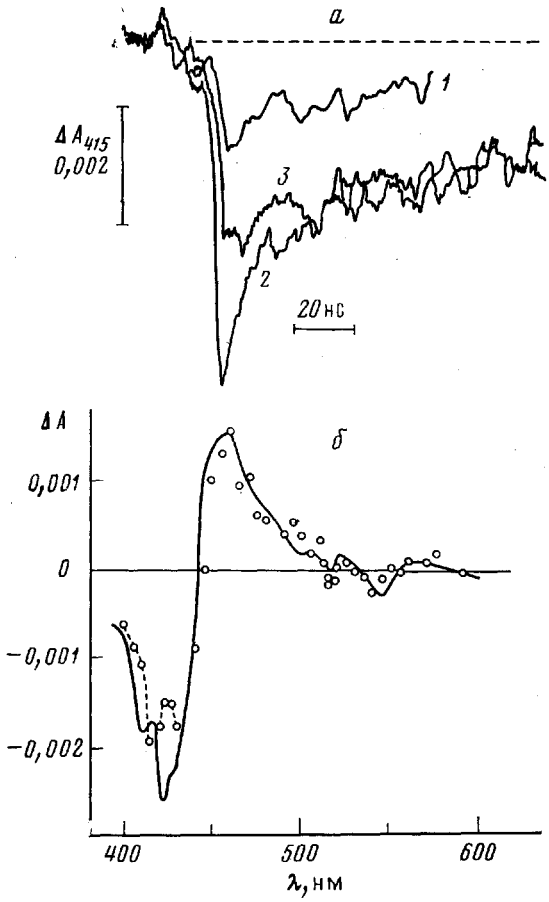


Рис. 4. Фотоиндуцированные изменения поглощения, связанные с образованием состояния $[П^{+}_{680}Фф^{\cdot-}]$ в РЦ ФС-II: *а* — кинетика изменений поглощения при 415 нм в присутствии 50 мкМ феррицианида (*1*), до и после фотовосстановления Фф при $E_h \approx -450$ мВ (*2* и *3* соответственно): *б* — спектр изменений поглощения со временем жизни ~4 нс для случая *2* на рис. 4, *а*. Сплошной линией показана сумма дифференциальных спектров поглощения, полученных при фотоокислении $П_{680}$ и фотовосстановлении Фф, измеренных ранее [14, 32]. Подробности см. в [24]

ФС-II, фотореакция

$$[П_{680}\,Фф]\,Q^{-} \overset{+h\nu}{\rightleftarrows} [П^{+\cdot}_{680}\,Фф^{\cdot-}]\,Q^{-}$$

должна сопровождаться изменениями поглощения, обладающими временем жизни ~4 нс и спектром, включающим изменения поглощения $П_{680}$ и Фф [20]. В работе [24] действительно удалось показать, что если Q восстановлен в темноте, то при освещении ФС-II наносекундным лазерным импульсом (λ=694,3 нм) наблюдаются изменения поглощения в области 400—600 нм, появляющиеся за время $\leqslant$1 нс и релаксирующие за ~4 нс (рис. 4). Эти изменения, так же как и рекомбинационная люминесценция, не видны после предварительного фотовосстановления Фф или окисления Q (рис. 4). Спектр изменений поглощения со временем жизни ~4 нс характеризуется уменьшением поглощения при 415, 430, 515 и 540 нм и увеличением поглощения при 450—500 и 570 нм и очень близок к ожидаемому спектру, построенному как сумма дифференциальных спектров поглощения для фотоокисления $П_{680}$ и фотовосстановления Фф (рис. 4).

Приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что действительно в результате первичной фотореакции ФС-II за время $<$1 нс происходит образование ионрадикальной пары $[П^{+\cdot}_{680}Фф^{\cdot-}]$, которая рекомбинирует за ~4 нс, если Q находится в восстановленной форме. Когда же Q окислен в темноте, электрон от $Фф^{\cdot-}$ переносится на Q по крайней мере в 10 раз быстрее, чем обратно на $П^{+\cdot}_{680}$, т. е. за время $<$400 пкс. Этот вывод следует из данных о том, что после окисления Q интенсивность наносекундной рекомбинационной люминесценции [16, 24] и соответствующие ей изменения поглощения (рис. 4) уменьшаются более чем в 10 раз.

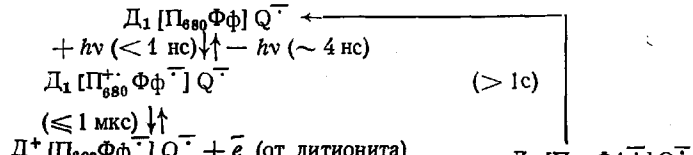
Предположение о существовании в ФС-II акцептора электрона (W) с более низким, чем у Q, значением E_0' выдвигалось также недавно [46] на основании измерений

послесвечения Хл со временем жизни ~0,6 мкс в условиях, когда Q восстановлен в темноте. Очевидно, что W не идентичен Фф, поскольку ион-радикальная пара с участием Фф рекомбинирует в наносекундной, а не в микросекундной временной области. Не исключено, однако, что упомянутое выше микросекундное послесвечение связано с образованием триплетных состояний в РЦ ФС-II после разделения зарядов между $П_{680}$ и Фф или с рекомбинацией зарядов между $Фф^-$ и окисленным вторичным донором электрона ФС-II ($Д_1^+$).

Фотонакопление долгоживущего состояния $[П_{680}Фф^-]Q^-$. Как следует из опытов по импульсной спектроскопии, после фоторазделения зарядов в РЦ ФС-II феофитин находится в восстановленном состоянии менее 400 пкс, если Q окислен, и ~4 нс, если Q уже восстановлен. В то же время, при постоянном освещении при E_h<—200 мВ спектральные эффекты, связанные с фотовосстановлением Фф, обладают временем жизни >1 с (рис. 1). Это, очевидно, связано с переходом состояния $[П_{680}^{+\cdot}Фф^-]Q^-$ (живущего ~4 нс) в долгоживущее состояние $[П_{680}Фф^-]Q^-$ в результате быстрого восстановления $П_{680}^{+\cdot}$ донором $Д_1$, конкурирующего с рекомбинацией зарядов в $[П_{680}^{+\cdot}Фф^-]$. О необходимости быстрого донирования электрона на $П_{680}^{+\cdot}$ для фотонакопления долгоживущего $Фф^-$ свидетельствуют данные по активации этого фотопроцесса при добавлении Mn^{2+}, функционирующего в донорной части ФС-II (рис. 3).

С учетом того, что донирование электрона на $П_{680}^{+\cdot}$ происходит за ≤1 мкс [47, 48], а рекомбинация зарядов — за ~4 нс [16, 24], квантовый выход фотонакопления состояния $[П_{680}Фф^-]Q^-$ должен составлять ≥0,004. Близкое значение (0,002—0,005) дала экспериментальная оценка этой величины путем сравнения скоростей фотоиндуцированного увеличения выхода «флуоресценции», связанного с фотовосстановлением Q, и уменьшения выхода «флуоресценции» при фотовосстановлении Фф [14, 20].

Таким образом, можно предложить следующую схему фотонакопления состояния $[П_{680}Фф^-]Q^-$ при E_h < — 200мВ:



Восстановление $Д_1^+$ дитионитом приводит к тому, что при непрерывном освещении регистрируются только эффекты, связанные с фотовосстановлением Фф.

Как следует из изучения ЭПР свойств РЦ ФС-II с восстановленным Фф [21, 22, 26], состояние $[П_{680}/Фф^-]Q^-$ накапливается лишь в случае освещения при 200—220 К. При комнатной температуре длительное освещение, вероятно, приводит к переносу электрона от $Фф^-$ на Q^- с образованием $[П_{680}Фф]Q^{2-}$, а в результате последующего цикла фотовосстановления Фф накапливается состояние $[П_{680}Фф^-]Q^{2-}$. Подобные процессы были описаны ранее в бактериальных РЦ [12].

Взаимодействие Фф с основными компонентами РЦ ФС-II. Благодаря возможности фотонакопления долгоживущих состояний РЦ ФС-II с восстановленным Фф удалось провести эксперименты, свидетельствующие о взаимодействии Фф с другими компонентами РЦ. Было показано, что после фотовосстановления Фф в ФС-II при 220 К, благоприятного для фотонакопления состояния $[П_{680}Фф^-]Q^-$, наблюдается «узкий» сигнал ЭПР анион-радикала $Фф^-$ (g=2,0033; ΔH≃13 Гс), а также широкий «дублетный» сигнал ЭПР с центром при g=2,00 и расщеплением 52 Гс при 7 К (рис. 5). Для насыщения дублетного сигнала при 7К требовалась гораздо бóльшая мощность микроволнового излучения (выше 10 мВт), чем для узкого сигнала (менее 5 мкВт), и дублетный сигнал не наблюдался при температуре выше 15К [21, 22, 26]. Дублетный сигнал наблюдается и в хлоропластах (рис. 5), и его амплитуда в различных препаратах коррелирует с содержанием в них РЦ ФС-II.

Анализ характеристик дублетного сигнала ЭПР ФС-2, проведенный в соответствии с теоретическими рассмотрениями Шеплера и др. [49], показывает, что этот сигнал может быть результатом обменного взаимодействия анион-радикала $Фф^-$ с каким-то парамагнитным центром, имеющим g-фактор ~1,8 [22, 26]. В бактериальных РЦ подобный дублетный сигнал был приписан взаимодействию $Бфф^-$ с восстановленным акцептором электрона — комплексом менахинон — Fe^{2+} ($Мх^-$-Fe^{2+}) [9, 12]. Было предположено, что и в ФС-II дублетный сигнал ЭПР является результатом взаимодействия $Фф^-$ с Q^-, включающим в себя Fe или другой металл [21, 22, 26]. Это предположение подтверждается рядом экспериментальных данных.

1. Дублетный сигнал ЭПР отсутствует после фотовосстановления Фф при 300К [21, 22, 26], т. е. в условиях, благоприятствующих фотонакоплению состояния РЦ с дважды восстановленным непарамагнитным Q: $[П_{680}Фф^-]Q^{2-}$.

2. Дублетный сигнал эффективно подавляется в результате экстракции Пх из ФС-II с помощью 0,13—0,16%-ного раствора метанола в гексане; фотовосстановление Фф при этом сохраняется. Последующее добавление к ФС-II чистого Пх (одного или вместе с β-каротином) вызывает восстановление дублетного сигнала [22, 26].

3. Показано [22, 26], что препараты ФС-II содержат негемовое (и не в форме Fe-серных белков) Fe в количестве ~2 атома на один РЦ. Экстракция Fe с помощью *о*-фенантролина и $LiClO_4$ (до <0,6 атомов на РЦ) полностью подавляет дублетный сигнал ЭПР, который восстанавливается (на ~25% от исходной величины) при последующей инкубации образцов с Fe^{2+} (рис. 6), тогда как Mn^{2+} или Mg^{2+} не оказывают подобного действия [22, 26].

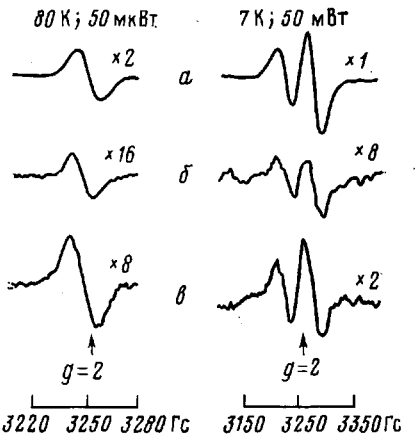


Рис. 5. Сигналы ЭПР после фотовосстановления Фф в препаратах ФС-II при 220 К и при $E_h \approx$ —450 мВ и быстрого охлаждения в жидком азоте (после вычета сигналов параллельных неосвещенных образцов): *а* — частицы TSF-IIa, *б* — хлоропласты, *в* — частицы TSF-II. Амплитуда модуляции 7 Гс; 1,4 мг Хл/мл. Подробности см. в [22]

4. Экстракция Fe из ФС-II сопровождается появлением нового фотоиндуцированного сигнала ЭПР (при $E_h \approx +50$ мВ), характеристики которого ($g=2{,}0044$; $\Delta H \simeq 9$ Гс) соответствуют анион-радикалу $Пх^{\cdot}$. После экстракции Пх из ФС-II этот сигнал полностью исчезал [22, 26]. Подобный сигнал ЭПР семихинона в бактериальных РЦ также виден лишь после удаления Fe [9, 12].

На основании приведенных результатов были сделаны следующие выводы.

а. Акцептор электронов ФС-II(Q) представляет собой комплекс Пх—Fe^{2+}. Восстановление Пх в этом комплексе не сопровождается появлением сигнала ЭПР анион-радикала $Пх^{\cdot}$ (с *g*-фактором в области 2,00) вследствие взаимодействия $Пх^{\cdot}$ с Fe^{2+}. Сигнал ЭПР комплекса $Пх^{\cdot}$-Fe^{2+} расположен, вероятно, в области $g \simeq 1{,}8$.

б. После фотонакопления состояния $[П_{680}Фф^{\cdot}]Q^{\cdot}$ анион-радикал $Фф^{\cdot}$ находится в обменном взаимодействии с комплексом $Пх^{\cdot}$-Fe^{2+} (проявляющемся в возникновении дублетного сигнала ЭПР). Это свидетельствует о близком расположении молекул Фф и Q и убедительно подтверждает правильность представлений о функционировании Фф в качестве промежуточного акцептора электрона между $П_{680}$ и Q.

в. Разрушение комплекса Пх-Fe^{2+} в результате экстракции Fe приводит к появлению фотоиндуцированного сигнала ЭПР $Пх^{\cdot}$, а дублетный сигнал ЭПР исчезает, поскольку взаимодействие $Фф^{\cdot}$ с $Пх^{\cdot}$, вероятно, не может дать сигнала ЭПР с таким расщеплением. Не исключено также, что в отсутствие Fe^{2+} дитионит восстанавливает Пх до $Пх^{2-}$ уже в темноте [22].

Если дублетный сигнал ЭПР в ФС-II действительно возникает в результате обменного взаимодействия $Фф^{\cdot}$ с $Пх^{\cdot}$-Fe^{2+}, то из расщепления этого сигнала (52 Гс) можно оценить энергию обменного взаимодействия (~26 Гс) и константу скорости спинового обмена (~$4{,}5 \cdot 10^8$ $с^{-1}$), а следовательно, используя приближенную формулу (1) из [50], и расстояние между Фф и Пх-Fe^{2+}. Расчет показывает, что это расстояние составляет 8—9 Å. Близкая величина (7,5—10 Å) была найдена ранее [12] для расстояния между Бфф и Мх—Fe^{2+} в бактериальных РЦ.

О взаимодействии Фф и Q свидетельствуют также данные о том, что при фотовосстановлении Q наблюдается сдвиг полос поглощения Фф (рис. 2, *а*) при 545 нм (приписываемый ранее фотовосстановлению пигмента $С_{550}$ (см. [34])) и при 685 нм [14, 15, 32].

Взаимодействие $Фф^{\cdot}$ с другим компонентом РЦ — $П_{680}$, вероятно, ответственно за коротковолновый сдвиг полосы поглощения с максимумом при ~680 нм, регистрируемый при фотовосстановлении Фф (рис. 2, *б*).

Влияние фотовосстановления Фф в ФС-II на триплетное состояние каротиноидов. В бактериальных РЦ рекомбинация зарядов в паре $]П^{+\cdot}_{890}Бфф^{\cdot}]$ сопровождается формированием возбужденного триплетного состояния $П_{890}$, которое вследствие триплет-триплетного переноса энергии передается на каротиноид (Car), входящий в состав РЦ [8, 51]. В состав РЦ ФС-II, вероятно, также входят Car. В пользу этого косвенно свидетельствуют данные о том, что после обработки ФС-II органическими растворите-

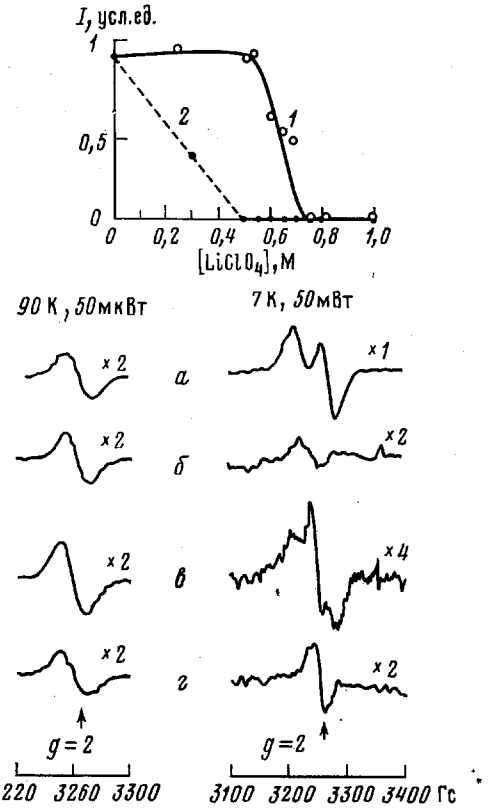


Рис. 6. Влияние $LiClO_4$ и *о*-фенантролина на сигналы ЭПР в TSF-II, регистрируемые после фотонакопления $Ф\phi^-$ при 220 К. Вверху интенсивность (I) дублетного сигнала как функция концентрации (при которой проводилась обработка) $LiClO_4$ в отсутствие (*1*) и в присутствии 2,5 мМ *о*-фенантролина (*2*). Внизу спектры после обработки с помощью 0,5 М $LiClO_4$ (*а*); 0,5 М $LiClO_4$ +2,5 мМ *о*-фенантролина (*б*); *в* и *г* — то же, но после дополнительной инкубации с 0,2 мМ Fe^{2+} (*в*) или Mn^{2+} (*г*). Амплитуда модуляции 7 Гс; 1,5 мг Хл/мл. Подробности см. в [22]

лями для восстановления сигнала C_{550} необходимо добавление не только Пх, но и β-каротина (см. [34]), а также данные о влиянии добавки β-каротина на восстановление дублетного сигнала ЭПР в ФС-II [22, 26].

При возбуждении Хл в хлоропластах, в препаратах ФС-I, ФС-II и светособирающего комплекса обнаруживается триплетное состояние Car(^{3}Car), которое не зависит от состояния РЦ и, вероятно, обусловлено формированием триплетного возбуждения Хл(^{3}Хл) в антенне и переносом возбуждения на Car [52]. Однако недавно [23, 26] удалось показать, что по крайней мере часть ^{3}Car в ФС-II зависит от состояния РЦ, а именно выход ^{3}Car резко увеличивается при восстановлении Q и уменьшается в 3—4 раза в результате последующего фотовосстановления Фф [23, 26]. Эти данные согласуются с предположением [23, 26] о том, что триплетное возбуждение формируется в РЦ при рекомбинации зарядов в паре $[П^{+\cdot}_{680}Ф\phi^-]$ (которая, как следует из влияния магнитного поля на флуоресценцию ФС-II [19], может находиться как в синглетном, так и в триплетном состояниях). Возникающее при рекомбинации ион-радикальной пары триплетное возбуждение, вероятно, может быть локализовано на Хл или на Фф (так как уровни ^{3}Хл и ^{3}Фф in vitro мало отличаются [53]), а затем передается на нижележащий уровень ^{3}Car. Функциональное значение такого переноса энергии возбуждения на Car может быть в защите хлорофилла РЦ от долгоживущего триплетного возбужденного состояния, способного вызвать деструктивные химические процессы в РЦ [26].

Оценка E_0' для Фф/$Ф\phi^-$ и $П^{+}_{680}$/$П_{680}$. Окислительно-восстановительное титрование обратимых фотоиндуцированных изменений поглощения, связанных с фотовосстановлением Фф в ФС-II [17], показало, что их величина максимальна в области —480÷÷—500 мВ, причем эта зависимость хорошо укладывается на теоретическую кривую (полученную из уравнения Нернста) для одноэлектронного темнового восстановления вещества, потенциал E_0' которого равен —610±30 мВ. Следует отметить, что для получения E_h ниже —600 мВ в этих опытах приходилось повышать pH среды до 10—11, что в принципе может вызвать инактивацию образца. Однако полученное умень-

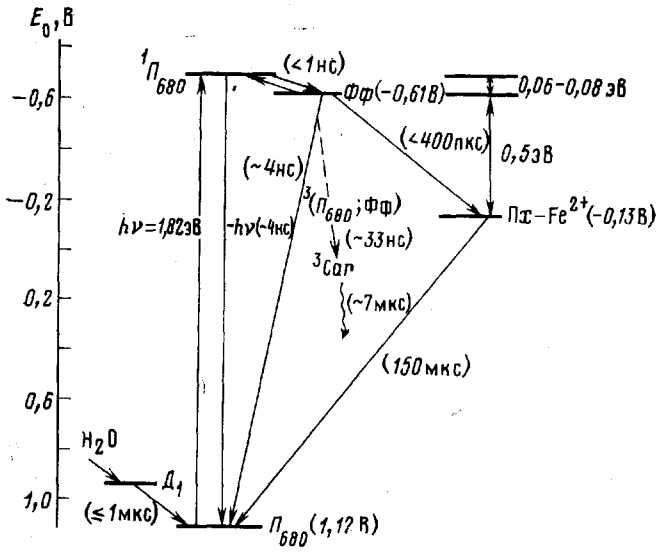


Рис. 7. Предполагаемая схема фотопереноса электрона в РЦ ФС-II

шение изменений поглощения при низких E_h, очевидно, связано с темновым восстановлением Фф, а не с инактивирующим действием высоких pH, поскольку при повышении E_h от —600÷—620 мВ до —450÷—500 мВ (с помощью феррицианида) при pH 10,5 эти изменения поглощения возрастали до 90—95% от исходной величины, т. е. титрование было обратимым.

Величина E_0' пары Фф/$Фф^-$ в ФС-II, согласно приведенным данным, составляет —610±30 мВ [17], что практически совпадает с E_0' для Фф в растворе (—610÷÷—640 мВ), тогда как для пары Хл/$Хл^-$ в растворе E_0'=—840÷—880 мВ [27, 42]. Полученные результаты, с одной стороны, подтверждают, что фотовосстановлению подвергается именно Фф, а с другой — позволяют оценить другие энергетические характеристики РЦ ФС-II. Действительно, если учесть, что энергия кванта, поглощаемого $П_{680}$, равна 1,8—1,82 эВ, энергетический барьер между уровнем $[П_{680}^{+\cdot} Фф^-]$ и уровнем возбужденного $П_{680}$($^1П_{680}$) составляет 0,04—0,08 эВ, а значение E_0' для Фф равно —610±30 мВ, то отсюда потенциал E_0' для пары $П_{680}^{+\cdot}/П_{680}$ должен составлять +1,12±0,05 В [17]. Это вполне вероятная величина E_0' для $П_{680}$, поскольку $П_{680}$ должен быть способным окислить H_2O до O_2 (E_0'=+0,8 В), и следовательно, различие в 0,3 эВ может обеспечить эффективное протекание данного процесса.

Двойной электрон-ядерный резонанс (ДЭЯР) $Фф^-$ в ФС-II. Характеристики сигнала ЭПР $Фф^-$, а также его величина E_0' позволили сделать вывод о функционировании мономерной формы Фф в ФС-II [18]. Особенно убедительное подтверждение этот вывод получил в опытах по измерению ДЭЯР анион-радикала $Фф^-$ [25], в которых было показано, что константы сверхтонкого протонного расщепления для $Фф^-$ в ФС-II соответствуют мономерной (но не олигомерной) форме $Фф^-$ или $Хл^-$. (Выбор в пользу Фф основывается на данных о фотовыцветании полос поглощения при 545 и 515 нм, характерных только для Фф (рис. 2), и на результатах определения E_0' для пары Фф/$Фф^-$ в ФС-II [17].)

Схема разделения и стабилизации зарядов в РЦ ФС-II. На основании описанных выше результатов можно предложить последовательность стадий переноса электрона, протекающих в РЦ ФС-II в результате поглощения кванта света (рис. 7).

Синглетное возбуждение $П_{680}$ (E_0'≃1,12 В) ведет к переносу электронов от $^1П_{680}$ на Фф (E_0≃—0,61 В) за время ≤1 нс. Этот процесс сопровождается потерей энергии ~0,06 эВ и дает в результате ион-радикальную пару $[П_{680}^{+\cdot} Фф^-]$. Рекомбинация зарядов в этой паре (способная происходить за ~4 нс) предотвращается благодаря быстрому (<400 пкс) переносу электрона от $Фф^-$ на «стабильный» акцептор электрона Q (E_0'≃—130 мВ), вероятно, представляющий собой комплекс Пх—Fe^{2+}. При этом теряется ~0,5 эВ энергии и образуется состояние $[П_{680}^{+\cdot}, Фф] Q^-$, способное рекомбинировать за ~150 мкс. Эта рекомбинация, однако, предотвращается благодаря более быстрому (≤1 мкс) восстановлению $П_{680}^{+\cdot}$ вторичными донорами электрона, в результате чего происходит дальнейшая стабилизация разделенных зарядов. Восстановление $Д_1^+$ приводит в конечном счете к окислению воды, а электрон от $Пх^-$—Fe^{2+} передается в цепь переноса электрона между двумя фотосистемами.

Если до фоторазделения зарядов Q уже был восстановлен, то донирование электрона от $Д_1$ на $П_{680}^{+\cdot}$ приводит к образованию долгоживущего состояния $[П_{680} Фф^-] Q^-$

или же электрон от $Фф^{-\cdot}$ возвращается на $П^{+\cdot}_{680}$ за ~4 нс. Последний процесс с определенной вероятностью сопровождается высвечиванием люминесценции или формированием в РЦ триплетного возбужденного состояния, перенос энергии которого от $П_{680}$ или Фф на каротиноиды защищает РЦ от фотоинактивации.

Из приведенных выше данных следует, что РЦ ФС-II растений (особенно, система акцепторов электрона) имеют ряд особенностей, которые свойственны также для РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий: 1) участие Фф (а не Хл, как в ФС-I [13]) в качестве первичного, а комплекса $Пх—Fe^{2+}—$ в качестве «стабильного» акцептора электрона; 2) проявление взаимодействия $Фф^{-\cdot}$ и $Пх^{-\cdot}—Fe^{2+}$ в виде дублетного сигнала ЭПР при $T<15$K и в сдвиге полос поглощения Фф при фотовосстановлении Q; 3) появление наносекундной рекомбинационной люминесценции Хл с энергией активации ~0,1 эВ при восстановлении Q; 4) формирование триплетного возбужденного состояния в РЦ при рекомбинации ион-радикальной пары $[П^{+\cdot}_{680}Фф^{-\cdot}]$ и перенос его энергии на каротиноиды; 5) фотонакопление долгоживущего состояния РЦ с ион-радикалом $Фф^{-\cdot}$ (в условиях, когда Q восстановлен), происходящее вследствие быстрого восстановления $П^{+\cdot}_{680}$ электроном от $Д_1$. Эти данные могут свидетельствовать об общности происхождения ФС-II и фотосистемы пурпурных фотосинтезирующих бактерий в процессе эволюции фотосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А.* В кн: Биохимия и биофизика фотосинтеза. М.: Наука, 1965.
2. *Красновский А. А.* В кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.-Л.: Наука, 1966, с. 213—242.
3. *Евстигнеев В. Б.* В кн.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.-Л.: Наука, 1966, с. 243—266.
4. *Красновский А. А.* Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы. М.: Наука, 1974.
5. *Sauer K.* Ann. Rev. Phys. Chem., 1979, v. 30, p. 155.
6. *Шувалов В. А., Красновский А. П.,* Биофизика, 1981, т. 26, с. 544.
7. *Fajer J., Brune D. C., Davis M. S. et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 4956.
8. *Shuvalov V. A., Klimov V. V.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 440, p. 587.
9. *Prince R. C., Tiede D. M., Thornber J. Ph., Dutton P. L.* Ibid., 1977, v. 462, p. 467.
10. *Климов В. В., Шувалов В. А., Крахмалева И. Н. и др.* Биохимия, 1976, т. 41, с. 1435.
11. *Климов В. В., Шувалов В. А., Крахмалева И. Н. и др.* Там же, 1977, т. 42, с. 519.
12. *Okamura M. Y., Isaacson R. A., Feher G.* Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 546, p. 394.
13. *Shuvalov V. A., Ke B., Dolan E.* FEBS Letters, 1979, v. 100, p. 5.
14. *Klimov V. V., Klevanik A. V., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A.* Ibid., 1977, v. 82, p. 183.
15. *Клеваник А. В., Климов В. В., Шувалов В. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 241.
16. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Пащенко В. З.* Там же, 1978, т. 242, с. 1204.
17. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Диметер Ш., Красновский А. А.* Там же, 1979, т. 249, с. 227.
18. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Красновский А. А.* Там же, 1979, т. 249, с. 485.
19. *Клеваник А. В., Шувалов В. А., Горюшкин Г. Е.* Там же, 1979, т. 249, с. 1238.
20. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Шутилова Н. И., Красновский А. А.* Физиол. раст., 1980, т. 27, с. 315.
21. *Klimov V. V., Dolan E., Ke B.* FEBS Letters, 1980, v. 112, p. 97.
22. *Klimov V. V., Dolan E., Shaw E., Ke B.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1980, v. 77, p. 7227.
23. *Klimov V. V., Ke B., Dolan E.* FEBS Letters, 1980, v. 118, p. 123.
24. *Shuvalov V. A., Klimov V. V., Dolan E. et al.* Ibid., 1980, v. 118, p. 279.
25. *Fajer J., Davis M. S., Forman A. et al.* J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, p. 7143.
26. *Климов В. В., Долан Е., Ки Б.* Биофизика, 1981, т. 26, № 5, с. 802.
27. *Fujita I., Davis M. S., Fajer J.* J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 100, p. 6280.
28. *Красновский А. А., Шапошникова М. Г.* Физиол. раст., 1970, т. 17, с. 436.
29. *Пакшина Е. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1974, т. 19, с. 238.
30. *Krasnovsky A. A., Bystrova M. V.* Biosystems, 1980, v. 12, p. 181.
31. *Doring G., Renger G., Vater J., Witt H. T.* Z. Naturforsch., 1969, B 24b, S. 1139.
32. *Van Gorkom H. J., Pulles P. J., Wessels J. S. C.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, t. 408, c. 331.
33. *Still H. H., Witt H. T.* Z. Naturforsch., 1969, v. B 24b, S. 1588.
34. *Knaff D. B.* Photochem. Photobiol., 1977, v. 26, p. 327.
35. *Duysens L. N. M., Sweers H. E.* In: Studies on microalgae and photosynthetic Bacteria/ Ed. Miyachi S. Univ. of Tokyo Press, 1963, p. 253—372.
36. *Карапетян Н. В., Климов В. В., Крахмалева И. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1971, т. 201, с. 1244.
37. *Карапетян Н. В., Климов В. В.* Физиол. раст., 1973, т. 20, с. 545.
38. *Климов В. В.* Исследование фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла при фотосинтезе: Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: Ин-т фотосинтеза АН СССР, 1973.
39. *Карапетян Н. В.* Успехи соврем. биол., 1977, т. 83, с. 370.

40. *Cheniae G. M., Martin I. F.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 197, p. 219.
41. *Yamashita K., Itoh M., Shibata K.* Ibid., 1969, v. 189, p. 133.
42. *Киселев Б. А., Козлов Ю. Н., Евстигнеев В. Б.* Докл. АН СССР, 1976, т. 266, с. 210.
43. *Столовицкий Ю. М., Евстигнеев В. Б.* В кн.: Методы исследования фотохимических реакций фотосинтеза in vivo и in vitro. Пущино, 1975, с. 124—136.
44. *Pellin M. J., Kaufmann K. J., Wasilewski M.* Nature, 1979, v. 278, p. 54.
45. *Федотова Е. Я., Столовицкий Ю. М., Франкевич Е. Л.* Докл. АН СССР, 1980, т. 254, с. 423.
46. *Van Best J. A., Duysens L. N. M.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 459, p. 187.
47. *Glaser M., Wolf Ch., Renger G.* Z. Naturforsch., 1976, B 31c, S. 712.
48. *Van Best J. K., Mathis P.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 503, p. 178.
49. *Schepler K. L., Dunham W. R., Sands R. H. et al.* Ibid., 1975, v. 397, p. 510.
50. *Likhtenstein G. I., Kotenkov A. I., Kulikov A. V. et al.* Intern. J. Quantum Chem., 1979, v. 16,p.419.
51. *Monger T. G., Cogdell R. J., Parson W. W.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 136.
52. *Mathis P., Butler W. L., Satoh K.* Photochem. Photobiol., 1979, v. 30, p. 603.
53. *Красновский А. А. (мл.), Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.* Докл. АН СССР, 1974, 216, с. 1406.

Институт фотосинтеза АН СССР,
Пущино (Московская область);
Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
2.IV.1981

PHEOPHYTIN PARTICIPATION IN PRIMARY PROCESSES OF ELECTRON TRANSFER IN THE PHOTOSYSTEM 2 REACTION CENTRES

KLIMOV V. V., KRASNOVSKY A. A.

Institute of Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region); A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Reversible photoreduction of pheophytin «a» was found in preparations of the Photosystem 2 of green plants, the «primary» electron acceptor of PS-2, Q, being reduced in the dark. Study of this photoreaction showed that pheophytin functions in PS-2 reaction centres (r. c.) as a primary electron acceptor between the primary electron donor, $П_{680}$ and Q. It also permitted specification of the nature and properties of other r. c. components and revealing the similarity in the organization of PS-2 r. c. and of r. c. of purpur photosynthesizing bacteria.

Академик А.А. КРАСНОВСКИЙ, А.Н. СЕМЕНОВА, В.В. НИКАНДРОВ

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРВОЙ ФОТОСИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ ХЛОРОФИЛЛ

В нашей лаборатории была обнаружена реакция фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления метилвиологена (МВ), которую можно рассматривать как модель переноса электронов в первой фотосистеме. В первых работах использовали растворы пигмента в органических растворителях [1, 2]. В дальнейшем реакцию исследовали в водных растворах детергентов, где хлорофилл солюбилизирован в мицеллах и пространственно отделен от донора и акцептора электронов [3]. В такой системе в присутствии доноров электрона, МВ и бактериальной гидрогеназы было обнаружено фотовыделение водорода [4, 5].

В последнее время возрос интерес к исследованию фотохимических реакций в водных суспензиях хлорофиллсодержащих липосом [6]. В липосомах молекулы хлорофилла расположены в липидном бислое, что создает условия, приближающие эту модель к тилакоидной мембране хлоропластов. В таких липосомах в присутствии акцепторов электрона была зарегистрирована светозависимая генерация катион-радикалов хлорофилла [7, 8]. Были измерены параметры возбужденных состояний хлорофилла в липосомах с различным содержанием пигмента [9, 10]. Наблюдали реакции, приписанные трансмембранному переносу электрона от аскорбата к ионам меди [11] и метиловому красному [12]; следует отметить, однако, что описанные реакции имеют место и в том случае, когда донор и акцептор электронов не разделены липосомальной мембраной.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование реакций фотовосстановления МВ и фотообразования водорода, сенсибилизированных хлорофиллсодержащими липосомами и хлорофиллом, солюбилизированным мицеллами детергента тритона X-100; при этом показана возможность фотовосстановления МВ при трансмембранном переносе электрона.

Для приготовления липосом использовали яичный лецитин (фосфатидилхолин) и хлорофилл а, выделенные по стандартным методикам с конечной хроматографической очисткой. В опытах использовали липосомы, полученные двумя различными способами; оба способа давали сходные результаты. Согласно первому из них [13], 0,25 мл спиртового раствора, содержащего липид (20 мг/мл) и хлорофилл, с помощью тонкой иглы шприца впрыскивали в 20-кратный объем буферного раствора: 1/15 *М* K-Na-фосфат, 0,1 *М* KCl, pH-7,5. Молярное соотношение липида и хлорофилла в получаемых липосомах определялось исходной концентрацией хлорофилла в спиртовом растворе. Согласно второму методу [14], в круглодонном стакане при последовательном испарении спиртового и эфирного растворов получали смешанную пленку из липида и хлорофилла, к ней приливали 5 мл буферного раствора, стакан помещали в баню со льдом и содержимое подвергали обработке на ультразвуковом дезинтеграторе MSE-500 в атмосфере аргона в течение 5 мин при выходной мощности дезинтегратора 250 Вт и частоте 20 кГц. Полученную суспензию центрифугировали при 17 000*g* в течение 10 мин, супернатант использовали в экспериментах. Для получения липосом, содержащих донор электрона во внутреннем объеме, также применяли оба метода, причем, перед впрыскиванием или ультразвуковой обработкой пленки в буферной смеси растворяли аскорбат (0,5 *М*) или НАД-Н (0,05 *М*). Для удаления донора электронов из внешнего объема липосом, суспензию дважды пропускали через колонку с сефадексом G-25, уравновешенную буферным раствором. В результате этого концентрация аскорбата и НАД-Н, измеренная спектрофотометрически по поглощению при 264 и 340 нм, уменьшалась до $5 \cdot 10^{-4}$ *М* и $5 \cdot 10^{-5}$ *М*

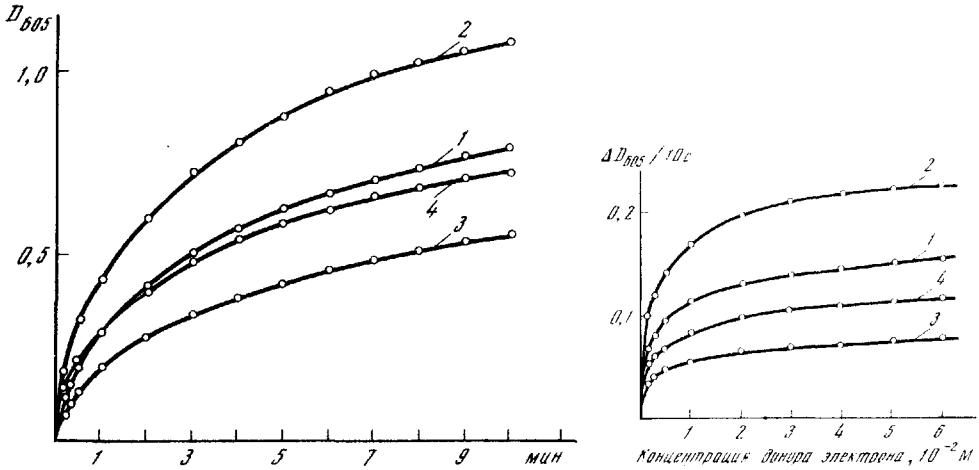


Рис. 1. Фотовосстановление МВ, сенсибилизированное хлорофиллсодержащими липосомами (*1, 3*) и хлорофиллом в 1% растворе Тритона Х-100 (*2, 4*) с $5 \cdot 10^{-2}$ *М* ДТТ (*1, 2*) и с $5 \cdot 10^{-2}$ *М* цистеина (*3, 4*). Молярное соотношение хлорофилл: липид-1:1000. Хлорофилл 10^{-6} *М*, МВ – $5 \cdot 10^{-4}$ *М*

Рис. 2. Зависимость начальной скорости фотовосстановления МВ в суспензии хлорофиллсодержащих липосом (*1, 3*) и в 1% растворе тритона Х-100 от концентрации ДТТ (*1, 2*) и цистеина (*3, 4*). Соотношение хлорофилл: липид-1:100. Хлорофилл 10^{-5} *М*, МВ $5 \cdot 10^{-4}$ *М*

соответственно. При последующих пропусканиях через колонку концентрация доноров не изменялась, что свидетельствовало о включении доноров во внутреннее пространство липосом. Фотовосстановление МВ проводили в трубке Тунберга, приспособленной для спектральных измерений, воздух удаляли на форвакуумном насосе. Восстановление МВ регистрировали по изменению оптической плотности при 605 нм. В качестве источника света использовали лампу накаливания 750 Вт с конденсором. Трубку освещали через 5-сантиметровый слой воды и светофильтры КС-11 и СЗС-25. Интенсивность света – $2{,}5 \cdot 10^5$ эрг/см^2 с. Выделение водорода регистрировали с помощью газожидкостного хроматографа Chrom-4 по методике, описанной ранее [4].

Мы провели сравнение фотовосстановления МВ, сенсибилизированного хлорофиллом в растворе тритона Х-100 и хлорофиллсодержащими липосомами. Для этого использовали липосомы, в которых молярное соотношение хлорофилл: липид составляло 1:1000. Данные на рис. 1 показывают, что начальная скорость восстановления МВ дитиотреитолом (ДТТ) и цистеином в мицеллярном растворе детергента примерно в 2 раза выше, чем в суспензии хлорофиллсодержащих липосом. Меньшую эффективность реакции можно объяснить тем, что в липосомах часть молекул хлорофилла расположена во внутреннем липидном монослое и недоступна для донора и акцептора электронов, находящихся во внешнем пространстве; действительно, при воздействии на хлорофиллсодержащие липосомы окислителей, непроникающих через липидный бислой, наблюдалось деструктивное выцветание лишь 50–70% хлорофилла [15].

На рис. 2 представлена зависимость начальной скорости фотовосстановления МВ от концентрации доноров электрона – ДТТ и цистеина в суспензии хлорофиллсодержащих липосом и в тритоне Х-100. Восстановление МВ достигает насыщения в обеих системах при одной и той же концентрации доноров электрона, что может служить указанием на то, что хлорофилл, расположенный во внешней части липосомальной мембраны, и хлорофилл в мицеллах детергента в равной степени доступны для этих доноров электрона.

Из табл. 1 видно, что фотообразование водорода в суспензии хлорофиллсодержащих липосом также менее эффективно, чем в мицеллах детергента. При использовании цистеина соотношение скорости реакции в липосомах и в детергенте такое же, как при фотовосстановлении МВ (рис. 1). Однако фотообразование водорода в липосомах в присутствии ДТТ в 4 раза менее эффективно, чем в мицеллах детергента при той же концентрации хлорофилла.

Таблица 1

Фотообразование водорода в суспензии хлорофиллсодержащих липосом (соотношение хлорофилл: липид-1:1000) и в 1% водном растворе тритона X-100 (мкл H_2 в мин) *.

Система	Донор электрона	
	ДТТ	Цистеин
Мицеллы тритона X-100	0,80	0,52
Липосомы	0,20	0,24

* Состав реакционной смеси: хлорофилл а в липосомах или в мицеллах детергента 10^{-5} *M*, МВ $5 \cdot 10^{-4}$, гидрогеназа из Clostridium butyricum 10 ед., 1/15 *M* K-Na-фосфат, 0,1 *M* KCl, pH 6,5; ДТТ $5 \cdot 10^{-2}$ *M*, цистеин $5 \cdot 10^{-2}$ *M*.

Уменьшение эффективности фотообразования водорода, так же как и фотовосстановления МВ, в суспензии хлорофиллсодержащих липосом по сравнению с раствором хлорофилла в детергенте связано, по-видимому, с недоступностью молекул хлорофилла, находящихся во внутреннем липидном монослое, для доноров и акцепторов электрона и, возможно, с концентрационным тушением возбужденных состояний хлорофилла в липосомах [9].

Ранее в нашей лаборатории наблюдали реакцию фотовосстановления МВ, сенсибилизированную хлорофиллом, в присутствии аскорбата в воднопиридиновых и этаноловых растворах пигмента [1, 2]. В мицеллярных растворах детергентов в анаэробных условиях накопления восстановленного МВ в подобной реакции наблюдать не удавалось, что можно было объяснить высокой скоростью обратных реакций в данной системе. Следовало ожидать, что пространственное разделение донора и акцептора электронов с помощью липидной мембраны в хлорофиллсодержащих липосомах будет препятствовать быстрому течению обратных реакций. На рис. 3*а* представлены результаты опытов по фотосенсибилизированному хлорофиллом восстановлению МВ аскорбатом, находящимся внутри липосом. При освещении наблюдается восстановление МВ, быстро достигающее стационарного уровня. При выключении света происходит падение поглощения при 605 нм. Последующее осве-

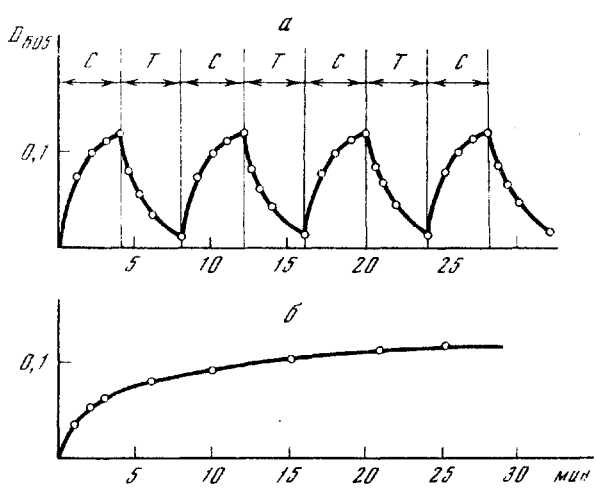


Рис. 3. Фотовосстановление МВ при транс-мембранном переносе электронов *а* – аскорбат внутри липосом; *б* – НАД-Н внутри липосом. Соотношение хлорофилл: липид-1:100. Хлорофилл 10^{-5} *M*, МВ $5 \cdot 10^{-4}$ *M*. *С* – освещение, *Т* – темнота

щение опять приводит к восстановлению МВ. Падение поглощения при 605 нм, наблюдающееся в системе после выключения света, указывает на протекание обратной реакции, при этом следует предположить, что восстановленный МВ обладает способностью проникать через липосомальную мембрану, что приводит к реакции с дегидроаскорбиновой кислотой, находящейся во внутреннем пространстве липосом. В случае проведения этих опытов при pH 8,7 скорость обратной реакции существенно замедлялась; это может быть связано с увеличением восстановительной способности аскорбата при этих значениях pH.

О том, что данная реакция связана с трансмембранным переносом электронов, свидетельствуют следующие опыты. Если в ходе восстановления МВ от аскорбата в суспензию липосом анаэробно вводить водный раствор Тритона X-100 (конечная концентрация 1%), то наблюдается быстрое окисление восстановленного МВ. При последующем освещении смеси накопления восстановленного МВ не наблюдается, что свидетельствует о разрушении липосом и выходе аскорбата в раствор.

Следует отметить, что при фотовосстановлении МВ от НАД-Н, включенного во внутреннее пространство липосом, обратной реакции после выключения света не наблюдалось (Рис. 3*б*). Реакция фотовосстановления МВ протекала и в том случае, когда НАД-Н и МВ не были разделены мембраной, что, вероятно, связано с необратимым фотоокислением НАД-Н в данных условиях. Однако в присутствии аскорбата фотовосстановление МВ не удается наблюдать в суспензии липосом, если и аскорбат и МВ находятся во внешнем пространстве липосом; лишь при пространственном разделении донора и акцептора электронов с помощью липосомальной мембраны, содержащей хлорофилл, удается замедлить обратную реакцию и наблюдать накопление восстановленного МВ.

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

Поступило
15 IX 1981

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А., Брин Г.П.* – ДАН 1965, т. 163, с. 761. 2. *Брин Г.П., Луганская А.Н., Красновский А.А.* – ДАН, 1967, т. 174, с. 221. 3. *Луганская А.Н., Красновский А.А.*, – Мол. биол., 1970, т. 4, с.848. 4. *Красновский А.А., Никандров В.В., Брин Г.П. и др.* – ДАН, 1975, т. 225, с. 711. 5. *Krasnovsky A.A.* Topics in Photosynthesis, 1979, vol. 3, p. 281. 6. *Ti-Tien H.* Ibid., 1979, vol. 3, p. 115. 7. *Tomkiewicz M., Corker G.A.* – Photochem. Photobiol., 1975, vol. 22, p. 249. 8. *Oettmeier W., Norris J., Katz J.* – Z. Naturforsch., 1976, vol. 31c, p. 163. 9. *Hurley J.K., Castelli F., Tollin G.* – Photochem. photobiol., 1980, vol. 32, p. 79. 10. *Красновский А.А. мл., Семенова А.Н.* – ДАН, 1981, т. 257, с. 729. 11. *Kurihara K., Sukigara M., Toyashima Y.* – Biochim. et biophys. acta, 1979, vol. 547, p. 117. 12. *Leblanc R.M., Werson B., Dijkmans H., Aghion J.* – Photosynthetica, 1981, vol. 15, p. 109. 13. *Batzri S, Korn E.D.*– Biochim. et biophys. acta, 1973, vol. 298, p. 1015. 14. *Huang C.* – Biochemistry, 1969, vol. 8, p. 344. 15. *Fragata M.* – Photosynthetica, 1977, vol. 11, p. 296.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. LVI 1982 № 7

УДК 541.144.7:577,355.2

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА, АДСОРБИРОВАННОГО НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ. ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ КИСЛОРОДА

Луганская А. Н., Лебедев Н. Н., Брин Г. П., Красновский А. А

Измерены спектры поглощения, флуоресценции и второй производной спектров флуоресценции хлорофилла *а*, адсорбированного на силохроме и окиси магния. Адсорбция на силохроме приводит к образованию неспецифического набора агрегатов хлорофилла, тогда как при адсорбции на окиси магния образуется только один тип агрегатов хлорофилла *а*. Установлено, что агрегированный хлорофилл в адсорбатах обладает более эффективным фотосенсибилизирующим действием в реакции фотовосстановления кислорода, нежели адсорбированный хлорофилл в мономерном состоянии. Фотохимическая активность адсорбатов хлорофилла на окиси магния на порядок превышает активность пигмента, адсорбированного на силохроме.

Ранее изучалось фотокаталитическое действие неорганических фотокатализаторов: окислов цинка, титана, вольфрама и сульфида кадмия, обладающих поглощением в ультрафиолетовой и коротковолновой видимой областях спектра. В водных суспензиях этих соединений было обнаружено фотовыделение кислорода, фотовосстановление метилвиологена и фотовыделение водорода, а также фотовосстановление кислорода с образованием перекиси водорода [1—4].

Существенной задачей является использование всего спектра видимого света для осуществления реакций такого типа; в наших опытах лишь использование сульфида кадмия позволило достичь длинноволновой границы в 600 нм [4]. В данной работе в качестве фотосенсибилизаторов реакции восстановления кислорода с образованием перекиси водорода были использованы адсорбаты — хлорофилл на неорганических носителях; в этом случае фотохимически активной была вся область видимого спектра, поглощаемого хлорофиллом.

Экспериментальная часть

Хлорофилл *а* получали по методу Такамии [5] с последующей хроматографией пигмента на колонках с сахарозой. Адсорбцию хлорофилла проводили из смеси ацетона (10%) с петролейным эфиром (т. кип. 60—90° С). В качестве адсорбентов использовали окись магния (марки «х.ч.») и силохром С-120. Спектры диффузного отражения образцов измеряли на спектрофотометре СФ-14, спектры флуоресценции — на собранной одним из авторов данной статьи (Н. Н. Лебедевым) установке, состоящей из двух монохроматоров МДР-2, ксеноновой лампы ДКсШ-250 и фотоэлектрической системы регистрации, включающей ФЭУ-79, усилитель постоянного тока ЛПУ-01, микрокомпьютер DCSU-2 (Перкин-Элмер, США) и самописец КСП-4. Фотохимическое восстановление кислорода исследовали методом измерения хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы, позволяющим регистрировать перекись водорода до 10^{-7} М [6].

Результаты эксперимента

Адсорбция на силохроме. Полученная изотерма адсорбции хлорофилла *а* на силохроме (зависимость количества адсорбированного пигмента от его равновесной, последовательно увеличивающейся концентрации в растворе) имеет две области насыщения (рис. 1). Ранее было высказано

Рис. 1. Изотерма адсорбции хлорофилла *а* на силохроме (*1*) и зависимость относительного квантового выхода флуоресценции адсорбатов от концентрации хлорофилла на силохроме (*2*)

Рис. 2. Вторые производные спектров флуоресценции хлорофилла *а*, адсорбированного на силохроме (адсорбция хлорофилла 300 (*1*) и 3400 мМ/г (*2*) и растворенного в смеси ацетона (10%) и петролейного эфира в концентрации 10^{-4} М (*3*) и 10^{-6} М (*4*)

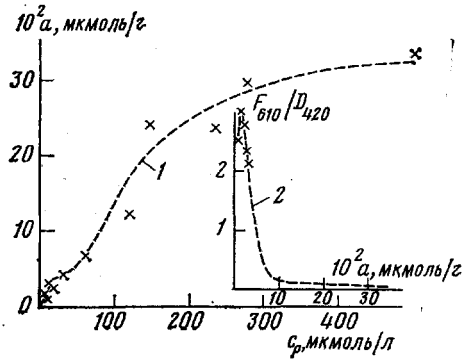


Рис. 1

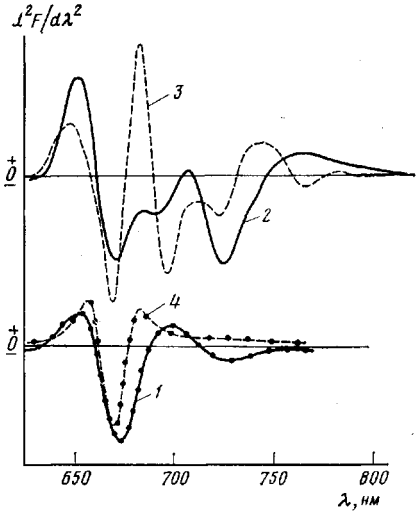


Рис. 2

предположение [7], что такой характер изотермы адсорбции обусловлен образованием двух типов упаковки пигмента на носителе. Проведенное нами измерение спектров поглощения и флуоресценции и вторых производных спектров флуоресценции адсорбатов подтверждает это предположение. Так, оказалось, что в области малых концентраций адсорбированного пигмента спектры хлорофилла имеют форму и положение максимумов, близкие к тем, которые имеет мономерный пигмент (рис. 2). В области высоких концентраций адсорбированного хлорофилла в его спектрах поглощения и флуоресценции наблюдается значительное уширение и смещение максимумов в длинноволновую сторону. На второй производной спектров флуоресценции этих адсорбатов появляются длинноволновые полосы с максимумами при 690 и 724 нм, аналогичные наблюдаемым для агрегатов хлорофилла, образующихся в концентрированных растворах (рис. 2).

Характерным свойством агрегированных форм хлорофилла по сравнению с мономерными является, как известно, низкая интенсивность их флуоресценции при комнатной температуре. Действительно, измерения показали, что квантовый выход флуоресценции относительно высок у адсорбатов, полученных из разбавленных растворов, но резко падает при увеличении концентрации пигмента на носителе (рис. 1). Измерение низкотемпературных спектров флуоресценции показало, что при −196° С интенсивность коротковолновых полос, наблюдающихся как при малых, так и при больших концентрациях адсорбированного хлорофилла, увеличивается незначительно. В противоположность этому интенсивность длинноволновых полос, наблюдающихся при высоких концентрациях адсорбированного пигмента, возрастает в 2—2,5 раза при замораживании образца до −196° С, что характерно для агрегированных форм пигментов.

Следует отметить, что в исходном растворе пигмента, из которого происходит адсорбция хлорофилла, образования агрегированных форм пигмента не наблюдается. Они появляются вследствие взаимодействия пигмента с поверхностью носителя. Однако набор агрегатов, образующихся при этом на силохроме, не является специфическим и соответствует наблюдаемому при высоких концентрациях пигмента в неполярных растворителях [8].

Адсорбция на окиси магния. Изотерма адсорбции хлорофилла на окиси магния имеет такой же вид, что и изотерма адсорбции хлорофилла на силохроме. В ней также наблюдаются две области насыщения, причем

переход к высокой концентрации адсорбированного хлорофилла сопровождается значительным падением интенсивности его флуоресценции (рис. 3). Однако спектральные характеристики пигмента, адсорбированного на этом носителе, отличаются от наблюдаемых при адсорбции на силохроме.

Так, во второй производной спектров флуоресценции адсорбатов на окиси магния с высокой концентрацией хлорофилла имеется только одна длинноволновая полоса с максимумом при 718 нм (рис. 4). Резкое падение квантового выхода флуоресценции и температурная зависимость интенсивности этой полосы свидетельствуют о том, что она принадлежит агрегиро-

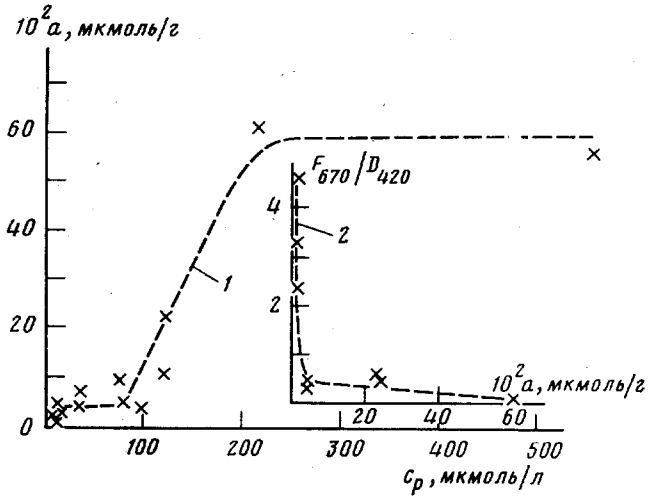


Рис. 3. Изотерма адсорбции хлорофилла на окиси магния (*1*) и зависимость относительного квантового выхода флуоресценции адсорбатов от концентрации хлорофилла на окиси магния (*2*)

ванной форме хлорофилла. Кроме длинноволновой полосы в спектрах поглощения и флуоресценции хлорофилла, адсорбированного на окиси магния, даже при низких концентрациях пигмента на носителе появляется коротковолновое «плечо» с максимумами при 665 и 670 нм соответственно. Интенсивность этого плеча практически не зависит от температуры, не коррелирует с концентрацией пигмента, и скорее всего плечо обусловлено взаимодействием центрального атома магния с кристаллической решеткой носителя.

Таким образом, полученные данные показывают, что адсорбция хлорофилла на окиси магния приводит к образованию только одного типа агрегатов хлорофилла, что вызвано, видимо, специфическим взаимодействием пигмента с носителем.

Фотохимические свойства адсорбатов. При освещении красным светом суспензий порошков силохрома и окиси магния в воде не образуется перекиси водорода. При действии же красного света на водные суспензии адсорбатов хлорофилла на окиси магния и силохроме в присутствии кислорода воздуха наблюдается образование перекиси водорода. Увеличение концентрации пигмента на силохроме приводит к возрастанию фотохимической активности образцов. Удельная фотохимическая активность адсорбатов также растет с увеличением степени заполнения носителя и образованием агрегированных форм пигмента на силохроме (рис. 5).

Аналогичное увеличение фотохимической активности с ростом концентрации пигмента наблюдалось и для адсорбатов хлорофилла на окиси магния (рис. 5). Следует отметить, что эффективность восстановления кислорода до перекиси водорода адсорбатами на этом носителе на порядок превышала аналогичную величину для адсорбатов на силохроме.

Обсуждение результатов

В зависимости от исходной концентрации раствора хлорофилла, из которого производится адсорбция, на силохроме и окиси магния наблюдается образование как агрегированных, так и мономерных форм пигмента, о чем свидетельствуют различные длинноволновые максимумы спектров поглощения и флуоресценции и вторые производные спектров флуоресценции адсорбатов [9]. Однако адсорбция на этих носителях протекает поразному. По мере увеличения концентрации пигмента на силохроме обнаруживаются два различных длинноволновых максимума, тогда как на окиси магния — только один.

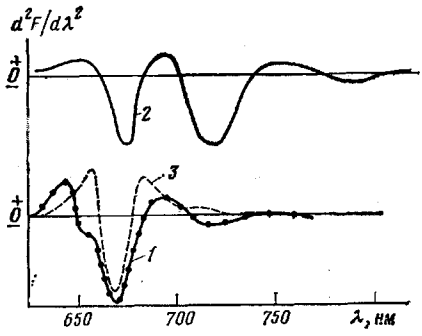


Рис. 4

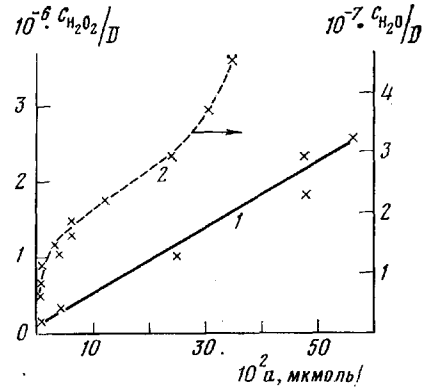


Рис. 5

Рис. 4. Вторые производные спектров флуоресценции хлорофилла *a*, адсорбированного на окиси магния (адсорбция хлорофилла 300 (*1*) и 5500 мМ/г (*2*)) и растворенного в смеси ацетона (10%) с петролейным эфиром в концентрации 10^{-6} М (*3*)

Рис. 5. Зависимость фотохимической активности адсорбированного хлорофилла на окиси магния (*1*) и силохроме (*2*) от концентрации пигмента на носителе

На активированной окиси магния ранее наблюдалось обратимое изменение окраски адсорбированного хлорофилла, связанное с выходом атома магния из молекулы хлорофилла в решетку носителя [10]. Наличие в нашем случае коротковолнового «плеча» в «красных» максимумах поглощения и люминесценции адсорбированного на неактивированной окиси магния хлорофилла может свидетельствовать об образовании координационной связи атома магния молекулы пигмента с решеткой носителя (возможно, через кислород) со смещением атома магния в молекуле хлорофилла.

Известно, что при агрегации пигмента образуется координационная связь атома магния одной молекулы хлорофилла с атомом кислорода циклопентанового кольца другой молекулы пигмента [11]. Можно предположить, что наличие агрегированной формы пигмента только одного типа на окиси магния является следствием того, что непосредственно связанная с этим носителем молекула хлорофилла может взаимодействовать с другой молекулой пигмента лишь через атом кислорода циклопентанового кольца, поскольку ее атом магния связан с решеткой носителя. Хлорофилл же, адсорбированный на силохроме, не связывается с носителем через атом магния [12] и может образовывать агрегаты с другими молекулами пигмента, используя обе связи, ответственные за агрегацию пигмента, результатом чего и являются два типа агрегатов на силохроме.

Фотохимическая активность (по восстановлению кислорода) полученных адсорбатов на окиси магния сравнима с изученной ранее активностью двуокиси титана. Активность адсорбатов хлорофилла на силохроме примерно на порядок ниже.

Следует отметить, что фотосенсибилизирующая активность адсорбатов значительно ниже фотосенсибилизирующей активности пигмента в растворенном состоянии. Вероятно, адсорбируясь на носителе, пигмент частично теряет возможность проявления своих донорно-акцепторных свойств. Это

может происходить вследствие того, что возбужденные электроны хлорофилла могут захватываться и гаситься примесными ловушками носителя. Полученные нами данные по увеличению фотохимической активности агрегированных форм адсорбированного пигмента по сравнению с мономерными формами могут быть объяснены ослаблением влияния подложки на фотоактивную молекулу пигмента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Молекулярная фотоника. М.: Наука, 1970, с. 161–178.
2. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1973, т. 213, с. 1431–1434.
3. *Красновский А. А., Брин Г. П., Никандров В. В.* Там же, 1976, т. 229, с. 990–993.
4. *Красновский А. А., Брин Г. П., Луганская А. Н., Никандров В. В.* Там же, 1979, т. 249, с. 896–899.
5. *Irijama K., Ogura N., Takamiya A.* J. Biochem., 1974, v. 76, p. 901–905.
6. *Cormier M. J., Prichard P. M.* J. Biol. Chem., 1968, v. 234, p. 4706–4708.
7. *Некрасов Л. И.* Биофизика, 1967, т. 12, с. 215–223.
8. *Литвин Ф. Ф., Шубин В. В., Синещеков В. А.* Биофизика, 1975, т. 20, с. 202–206.
9. *Некрасов Л. И., Каплер Р.* Биофизика, 1966, т. 11, с. 48–53.
10. *Григорян А. Н., Некрасов Л. И., Кобозев А. И.* Вестн. МГУ. Химия, 1966, № 3, с. 42–44.
11. *Katz J. J., Closs J. L., Pennington F. C. et al.* J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, p. 3801–3809.
12. *Борисова М. А., Некрасов Л. И., Кобозев Н. И. и др.* Ж. физ. химии, 1969, т. 43, с. 529–532.

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

Поступила в редакцию
26.VI.1981

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том, 29, вып. 5 1982 г.

УДК 581.131 : 581.174.1

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПОГЛОЩЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА ИЗОЛИРОВАННЫМИ ХЛОРОПЛАСТАМИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

С. В. МАЛЬЦЕВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биологический факультет Московского государственного университета
Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Исследовали выделение и поглощение молекулярного водорода хлоропластами высших растений с использованием амперометрического метода измерения H_2. Фотообразование H_2 зависело от состава среды выделения хлоропластов и активировалось ионами калия. Выделение H_2 и O_2 хлоропластами в анаэробных условиях находится в конкурентных взаимоотношениях в зависимости от интенсивности света. На свету низкой интенсивности ($\leqslant 4{,}8 \cdot 10^4$ эрг/см^2·с) доминирует выделение H_2. Повышение интенсивности света ведет к преобладанию образования O_2. Обработанные диуроном (10 мкМ) или прогретые (55°, 5 мин) хлоропласты выделяли H_2 на свету высокой интенсивности в связи с ингибированием кислородвыделяющей системы. Освещение хлоропластов в присутствии феррицианида приводило к поглощению экзогенного H_2 за счет взаимодействия с кислородом, образующимся при реакции Хилла. Хлоропласты, изолированные из листьев стерильных растений, полностью сохраняли эффекты выделения и поглощения H_2. Сделан вывод о сходстве процессов фотообразования H_2 хлоропластами высших растений и адаптированными к анаэробиозу зелеными водорослями.

Изолированные хлоропласты — гидрогеназа — молекулярный водород.

Со времени открытия способности адаптированных зеленых водорослей выделять молекулярный водород (H_2) на свету [1] гидрогеназная активность была обнаружена у большого числа фототрофных организмов [2]. Однако известны лишь единичные сообщения о фотообразовании H_2 изолированными хлоропластами высших растений [3] или стерильными проростками [4]. Незначительное выделение водорода при освещении целых листьев регистрировали методами газовой хроматографии [5] и амперометрии [6].

Наибольшее внимание в настоящее время уделяется сопряжению хлоропластов с экзогенными бактериальными гидрогеназами с целью увеличения выхода H_2 и перспективой его технического использования. Скорость выделения H_2 в таких модельных системах достигает 400 мкмоль/мг хл·ч [7, 8], что позволяет изучать процесс сравнительно низкочувствительными манометрическим и газохроматографическим методами. Но большинство фототрофных организмов и выделенных из них структур, обладающих гидрогеназной активностью, выделяют и поглощают H_2 гораздо менее активно, чем системы, содержащие бактериальные гидрогеназы, что значительно ограничивает возможности применения этих методов для исследования механизма явления.

В настоящей работе изучена способность изолированных хлоропластов высших растений выделять и поглощать молекулярный водород без введения в систему экзогенной гидрогеназы. Мы использовали для этого амперометрический метод измерения [9], который чувствительнее обычно применяемых методов манометрии и газовой хроматографии.

МЕТОДИКА

Хлоропласты выделяли из листьев двухнедельных проростков гороха *Pisum sativum* сорта Грибовский ранний. Обычно 30 г листьев растирали в фарфоровой ступке с 75 мл среды выделения, которая содержала 350 мМ маннита, 100 мМ хлористого калия, 5 мМ

хлористого магния в $^1/_{15}$ М фосфатном буфере pH 7,0. При этом составе среды наблюдалось наиболее эффективное выделение водорода. Гомогенат фильтровали через два слоя капроновой ткани (газ № 37) и центрифугировали при 200 g 4 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 1000 g 9 мин, осадок ресуспендировали в 75 мл среды выделения и повторно осаждали при 1000 g 9 мин. К осадку хлоропластов добавляли глицерин (50% по объему) и брали в опыт 0,1 мл такой суспензии. Все операции по выделению хлоропластов проводили при температуре не выше 4° не более 30 мин.

Скорость выделения и поглощения водорода и кислорода измеряли на амперометрической установке на основе полярографа LP-7e (ЧССР) и потенциометра КСП-4 со шкалой 1 мВ. Закрытый тефлоновой пленкой (толщина 1,5 мкм) платиновый электрод (площадь поверхности платины 20 мм^2) поляризовали при +600 мВ для измерения водорода [9] и при —600 мВ для измерения кислорода. Чувствительность по водороду составляла 0,2 нмоль/мл на шкалу самописца (250 мм). Установку калибровали введением в стеклянную герметичную термостатируемую ячейку объемом 3,5 мл насыщенных при 25° растворов H_2 или O_2 в деионизованной воде, используя микрошприц. Анаэробные условия создавали методом «раздельного продувания» аргоном [8]. Акцепторы электронов (10 мМ) вводили в реакционную смесь в виде концентрированных растворов (pH 7,0) в объеме 50 мкл. Диурон (10 мкМ) растворяли в этаноле и вводили в реакционную смесь в объеме 10 мкл. Хлоропласты освещали конденсированным красным светом лампы КГМ 24 В 150 Вт в области 600—800 нм. Интенсивность света изменяли нейтральными светофильтрами. Наибольшая интенсивность света, измеренная с помощью термоэлемента РТН-20С, составляла $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с. Концентрация хлорофилла в реакционной смеси обычно составляла 50—60 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ВЫДЕЛЕНИЕ H_2 ХЛОРОПЛАСТАМИ

Влияние pH среды. Фотообразование H_2 было наибольшим при pH 7,0 (рис. 1), что соответствует максимуму в системе, содержащей хлоропласты с бактериальной гидрогеназой [7]. В кислой области pH ингибирующее действие было несколько большим, чем в щелочной. Поглощение экзогенного H_2 (0,2 нмоль/мл) имело широкий оптимум при pH 5,5—7,5 и ингибировалось в щелочной области pH. Подобное соотношение оптимумов pH для выделения и поглощения H_2 было описано для зеленой водоросли *Chlamydomonas* [14].

Влияние состава среды выделения. Существенное влияние на фотообразование H_2 оказывали вещества, применяемые для создания изоосмотических условий в средах выделения хлоропластов. Выделенные в средах с применением 350 мМ маннита или сорбита хлоропласты обнаруживали в 2 раза бо́льшую скорость образования H_2 при pH 7,0 в сравнении с хлоропластами, выделенными в присутствии 400 мМ сахарозы или галактозы (рис. 1). Активирующее влияние на фотообразование H_2 оказывали ионы щелочных и щелочноземельных металлов (рис. 2). Среди использованных в опыте ионов наибольшее влияние оказывал ион калия. Максимальные скорости выделения H_2 на свету наблюдали при концентрации хлористого калия в реакционной среде 100—400 мМ. Хлориды натрия, магния, кальция оказывали в 5—6 раз менее активирующее действие, чем хлорид калия. Карбонаты калия, натрия, кальция в концентрациях 10—400 мМ не оказывали влияния на фотообразование H_2 при pH 7,0. Таким образом, участие хлористого калия в фотообразовании H_2 специфично, что, по-видимому, связано с ускорением потока электронов между двумя фотосистемами из-за конформационных изменений мембран хлоропластов [10]. Нельзя исключить также прямое влияние ионов калия на ферментативную активность гидрогеназы [2].

Влияние интенсивности света. Кинетика выделения H_2 на свету имела двухфазный характер (рис. 3). На свету высокой интенсивности ($1{,}1$—$5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с) первоначальное быстрое выделение H_2 вскоре сменялось его поглощением. Снижение интенсивности света вызвало удлинение первой (быстрой) фазы и уменьшало ее скорость. При низкой интенсивности света ($\leqslant 1{,}1 \cdot 10^4$ эрг/см^2·с) наблюдалось медленное линейное выделение H_2 в течение длительного времени. В отдельной серии опытов мы измерили выделение кислорода хлоропластами в анаэробных

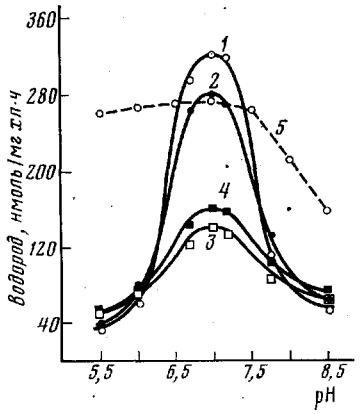


Рис. 1

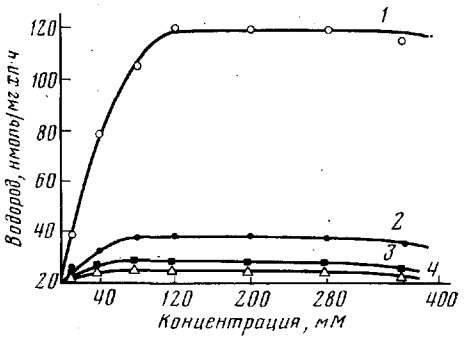


Рис. 2

Рис. 1. Влияние pH среды на скорость первой (быстрой) фазы фотообразования водорода хлоропластами

Среды выделения хлоропластов в присутствии: *1*—350 мМ маннита, *2*—350 мМ сорбита, *3*—400 мМ сахарозы, *4*—400 мМ галактозы; *5* — поглощение водорода. Хлоропласты (60 мкг/мл хлорофилла) в 1/15 М фосфатном буфере с 100 мМ хлористого калия. Интенсивность света $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см²·с

Рис. 2. Влияние ионов металлов на фотообразование водорода хлоропластами

1 — хлористый калий, *2* — хлористый натрий, *3* — хлористый магний, *4* — хлористый кальций. Хлоропласты (50 мкг/мл хлорофилла) в 1/15 М фосфатном буфере pH 7,0

условиях. На рис. 4 показана зависимость скорости выделения кислорода хлоропластами от интенсивности света. Видно, что выделение O_2 регистрировалось лишь при интенсивности света более $5 \cdot 10^4$ эрг/см²·с. Выделение H_2 в тех же условиях происходило при гораздо меньших интенсивностях света — от $1{,}1 \cdot 10^4$ до $4{,}8 \cdot 10^4$ эрг/см²·с. Свет выше $5 \cdot 10^4$ эрг/см²·с стимулировал поглощение выделенного H_2 (рис. 4). Таким образом, выделение H_2 и O_2 хлоропластами находится в конкурентных взаимоотношениях в зависимости от интенсивности света, так же как это описано для хлореллы [11]. На свету низкой интенсивности доминирует выделение H_2. Повышение интенсивности света ведет к преобладанию фотообразования кислорода (рис. 4). Существенно, что хлоропласты, прекратившие выделение H_2 на свету высокой интенсивности, восстанавливают такую способность после 2—3 мин темноты (в это время происходит поглощение выделенного H_2).

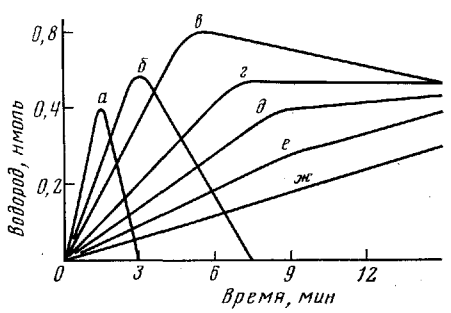


Рис. 3

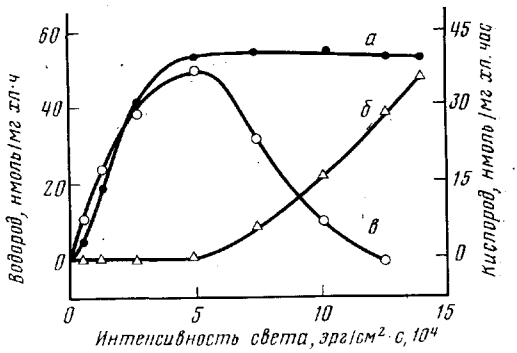


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость кинетики выделения H_2 хлоропластами от интенсивности света

Хлоропласты (60 мкг/мл хлорофилла) в 1/15 М фосфатном буфере pH 7,0 с 100 мМ хлористого калия. Интенсивность света (эрг/см²·с): *а* — $5{,}4 \cdot 10^5$, *б* — $2{,}4 \cdot 10^5$, *в* — $1{,}1 \cdot 10^5$, *г* — $4{,}8 \cdot 10^4$, *д* — $3{,}3 \cdot 10^4$, *е* — $2{,}2 \cdot 10^4$, *ж* — $1{,}1 \cdot 10^4$

Рис. 4. Выделение H_2 и O_2 хлоропластами в зависимости от интенсивности света

а — выделение H_2 прогретыми (55°, 5 мин) хлоропластами, *б* — выделение O_2, *в* — выделение H_2

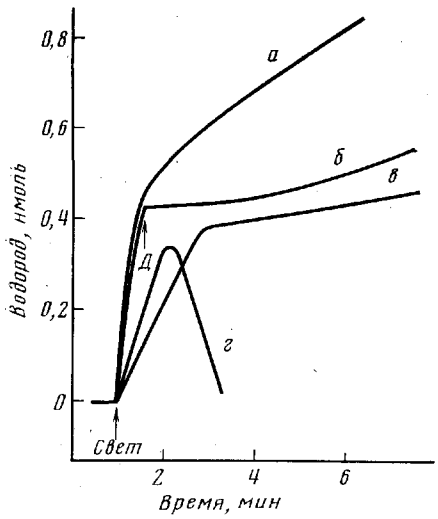


Рис. 5

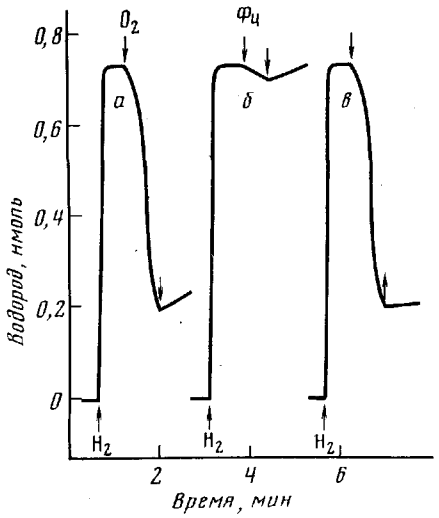


Рис. 6

Рис. 5. Влияние диурона и нагревания на выделение водорода хлоропластами
а — прогретые (55°, 5 мин) хлоропласты, *б* — прогретые (55°, 5 мин) хлоропласты, Д — введение 10 мкМ диурона, *в* — хлоропласты+диурон (10 мкМ), *г* — необработанные хлоропласты. Интенсивность света — $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см²·с

Рис. 6. Поглощение водорода хлоропластами
а — прогретые (55°, 5 мин) хлоропласты, O_2 — введение кислорода (1 мМ), *б* — то же, Фц — введение 10 мМ феррицианида, *в* — необработанные хлоропласты+10 мМ феррицианида. Водород (H_2) — 0,2 нмоль/мл. Свет — $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см²·с; стрелка вниз — включение, стрелка вверх — выключение

Влияние предварительного нагревания хлоропластов. Прогретые в течение 5 мин при 50—55° хлоропласты шпината и эвглены теряли способность к реакции Хилла, т. е. не выделяли O_2, но сохраняли активность фотосистемы 1 и восстанавливали $НАДФ^+$ от пары аскорбат — ДХФИФ [12]. В согласии с этими данными на рис. 4 видно, что прогретые при 55° 5 мин хлоропласты выделяли H_2 на свету высокой интенсивности. Нагревание хлоропластов до 100° полностью и необратимо ингибировало фотообразование H_2.

Влияние диурона. Диурон (10 мкМ) лишь частично подавлял фотовыделение H_2. До 80% подавление наблюдалось через 1—2 мин после введения диурона, затем скорость выделения H_2 возрастала и блокирующее его действие сохранялось на уровне 60% (рис. 5). Следует отметить, что прогретые (55°, 5 мин) хлоропласты выделяли H_2 на свету в 8 раз более активно (51,2 нмоль/мг хл·ч), чем обработанные диуроном (6,5 нмоль/мг хл·ч, рис. 5, *а*, *в*). Введение диурона к прогретым хлоропластам снижало скорость фотообразования H_2 до 10 нмоль/мг хл·ч (рис. 5, *б*). Это свидетельствует о донировании электронов на уровне фотосистемы 2, что подтверждается данными о том, что некоторые органические и неорганические соединения могут донировать электрон на окислительном участке фотосистемы 2 вместо воды [13]. Весьма существенно, что у обработанных диуроном или прогретых хлоропластов образование H_2 на свету высокой интенсивности не подавлялось (рис. 5) в связи с ингибированием кислородвыделяющей системы. Поэтому обработанные таким образом хлоропласты использовали в экспериментах по поглощению экзогеннного H_2.

Поглощение экзогенного H_2. Хлоропласты поглощали введенный в ячейку водород (0,2 нмоль/мл) как без, так и в присутствии искусственных акцепторов электронов (таблица). Заметное поглощение водорода происходило при наличии в реакционной среде акцепторов, обладающих положительным окислительно-восстановительным потенциалом (мети-

Поглощение (—) и выделение (+) водорода хлоропластами в присутствии акцепторов электронов

Хлоропласты (60 мкг/мл хлорофилла) в $^1/_{15}$ М фосфатном буфере pH 7,0; диурон — 10 мкМ; свет — $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с

Акцептор, 10 мМ	Водород, нмоль/мг хл·ч				E_0', В при pH 7,0
	темнота		свет		
	55°, 5 мин	+ диурон	55°, 5 мин	+ диурон	
Нет	—2,5	—1,2	+4,9	+3,0	—
НАД+	—9,4	—8,1	+8,7	—0,8	—0,324
НАДФ+	—6,2	—10,0	+8,7	—1,2	—0,320
Метиленовый синий	—12,5	—6,4	+3,1	+2,4	+0,011
ДХФИФ	—15,6	—8,1	—1,9	—2,4	+0,217
Феррицианид	—7,5	—1,2	+4,4	0,0	+0,360
Кислород, 1 мМ	—71,6	—48,2	+16,2	+3,6	+0,816

леновый синий, ДХФИФ). Однако наибольшие скорости поглощения H_2 наблюдали при использовании кислорода в низких концентрациях (рис. 6, *а*). Интересно отметить, что феррицианид слабо стимулировал фотопоглощение H_2 у хлоропластов с поврежденной системой фотоокисления воды (55°, 5 мин) (рис. 6, *б*), но вызывал активное поглощение H_2 у непрогретых хлоропластов на свету (рис. 6, *в*). Очевидно, что феррицианид стимулировал выделение кислорода в реакции Хилла у непрогретых хлоропластов и вызывал поглощение H_2, как и при введении экзогенного кислорода. Из таблицы видно, что свет подавлял поглощение водорода или наблюдалось его слабое выделение в присутствии большинства использованных акцепторов. По-видимому, выделение водорода в этих условиях доминирует над его поглощением.

Метилвиологен значительно активирует выделение H_2 в системе хлоропластов с экзогенной бактериальной гидрогеназой [7]. В отличие от этого введение метилвиологена (50 мкМ) не активировало фотообразование H_2 хлоропластами. По-видимому, при описанных выше условиях выделения хлоропластов сохраняются эндогенные переносчики, связывающие фотосистему 1 и гидрогеназу, и введение искусственного медиатора (метилвиологена) не активирует процесс выделения H_2 на свету.

Хлоропласты выделяли H_2 в темноте из восстановленного дитионитом (100 мкг/мл) метилвиологена со скоростью до 30 нмоль/мг хл·ч. Насыщающая концентрация метилвиологена составляла 150 мкМ при концентрации хлорофилла 60 мкг/мл реакционной смеси. Необходимо отметить, что при использовании нейтрализованного дитионита в концентрациях выше 100 мкг/мл выделение водорода подавлялось.

Хлористый аммоний (5 мМ), разобщающий фотофосфорилирование и транспорт электронов, при введении в реакционную смесь практически не изменял скорость фотообразования H_2.

Окись углерода подавляет активность гидрогеназ многих организмов. Однако влияние CO на гидрогеназную активность целых клеток значительно слабее, чем на очищенный фермент [2]. Кроме того, ингибирование гидрогеназы CO реактивируется светом и продуванием инертным газом, что приводит к вымыванию окиси углерода из реакционной смеси [17]. В наших опытах скорость выделения и поглощения водорода хлоропластами снижалась на 20% через 10 мин и на 80% через 50 мин инкубации в атмосфере CO.

Газохроматографическое определение. Использование крайне чувствительного амперометрического метода оставляло сомнения в том, что из-за возможных микротрещин в тефлоновой пленке могло регистрироваться не выделение водорода, а образование различных восстановителей при освещении хлоропластов. В опыте с максимальным газовыделением (прогретые хлоропласты на свету) для определения водорода был

использован газовый хроматограф «Хром-4» по методике [11]. Необходимое для регистрации количество газа накапливали в ячейке в течение 40—60 мин. Газ, выделяющийся при освещении хлоропластов, идентифицирован как водород. В этом опыте рассчитанная скорость образования H_2 совпадала с амперометрическим определением.

Хлоропласты из других видов растений. Кроме *Pisum sativum* использовали хлоропласты, изолированные по описанной выше методике из листьев *Zea mays, Triticum vulgare* (выращенных методом водной культуры), *Chenopodium album, Lamium album*. Хлоропласты этих видов растений были активны в отношении выделения и поглощения H_2, однако скорости процессов были различны. По-видимому, для сравнения активности различных видов растений необходим подбор оптимальных условий выращивания, возраста, методов выделения хлоропластов и состава реакционной среды.

Контроль на сопутствующую микрофлору. Существовала возможность загрязнения хлоропластов микроорганизмами, обладающими гидрогеназной активностью. Для выделения хлоропластов использовали растения, выращенные в стерильных условиях. Предварительно промытые семена гороха стерилизовали погружением в 70%-ный этанол (15 мин), дважды промывали стерильной дистиллированной водой и выдерживали 30 мин при интенсивном перемешивании в 30%-ной перекиси водорода. Стерилизованные семена проращивали при 26° 48 ч в чашках Петри, после чего переносили в предварительно стерилизованные автоклавированием (1 атм, 30 мин) колбы объемом 700 мл с 100 мл минеральной питательной смеси и стеклянным наполнителем. Растения выращивали в люминостате (освещенность 20 тыс. лк, лампы ЛБ-80). Листья стерильных растений, помещенные на питательные среды (мясо-пептонный агар (МПА) или мясо-пептонный бульон с 3% глюкозы), не обнаруживали бактериального загрязнения. Существенно, что выделенные из таких листьев хлоропласты полностью сохраняли описанные выше эффекты выделения и поглощения H_2, полученные на хлоропластах из нестерильных листьев растений, выращенных в тех же условиях. Колонии микроорганизмов, выращенных из смыва с нестерильных листьев (МПА, 28°, 48 ч), не выделяли и не поглощали H_2 в темноте или на свету. Добавка таких микроорганизмов к хлоропластам не вызывала ускорения фотообразования или поглощения H_2. Загрязнение хлоропластов фототрофными организмами во время процедуры выделения (4°, 30 мин) представляется маловероятным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты указывают на сходство процессов образования на свету H_2 хлоропластами высших растений и адаптированными к анаэробиозу зелеными одноклеточными водорослями [1]. В опытах на Chlorella pyrenoidodan было установлено, что освещение светом низкой интенсивности приводит к выделению H_2, при этом выделение O_2 не регистрируется. Увеличение интенсивности света приводило к постепенному переходу от выделения H_2 к выделению O_2. Обратимый характер таких переходов в зависимости от интенсивности света свидетельствовал о конкурентных взаимоотношениях H_2 и O_2 [11]. Высказывалось предположение о возможных конкурентных взаимоотношениях выделения H_2 и O_2 и для листьев высших растений [6].

Двухфазный характер процесса фотообразования H_2, т. е. интенсивное выделение H_2 в начале освещения и последующее снижение скорости до более низкого уровня, выявлен у Scenedesmus [15]. Авторы предположили, что первая (быстрая) фаза связана с расходованием неизвестного пула электронов для фотосистемы 1, образованного во время предварительной темновой анаэробной адаптации объекта, а вторая

(медленная) фаза зависит от сравнительно медленного процесса темнового ферментативного окисления глюкозы. Описано влияние нагревания (1—2 мин, 55°) на адаптированные клетки *Scenedesmus* [16]. Прогретые клетки теряли способность выделять O_2 при реакции Хилла и к циклическому фотофосфорилированию, но фотообразование H_2 стимулировалось либо сохранялось на прежнем уровне. Относительный вклад фотосистемы 2 в фотообразование водорода (определенный по влиянию диурона) варьировал от 0 до 20—50% в зависимости от условий выращивания и вида зеленой водоросли [17]. Применение разобщителей показало независимость процесса фотообразования H_2 от фотофосфорилирования [16]. Стимуляция фотообразования H_2 экзогенной глюкозой [15] свидетельствовала о возможной роли циклов катаболизма углеводородов как поставщиков Н-доноров. Сравнительное исследование явления фотообразования H_2 у зеленых водорослей позволило представить обобщенную схему процесса [15], которая предполагает участие нециклического потока электронов через фотосистемы, при котором донором водорода являются углеводороды и продукты их разложения.

Исследованные хлоропласты высших растений, как и зеленые водоросли, проявляли способность к переходу от выделения H_2 к выделению O_2 в зависимости от интенсивности света (см. рис. 4), причем кинетика фотообразования H_2 была двухфазной (см. рис. 3). Обработанные диуроном или прогретые хлоропласты сохраняли функцию выделения H_2 на свету высокой интенсивности (см. рис. 4, *а*, рис. 5), что исключает использование молекул воды как доноров электронов при образовании H_2. Отсутствие влияния или слабое стимулирующее действие такого разобщителя, как хлористый аммоний, указывает на то, что фотообразование H_2 происходит при нециклическом потоке электронов через фотосистемы без участия АТФ. Увеличение скорости фотообразования H_2 у прогретых хлоропластов в сравнении с обработанными диуроном (см. рис. 5) свидетельствует об участии (до 60%) фотосистемы 2 в передаче электронов от Н-доноров. Опыты по влиянию различных акцепторов электронов на поглощение экзогенного H_2 (см. таблицу и рис. 6), среди которых наиболее эффективным является кислород, подтверждают вывод о конкурентных взаимоотношениях H_2 и O_2 в зависимости от интенсивности света (см. рис. 5).

Таким образом, описанные результаты указывают на сходство механизма фотообразования H_2 хлоропластами высших растений и адаптированными зелеными водорослями. При этом следует отметить, что фотовыделение H_2 хлоропластами на 2—3 порядка меньше, чем в системах, содержащих хлоропласты и бактериальные гидрогеназы. Остается место для сомнений в том, что использованные препараты хлоропластов могли быть загрязнены одноклеточными фототрофными организмами, обладающими гидрогеназой, но описанные выше опыты с использованием стерильных проростков указывают на малую вероятность этого допущения. С другой стороны, описанные результаты могут указывать на вероятность старой гипотезы о том, что на пути эволюции хлоропластов могла быть стадия включения одноклеточных водорослей в клетки растений.

Приносим глубокую благодарность В. В. Никандрову за обсуждение результатов работы и газохроматографическое определение водорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gaffron H., Rubin J.* Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.— J. Gen. Physiol., 1942, v. 26, № 2, p. 219.
2. *Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 344 с.
3. *Бойченко Е. А.* Выделение водорода изолированными хлоропластами.— Докл. АН СССР, 1946, т. 52, № 6, с. 525.

4. *Renwick G. M., Giumarro C., Siegel S. M.* Hydrogen metabolism in higher plants.— Plant physiol., 1964, v. 39, № 3, p. 303.
5. *Санадзе Г. А.* Поглощение молекулярного водорода зелеными листьями на свету.— Физиол. растений, 1961, т. 8, вып. 5, с. 555.
6. *Ефимцев Е. И., Бойченко В. А., Литвин Ф. Ф.* Фотоиндуцированное выделение водорода бактериями, водорослями и высшими растениями.— Докл. АН СССР, 1975, т. 220, № 4, с. 986.
7. *Красновский А. А., Чан Ван Ни, Никандров В. В., Брин Г. П.* Исследование условий эффективного фотовыделения водорода хлоропластами в присутствии бактериальной гидрогеназы.— Молек. биол., 1980, т. 14, вып. 2, с. 287.
8. *Krasnovsky A. A., Chan Van Ni, Nikandrov V. V., Brin G. P.* Efficiency of hydrogen photoproduction by chloroplasts-bacterial hydrogenase systems.— Plant Physiol., 1980, v. 66, № 5, p. 925.
9. *Wang R., Healey F. P., Myers J.* Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*.— Plant Physiol., 1971, v. 48, № 1, p. 108.
10. *Barber J.* Ionic regulation in intact chloroplasts and its effect on primary photosynthetic processes.— In: Topics in photosynthesis, v. 1. The intact chloroplasts. Amsterdam, Elsevier, 1976, p. 105.
11. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* Исследование выделения водорода при освещении водорослей.— Физиол. растений, 1972, т. 19, вып. 5, с. 1090.
12. *Tagava K., Arnon D. I.* Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas.— Nature, 1962, v. 195, p. 537.
13. *Cheniae G. M.* Photosystem 2 and O_2 evolution.— Ann. Rev. Plant Physiol., 1970, v. 21, p. 467.
14. *Ben-Amots A., Erbes P. L., Riederer-Henderson M. N., Peavey D. G., Gibbs M.* Hydrogen metabolism in photosynthetic organisms.— Plant Physiol., 1975, v. 56, № 1, p. 72.
15. *Stuart T. S., Gaffron H.* The kinetics of hydrogen production by adopted *Scenedesmus*.— Planta, 1971, v. 100, № 3, p. 228.
16. *Stuart T. S.* Hydrogen production by photosystem 1 of *Scenedesmus*. Effect of heat and salycyaldoxime on electron transport and photophosphorylation.— Planta, 1971, v. 96, № 1, p. 81.
17. *Stuart T. S., Gaffron H.* The mechanism of hydrogen photoproduction by several algae. The contribution of photosystem 2.— Planta, 1972, v. 106, № 2, p. 101.
18. *Adams M. W. W., Mortenson L. E., Chen J.-S.* Hydrogenase.— Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 594, № 2—3, p. 105.

Поступила в редакцию
16.II.1982

PRODUCTION AND CONSUMPTION OF MOLECULAR HYDROGEN BY ISOLATED CHLOROPLASTS OF HIGHER PLANTS

S. V. MALTSEV, A. A. KRASNOVSKY

M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Chair of Plant Physiology, Moscow,
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Production and consumption of molecular hydrogen by higher plant chloroplasts was studied using the amperometric method of H_2 measuring. The light-induced production of H_2 depended on the medium composition for chloroplast isolation and was activated by potassium ions. The processes of H_2 and O_2 production by chloroplasts under anaerobic conditions were competitively interrelated with respect to light intensity. At low light intensity ($\leqslant 4.8 \cdot 10^4$ erg·cm^{-2}·s^{-1}) H_2 production dominated. Increasing light intensity led to a prevalence of O_2 evolution. When exposed to high light intensity, the chloroplasts treated with DCMU or heated at 55° for 5 min produced H_2 due to inhibiting the O_2-evolving system. Irradiation of chloroplasts in the presence of ferricyanide resulted in a consumption of exogenous H_2 on the account of interaction with oxygen formed in the Hill reaction. The chloroplasts isolated from sterile plant leaves fully retained the phenomena of H_2 production and consumption. A conclusion is made on the similarity between the processes of light-induced H_2 production by higher plant chloroplasts and by green algae adapted to anaerobiosis.

БИОХИМИЯ
Т. 47, вып. 4 1982

УДК 577.344.2

ОБРАТИМОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОГО СВЕТА НА ФОТОБИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХРОМАТОФОРОВ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

ПАКШИНА Е. В., ЛЕБЕДЕВ Н. Н., ШАПОШНИКОВА М. Г., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследовано влияние света высокой (насыщающей фотосинтез) интенсивности на оптические свойства бактериохлорофилла и фотоиндуцированное поглощение ионов водорода в хроматофорах *R. rubrum*. Показано, что освещение в аэробных условиях вызывает обратимое в темноте ингибирование способности хроматофоров к фотоиндуцированному поглощению ионов водорода, обратимое подавление работы фотосинтетических реакционных центров и необратимое выцветание бактериохлорофилла антенны. На основании сопоставления кинетики спектральных изменений и обратимых изменений pH, влияния на них кислорода воздуха и экзогенных доноров электрона делается вывод, что подавление фотоактивности хроматофоров при освещении обусловлено накоплением бактериохлорофилла реакционного центра в окисленном состоянии.

Внимание исследователей привлекает использование принципов фотосинтеза для создания искусственных систем, способных к преобразованию солнечной энергии в широкой спектральной области. В качестве фоторецепторов в таких системах используются хлорофилл и другие пигменты, а также изолированные клеточные структуры, содержащие пигменты. При создании эффективных фотобиохимических систем необходимо выяснение условий сохранения высокой функциональной активности фотосинтетических структур. При исследовании влияния нагревания, органических растворителей и детергентов на фотоиндуцированное поглощение ионов водорода нами было показано, что мембранные структуры хроматофоров обладают большей устойчивостью ко всем испытанным воздействиям по сравнению с хлоропластами [1, 2]. Одним из возможных путей определения устойчивости является изучение действия света на фотосинтетические структуры. Известно, что освещение в аэробных условиях вызывает необратимую инактивацию фотосинтетической активности хлоропластов [3], а в хроматофорах происходит ингибирование циклического фотофосфорилирования [4] и подавление образования мембранного потенциала [5].

Настоящая работа посвящена исследованию действия света высокой (насыщающей) интенсивности на фотоиндуцированное поглощение ионов водорода и оптические свойства бактериохлорофилла в хроматофорах *R. rubrum*. Установлено, что интенсивное освещение вызывает как обратимые, так и необратимые изменения в пигментном аппарате бактерий, и эффект обратимого подавления фотосинтетической активности обусловлен переходом бактериохлорофилла реакционного центра в неактивное (фотоокисленное) состояние.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки пурпурной фотосинтезирующей бактерии *R. rubrum* выращивали в анаэробных условиях [6] и для выделения хроматофоров использовали культуру, находящуюся в логарифмической фазе роста. Метод выделения хроматофоров из клеток, разрушенных ультразвуковой обработкой, и условия хранения образцов описаны в работе [1]. Перед опытами хроматофоры суспендировали в 0,1 М KCl (pH 6,5—6,8, окислительно-восстановительный потенциал +180 — +210 мВ). При измерении обратимых фотоиндуцированных изменений pH в суспензии хроматофоров, обозначенных нами как ΔpH среды (ΔpH_c), концентрация бактериохлорофилла (БХл) составляла 100—200 мкг/мл, что при учете оптического пути в измерительной ячейке ($\sim$0,1 см) соответствовало 1,5 ед. A_{880}. При оптических измерениях, осуществляемых в 1-см кюветах, для получе-

ния соответствующей плотности образцов исходную концентрированную суспензию хроматофоров разбавляли в 10 раз. Для получения анаэробных условий из суспензии удаляли воздух путем откачивания на форвакуумном насосе. Предварительные измерения показали, что в отличие от хлоропластов такая процедура не влияет на фотохимическую активность хроматофоров.

Предварительное освещение хроматофоров проводили светом 700 Вт лампы накаливания через тепловой фильтр и светофильтр КС-19 ($\lambda \geqslant 700$ нм, интенсивность света на поверхности образца $5 \cdot 10^3$ Вт/м^2). Температура образца в процессе предварительного освещения и во время измерения поддерживалась постоянной (20°). Измерение спектров поглощения и разностных спектров поглощения проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer 554. Способность реакционного центра (РЦ) к фотоиндуцированному разделению зарядов определяли по изменению спектра в области 650—900 нм (ΔA) при освещении хроматофоров светом импульсного азотного лазера ЛГИ-21 ($\lambda = 336$ нм, средняя мощность 1 мВт, длительность импульсов 10 нс, частота следования 25 Гц). Измерение фотоиндуцированного поглощения ионов водорода проводили по методике, описанной ранее [1]. Величина фотоиндуцированного сигнала ΔpH_c обычно составляла 0,02 единицы pH.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие предварительного освещения на ΔpH_c. В аэробных условиях фотоиндуцированное поглощение ионов водорода суспензией хроматофоров достигает стационарного уровня после 5 мин освещения светом насыщающей интенсивности. Обратный процесс при выключении света продолжается до 15 мин. При повторном освещении хроматофоров наблюдается фотоиндуцированный сигнал изменения pH среды, равный по амплитуде исходному. Увеличение длительности предварительного освещения до 1 ч приводит к исчезновению обратимого фотоиндуцированного сигнала ΔpH_c. Однако если хроматофоры после освещения выдержать в темноте, то наблюдается постепенное восстановление исходного сигнала. Время этого восстановления зависит от длительности предварительного освещения хроматофоров (рис. 1).

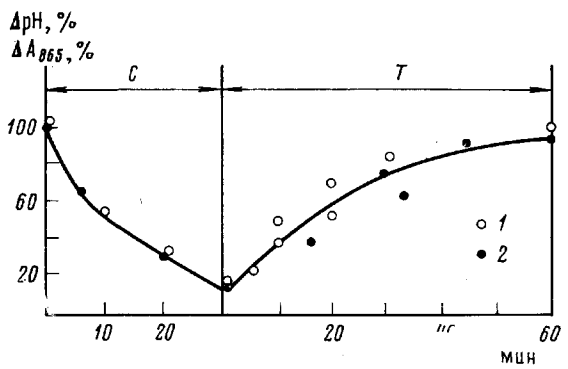


Рис. 1. Фотоингибирование и темновая реактивация фотосинтетической активности хроматофоров. *1* — ΔpH_c, *2* — ΔA_{865}, % от исходного значения. За 100% ΔpH_c принималось изменение pH суспензии после выхода на стационар. *C* — предварительное освещение, *T* — темнота после 30 мин предварительного освещения

В анаэробных условиях хроматофоры не теряют способности к обратимому поглощению ионов водорода. Однако предварительное освещение хроматофоров в этих условиях не вызывает подавления способности к поглощению ионов водорода. Функция сохраняется и при освещении в присутствии кислорода, но с добавлением в среду доноров электрона (аскорбат натрия $5 \cdot 10^{-3}$ М, сукцинат натрия $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ М, феррицианид 10^{-2} М). Добавление указанных соединений после освещения в аэробных условиях приводит к восстановлению исходной активности у фотоингибированных хроматофоров. Скорость этого процесса значительно превышает скорость восстановления активности в темноте без доноров. Акцепторы электрона (феррицианид и *n*-бензохинон) на скорость процесса инактивации и последующего восстановления активности хроматофоров существенного влияния не оказывали.

Изменения в спектрах поглощения БХл в хроматофорах при освещении. Исчезновение сигнала ΔpH_c после предварительного освещения сопровождается изменениями спектров поглощения хроматофоров. На рис. 2 представлены разностные спектры поглощения хроматофоров до и после освещения. Видно, что освещение вызывает выцветание полос поглощения БХл с максимумами в районе 885 и 805 нм и появление новых полос поглощения в районе 795 и 700 нм. Последующее выдерживание хроматофоров в темноте в течение 2 ч приводит лишь к частичной

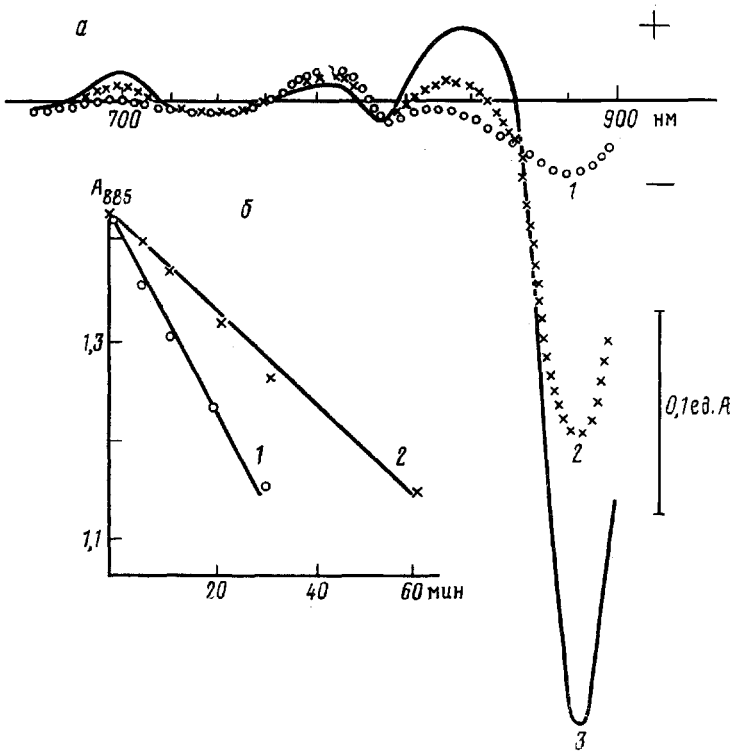


Рис. 2. Необратимое фотовыцветание бактериохлорофилла. *а* — разность спектров поглощения хроматофоров, освещавшихся и находившихся в темноте: *1* — 5 мин освещения — темнота; *2* — 30 мин освещения — темнота; *3* — 60 мин освещения — темнота. Перед измерением спектров хроматофоры выдерживали в темноте в течение 5 мин. Температура при освещении 10°, при измерении 20°. *б* — кинетика изменения поглощения при 885 нм по мере освещения; *1* — 20°, *2* — 10°

обратимости этих спектральных изменений. Можно было думать, что наблюдаемые необратимые спектральные изменения связаны с окислением БХл кислородом воздуха. Действительно, проведенные измерения показали, что уменьшение максимума при 885 нм происходит параллельно росту полосы 700 нм, близкой по спектру поглощения фотоокисленному БХл в растворе [7]. Это превращение полос линейно зависит от длительности освещения и температуры ($Q_{10}=1{,}8$) (рис. 2*б*).

Следует отметить, что необратимое выцветание БХл на 20% (30 мин освещения, 20°) не оказывает существенного влияния на работу системы переноса протонов в условиях светового насыщения. После темновой адаптации хроматофоров в течение 1 ч сигнал ΔpH_c по амплитуде и кинетике был равен исходному сигналу до освещения.

Кроме необратимого выцветания освещение хроматофоров светом высокой интенсивности вызывает ряд обратимых изменений в спектре поглощения БХл. Так, непосредственно после предварительного освещения наблюдается быстрое (в течение 4—5 мин) уменьшение поглощения в районе 855 нм, сопровождающееся увеличением поглощения при 885 нм (рис. 3). Кинетика исчезновения полосы 855 нм соответствует кинетике увеличения поглощения при 885 нм (рис. 3*б*). Однако эти

спектральные изменения происходят слишком быстро, чтобы их можно было связать с фотоингибированием ΔpH_c и скорее всего они предшествуют необратимому выцветанию БХл.

Для выявления более медленных обратимых спектральных изменений, которые могли бы быть функционально связанными с ΔpH_c, мы измеряли (рис. 4) разностные спектры поглощения после 5 мин выдерживания освещенных хроматофоров в темноте. Этот темновой период был достаточным, чтобы исключить быстрые спектральные изменения, представленные на рис. 3. Дальнейшие измерения проводили через каждые 15 мин в течение 2 ч, к этому времени заканчивались медленные спектральные изменения.

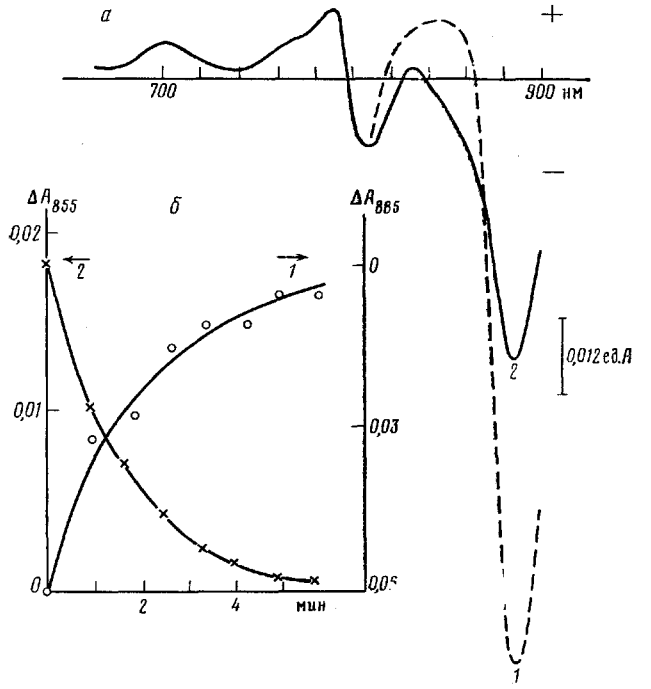


Рис. 3. Обратимые спектральные изменения бактериохлорофилла, предшествующие необратимому выцветанию. *а* — разность спектров поглощения хроматофоров, находившихся в темноте и после 5 мин освещения. Измерение: *1* — сразу после освещения, *2* — после 5 мин темноты. *б* — кинетика изменения поглощения после освещения при 885 нм (*1*) и 855 нм (*2*)

Чтобы вычленить обратимые спектральные изменения, был рассчитан разностный спектр из двух спектров, измеренных в начале и в конце темнового периода (рис. 4*б*). Полученный спектр имеет характерные полосы уменьшения поглощения при 865 и 810 нм и увеличения поглощения при 786 и 760 нм. По своей форме и соотношению интенсивности полос он соответствует измеренному нами спектру фотоокисленного РЦ и, судя по литературным данным [8], отражает процесс разделения зарядов в РЦ. Измерение эффективности фотоиндуцированного разделения зарядов в РЦ после предварительного освещения хроматофоров и последующего выдерживания образца в темноте показало, что способность БХл РЦ к фотоиндуцированному разделению зарядов пропадает в результате освещения в аэробных условиях, но затем снова появляется в темноте. Кинетика изменений фотохимической активности БХл РЦ соответствует кинетике исчезновения и восстановления ΔpH_c (рис. 1). Добавление экзогенных доноров до освещения препятствует накоплению БХл РЦ в окисленном состоянии, а добавление их после освещения приводит к более быстрому восстановлению активности РЦ. При освещении хроматофоров в анаэробных условиях накопления БХл РЦ в окисленном состоянии не происходит.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Освещение хроматофоров светом насыщающей интенсивности в аэробных условиях подавляет у них способность к обратимому фотоиндуцированному поглощению ионов водорода с последующей ее регенерацией в темноте. Эффект не наблюдается в анаэробных условиях или

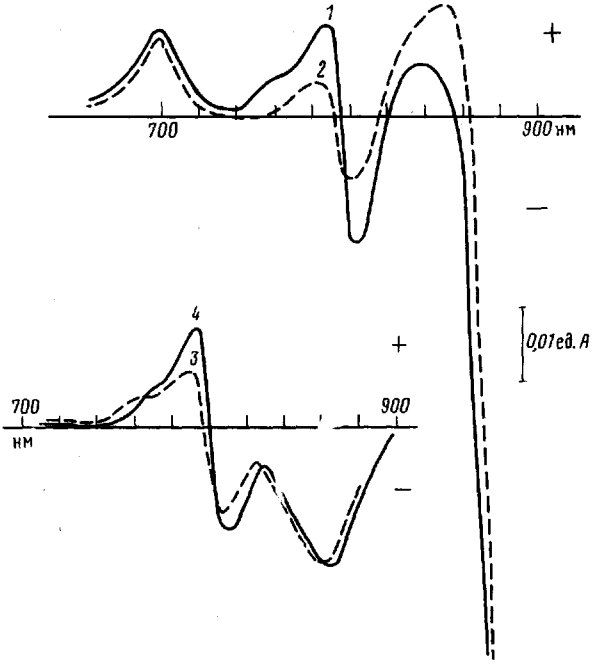


Рис. 4. Изменение спектров поглощения хроматофоров после 30 мин предварительного освещения. *1* — измерение после выдерживания освещенных образцов в темноте в течение 5 мин; *2* — 120 мин; *3* — разность между кривыми *1* и *2*; *4* — фотоиндуцированные изменения поглощения РЦ

при добавлении экзогенных доноров электрона. На основании полученных данных можно сделать вывод, что потеря хроматофорами способности к фотоиндуцированному переносу протонов происходит при участии кислорода и обусловлена накоплением БХл РЦ в неактивном окисленном состоянии. Переход РЦ в стационарное окисленное состояние может быть связан с исчерпанием запаса эндогенных доноров электрона, о чем свидетельствует повышение окислительно-восстановительного потенциала среды после освещения (от +180 — +210 до +300— +320 мВ) и быстрое восстановление фотокаталитической активности РЦ и обратимых изменений pH в присутствии экзогенных доноров.

После выключения света происходит постепенное восстановление фотоокисленного РЦ (за счет внутренних ресурсов или за счет экзогенного донора) и, как следствие этого, восстановление способности хроматофоров к фотоиндуцированному разделению зарядов и переносу протонов. В анаэробных условиях переноса электрона на кислород не происходит и, естественно, это не приводит к исчерпанию пула эндогенных доноров и подавлению фотосинтетической активности хроматофоров.

Параллельно с обратимым выцветанием БХл РЦ (или после этого выцветания, когда энергия поглощенного света не может быть передана на РЦ) при действии света высокой интенсивности происходит необратимое фотовыцветание БХл с максимумом 885 нм, т. е. видимо, БХл антенны. Необходимость для этого выцветания кислорода воздуха и положение максимума образующегося при этом конечного продукта (700 нм) говорят о том, что наблюдаемый процесс является фотоокислением пигмента. Наблюдающееся на начальных этапах фотоокисления коротковолновое смещение максимума БХл антенны с 885 до 855 нм

может быть связано с процессом фотодезагрегации димера БХл антенны, превращающегося в мономер при фотоокислении пигмента [9, 10].

Следует подчеркнуть, что необратимое выцветание пигмента антенны, достигающее при часовом освещении 20%, не оказывает заметного влияния на активность РЦ и генерацию ΔpH. Возможно, подвергающаяся фотоокислению длинноволновая форма БХл служит ловушкой неиспользованной световой энергии в условиях, когда РЦ находится в неактивном состоянии, и тем самым защищает его от разрушения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Пакшина Е. В., Шапошникова М. Г., Красновский А. А.* Светозависимое поглощение ионов водорода в хлоропластах и хроматофорах: действие нагревания, растворителей, детергентов.— Биохимия, 1977, т. 42, № 11, с. 1953—1959.
2. *Шапошникова М. Г., Пакшина Е. В., Шубин В. В., Красновский А. А.* Активация и ингибирование фотоиндуцированного поглощения протонов в хроматофорах *Rhodospirillum rubrum* детергентами и растворителями.— Биофизика, 1979, т. 24; № 3, с. 554—555.
3. *Satoh K.* Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems I. The dark reaction in photoinactivation.— Plant and Cell Physiol., 1970, v. 11, № 1, p. 15—27.
4. *Horio T., Kamen M. D.* Optimal oxidation-reduction potentials and endogenous cofactors in bacterial photophosphorylation.— Biochemistry, 1962, v. 1, № 1, p. 144—153.
5. *Remennikov V. G., Samuilov V. D.* Photooxidase activity of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores and reaction center complexes. The role of non-cyclic electron transfer in generation of the membrane potential.— Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 546, № 2, p. 220—235.
6. *Кондратьева Е. Н.* Фотосинтезирующие бактерии. М.: Изд-во АН СССР, 1963.
7. *Красновский А. А., Войновская К. К.* Обратимое фотохимическое восстановление и окисление бактериохлорофилла и бактериофеофитина.— Докл. АН СССР, 1951, т. 81, № 5, с. 879—882.
8. *Kunts I. D., Jr., Loach P. A., Calving M.* Absorption changes in bacterial chromatophores.— Biophys. J., 1964, v. 4, № 3, p. 227—249.
9. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Фотоокисление хлорофилла кислородом, сопровождающееся дезагрегацией.— Докл. АН СССР, 1972, т. 205, № 1, с. 233—236.
10. *Rafferty C. N., Bolt J., Sauer K., Clayton R. K.* Photooxidation of antenna bacteriochlorophyll in chromatophores from carotenoidless mutant *Rhodopseudomonas sphaeroides* and the attendatn loss of dimeric excition interaction.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1979, v. 76, № 9, p. 4429—4432.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
20.II.1981

REVERSIBLE EFFECT OF INTENSIVE LIGHT ON PHOTOBIOCHEMICAL PROPERTIES OF *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

PAKSHINA E. V., LEBEDEV N. N., SHAPOSHNIKOVA M. G., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effect of high intensity (photosynthesis-saturating) light on the optical properties of the bacteriochlorophyll and the light-induced H^+ uptake by *R. rubrum* chromatophores was studied. It was shown that under aerobic conditions illumination causes reversible inhibition (in the dark) of the chromatophore ability for the light-induced uptake of H^+, a reversible inhibition of the photosynthetical reaction center function and irreversible bleaching of the antennal bacteriochlorophyll. A kinetic comparison of spectral effects and reversible changes in pH as well as the effects of atmospheric oxygen and exogenous electron donors suggests that inhibition of photoactivity of the chromatophores upon illumination is due to accumulation of oxidized bacteriochlorophyll in the reaction center.

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

ТОМ XVIII 1982 ВЫП. 3

УДК 582.232.5

ОБРАЗОВАНИЕ И ПОГЛОЩЕНИЕ ВОДОРОДА КУЛЬТУРАМИ И ИЗОЛИРОВАННЫМИ ГЕТЕРОЦИСТАМИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

ПОЛЕССКАЯ О. Г., МАЛЬЦЕВ С. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследовали выделение и поглощение водорода в интактных нитях, препаратах гетероцист и вегетативных клеток у двух видов аэробнорастущих цианобактерий *Anabaena variabilis* и *Anabaena cylindrica* при использовании доноров электронов — дитионита и дитиотреитола и медиатора — метилвиологена. Выделение и поглощение водорода измеряли амперометрическим методом. Целые нити, изолированные гетероцисты и вегетативные клетки способны к выделению водорода из восстановленного метилвиологена, т. е. обладают гидрогеназной активностью. Выделение водорода при освещении интактных нитей наблюдалось только в присутствии донора электронов — дитиотреитола. Интенсивный свет подавлял образование водорода. Введение в реакционную смесь метилвиологена ускоряло реакцию на свету в 3—4 раза. Изолированные гетероцисты *Anabaena variabilis* выделяли водород при освещении лишь в присутствии дитиотреитола и метилвиологена. Интактные нити цианобактерий поглощали экзогенный водород под действием света. В препаратах гетероцист и вегетативных клеток поглощение водорода не зависело от освещения. Скорость поглощения водорода в 3—7 раз выше в гетероцистах, чем в вегетативных клетках. По мере старения культур скорость светозависимых процессов выделения и поглощения водорода уменьшалась.

В последнее время значительное число работ посвящено изучению метаболизма молекулярного водорода у нитчатых азотфиксирующих цианобактерий, образующих при росте на безазотистых средах специализированные клетки — гетероцисты, в которых отсутствуют основные пигменты фотосистемы 2 и функционирует только фотосистема 1 и где, по современным представлениям, протекает фиксация молекулярного азота [1, 2].

Темновое образование водорода (H_2) культурой *Anabaena variabilis* наблюдалось при добавлении органических субстратов [3, 4]. *Anabaena cylindrica* и ряд других цианобактерий в анаэробных условиях способны продолжительное время выделять H_2 на свету в отсутствие экзогенных доноров электронов, причем по ряду данных образование H_2 катализируется нитрогеназой [5—8]. Азотфиксирующие цианобактерии наряду с нитрогеназой, катализирующей АТФ-зависимое образование H_2, обладают также активной гидрогеназой, способной в определенных условиях к выделению и поглощению H_2 [8, 9—11].

Целые нити, а также изолированные гетероцисты некоторых цианобактерий способны к интенсивному поглощению H_2. В ряде случаев поглощение H_2 стимулируется светом, но может происходить и в темноте при добавлении искусственных акцепторов электронов или кислорода [8, 9, 11, 12]. По мнению ряда авторов, гидрогеназа цианобактерий осуществляет рециклизацию H_2, выделяемого нитрогеназой, и направляет его на поддержание процесса азотфиксации. В определенных условиях H_2 может поддерживать нитрогеназную активность как донор электронов [9, 13, 14]. Поглощенный H_2 может также окисляться кислородом в оксигидрогенной реакции, связанной с образованием АТФ, которая используется в дальнейшем при функционировании нитрогеназной системы [9, 11, 12, 14]. Есть данные, что нитрогеназная активность может регулироваться уровнем H_2, присутствующим в клетке [15]. Водород в интактных нитях *Anabaena sp.* ТА-1 оказывал эффект не только на нитрогеназную активность, но и на транспорт электронов между двумя фотосистемами [16]. Для изучения метаболических путей, связывающих фотосинтез и азотфиксацию, в настоящей работе исследовалось вы-

деление и поглощение H_2 культурами цианобактерий, гетероцистами и вегетативными клетками, изолированными из аэробнорастущих культур *A. cylindrica* и *A. variabilis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МЕТОДИКА

В работе были использованы цианобактерии *A. cylindrica* Lemm (из музея биологического факультета ЛГУ) и *A. variabilis* Kutz, полученная от кафедры генетики биологического факультета МГУ. Культуры цианобактерий выращивали на безазотистой среде Кратца — Майерса [17] в стационарных условиях при освещенности 4000—4500 лк и температуре 20 и 25° для культур *A. cylindrica* и *A. variabilis* соответственно. В опытах использовали культуры в возрасте 5—10 сут, взятые в фазе интенсивного роста. Нити цианобактерий, содержащие вегетативные клетки и гетероцисты, отмывали от культуральной жидкости двукратным центрифугированием в 50 мМ *трис*-HCl-буфере pH 7,2 при 1500 *g* 15 мин. Перед опытом суспензию клеток выдерживали 1 ч в темноте в аэробных условиях. Выделение гетероцист проводили по методике, предложенной в ряде работ и включающей обработку клеток лизоцимом [2]. Нити цианобактерий собирали центрифугированием при 1500 *g* 15 мин, отмывали 1 раз в 50 мМ *трис*-HCl-буфере pH 7,2 и ресуспендировали в небольшом объеме 500 мМ маннитола в буфере. В суспензию добавляли лизоцим (2 мг/мл) и инкубировали ее при медленном перемешивании при 35—36° в течение 2—2,5 ч. Лизоцим разрушал клеточные стенки вегетативных клеток, что приводило к выходу из них фикобилиновых пигментов в среду, в то время как клеточная стенка гетероцист оставалась неповрежденной. Разрушенные вегетативные клетки теряли способность к фотосинтетическому образованию O_2.

После инкубации с лизоцимом суспензию центрифугировали 10 мин при 2000 *g* и осадок ресуспендировали в буфере 1 : 20, подвергая тем самым клетки осмотическому шоку. Неразрушенные нити отделяли центрифугированием при 200 *g* 1—3 мин. Содержащиеся в супернатанте гетероцисты отделяли центрифугированием при 400—500 *g* в течение 3—4 мин, промывали таким образом 3—5 раз в 50 мМ *трис*-HCl-буфере + +1 мМ ЭДТА и затем ресуспендировали в минимальном объеме буфера без ЭДТА. Надосадочная жидкость содержала как одиночные вегетативные клетки, так и фрагменты мембран вегетативных клеток, разрушенных при осмотическом шоке. Фракцию вегетативных клеток осаждали при 3000 *g* 15 мин. В опытах использовали препараты свежевыделенные или хранившиеся в жидком азоте. Контроль на чистоту препаратов гетероцист проводили микроскопически. Обычно препараты гетероцист содержали не более 3—5% вегетативных клеток.

Выделение и поглощение водорода измеряли амперометрическим методом [18] на полярографе LP-7e (ЧССР), используя герметичную термостатируемую ячейку с закрытым электродом типа Кларка с поляризационным потенциалом +600 мВ на платине. Измерение проводили при 25°. Реакционную смесь перемешивали магнитной мешалкой. Анаэробные условия в опыте создавали методом раздельного продувания [19]. При продувании аргоном газ барботировали через реакционную среду в склянке Дрекселя и пропускали над концентрированной суспензией клеток, находящихся в ячейке. После 5-минутного продувания реакционную среду перемещали давлением газа в ячейку и перемешивали с суспензией. В опытах по поглощению H_2 в ячейку вводили $2 \cdot 10^{-2}$ мкмоля растворенного в буфере H_2. Суспензию освещали конденсированным светом лампы КГМ 24 в 150 Вт с тепловым фильтром и светофильтром ОС-13. Интенсивность света изменяли нейтральными светофильтрами. При определении хлорофилла последний экстрагировали горячим 90%-ным водным раствором метанола. Содержание хлорофилла рассчитывали согласно [20].

Образование H_2 цианобактериями. В наших опытах суспензии нитей цианобактерий не проявили способности к образованию H_2 без введения экзогенных доноров электронов как в темноте, так и при освещении, хотя в ряде работ сообщалось, что *A. cylindrica* выделяет H_2 в анаэробных условиях на свету без экзогенных доноров в реакции, катализируемой нитрогеназой [5, 6]. Возможно, отсутствие видимого выделения H_2 можно объяснить доминированием поглощения H_2 над его выделением с использованием одновременно образующегося при фотосинтезе O_2 как акцептора электронов. Действительно, в ряде случаев фотовыделения H_2 удается наблюдать лишь при добавлении CO и C_2H_2, что блокирует поглощение H_2 гидрогеназой [9], а также в присутствии диурона и других ингибиторов транспорта электронов, действующих на уровне фотосистемы 2 и препятствующих образованию O_2 при фотосинтезе [21].

Добавление дитионита (20 мМ) к суспензии нитей не приводило к выделению H_2 как в темноте, так и при освещении. При введении в реакционную среду восстановленного дитионитом метилвиологена (5 мМ) наблюдалось выделение H_2 в темноте со скоростью 1—3 мкмоль/мг·хл·ч (табл. 1). Освещение в этих условиях приводило к подавлению выделения H_2, и наблюдалось поглощение выделенного H_2 (рис. 1). При использовании дитиотреитола в качестве донора электронов выделения H_2 в темноте не наблюдалось, но начиналось сразу же после включения света. Оптимальная интенсивность света для фотовыделения H_2 в этих условиях была подобрана с помощью нейтральных светофильтров (рис. 2) и использовалась в дальнейших опытах. Освещенность при оптимальной интенсивности света равнялась 4000 лк. Добавление к реакционной смеси метилвиологена (5 мМ) ускоряло реакцию с дитиотреитолом (20 мМ) на свету в 3—4 раза (табл. 1).

Выделение H_2 начиналось сразу при включении света, и кинетика процесса имела двухфазный характер. В течение нескольких минут скорость реакции увеличивалась и достигала постоянной величины —0,4—0,7 мкмоль H_2/мг·хл·ч (рис. 3). Образование H_2 обычно продолжалось 1—1,5 ч, после чего скорость реакции начинала падать и выделение H_2 прекращалось. Скорость выделения H_2 на свету в присутствии дитиотреитола и метилвиологена зависела от возраста культуры. Активность высока в молодых растущих клетках и падает по мере старения культуры (табл. 2).

Образование H_2 препаратами гетероцист. Так же как и целые нити, препараты гетероцист и вегетативных клеток не выделяли H_2 в отсутст-

Таблица 1

Образование H_2 в темноте и на свету в присутствии доноров электронов целыми нитями, препаратами гетероцист и вегетативных клеток цианобактерий *

Система	Целые нити		Вегетативные клетки		Гетероцисты	
	темнота	свет	темнота	свет	темнота	свет
Anabaena variabilis						
Дитионит + метилвиологен	3,4	—**	0,3	0,3	0,8	0,8
Дитиотреитол	0	0,2	0	0	0	0
Дитиотреитол + метилвиологен	0	0,5	0	0	0	0,3
Anabaena cylindrica						
Дитионит + метилвиологен	1,2	—*	0,1	0,1	0,4	0,4
Дитиотреитол	0	0,3	0	0	0	0
Дитиотреитол + метилвиологен	0	0,8	0	0	0	0

* Реакционная среда указана в подписях к рис. 1.
** «—» — не определяли.

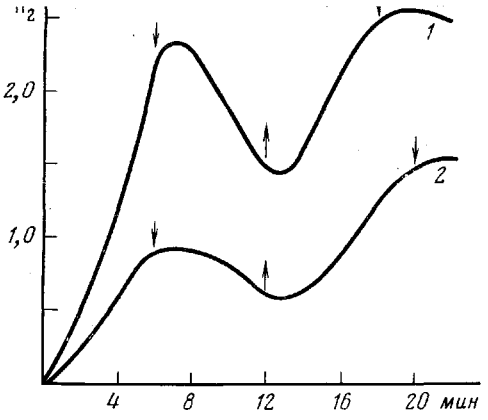


Рис. 1

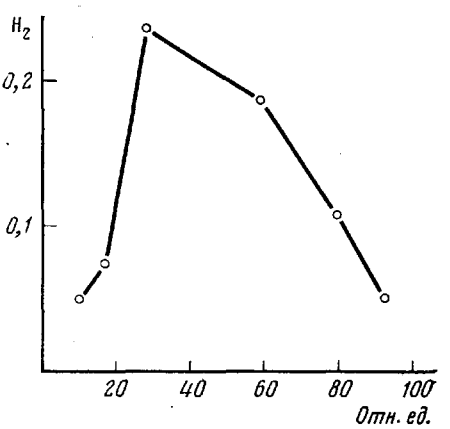


Рис. 2

Рис. 1. Выделение H_2 (мкмоль·10^{-2}) нитями *A. variabilis* (*1*) и *A. cylindrica* (*2*) из восстановленного метилвиологена. Реакционная среда содержала: 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,2, 1 мМ хлористый магний, 20 мМ дитионит, 5 мМ метилвиологен, хлорофилл — 40 мкг/мл *A. variabilis*, 46 мкг/мл *A. cylindrica*. Свет: стрелка вниз — включение, стрелка вверх — выключение

Рис. 2. Зависимость скорости фотовыделения H_2 (мкмоль/мг·хл·ч) нитями *Anabaena cylindrica* от интенсивности света (отн. ед.) в присутствии дитиотреитола. Реакционная среда содержала: 50 мМ *трис*-HCl-буфер pH 7,2, 1 мМ хлористый магний, 20 мМ дитиотреитол, 70 мкг/мл хлорофилла. 100 единиц интенсивности соответствуют свету лампы КГМ 24в 150 Вт с конденсором через светофильтр ОС-13

вие экзогенных доноров электронов ни в темноте, ни на свету. Добавление дитионита не приводило к образованию H_2. Препараты гетероцист и вегетативных клеток выделяли H_2 из восстановленного дитионитом метилвиологена в темноте, но скорость реакции была ниже, чем в нитях, и составляла 0,4—0,8 и 0,1—0,2 мкмоль H_2/мг·хл·ч для гетероцист и вегетативных клеток соответственно (табл. 1). Освещение в этом случае не оказывало заметного влияния на скорость реакции.

Проведенные опыты показали, что гетероцисты не образуют H_2 в присутствии одного дитиотреитола. Светозависимое выделение H_2 препаратами гетероцист *A. variabilis* наблюдалось лишь при одновременном внесении в реакционную среду 20 мМ дитиотреитола и 5 мМ метилвиологена. Реакция имела ряд особенностей: образование H_2 начиналось лишь после 10—15 мин освещения, выделение H_2 протекало с низкой скоростью (0,2—0,4 мкмоль/мг·хл·ч) и прекращалось через 30—40 мин (табл. 1, рис. 3). Образование H_2 в этих условиях препаратами вегетативных клеток наблюдать не удалось. Аналогичная реакция, но с более высокой скоростью (0,8 мкмоль H_2/мг·хл·ч) и более продолжительная наблюдалась ранее в препаратах гетероцист *Nostoc muscorum* [11]. Низкую скорость выделения H_2 в исследуемых нами препаратах гетероцист и отсутствие активности в изолированных вегетативных клетках можно объяснить тем, что выделение гетероцист проводилось в аэробных условиях, а это могло снизить активность ферментов за счет окисления.

Поглощение экзогенного H_2 цианобактериями. Интактные нити цианобактерий поглощали добавленный H_2 в темноте с незначительной скоростью. Освещение приводило к увеличению скорости поглощения до 4—8 мкмоль/мг·хл·ч. Через несколько световых интервалов по 2—4 мин поглощение H_2 прекращалось, несмотря на присутствие H_2 в ячейке. При выключении света целые нити молодой культуры *A. variabilis* (5—6 сут роста) выделяли в темноте поглощенный на свету H_2. В тех же условиях у культуры, взятой в опыт после 15 сут роста, выделение в темноте поглощенного на свету H_2 не происходило (рис. 4). По мере старения культуры скорость поглощения H_2 на свету падала (табл. 3).

Таблица 2

Скорость фотообразования H_2 нитями цианобактерий в зависимости от возраста культуры *

Возраст культуры, сут	*Anabaena variabilis*	*Anabaena cylindrica*
10	0,6	0,7
15	0,4	0,6
30	0,3	0,2
55	0	0,1
85	0	0

* Реакционная среда указана в подписях к рис. 3.

Таблица 3

Возрастные изменения скорости поглощения экзогенного H_2 нитями цианобактерий на свету *

Возраст культуры, сут	*Anabaena cylindrica*	*Anabaena variabilis*
6	—**	4,2
10	7,5	4,0
25	3,0	3,0
40	1,7	0,9
85	0,1	0,0

* Реакционная среда указана в подписях к рис. 4.
** «—» — не определяли.

Таблица 4

Поглощение экзогенного H_2 нитями, препаратами гетероцист и вегетативных клеток цианобактерий *

Препараты	*Anabaena cylindrica*		*Anabaena variabilis*	
	темнота	свет	темнота	свет
Нити	0	5,3	0	4,2
Вегетативные клетки	1,2	1,1	0,7	0,7
Гетероцисты	3,2	3,2	5,0	5,0

* Реакционная среда указана в подписях к рис. 4.

Поглощение H_2 препаратами гетероцист и вегетативных клеток. Такие препараты поглощали добавленный в ячейку H_2 с одинаковой скоростью как в темноте, так и на свету. Скорость поглощения H_2 в 3—7 раз выше в гетероцистах, чем в вегетативных клетках (табл. 4). Приведенные выше данные показывают, что освещение стимулирует поглощение H_2 целыми нитями цианобактерий. Действие света на поглощение H_2 нитями можно объяснить окислением H_2, образующимся при фотосинтезе кислородом [9, 14, 21]. С другой стороны, обратимость реакции поглощения H_2 в молодой культуре *A. variabilis* указывает на то, что акцепторами H_2 могут быть соединения, способные к обратимому окислению — восстановлению и, вероятно, связанные с цепью переноса электронов. Этот факт косвенно подтверждает данные о двух путях реализации поглощенного H_2: через дыхательную цепь на кислород и через фотосистему 1 на нитрогеназу, причем связь этих путей осуществляется через общий промежуточный участок, предположительно пластохинон [9, 14].

Известно, что у цианобактерий поглощение H_2 и его выделение из восстановленного метилвиологена катализируются гидрогеназой [10, 11]. Изученные нами целые нити, изолированные гетероцисты и вегетативные клетки обладали гидрогеназной активностью не только в отношении поглощения H_2, но также и выделения H_2 из восстановленного метилвиологена. Выделение H_2 нитями цианобактерий наблюдалось нами при освещении их светом низкой интенсивности. Такая зависимость от интенсивности света наблюдалась ранее. Освещение светом высокой интенсивности ($5{,}2 \cdot 10^3$—$4{,}0 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с) ингибировало темновое выделение H_2 в присутствии глюкозы и формиата в клетках *A. variabilis* [3]. Свет низкой интенсивности ($\leqslant 2{,}5 \cdot 10^3$ эрг/см^2·с) оказывал стимулирующий эффект на выделение H_2 клетками *A. variabilis* в присутствии пирувата, глюкозы [4], а также клетками *Chlorella* за счет эндогенных субстратов [22]. Ингибирование образования H_2 при увеличении интенсивности света, возможно, объясняется инактивацией гидрогеназы выделяющимся при фотосинтезе кислородом, выделение которого усилива-

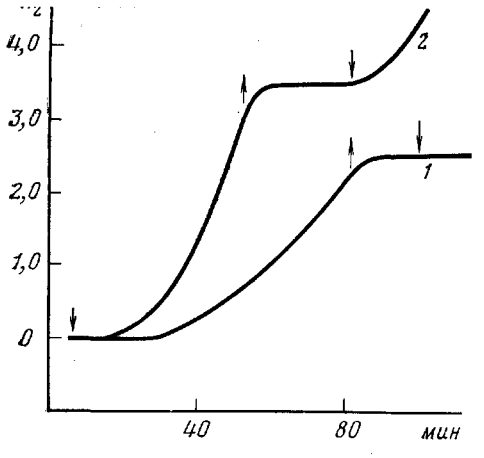


Рис. 3

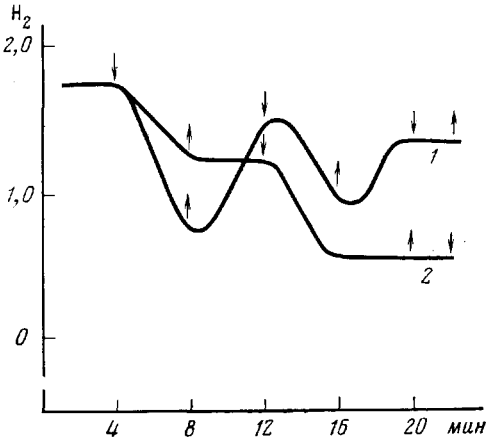


Рис. 4

Рис. 3. Фотовыделение H_2 (мкмоль·10^{-2}) изолированными гетероцистами (*1*) и суспензией нитей (*2*) *A. variabilis* в присутствии дитиотреитола и метилвиологена. Реакционная среда содержала: 50 мМ *трис*-HCl-буфер pH 7,2, 1 мМ хлористый магний, 20 мМ дитиотреитол, 5 мМ метилвиологен, хлорофилл — 50 мкг/мл в суспензии нитей, 45 мкг/мл в суспензии гетероцист. Свет: стрелка вниз — включение, стрелка вверх — выключение

Рис. 4. Фотопоглощение экзогенного H_2 (мкмоль·10^{-2}) суспензиями нитей *A. variabilis* в зависимости от возраста культуры. Реакционная среда содержала: 50 мМ *трис*-HCl-буфер pH 7,2, 1 мМ хлористый магний, 2·10^{-2} мкмоля водорода, хлорофилл — 40 мкг/мл в суспензии нитей 5-суточной культуры (*1*), 40 мкг/мл в суспензии нитей 15-суточной культуры (*2*). Свет: стрелка вниз — включение, стрелка вверх — выключение

ется при высоких интенсивностях света [4, 22]. Увеличение интенсивности света вело к снижению фотовыделения H_2 азотфиксирующей культурой *N. muscorum*, что было связано с повышением кислородзависимого поглощения H_2 [21].

Наша работа не преследовала цель выяснить, какой фермент катализирует фотовыделение H_2 в присутствии дитиотреитола — гидрогеназа или нитрогеназа. Однако в наших опытах реакция с дитиотреитолом на свету в несколько раз ускорялась в присутствии метилвиологена. Известно, что в препаратах зеленых водорослей, а также в системе хлоропласты+бактериальная гидрогеназа дитиотреитол может восстанавливать через электронтранспортную цепь фотосистемы 1 метилвиологен, который в свою очередь отдает электроны гидрогеназе [23, 24]. Можно предположить, что выделение H_2 в присутствии дитиотреитола и метилвиологена в нитях цианобактерий осуществляется таким же путем. Возможно, азотфиксирующие цианобактерии способны в определенных условиях выделять H_2 не только благодаря нитрогеназе, но, как и некоторые зеленые водоросли, от органических доноров через фотосистему 1 и гидрогеназу. Этот вопрос требует дальнейших исследований.

В наших препаратах гетероцист и вегетативных клеток поглощение H_2 не зависело от освещения и темновое поглощение небольших количеств H_2 наблюдалось без добавления искусственных акцепторов, что говорит о присутствии эндогенных акцепторов электронов. Следует отметить, что в работе [11] поглощение H_2 препаратами гетероцист *A. cylindrica* и *N. muscorum* стимулировалось при освещении. Из табл. 3 видно, что поглощение H_2 гетероцистами в несколько раз превышало таковое в вегетативных клетках. Подобные результаты были получены с гетероцистами и вегетативными клетками *A. cylindrica* и *N. muscorum*, и авторы считают, что H_2-поглощение осуществляется главным образом в гетероцистах и связано с нитрогеназной активностью [11]. Изолированные нами гетероцисты из *A. variabilis* выделяли H_2 на свету в присутствии дитиотреитола и метилвиологена. В препаратах гетероцист *N. muscorum* подобная реакция катализировалась гидрогеназой [11].

Из данной работы следует, что изучаемые виды цианобактерий растущие в условиях периодической культуры, и изолированные из них гетероцисты и вегетативные клетки активны в отношении образования и поглощения H_2.

Получены результаты, характеризующие скорости выделения и поглощения H_2, зависимость этих процессов от освещения, возраста культуры. Падение скоростей фотовыделения и фотопоглощения H_2 при старении клеток связано, вероятно, с возрастными изменениями в структуре и функции фотосинтетического аппарата.

В настоящее время ясно, что водородный обмен азотфиксирующих цианобактерий сопряжен с функционированием нитрогеназной системы, поэтому дальнейшее исследование должно быть направлено на изучение связей водородного метаболизма с работой фотосистемы 1 гетероцист, а также должно идти параллельно с изучением азотфиксации как на целых нитях, так и на изолированных гетероцистах.

Авторы выражают благодарность М. В. Гусеву и К. А. Никитиной за постоянное внимание к работе и ее обсуждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Thomas J.* Absences of the pigments of photosystem 2 of photosynthesis in heterocysts of a blue-green algae.— Nature, 1970, v. 228, № 5267. p. 181.
2. *Tel-Or E., Stewart W. D. P.* Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica.*— Proc. Roy. Soc. B, 1977, v. 198, № 1, p. 61.
3. *Ощепков В. П., Никитина К. А., Гусев М. В., Красновский А. А.* Выделение молекулярного водорода культурами синезеленых водорослей.— Докл. АН СССР, 1973, т. 313, № 3, с. 739.
4. *Гоготов И. Н., Косяк А. В., Крупенко А. Н.* Образование водорода цианобактериями *Anabaena variabilis* в присутствии света.— Микробиология, 1976, т. 45, № 6, с. 941.
5. *Косяк А. В., Гоготов И. Н., Кулакова С. М.* Фотовыделение водорода цианобактериями *Anabaena cylindrica.*— Микробиология, 1978, т. 47, № 4, с. 605.
6. *Benemann J. R., Weare N. M.* Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures.— Science, 1974, v. 184, № 4133, p. 174.
7. *Jones W. J., Bishop N. J.* Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga *Anabaena.*— Plant Physiol., 1976, v. 57, № 4, p. 659.
8. *Bothe H., Tennigkeit J., Eisbrenner G., Yates M. G.* The hydrogenase-nitrogenase relationship in the blue-green alga *Anabaena cylindrica.*— Planta, 1977, v. 133, № 3, p. 237.
9. *Bothe H., Tennigkeit J., Eisbrenner G.* The utilisation of molecular hydrogen by the blue-green alga *Anabaena cylindrica.*— Arch. Microbiol., 1977, v. 114, № 1, p. 43.
10. *Daday A., Lambert G. R., Smith G. D.* Measurement in vivo of hydrogenase-catalysed hydrogen evolution in the presence of nitrogenase enzyme in cyanobacteria.— Biochem. J., 1979, v. 177, № 1, p. 139.
11. *Tel-Or E., Luijk L. W., Packer L.* Hydrogenase in N_2-fixing cyanobacteria.— Arch. Biochem. Biophys., 1978, v. 185, № 1, p. 185.
12. *Peterson R. B., Burris R. H.* Hydrogen metabolism in isolated heterocysts of *Anabaena* 7120.— Arch. Microbiol., 1978, v. 116, № 2, p. 125.
13. *Benemann J. R., Weare N. M.* Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica.* III. Hydrogen-supported nitrogenase activity.— Arch. Microbiol., 1974, v. 101, № 4, p. 401.
14. *Eisbrenner G., Bothe H.* Modes of electron transfer from molecular hydrogen in *Anabaena cylindrica.*— Arch. Microbiol., 1979, v. 123, № 1, p. 37.
15. *Scherer S., Kerfin W., Boger P.* Regulatory effect of hydrogen on nitrogenase activity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Nostoc muscorum.*— J. Bacteriol., 1980, v. 141, № 3, p. 1037.
16. *Antarikanonda P., Berndt H., Mayer F., Lorenzen H.* Molecular hydrogen: a new inhibitor of photosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena sp.* TA-1.— Arch. Microbiol., 1980, v. 126, № 1, p. 1.
17. *Kratz W., Myers J.* Nutrition and growth of several blue-green algae.— Amer. J. Botan., 1955, v. 42, № 1, p. 282.
18. *Wang R., Healey F. P., Myers J.* Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas.*— Plant Physiol., 1971, v. 48, № 1, p. 108.
19. *Никандров В. В., Чан Ван Ни, Брин Г. П., Красновский А. А.* Исследование условий фотовосстановления метилвиологена хлоропластами.— Мол. биол., 1978, т. 12, № 6, с. 1278.
20. *MacKinney G.* Absorption of light by chlorophyll solutions.— J. Biol. Chem., 1941, v. 140, № 2, p. 315.
21. *Spiller H., Ernst A., Kerfin W., Boger P.* Increase and stabilisation of photoproduction of hydrogen in *Nostoc muscorum* by photosynthetic electron transport inhibitors.— Z. Naturforsch., 1978, v. 33c, № 7/8, p. 541.

22. *Персанов В. М., Гоготов И. Н.* Выделение молекулярного водорода клетками зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*.— Физиол. растений, 1979, т. 26, № 3, с. 560.
23. *Ben-Amotz A., Gibbs M.* H_2-metabolism in photosynthetic organisms.— Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, v. 64, № 1, p. 355.
24. *Красновский А. А., Чан Ван Ни, Никандров В. В., Брин Г. П.* Исследование условий эффективного фотовыделения водорода хлоропластами в присутствии бактериальной гидрогеназы.— Мол. биол., 1980, т. 14, № 2, с. 287.

Московский государственный университет
Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
12.VIII.1981

HYDROGEN PRODUCTION AND CONSUMPTION BY THE CULTURES AND ISOLATED HETEROCYSTS OF CYANOBACTERIA

POLESSKAYA O. G., MALTSEV S. V., KRASNOVSKY A. A.

Moscow State University, and Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The production and consumption of hydrogen by intact filaments, heterocyst preparations and vegetative cells of *Anabaena variabilis* and *Anabaena cylindrica*, two species of aerobic cyanobacteria, were investigated by using the electron donors, dithionite and tithiotreitol, and the transmitter, methyl viologen. The hydrogen production and consumption were measured amperometrically. Intact filaments, isolated heterocysts and vegetative cells were able to produce hydrogen from reduced methyl viologen, i. e. they showed a hydrogenase activity. Hydrogen production upon illumination of intact filaments occurred only in the presence of the electron donor, dithiotreitol. Hydrogen production was inhibited by intensive illumination. An addition of methyl viologen to the reaction mixture accelerated the reaction in the light 3—4-fold. Isolated heterocysts of *Anabaena variabilis* produced hydrogen upon illumination only in the presence of dithiotreitol and methyl viologen. Intact filaments of the bacteria consumed exogenous hydrogen under the influence of light. Hydrogen consumption by heterocysts and vegetative cells did not depend on illumination. In heterocysts the hydrogen consumption was 3—7 times higher than in vegetative cells. The rate of the light-dependent processes of hydrogen production and consumption diminished with age of the cultures.

Effect of extraction and re-addition of manganese on light reactions of photosystem-II preparations

Vyacheslav V. Klimov, Suleiman I. Allakhverdiev, Vladimir A. Shuvalov and Alexander A. Krasnovsky*

Institute of Photosynthesis, USSR Academy of Sciences, Poustchino, 142292 and **A.N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow, USSR*

Received 23 July 1982; revision received 15 September 1982

Manganese *Photosystem II* *Oxygen evolution*

1. INTRODUCTION

Manganese plays an important role in photosynthetic oxidation of H_2O (reviews [1–3]). Reaction centers (RC) of photosystem II (PS II) carry out successive 4-step oxidation of a special (Mn-containing) enzymatic system which in turn oxidizes H_2O [1–3]. The minimal quantity of Mn necessary for O_2 evolution is 5–6 atoms/400 chlorophyll (chl) molecules or /1 RC of PS II [1–4]. The greater part (~2/3rds) of this Mn is 'loosely bound' and can be easily extracted by alkaline Tris, NH_2OH, Triton X-100 or by heating, and the extraction leads to inhibition of O_2 evolution and associated light reactions of PS II [1–10]. 'Firmly bound' Mn (~1/3rd of the pool) which remains in PS II after the extraction procedures seems not to be required for electron transport in PS II [4]. However, up to 70% of Mn can be removed from chloroplasts without essential loss of their ability to evolve O_2 [11]. Reported characteristics of EPR spectra of Mn in chloroplasts [12–15] may indicate participation of either 4 or 2 atoms of Mn in PS II reactions.

In [10] we described a procedure for 'gentle' extraction of practically all (>99%) Mn from PS II preparations after which up to 80% of activity in the oxidizing side of PS II (evaluated from photo-induced changes of chl fluorescence related to photoreduction of the primary electron acceptor of PS II, Q) can be restored by addition of $MnCl_2$ at extremely low concentrations (0.1–0.2 μM in the absence of Mg^{2+} and 0.05–0.1 μM in the presence of Mg^{2+} or any other divalent cation of metals, M^{2+}). New results from a thorough investigation of these effects reported here show that activity of the Mn-containing system in the donor side of PS II requires 4 Mn atoms, 2 of which can be replaced by either Mg^{2+} or some other divalent metal ions (M^{2+}).

2. MATERIALS AND METHODS

Subchloroplast particles (DT-20) enriched in PS II were prepared by treatment of pea chloroplasts with digitonin (0.4%) and Triton X-100 (0.1%) followed by centrifugation (30 min at 20 000 × *g*) as in [16]. Content of PS II in the particles determined from photoreduction of pheophytin (Pheo), the intermediary electron acceptor of PS II [17], was 1 RC/200–220 chl molecules [10]. Hill reaction rate evaluated from both photoreduction of 2,6-dichlorophenol indophenol (DPIP) and O_2 evolution in DT-20 was 10–20% of that observed in chloroplasts [10,16].

The partial (60–80%) extraction of Mn from PS II was carried out by the widely-used method of washing in 0.8 M Tris–HCl (pH 8.0) at 2°C [4,5] as in [10]. The complete (>99%) extraction of Mn from DT-20 was reached as in [10]. DT-20 particles at 50 μg chl/ml were incubated for 1 h at 2°C in the medium containing 1 M Tris–HCl (pH 8.0) as well as 0.5 M $MgCl_2$ (applied sometimes for 'displacement' of Mn in chloroplasts [1,8]). Then the DT-20 particles were precipitated at 20 000 × *g*. The pellet was washed twice, by resuspending to

Published by Elsevier Biomedical Press
00145793/82/0000–0000/$2.75 © 1982 Federation of European Biochemical Societies

10 μg chl/ml and centrifugation, first in 0.8 M Tris–HCl (pH 8.0) then in a medium containing 20 mM Tris–HCl (pH 8.0) plus 35 mM NaCl. The latter medium was used in all measurements of PS II activity, adjusted to 10 μg chl/ml.

Photoreduction of DPIP as well as photoinduced changes of chl fluorescence (ΔF) related to photoreduction of Q and Pheo, measured in a phosphoroscopic set-up as in [9,10,16], were used as tests for PS-II activity. The content of Mn in DT-20 particles (at 1 mg chl/ml) was determined using an atomic-absorption spectrophotometer AAS-1N (Karl Zeiss, Jena) [10].

3. RESULTS

3.1. *Photoreduction of Q*

Illumination of untreated DT-20 particles by actinic light induces an increase in chl fluorescence yield (related to photoreduction of Q [18]) by a factor of 2.5–3 and the effect does not depend on the presence of Mn^{2+} or other M^{2+} in the medium (fig.1A). (In chloroplasts the fluorescence is increased by a factor of 3–3.5 upon illumination.) The complete extraction of Mn (see section 2) is accompanied by a 15–20-fold decrease of the photoinduced ΔF while the 'constant' component of fluorescence is not affected (fig.1B). Subsequent addition of the cations Mg^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} (fig.1B) as well as Ba^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} (not shown) at 3–150 μM does not influence the photoinduced ΔF, while addition of Mn^{2+} leads to an almost complete restoration of the ΔF (up to 85% of the ΔF-value observed in untreated DT-20). If $MnCl_2$ is added to the totally extracted DT-20 at 0.05–0.08 μM (when the reactivation is negligible), subsequent addition at all the M^{2+} mentioned above leads to considerable activation of ΔF (fig.1C). Upon addition of dithionite (10 mM) to the extracted DT-20, fluorescence increases in the dark up to the level which is reached upon illumination in the samples reactivated by Mn^{2+}. These data as well as activation of the ΔF by ascorbate (10 mM) or by NH_2OH (1 mM) confirm that removal of Mn leads to inactivation namely of the donor side of PS II.

Reactivation of ΔF by any M^{2+} (including Mn) is also seen after the partial (see section 2) extraction of Mn resulted in a 6–8-fold inhibition of ΔF (fig.1D). The monovalent cation Na^+ at up to 0.35 M did not influence the reactivation of ΔF by $MnCl_2$ after removal of Mn.

Fig.1E shows dependence of reactivation of ΔF in the totally depleted DT-20 on $MnCl_2$. The most important facts here are:

(1) Maximal reactivation is observed at extremely low [$MnCl_2$] (0.2 μM) when ≤ 4 Mn atoms/RC are added to the medium;

(2) Addition of Mn^{2+} jointly with Mg^{2+} (fig.1E,○) or with other M^{2+} (not shown) leads to a shift of the dependence to lower [$MnCl_2$] (0.05–0.1 μM) when there are ≤ 2 Mn atoms/RC in the medium.

Fig.1E also shows that the experimental dependences of reactivation of ΔF on concentration of Mn^{2+} added alone or jointly with Mg^{2+} coincide with theoretically predicted dependences for the cases when reactivation of ΔF requires 'filling' of a 4-atomic or a 2-atomic Mn-containing center, respectively.

3.2. *Photoreduction of Pheo*

At a redox potential (E_h) established near −450 mV when Q is reduced in the dark, illumination of PS-II preparations induces a reversible photoreduction of the intermediary electron acceptor of PS II, Pheo, located between P680 and Q (see [17]). This photoreaction can be monitored by a negative photoinduced ΔF (which is actually the disappearance of nanosecond recombination luminescence due to photoaccumulation of the state [P680 $Pheo^{-\cdot}$]$Q^{-\cdot}$ (see [17]). The negative ΔF effect is inhibited upon the total removal of Mn from DT-20 particles (fig.2A); the capability to exhibit a negative ΔF is restored by addition of $MnCl_2$ at 0.2 μM (if added alone) or at 0.1 μM (if added jointly with 3 μM $MgCl_2$). The dependence of restoration of the Pheo photoreduction on [$MnCl_2$], added alone or together with $MgCl_2$ (fig.2B), is close to that observed for photoreduction of Q (fig.1E). In accordance with [9], reactivation of the negative ΔF needs much higher [$MnCl_2$] (~400 μM) if it is added to the extracted particles after addition of dithionite (fig.2A).

3.3. *Photoreduction of DPIP*

The complete extraction of Mn from DT-20 particles results in a 30–50-fold decrease of the Hill reaction rate monitored by photoreduction of DPIP in the absence of exogenic electron donors

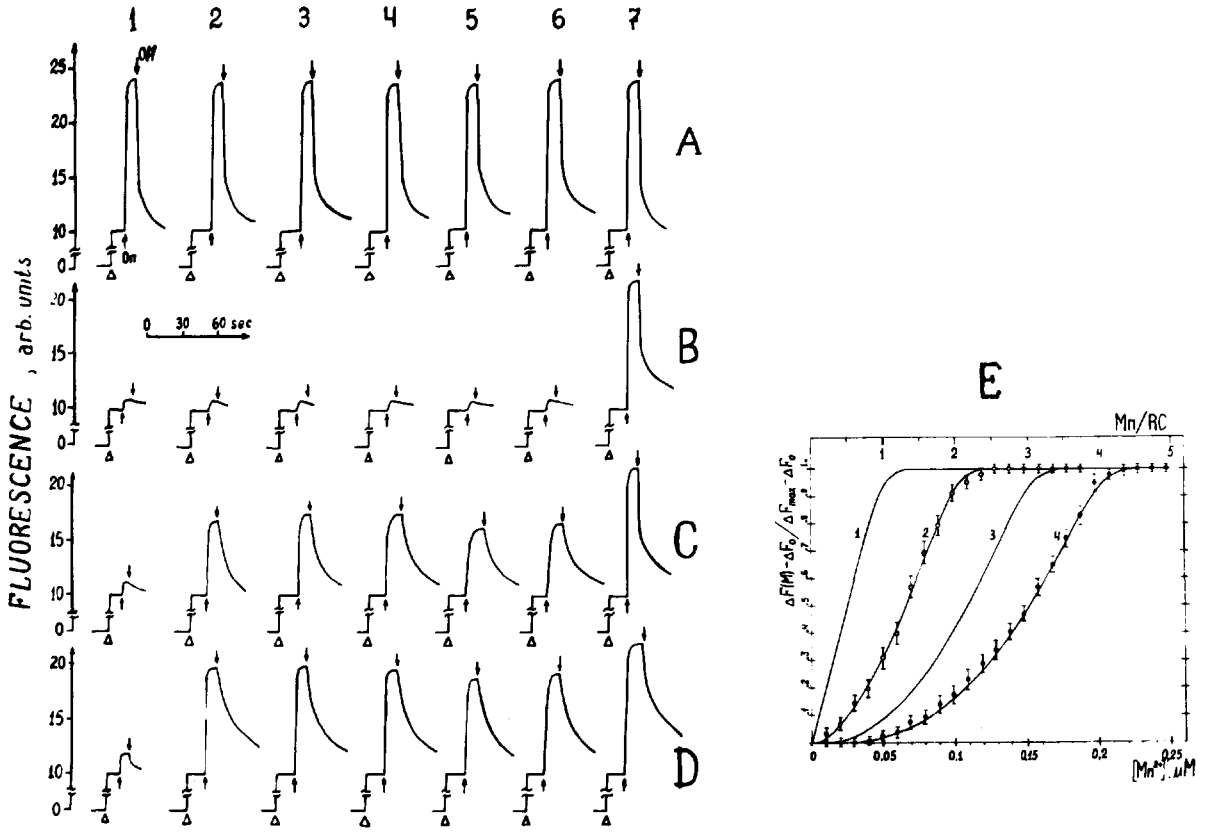


Fig.1. (A–D) Kinetics of photoinduced ΔF in DT-20 particles before (1) and after (2–7) addition of 3 μM cations: Mg^{2+} (2), Co^{2+} (3), Ni^{2+} (4), Fe^{2+} (5), Cu^{2+} (6) and Mn^{2+} (7); (A) untreated DT-20; (B,D) after the complete and partial (section 2) extraction of Mn, respectively; (C) after addition of 0.07 μM $MnCl_2$ to completely extracted DT-20. Measuring light (480 nm, ~100 erg . cm^{-2} . s^{-1}) exciting Chl fluorescence ($\lambda > 660$ nm), on (△); actinic light ($\lambda > 600$ nm, 0.5 . 10^5 erg . cm^{-2} . s^{-1}) on (↑) and off (↓) (20°C); (E) Magnitude of photoinduced ΔF in completely extracted particles as a function of [$MnCl_2$] added to the medium in the absence (•) and in the presence (○) of 3 μM $MgCl_2$. (Measurements were made after 10-min incubation with the added salts; $MgCl_2$ at 3 μM (which was saturating for the effect) was added after addition of corresponding concentration of $MnCl_2$.) The 2 experimental curves are the results of an average of 15 expt. done as in fig.1B. The height of each vertical bar corresponds to the average statistic error for average value of measured ΔF. ΔF, ΔF_{max} and ΔF(M) are ΔF values observed before addition of Mn^{2+}, after maximal reactivation by Mn^{2+} and at given [Mn^{2+}], respectively. Curves (1–4) are theoretically expected dependences for the cases when restoration of a Mn-containing center in the oxidizing side of PS II requires specific binding of 1, 2, 3 or 4 atoms of Mn, respectively [19]. The dependence was calculated [19] assuming that Mn is bound practically irreversibly [10] and that binding constants for each Mn atom in the Mn-containing cluster are nearly the same.

(fig.3). The photoreaction recovers up to 85% of the control after addition of either 0.2 μM $MnCl_2$ or 0.1 μM $MnCl_2$ added jointly with 3 μM $MgCl_2$. Separate addition of 0.1 μM $MnCl_2$ or 3 μM $MgCl_2$ does not result in such reactivation (fig.3A). Dependence of this restoration on [Mn^{2+}] (added alone or together with 3 μM $MgCl_2$) is quite similar to that observed for ΔF (fig.3B).

3.4. *Oxygen evolution*

Preliminary experiments have shown that some restoration by Mn^{2+} is also seen for photoinduced oxygen evolution measured in the completely extracted DT-20 in the presence of 1 mM ferricyanide or 50 μM DPIP. However, the reactivation effect was much lower than that for photoreduction of Q, Pheo and DPIP (probably due to inter-

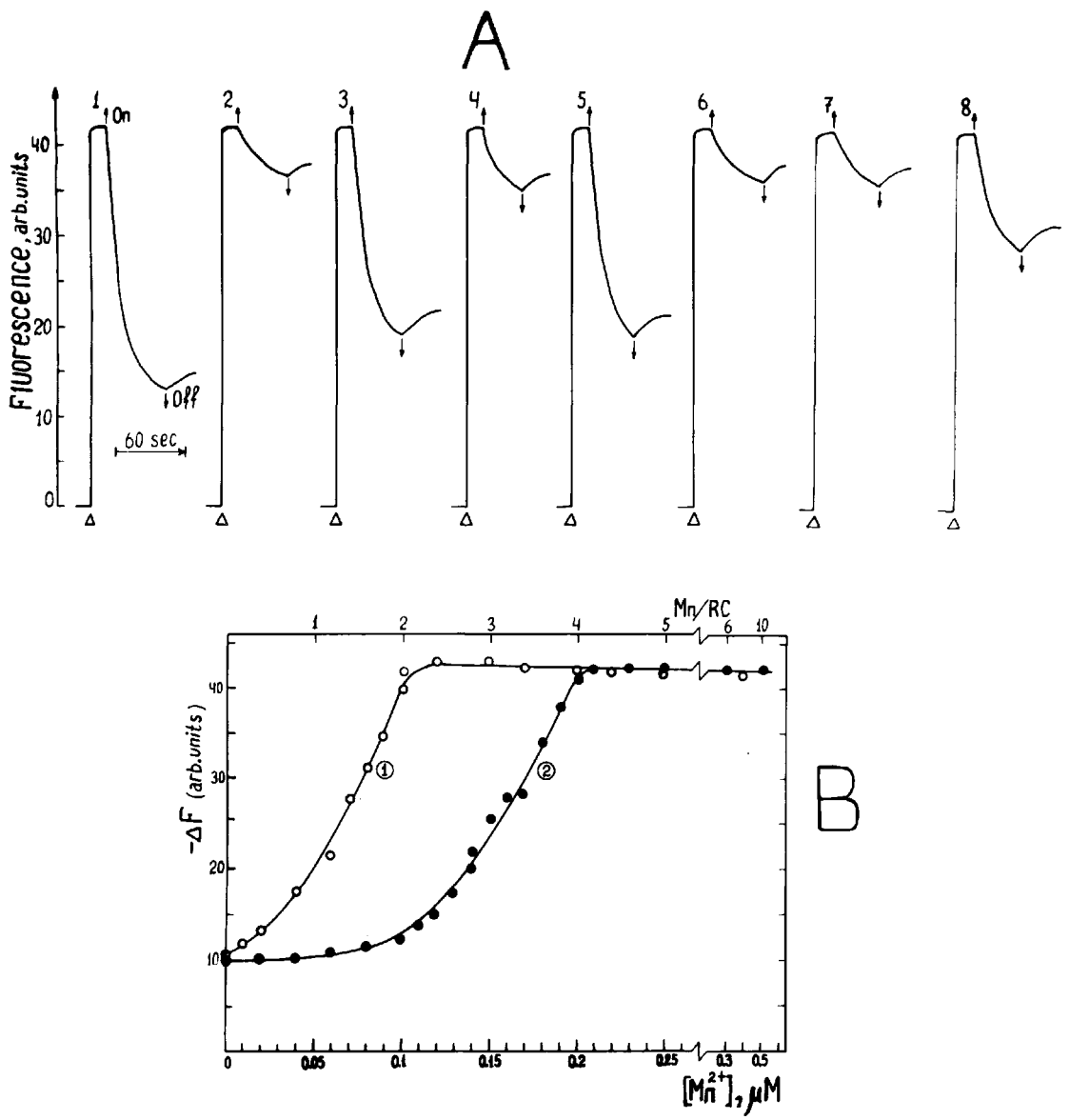


Fig.2. (A) Kinetics of photoinduced negative ΔF, related to photoreduction of Pheo, at $E_h \approx -450$ mV in: untreated (1); completely extracted (2–8) DT-20 particles with no additions (2); and in the presence of 0.2 μM $MnCl_2$ (3), 0.1 μM $MnCl_2$ (4), 0.1 μM $MnCl_2$ plus 3 μM $MgCl_2$ (5), 3 μM $MgCl_2$ (6) added before addition of dithionite, and in the presence of 0.2 μM (7) and 400 μM (8) $MnCl_2$ added after addition of dithionite. Measuring light (480 nm, ~ 100 erg . cm^{-2} . s^{-1}) on (△); actinic light ($\lambda > 600$ nm, 1.2 . 10^5 erg . cm^{-2} . s^{-1}) on (↑) and off (↓) (20°C). (B) Dependence of magnitude of the negative photoinduced ΔF, related to photoreduction of Pheo, at $E_h \approx -450$ mV during the first 30 s illumination in completely extracted DT-20 particles (see fig.3A) on concentration of $MnCl_2$ added to the medium alone (•) or jointly with 3 μM $MgCl_2$ (○).

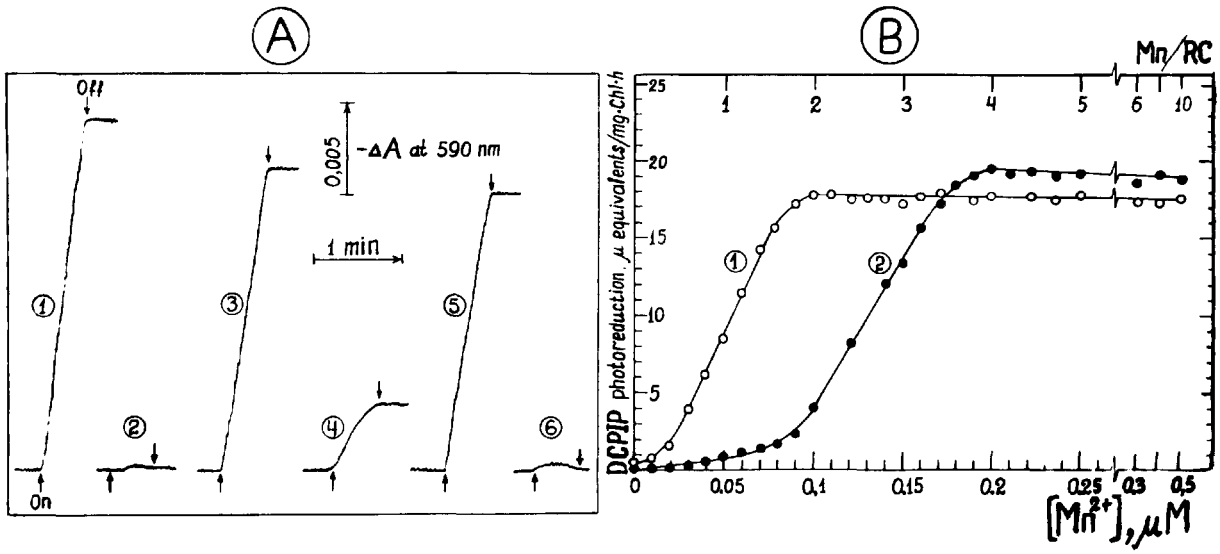


Fig.3. (A) Kinetics of photoreduction of DPIP in untreated (1), in completely extracted (2–6) DT-20 particles with no additions (2), and after addition of 0.2 μM $MnCl_2$ (3), 0.1 μM $MnCl_2$ (4), 0.1 μM $MnCl_2$ plus 3 μM $MgCl_2$ (5), 3 μM $MgCl_2$ (6) (20°C). (B) Dependence of the rate of DPIP photoreduction in completely extracted DT-20 particles on [$MnCl_2$] added alone (•) or jointly with 3 μM $MgCl_2$ (○).

ference with the effect of photoinduced oxygen consumption which was much higher in the extracted than in untreated DT-20.

3.5. *Content of Mn*

Determination of Mn content in DT-20 samples used in the experiments has shown that they contain 3.4±0.5 Mn atoms/1 RC of PS II. The partial and complete extraction of Mn results in a decrease of the ratio Mn/RC to ~0.7 and <0.02, respectively. Addition of 0.2 μM $MnCl_2$ to the totally extracted DT-20 at 10 μg chl/ml (followed by centrifugation) leads to binding of ~3.1 Mn atoms/RC.

4. DISCUSSION

The results reported here strongly support the idea [1–15] that Mn is a highly essential element for providing electron donation to RC from the oxidizing side of PS II. In fact, all the activities of PS II tested here require a high rate of electron donation (to prevent charge recombination in the RC after primary photoreaction), and they are inhibited upon removal of Mn and are reconstituted by added Mn^{2+} (but not by other M^{2+}). An advantage of these data (in comparison with previous similar experiments [6–9]) is the possibility to observe the reactivation at very low [Mn^{2+}] (nearly stoichiometric with that of RC) in preparations where >98% of RC do not contain Mn at all. This allows a more explicit investigation of the minimal Mn requirement and its specificity.

Our results indicate that the mangano-center acting in the donor side of PS II can comprise 4 Mn atoms. In fact, the maximal restoration of both ΔF and photoreduction of DPIP is observed upon re-addition of ≤4 Mn atoms/RC, and the experimental dependence of ΔF reactivation on [$MnCl_2$] (fig.1E) corresponds to 'filling' of a tetra-atomic manganese center. Not all of these Mn atoms are equivalent. Half of them (2 atoms) can be replaced by any M^{2+} without loss of the activities so that in the presence of Mg^{2+} the maximal reaction occurs at addition of ~2 Mn atoms/RC, and dependence of the reactivation on [Mn] corresponds to a 'filling' of a 2-atomic manganese system. So, the quantity of Mn which is strictly

necessary and irreplaceable in the donor side of PS II is 2 atoms/RC. This Mn is likely to correspond to so-called 'firmly bound' Mn since it remains after the partial extraction of Mn (fig.1D) used for removal of the 'loosely bound' Mn [1–11]. Our results also show that the irreplaceable (firmly bound) rather than the replaceable Mn is more likely to be involved in intrinsic redox processes of PS II (probably into catalytic oxidation of water). In fact, addition of 2 Mn/RC (in the presence of Mg^{2+}) is sufficient for restoration of Hill reaction in which the quantity of electrons transferred to DPIP exceeds the quantity of added Mn^{2+} at least by a factor of 50. Moreover, the reactivation effects of Mn remain after separation of the reconstituted particles from solution of $MnCl_2$ [10]. So, the effects of reactivation are related to formation of a stable Mn-complex in the functionally active structure of PS II, and Mn (or a donor system reactivated by Mn), being repeatedly oxidized by PS II, is capable of re-reduction (more likely using water as an electron donor).

The role of 2 Mn atoms which can be replaced by Mg^{2+} or by any other M^{2+} (but not by monovalent cations) may be considered as satisfying a special structural requirement of the manganoprotein that contributes to its catalytic activity.

REFERENCES

[1] Radmer, R. and Cheniae, G. (1977) in: Primary Processes of Photosynthesis (Barber, J. ed) Top. Photosynth. vol. 1, pp. 303–348, Elsevier Biomedical, Amsterdam, New York.
[2] Cheniae, G. (1980) Methods Enzymol. 69, 349–363.
[3] Goldfeld, M.G. and Blumenfeld, L.A. (1980) Bull. Mag. Res. 1, 66–112.
[4] Cheniae, G.M. and Martin, I.E. (1970) Biochim. Biophys. Acta 197, 219–239.
[5] Yamashita, T. and Butler, W.L. (1968) Plant Physiol. 43, 1978–1986.
[6] Homann, P.H. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 229–234.
[7] Itoh, M., Yamashita, K., Nishi, T., Konishi, K. and Shibata, K. (1969) Biochim. Biophys. Acta 180, 509–516.
[8] Goldfeld, M.G., Tsapin, A.I., Vozvishaeva, L.V. and Khalilov, P.I. (1978) Biofisika 23, 266–271.
[9] Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Shutilova, N.I. and Krasnovsky, A.A. (1980) Soviet Plant Physiol. 27, 315–326.
[10] Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Shuvalov, V.A. and Krasnovsky, A.A. (1982) Dokl. Akad. Nauk. SSSR 263, 1001–1005.
[11] Mansfield, R.W., Nakatani, H.Y., Barber, J. and Cammack, R. (1980) in: Abst. 5th Int. Cong. Photosynthesis, Halkidiki, p. 258.
[12] Dismukes, G.C. and Siderer, Y. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 957–959.
[13] Dismukes, G.Ch., Ferris, K. and Watnick, P. (1982) Photobiochem. Photobiophys. 3, 243–256.
[14] Yocum, C.F., Yerkes, C.T., Blankenship, R.E., Sharp, R.R. and Babcock, G.I. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7507–7511.
[15] Hansson, Ö. and Andreasson, L.-E. (1982) Biochim. Biophys. Acta 679, 261–268.
[16] Shutilova, N.I., Klimov, V.V., Shuvalov, V.A. and Kutyurin, V.M. (1975) Biofizika 20, 844–847.
[17] Klimov, V.V. and Krasnovsky, A.A. (1981) Photosynthetica 15, 592–609.
[18] Duysens, L.N.M. and Sweers, M.E. (1963) in: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria (Miyachi, S. ed) pp. 353–372, Univ. of Tokyo Press, Tokyo.
[19] Allakhverdiev, S.I., Klevanik, A.V., Klimov, V.V., Shuvalov, V.A. and Krasnovsky, A.A. (1982) Biofizika, in press.

Photobiochemistry and Photobiophysics, 4 (1982) 227–232
Elsevier Biomedical Press

CHLOROPHYLL-CONTAINING LIPOSOMES: PHOTOREDUCTION OF METHYL VIOLOGEN AND PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN

A.A. KRASNOVSKY, A.N. SEMENOVA and V.V. NIKANDROV

A.N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

Received March 19, 1982
Accepted April 1, 1982

SUMMARY

Photosensitized reduction of methyl viologen (MV) and photoevolution of hydrogen have been studied in the suspension of chlorophyll-containing liposomes and micelles of Triton X-100. MV photoreduction took place in the course of transmembrane transfer of electrons from donors incorporated in the inner space of liposomes under the action of light absorbed by chlorophyll. Spatial separation of donor and acceptor of electrons made it possible to observe MV photoreduction at the expense of ascorbate, which could not be observed when ascorbate and MV were located in the outer space of liposome suspension.

INTRODUCTION

Chlorophyll-photosensitized reduction of methyl viologen (MV) can be considered a model of electron transfer in photosystem I [1]. Pigment solutions in organic solvents were used in our early experiments [2,3]; furthermore this reaction was investigated in aqueous solutions of detergents, where chlorophyll was solubilized in micelles and spatially separated from the electron donor and acceptor [4]. In such a model system in the presence of electron donors, MV and bacterial hydrogenase photoproduction of hydrogen was observed [5,6].

Recently interest has arisen in the studies of photochemical reactions in chlorophyll-containing liposomes [7]. In such liposomes light-dependent generation of chlorophyll cation radicals was recorded in the presence of electron acceptors [8,9]. Generation of triplet states [10] and chlorophyll phosphorescence in liposomes were measured [11]. Reactions of the electron transfer from ascorbate to copper ions [12] and to methyl red [13] were reported in liposomes; it should be noted, however, that the reactions observed proceeded also in the case, when the electron donor and

0165-8646/82/0000–0000/$02.75 © 1982 Elsevier Biomedical Press

acceptor were not separated by the liposome membrane.

This paper presents the results of comparative investigations of MV photoreduction and hydrogen photoproduction sensitized by chlorophyll-containing liposomes and chlorophyll solubilized in Triton X-100 micelles; here the possibility of MV photoreduction in the course of transmembrane transfer was shown.

MATERIALS AND METHODS

Egg lecithin (phosphatidylcholine) and chlorophyll *a* isolated by standard technique with chromatographic purification were used. Liposomes were prepared by two different methods; both methods gave similar results. According to the first one [14], an alcohol solution (0.25 ml) containing the lipid (20 mg/ml) and chlorophyll was injected with a thin syringe needle into 20-fold volume of the buffer solution: 60 mM K–Na phosphate, 0.1 M KCl, pH 7.5. The lipid/chlorophyll molar ratio in the liposomes produced was determined by the concentration of chlorophyll in the initial alcohol solution. The second method [15] was as follows: in a round-bottomed glass at successive evaporation of alcohol solution of lipid ethyl ether solution of chlorophyll *a* mixed film was obtained; 5 ml of buffer solution was added, the glass placed into an ice bath and the contents sonicated on ultrasonic desintegrator MSE-500 in argon atmosphere for 5 min with output power 250 W and frequency 20 kHz. The suspension obtained was centrifuged at $17{,}000 \times g$ for 10 min, the supernatant being used in the experiments. To obtain the liposomes with the electron donor in the inner volume both methods were used, ascorbate (0.5 M) or NADH (0.05 M) being dissolved in the buffer mixture before injection or sonication of the film. In order to remove the electron donor from the liposome outer volume, the suspension was twice run through a column with Sephadex G-25, equilibrated with buffer solution. As a result, ascorbate and NADH concentration measured spectrophotometrically decreased to 5×10^{-4} M and 5×10^{-5} M correspondingly. Successive runs through the column did not change the electron donor concentration. This was taken as evidence of donor incorporation into the inner space of the liposomes. MV photoreduction was carried out in a Thunberg tube adjusted for spectral measurements; the air was removed with a vacuum pump. MV reduction was recorded according to a change of absorbance at 605 nm. An incandescent lamp of 750 W with a condensor was used as the light source. The tube was illuminated through a water layer (5 cm) and cut-off filters transmitting light with $\lambda \geqslant 600$ nm and $\lambda \leqslant 700$ nm. Light intensity was 2.5×10^5 erg $\cdot$ cm$^{-2} \cdot$ s^{-1}. Hydrogen evolution was recorded by gas–liquid chromatograph Chrom-4 applying the earlier described procedure [5].

RESULTS AND DISCUSSION

We compared MV photoreduction sensitized by chlorophyll in Triton X-100 micelles and liposomes having a chlorophyll/lipid ratio of 1:1000. The data presented in Fig. 1 show that the initial rate of MV reduction with dithiothreitol (DTT) and cysteine in detergent micellar solution was about 2-fold above that in the

suspension of chlorophyll-containing liposomes. The smaller reaction efficiency can be explained by the fact that in the liposomes part of the chlorophyll molecules is located in the inner lipid monolayer and is inaccessible for the donor and acceptor of electrons in the outer space; this is in accordance with the effect of oxidizing agents on the chlorophyll-containing liposomes which resulted in destructive bleaching of 50–70% of chlorophyll only [16].

Fig. 2 shows the relationship between the initial rate of MV photoreduction and the concentration of electron donors, such as DTT and cysteine in the suspension of chlorophyll-containing liposomes and in Triton X-100. Saturation of MV reduction was reached in both systems at the same concentration of the electron donors, which may indicate that chlorophyll located in the outer monolayer of the liposomal membrane and chlorophyll in the detergent micelles were equally accessible for these electron donors.

Table I shows that photoproduction of hydrogen in the suspension of chlorophyll-containing liposomes is also less efficient than in the detergent micelles. When cysteine was applied the ratio between the reaction rate in liposomes and detergent is the same as during MV photoreduction (Fig. 1). However, photoproduction of hydrogen in liposomes in the presence of DTT is four times less efficient than in the detergent micelles at the same chlorophyll concentration.

A decrease of the efficiency of hydrogen photoproduction and MV photoreduction in chlorophyll-containing liposome suspensions as compared to chlorophyll solutions in detergents seems to be related to the inaccessibility of chlorophyll molecules in the inner lipid monolayer for the electron donors and acceptors and, possibly, to the concentration quenching of chlorophyll excited states in the lipo-

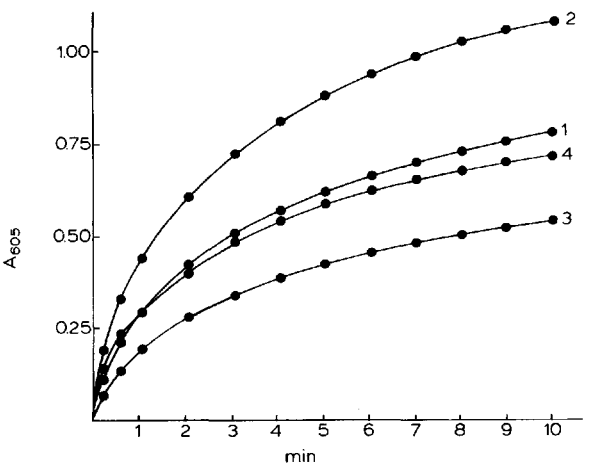


Fig. 1. MV photoreduction sensitized by chlorophyll-containing liposomes (1, 3) and chlorophyll in 1% solution of Triton X-100 (2, 4) with 5×10^{-2} M DTT (1, 2) and 5×10^{-2} M cysteine (3, 4). Molar ratio chlorophyll/lipid, 1 : 1000; chlorophyll, 10^{-6} M; MV, 5×10^{-4} M.

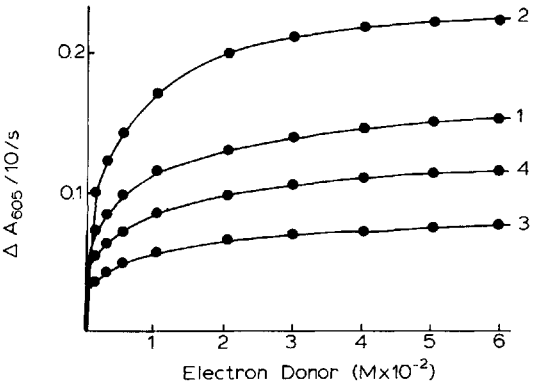


Fig. 2. Dependence of the initial rate of MV photoreduction in chlorophyll-containing liposome suspension (1, 3) and in 1% solution of Triton X-100 (2, 4) on electron donor concentration DTT (1, 2) and cysteine (3, 4).

somes [11]. Chlorophyll-sensitized MV photoreduction in the presence of ascorbate in water-pyridine and ethanol solutions of chlorophyll was observed previously [2,3]. No accumulation of reduced MV was observed in the detergent micellar solutions when ascorbate was used, as the overall process may proceed with a gain in free energy; it can be explained by a high rate of back reactions. So it should be expected that spatial separation of the electron donor and acceptor with the help of the lipid membrane in the chlorophyll-containing liposomes will interfere with the back reactions. Fig. 3A presents the experimental results of chlorophyll-photosensitized MV reduction, when ascorbate was located inside the liposomes. Under illumination MV reduction was observed, which rapidly reached the steady state. When the light was switched off a decrease of absorption at 605 nm took place. Subsequent illumination again brought about MV reduction. The absorption decrease at 605 nm observed in the system after the light had been switched off pointed to the back reaction. It should be suggested herewith that the reduced MV has the ability to

TABLE I

PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN IN CHLOROPHYLL-CONTAINING LIPOSOME SUSPENSION (CHLOROPHYLL/LIPID RATIO 1 : 100) AND IN 1% SOLUTION OF TRITON X-100 (in μl H_2/min)

Composition of reaction mixture: chlorophyll *a* in liposomes or detergent micelles, 10^{-5} M; MV, 5×10^{-4} M; hydrogenase from *Clostridium butyricum*, 10 units, 60 mM K–Na phosphate, pH 6.6, 0.1 M KCl; DTT, 5×10^{-2} M; cysteine, 5×10^{-2} M.

System	Electron donor	
	DTT	Cysteine
Triton X-100 micelles	0.80	0.52
Liposomes	0.20	0.24

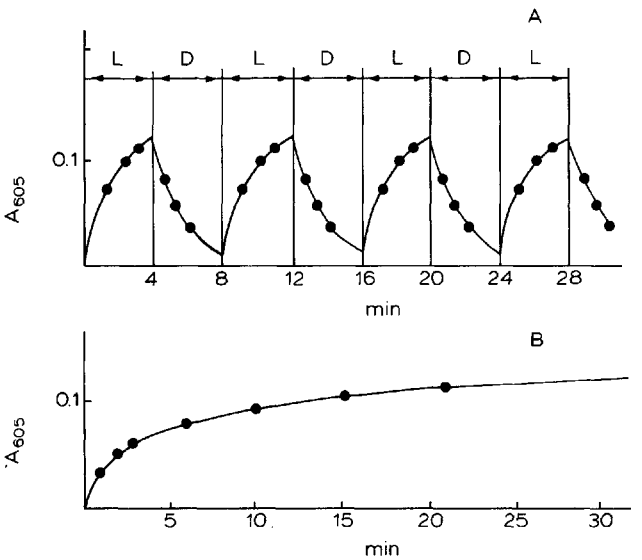


Fig. 3. MV photoreduction due to transmembrane electron transfer. A) Ascorbate inside the liposomes. B) NADH inside the liposomes. Chlorophyll/lipid ratio, 1 : 100; chlorophyll, 10^{-5} M; MV, 5×10^{-4} M; L, illumination, D, dark period.

penetrate through the liposomal membrane which results in a reaction with dehydroascorbic acid located in the inner space of the liposomes. When these reactions were carried out at pH 8.7, the rate of back reaction got essentially slower, which may be related to the increase of the reducing potential of ascorbate at these pH values. The following experiments show that this reaction is really due to transmembrane electron transfer. If in the course of MV reduction from ascorbate to liposome suspension an aqueous solution of Triton X-100 (final concentration: 1%) was introduced under anaerobic conditions, fast oxidation of reduced MV was observed. Under subsequent illumination of the mixture no accumulation of reduced MV was observed, which pointed to liposome destruction and ascorbate liberation into solution.

It should be noted that in the case of MV photoreduction with NADH incorporated into the inner space of liposomes, we could not observe the back reaction after the light had been switched off (Fig. 3B). It should be noted that MV photoreduction proceeded also in case NADH and MV were not separated by the membrane, i.e. when NADH was not introduced into the inner volume of the liposomes. Probably, this phenomenon may be related to irreversible photooxidation of NADH under conditions of the experiment. However, no MV photoreduction was observed in liposome suspensions if both ascorbate and MV were located in the liposome outer space; only separation of the electron donor and acceptor by means of the liposomal membrane made it possible to observe the accumulation of reduced MV at the expense of light energy absorbed by chlorophyll.

REFERENCES

1 Krasnovsky, A.A. (1972) Biophys. J. *12*, 749–763.
2 Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin (1965) Dokl. Akad. Nauk U.S.S.R. *163*, 761–764.
3 Brin, G.P., A.N. Luganskaya and A.A. Krasnovsky (1967) Dokl. Akad. Nauk U.S.S.R. *174*, 221–224.
4 Luganskaya, A.N. and A.A. Krasnovsky (1970) Mol. Biol. *4*, 848–859.
5 Krasnovsky, A.A., V.V. Nikandrov, G.P. Brin, I.N. Gogotov and V.P. Oshchepkov (1975) Dokl. Akad. Nauk U.S.S.R. *225*, 711–713.
6 Krasnovsky, A.A. (1979) *in*: Topics in Photosynthesis, Vol. 3, pp. 281–298. Elsevier, Amsterdam.
7 Ti Tien, H. (1979) *in*: Topics in Photosynthesis, *Vol. 3*, pp. 115–173. Elsevier, Amsterdam.
8 Tomkievicz, M. and G.A. Corker (1975) Photochem. Photobiol. *22*, 249–256.
9 Oettmeier, W., J. Norris and J. Katz (1976) Z. Naturforsch. *31b*, 163–168.
10 Hurley, J.K., F. Castelli and G. Tollin (1980) Photochem. Photobiol. *32*, 79–86.
11 Krasnovsky, A.A., Jr. and A.N. Semenova (1981) Photobiochem. Photobiophys. *3*, 11–18.
12 Kurihara, K., M. Sukigara and Y. Toyashima (1979) Biochim. Biophys. Acta *547*, 117–126.
13 Leblanc, R.M., B. Werson, H. Dijkmans and J. Aghion (1979) Photosynthetica *15*, 109–113.
14 Batzri, S. and E.D. Korn (1973) Biochim. Biophys. Acta *298*, 1015–1019.
15 Huang, C. (1969) Biochemistry *8*, 344–351.
16 Fragata, M. (1977) Photosynthetica *11*, 296–301.

Том XXVIII, вып. 1 1983

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА АТОМОВ МАРГАНЦА, ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ В ДОНОРНОЙ ЧАСТИ ФОТОСИСТЕМЫ II

АЛЛАХВЕРДИЕВ С. И., КЛЕВАНИК А. В., КЛИМОВ В. В., ШУВАЛОВ В. А., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Проведено сравнение теоретически ожидаемой и экспериментальной зависимостей реактивации донорного участка фотосистемы II (ФС-II) от концентрации экзогенного $MnCl_2$, наблюдаемой на препаратах ФС-II после полной экстракции Mn. Показано, что в отсутствие Mg^{2+} или двухвалентных катионов других металлов (Me^{2+}) реактивация соответствует заполнению четырехъядерного Mn-содержащего активного центра; в присутствии 3 мкМ Mg^{2+} или Me^{2+} реактивация наблюдается уже при поглощении центром двух атомов Mn. Предполагается, что в донорной части ФС-II функционирует четырехъядерный марганцевый комплекс (который, вероятно, ответствен за фотосинтетическое окисление воды); два из четырех атомов Mn могут быть замещены на Mg^{2+} или Me^{2+} без изменения активности центра.

Окисление воды при фотосинтезе происходит с участием марганца [1]. Минимальное количество Mn, необходимое для фотосинтетического окисления воды, составляет пять-шесть атомов на реакционный центр (РЦ) фотосистемы-II (ФС-II) [1]. Большая часть (2/3) этого Mn легко экстрагируется, что сопровождается полной инактивацией выделения кислорода [1]. Меньшая (1/3) и более прочно связанная фракция, вероятно, выполняет лишь структурную роль, поскольку ее экстракция не влияет на реакции ФС-II [1].

В [2] нами была разработана методика «мягкой» экстракции из препаратов ФС-II практически всего (более 99%) Mn, после которой добавление экзогенного Mn^{2+} вызывает восстановление до 80% активности донорного участка ФС-II (активность оценивалась по способности к фотоиндуцированному увеличению выхода флюоресценции хлорофилла ($\Delta\Phi$) и фотовосстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола в реакции Хилла). При этом максимальная реактивация наблюдается при чрезвычайно низких концентрациях $MnCl_2$ (0,1—0,2 мкМ), когда в среде находится не более двух атомов Mn на один РЦ фотосистемы II если Mn^{2+} добавляется вместе с Mg^{2+} или другим двухвалентным металлом (Me^{2+}), и не более четырех атомов в отсутствие Me^{2+} [2]. В данной работе проведено сравнение зависимости такого восстановления активности от концентрации Mn^{2+} с теоретически ожидаемой зависимостью. Результаты анализа показывают, что реактивация Mn-содержащего активного центра (который, вероятно, ответствен за фотосинтетическое окисление воды) происходит лишь в результате связывания четырех атомов Mn; два из них могут быть заменены на Mg^{2+} или Me^{2+}.

Фотоиндуцированное увеличение выхода флюоресценции хлорофилла ($\Delta\Phi$) связано с фотовосстановлением первичного акцептора электрона ФС-II, Q [3]. Согласно [4, 5], это увеличение представляет собой появление замедленной люминесценции со временем жизни 2—4 нс, связанной с рекомбинацией зарядов в ион-радикальной паре реакционного центра $[П^{+}_{680} \cdot ФФ^{-}]$, где $П^{+}_{680}$ — окисленный первичный донор электрона, а $ФФ^{-}$ — восстановленный промежуточный акцептор электрона, феофитин. Если донорная часть ФС-II не функционирует, то нако-

нить РЦ с восстановленным Q с помощью освещения не удается вследствие обратного переноса электрона от Q^- на $П^+_{680}$. Экстракция Mn из субхлоропластных частиц, обогащенных содержанием РЦ фотосистемы II, приводит к уменьшению фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ в 15—20 раз [2]. Назовем такие частицы неактивными. При добавлении экзогенного Mn^{2+} наблюдается активация фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ [2], и доля частиц, находящихся в активном состоянии, зависит от концентрации Mn^{2+} в растворе и от того, какое число атомов специфически связанного Mn вызывает реактивацию донорного участка ФС-II.

Пусть $\alpha(M)$ — доля частиц, находящихся в активном состоянии при заданной начальной концентрации ионов Mn^{2+} в растворе. Тогда для $\Delta\Phi$ (величина которых нормирована на уровень постоянной флюоресценции, т. е. $\Delta\Phi=\Delta I/I_0$, где ΔI — фотоиндуцированные изменения интенсивности флюоресценции, I_0 — интенсивность постоянной флюоресценции) можно записать соотношение

$$\Delta\Phi(M)=\Delta\Phi_{макс}\alpha(M)+\Delta\Phi_0[1-\alpha(M)], \qquad (1)$$

где $\Delta\Phi_{макс}$ — максимальное $\Delta\Phi$, получаемое при избыточной концентрации Mn^{2+}, $\Delta\Phi_0$ — минимальные (остаточные) $\Delta\Phi$, наблюдаемые при 99%-ной экстракции Mn из частиц [2]. Из соотношения (1) можно найти $\alpha(M)$

$$(\Delta\Phi(M)-\Delta\Phi_0)/(\Delta\Phi_{макс}-\Delta\Phi_0)=\alpha(M). \qquad (2)$$

Величина, стоящая слева в (2), измеряется экспериментально как функция концентрации ионов Mn^{2+} в растворе. Величину $\alpha(M)$ можно рассчитать теоретически, и ее зависимость от концентрации Mn^{2+} в растворе зависит от количества атомов Mn, необходимых для функционирования донорной части ФС-II. Предположим, что для восстановления активности частиц необходимо поглощение только одного атома Mn в донорной части ФС-II.

Пусть X_1 и X — концентрация активных и неактивных частиц, X_0 — полная концентрация частиц, M — концентрация ионов Mn^{2+} в растворе. Тогда изменение во времени X_1 и M после добавления в среду Mn и перемешивания описывается уравнениями

$$dX_1/dt=K_cXM-K_дX_1,\quad dM/dt=-K_cXM+K_дX_1, \qquad (3)$$

где K_c — константа связывания Mn с частицами, $K_д$ — константа диссоциации. Как показывают эксперименты [2], Mn связывается с частицами необратимо, поэтому диссоциацию можно не учитывать. Введем безразмерные переменные $\tau=K_cX_0t$, $\alpha=X_1/X_0$, $m=M/X_0$. Уравнения (3) принимают вид

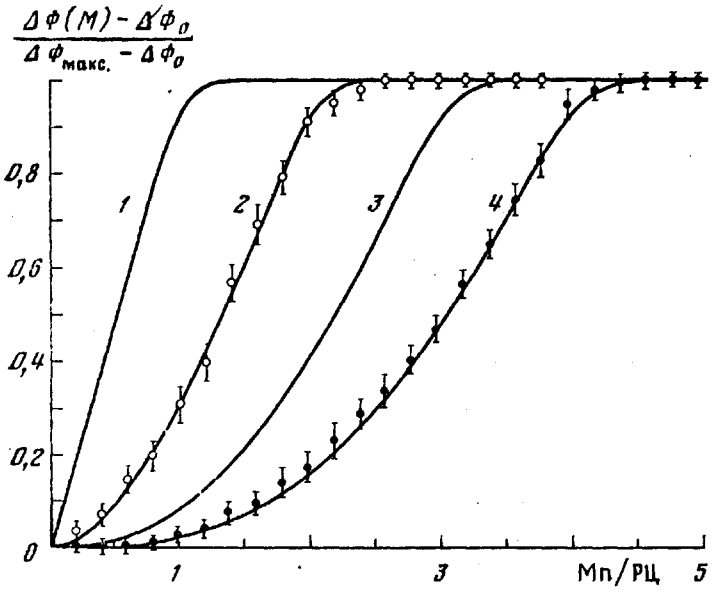
$$d\alpha/d\tau=m(1-\alpha),\ dm/d\tau=-m(1-\alpha),\ \alpha(0)=0,$$
$$m(0)=m_0. \qquad (4)$$

Здесь α — доля частиц ФС-II, находящихся в активном состоянии, m — число атомов Mn, приходящихся на частицу (или на реакционный центр). Поскольку измерения $\Delta\Phi$ проводились после насыщения активирующего действия добавленного Mn^{2+}, то нас интересует решение уравнений (4) при $\tau\to+\infty$ как функция начального значения m (m_0), т. е. $\alpha=f(m_0)$.

Если для проявления активности донорной части ФС-II необходимо два, три или четыре атома Mn (двух-, трех- или четырехъядерная модель марганцевого кластера), то для α в предположении одинаковой константы связывания частицами каждого атома Mn для двухъядерного кластера легко получить следующие уравнения:

$$d\alpha/d\tau=m\alpha_1,\ d\alpha_1/d\tau=m(1-2\alpha_1-\alpha),$$
$$dm/d\tau=-m(1-\alpha),\ \alpha_1(0)=\alpha(0)=0,\ m(0)=m_0. \qquad (5)$$

Здесь α_1 — доля частиц, связанных с одним атомом Mn.



Зависимость величины ΔФ субхлорпластных частиц фотосистемы II (ДТ-20) от концентрации добавленного $MnCl_2$; *1*, *2*, *3* и *4* — теоретически ожидаемые зависимости для случаев, когда реактивация донорного участка ФС-II требует специфической адсорбции соответственно одного, двух, трех или четырех атомов Mn (см. текст); показана среднестатистическая ошибка среднего значения измеренных ΔФ. Значение Mn/РЦ-1 соответствует добавлению $5 \cdot 10^{-8}$ М $MnCl_2$ в суспензию частиц ДТ-20 при концентрации хлорофилла 10 мкг/мл

Для трехъядерного кластера

$$d\alpha/d\tau = m\alpha_2,\ d\alpha_2/d\tau = m(\alpha_2 - \alpha_1),$$
$$d\alpha_1/d\tau = m(1 - 2\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha),\ dm/d\tau = -m(1-\alpha), \qquad (6)$$
$$\alpha_1(0) = \alpha_2(0) = \alpha(0) = 0,\ m(0) = m_0.$$

Здесь α_1 и α_2 — доли частиц, связанных с одним и двумя атомами Mn соответственно, но находящихся все еще в неактивном состоянии. Для четырехъядерного кластера уравнения имеют вид

$$d\alpha/d\tau = m\alpha_3,\ d\alpha_3/d\tau = m(\alpha_3 - \alpha_2),\ d\alpha_2/d\tau = m(\alpha_2 - \alpha_1),$$
$$d\alpha_1/d\tau = m(1 - 2\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_3 - \alpha),\ dm/d\tau = -m(1-\alpha), \qquad (7)$$
$$\alpha_1(0) = \alpha_2(0) = \alpha_3(0) = \alpha(0) = 0,\ m(0) = m_0.$$

Уравнения (4)—(7) интегрировались по схеме Адамса — Башфорта[1] до достижения стационарного значения α (т. е. α оставалось постоянным при последующих шагах интегрирования) при различных значениях m_0.

Результаты теоретического расчета зависимости ΔФ от концентрации добавленного Mn для одно-, двух-, трех- и четырехъядерной моделей Mn-содержащего активного центра приведены на рисунке. Там же для сравнения приведены экспериментальные зависимости ΔФ от концентрации Mn^{2+}, которые являются результатом усреднения 15 опытов, проведенных, как описано ранее [2], в отсутствие (темные кружки) и в присутствии (светлые кружки) 3 мкМ $MgCl_2$. Это сравнение показывает, что реактивация донорного участка ФС-II происходит только при включении в него четырех атомов Mn, если в среде нет Mg^{2+} (или другого двухвалентного металла). Это может свидетельствовать о функционировании в ФС-II четырехъядерного марганцевого центра. Из

[1] Программа расчетов составлена нами и реализована на языке Фортран IV. Расчеты проводились на ЭВМ ЕС-1040 в НИВЦ АН СССР (г. Пущино).

рисунка также видно, что в присутствии Mg^{2+} экспериментальная зависимость ΔΦ от концентрации Mn^{2+} соответствует заполнению двухъядерного марганцевого кластера. Следовательно, два из четырех атомов Mn могут быть заменены в этом центре на Mg (или другой двухвалентный металл). Были получены экспериментальные указания на возможность функционирования в системе окисления воды двух- [6] или, возможно, четырехъядерных [6, 7] комплексов Mn.

Как отмечалось ранее [2], реактивация ΔΦ с помощью Mn^{2+} сопровождается восстановлением способности частиц к фотовосстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (I) в отсутствие экзогенного донора электрона (в реакции Хилла). При этом количество восстанавливаемого (I) в десятки раз превышает количество добавленного Mn^{2+}. Кроме того, реактивирующее действие Mn^{2+} сохраняется после удаления частиц ДТ-20 из раствора $MnCl_2$ [2]. Все это свидетельствует о том, что эффекты реактивации связаны с образованием комплекса Mn в функционально активной структуре фотосистемы II и что Mn в этом комплексе, окисляясь фотосистемой II, способен к многократному ревосстановлению, вероятнее всего, за счет окисления воды. Следует, однако, отметить, что вывод о реактивации окисления воды нуждается в дополнительных экспериментальных доказательствах, поскольку, как показали предварительные исследования, в таких опытах выделение кислорода хотя и активируется, но остается на сравнительно низком уровне, несмотря на реактивацию ΔΦ и фотовосстановления (I).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Radmer R., Cheniae G.* Mechanisms of Oxygen Evolution. In: Primary Processes of Photosynthesis/Ed. Barber J. Elsevier-North-Holland Biochemical Press, 1977, p. 303—348.
2. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Шувалов В. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1982, т. 263, с. 1001.
3. *Duysens L. N. M., Sweers H. E.* In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria/Ed. Miyachi S. Tokyo: Univ. of Tokyo Press, 1963, p. 253—372.
4. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Пащенко В. З.* Докл. АН СССР, 1978, т. 242, № 5, с. 1204.
5. *Shuvalov V. A., Klimov V. V., Dolan E. et al.* FEBS Lett., 1980, v. 118, № 2, p. 279.
6. *Dismukes G. Ch., Siderer J.* Proc. Nat. Acad. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 274.
7. *Yocum C. F., Yerkes C. T., Blankenship R. E. et al.* Ibid., 1981, v. 78, № 12, p. 7507.

Институт фотосинтеза АН СССР
Пущино (Московская область);
Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
12.IV.1982

ESTIMATION OF THE NUMBER OF MANGANESE ATOMS FUNCTIONING IN THE DONOR SODE OF PHOTOSYSTEM 2

ALLAKHVERDIEV S. I., KLEVANIK A. V., KLIMOV V. V., SHUVALOV V. A., KRASNOVSKY A. A.

Institute of Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region); A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sc. USSR, Moscow

Comparison of theoretically expected and experimental dependence of reactivation of the donor side of photosystem 2 (PS-2) on concentration of exogenic $MnCl_2$ that was observed in PS-2 preparation after complete extraction of manganese was made. It is shown that in the absence of Mg^{2+} or bivalent cations of other metals (Me^{2+}) the reactivation corresponds to the filling of a tetranuclear Mn-containing active center; in the presence of 3 μM Mg^{2+} or other Me^{2+} the reactivation takes place as a result of binding of two manganese atoms in the center. It is suggested that a tetranuclear manganese complex (which probably is responsible for the photosynthetic oxidation of water) functions in the donor side of PS-2; two of these four manganese atoms can be substituted by Mg^{2+} or other Me^{2+} without changing activity of the center.

Доклады Академии наук СССР
1983. Том 270, № 5

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

М.И. БЫСТРОВА, И.А. САФРОНОВА, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА ДО ХЛОРОФИЛЛИДА В МИЦЕЛЛЯРНОМ РАСТВОРЕ ДЕТЕРГЕНТА

Фотовосстановление протохлорофиллида лежит в основе заключительного этапа образования хлорофилла в растениях. Поэтому понятен интерес к изучению механизма фотохимического восстановления изолированного протохлорофиллида в простых системах.

Водные мицеллярные растворы фотосинтетических пигментов в детергентах давно привлекают внимание как системы, моделирующие свойства и состояние естественных пигмент-белково-липидных комплексов.

В данной работе описано фотохимическое восстановление изолированного протохлорофиллида по месту полуизолированной двойной связи в IV пиррольном кольце в водном растворе детергента тритона X-100 с выходом хлорофиллида *а* до 20% от количества исходного пигмента; изучены условия этой реакции и установлена ее специфичность для протохлорофиллида.

Протохлорофиллид выделяли из 10–12-дневных этиолированных листьев пшеницы (сорт Юбилейная). Суть метода заключалась в экстрагировании листьев 80%-ным ацетоном, последующем многократном промывании экстракта гексаном или гептаном (для удаления протохлорофилла и каротиноидов) и переводе протохлорофиллида в диэтиловый эфир после доведения pH водно-ацетонового раствора до 7 добавлением насыщенного раствора KH_2PO_4. Таким путем, минуя стадию хроматографической очистки [1–4], мы получали пигмент, идентичный по спектрам поглощения и люминесценции растворов в полярных органических растворителях протохлорофиллу, который выделяли из внутренних оболочек семян тыквы методом, принятым в нашей лаборатории. Протофеофорбид получали путем феофитинизации протохлорофиллида в 1%-ном водном растворе тритона X-100 при pH 3 (данную кислотность создавали добавлением аскорбиновой кислоты до концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ *M*). Хлорофиллид получали из хлорофилла *а* по методу [5].

В качестве растворителя пигментов использовали водные растворы тритона X-100 (фирмы "Merck"), в качестве восстановителя – аскорбиновую кислоту (Союзглавреактив).

Фотовосстановление осуществляли после вакуумирования образцов в трубках Тунберга специальной формы, позволяющей их устанавливать в кюветном отделении спектрофлуорометра (типа MPF-44B фирмы "Perkin Elmer"). Реакционные системы освещали светом лампы накаливания через светофильтр ОС-13 ($\sim 5 \cdot 10^4$ эрг/см$^2 \cdot$ с) в условиях термостатирования при 18–20 °С. За ходом фотореакции следили по спектрам флуоресценции, регистрируемым по мере освещения (на регистрацию спектра флуоресценции уходило около 2 мин, поэтому во всех наших опытах освещение образцов было прерывистым). По окончании фотопроцесса в систему вводили воздух и записывали спектры в ходе обратной, темновой, реакции.

Опишем фотовосстановление протохлорофиллида в 1%-ном растворе тритона X-100, содержащем 5% пиридина и 10^{-2} *M* аскорбиновой кислоты. Реакция проявляется прежде всего в падении под действием света исходной люминесценции протохлорофиллида, которое протекает довольно быстро (время полупревращения

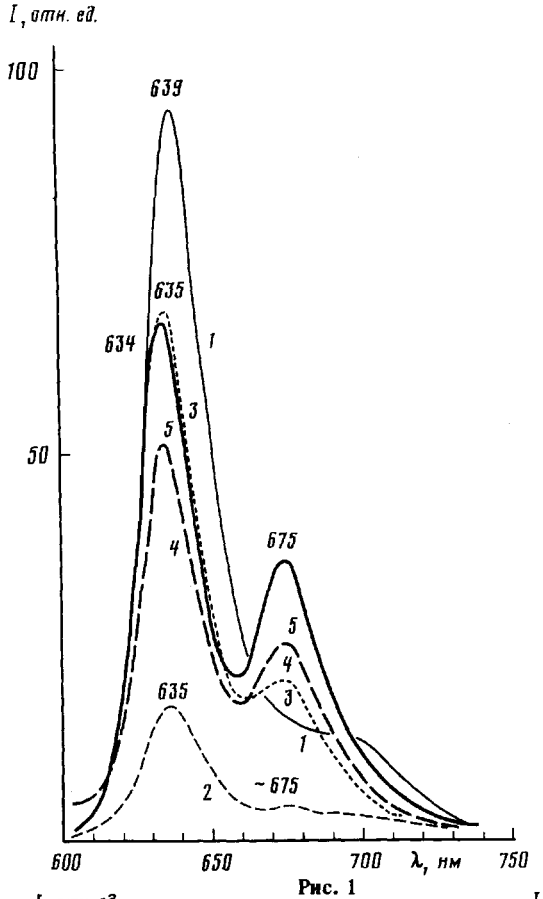


Рис. 1

Рис. 1. Фотовосстановление протохлорофиллида в 1%-ном водном растворе тритона X-100 в присутствии 10^{-2} *M* аскорбиновой кислоты и 5% пиридина. Спектры флуоресценции (λ возбуждения 440 нм): *1* – исходный; *2–4* – в ходе фотовосстановления, после освещения в течение 2–12 мин: *5* – после обратной реакции в присутствии воздуха. Спектры *1*, *2* зарегистрированы при усилении *I* (в условных единицах); спектры *3*, *4* – при усилении *I* × 10: спектр *5* – при усилении *I* × 3

Рис. 2. Спектры флуоресценции смеси протохлорофиллида ($0{,}2 \cdot 10^{-5}$ *M*) и хлорофиллида *a* ($0{,}2 \cdot 10^{-5}$ *M*) в 1%-ном водном растворе тритона X-100 в присутствии 10^{-2} *M* аскорбиновой кислоты и 5% пиридина: *1* – исходный, *2* – после освещения в течение 10 мин

Рис. 3. Фотовосстановление протофеофорбида в 1%-ном водном растворе тритона X-100 в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ М аскорбиновой кислоты и 5% пиридина. Спектры флуоресценции (λ возбуждения 420 нм): *1* – исходный, *2* – после освещения в течение 9 мин, *3* – после обратной реакции в присутствии воздуха

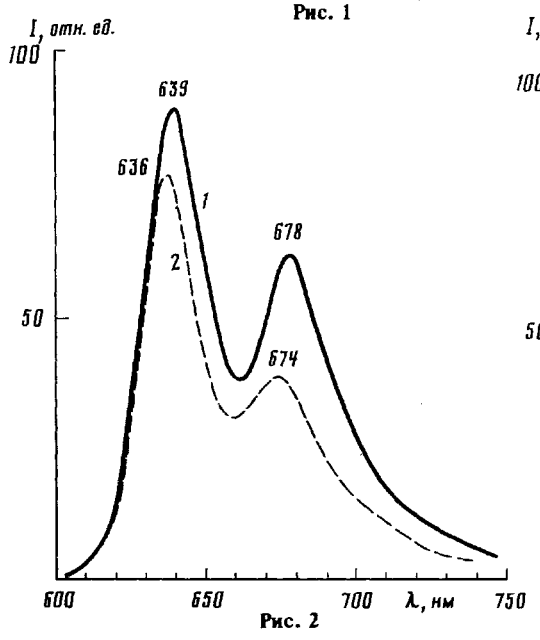


Рис. 2

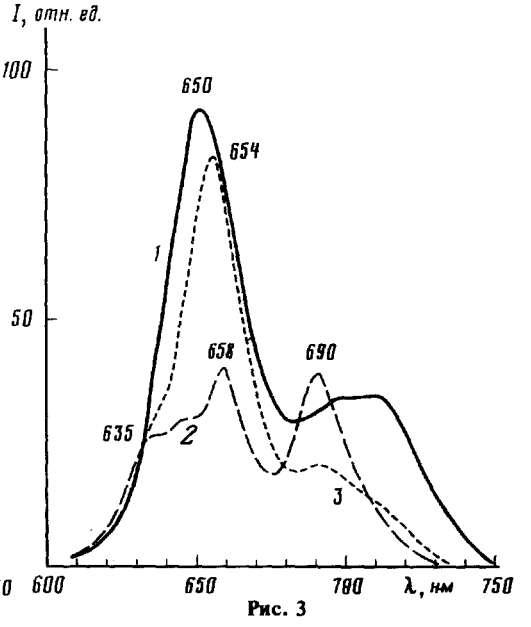


Рис. 3

в разных опытах 0,5–1 мин). При этом наблюдается смещение основного максимума в коротковолновую сторону на 3–5 нм. Через несколько минут действия света (обычно на 2–5-й минуте) наблюдается появление нового максимума при 672–675 нм, который растет в ходе дальнейшего освещения при продолжающемся падении люминесценции протохлорофиллида (более медленном, чем вначале). Люминесценция около 674 нм достигает максимальной величины обычно на 7–10-й минуте действия прерывистого света, когда наступает световое насыщение. В темноте, после пуска воздуха интенсивность новообразованного максимума значительно, иногда в несколько раз, возрастает, достигая, как правило, 10–15% исходной величины основного максимума люминесценции протохлорофиллида (см. рис. 1, где представлен наиболее типичный опыт по фотовосстановлению протохлорофиллида в описанных условиях).

Максимум 674 принадлежит устойчивому фотопродукту, который длительное время (сутки и более) сохраняется в реакционной системе после фотореакции. Сопоставление спектров флуоресценции системы после фотореакции с флуоресценцией искусственной смеси, составленной из равных количеств ($0{,}2 \cdot 10^{-5}$ *M*) протохлорофиллида и хлорофиллида *a* в полной реакционной среде, до и после освещения (рис. 2) позволило оценить выход фотопродукта с максимумом 674 нм, достигающий 20% от исходного содержания протохлорофиллида, и идентифицировать указанный продукт как хлорофиллид *a*.

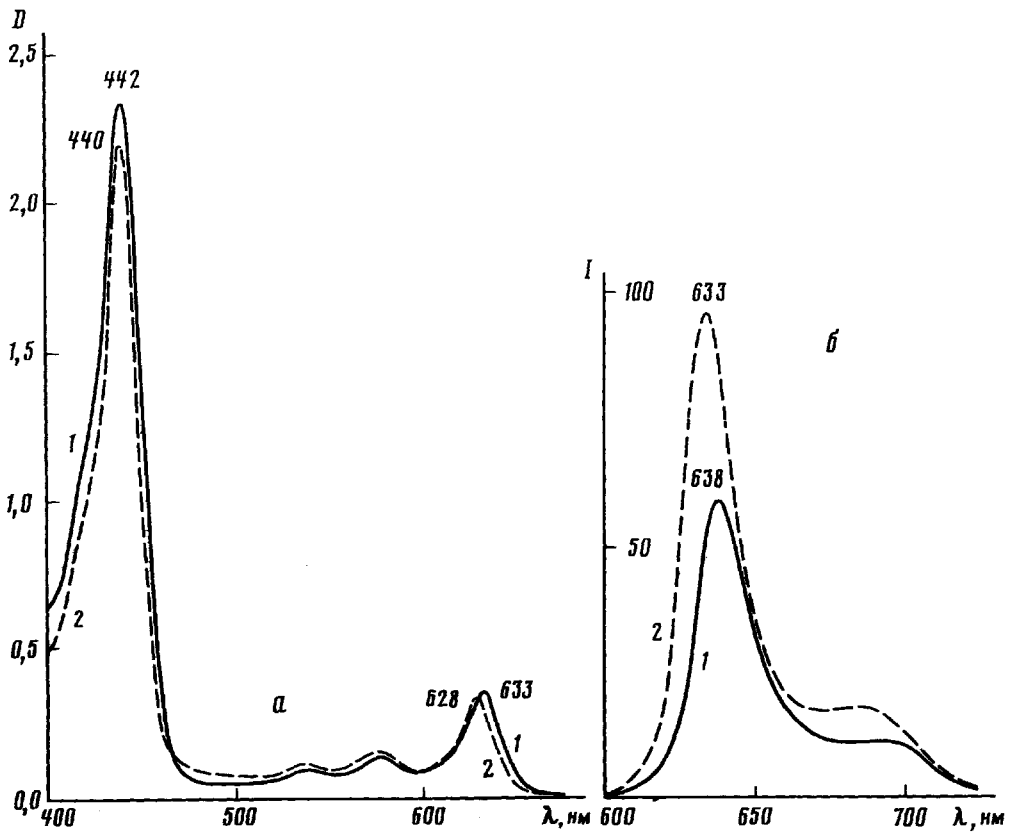


Рис. 4. Спектры поглощения (*а*) и флуоресценции (*б*) пигментов в 1%-ном водном растворе тритона X-100: *1* – протохлорофиллид, *2* – протохлорофилл

Таким образом, протохлорофиллид в мицеллярном растворе детергента под действием света подвергается количественному восстановлению по полуизолированной двойной связи в IV пиррольном кольце.

Следует отметить, что протохлорофиллид в растворе тритона X-100 (1%) в присутствии пиридина (5%) и аскорбиновой кислоты (10^{-2} *M*) восстанавливается при освещении по связи 7–8 (с образованием фотопродукта с максимумом флуоресценции при 668–670 нм) несравнимо в меньшей степени, чем протохлорофиллид, тогда как восстановительная деструкция у протохлорофиллида выражена в бóльшей мере (в темновой реакции регенерирует менее 7% пигмента).

Безмагниевое производное протохлорофиллида – протофеофорбид – в тех же условиях не дает устойчивого, восстановленного по полуизолированным связям, продукта. Его фотовосстановление протекает с обратимым образованием формы, люминесцирующей около 690 нм (рис. 3).

Из этих данных следует, что такие особенности строения протохлорофиллида, как наличие центрального атома магния и свободного пропионовокислого остатка у 7-го атома С, существенны для эффективного восстановления полуизолированных двойных связей пигмента в мицеллярном растворе детергента.

Из наблюдений за кинетикой фотопроцесса очевидно, что образование хлорофиллида связано с промежуточным обратимым восстановлением исходного пигмента. Появление в спектре поглощения реакционной системы при освещении максимумов около 480 и 530 нм позволяет предположить, что механизм упомянутой реакции заключается в последовательном восстановлении 4-пиррольного цикла молекулы протохлорофиллида сначала по системе сопряженных двойных связей с образованием формы, поглощающей около 480 нм [6], и затем по связи 7–8 в IV пиррольном кольце с образованием красной восстановленной формы хлорофиллида (~530 нм), которая при последующем окислении превращается в хлорофиллид. Такая реакция соответствует фотовосстановлению протохлорофилла до хлорофилла в пиридине, исследованному в наших работах [7–9] и работе [10], а также фотовосстановлению Zn-производных порфиринов и Zn-протофеофитина [11–13].

В данной работе максимальный выход образования хлорофиллида (до 20% от исходного пигмента) наблюдался в присутствии 5% пиридина. При уменьшении содержания пиридина до 1% образование хлорофиллида уменьшалось и при полном отсутствии пиридина становилось пренебрежимо малым. Однако использование пиридина без детергента в качестве реакционной среды существенно замедляло скорость реакции и снижало выход хлорофиллида. В спирто-пиридиновой и водно-пиридиновой средах образования хлорофиллида не наблюдалось даже при длительном освещении.

Таким образом, способность протохлорофиллида к восстановлению полуизолированных двойных связей наиболее полно проявляется в мицеллярном растворе детергента. Зависимость процесса от величины pH и концентрации электролитов в среде, т.е. факторов, могущих оказывать влияние на состояние мицелл детергента, приводит к предположению об особой, связанной с этим состоянием, организации протохлорофиллида в мицеллах детергента, которая, возможно, и определяет его фотореакционноспособность. Действительно, спектры поглощения и люминесценции протохлорофиллида в водном растворе тритона X-100 (с концентрацией 0,1–1%) при 20 °C отличаются от спектров протохлорофилла смещением максимумов в длинноволновую область на 4–6 нм, а также несколько бóльшей полушириной (рис. 4). Различие между спектрами флуоресценции протохлорофиллида и протохлорофилла сохраняется при температуре –196 °C, хотя максимумы обоих пигментов в этих условиях испытывают коротковолновое смещение.

При сравнительном изучении фотохимического окисления пигментов в тритоне X-100 кислородом воздуха была обнаружена более высокая скорость окислительной реакции у протохлорофиллида по сравнению с протохлорофиллом.

Изучение феофитинизации показало, что скорость реакции замещения магния на водород у протохлорофиллида во много раз превышает скорость реакции у протохлорофилла (время полупревращений указанных пигментов при pH 3,1 составляет соответственно 30–40 мин и 8,5–9 ч).

Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании специфического взаимодействия молекул протохлорофиллида с мицеллами детергента, которое имеет значение для проявления его фотохимической активности; наряду с этим для фотовосстановления протохлорофиллида до хлорофиллида *a*, вероятно, существенно координационное связывание молекул пигмента с молекулами основания – пиридина.

Исследованная нами система может быть использована как простая функциональная модель протохлорофиллид-голохрома.

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

Поступило
20 I 1983

ЛИТЕРАТУРА

1. *Seliskar C.J., Ke B.* – Biochim. et biophys. acta, 1968, vol. 153, № 3, p. 685–691. 2. *Brouers M.* – Photosynthetica, 1972, vol. 6, 4, p. 415–423. 3. *Griffiths W.T.* – Biochem. J., 1978, vol. 174, № 3, p. 681–692. 4. *Bombart P., Dujardin E.* In: V Intern. congr. on photosynthesis. Abstr. Halkidiki, Greece, 1980, p. 76. 5. *Mapleston R.E., Griffiths W.T.* – Biochem. J., 1980, vol. 189, № 1, p. 125–133. 6. *Красновский А.А., Войновская К.К.* – ДАН, 1949, т. 66, № 4, с. 663–666. 7. *Красновский А.А., Быстрова М.И.* – Биохимия, 1962, т. 27, вып. 5, с. 958–966. 8. *Быстрова М.И., Умрихина А.В., Красновский А.А.* – Там же, 1966, т. 31, вып. 1, с. 83–92. 9. *Красновский А.А., Быстрова М.И., Ланг Ф.* – ДАН, 1970, т. 194, № 6, с. 1441–1444. 10. *Suboch V.P., Losev A.P., Gurinovitch G.P.* – Photochem. Photobiol., 1974, vol. 20, p. 183–190. 11. *Seely G.R., Talmadge K.* – Ibid., 1964, vol. 3, № 3, p. 195–206. 12. *Сидоров А.Н.* – ДАН, 1964, т. 158, № 4, с. 973–976. 13. *Субоч В.П., Лосев А.П., Гуринович Г.П., Севченко А.Н.* – ДАН, 1970, т. 194, № 3, с. 723–726.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 30, вып. 2 1983 г

УДК 581.174 : 58.035

ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛОВОГО КОМПЛЕКСА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЭТИОПЛАСТОВ

Л. М. ВОРОБЬЕВА, И. Г. НАЗАРОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Изучали свойства пигментного комплекса этиопластов из листьев пшеницы с помощью измерения спектров флуоресценции при —196°. Хранение этиопластов в водной среде при комнатной температуре приводит к быстрому превращению фотоактивного протохлорофилла с максимумом флуоресценции 655 нм в неактивную форму с максимумом при 635 нм. Добавление глицерина стабилизирует пигментный комплекс этиопластов. Замораживание — оттаивание в присутствии глицерина не изменяет спектральные и фотохимические свойства, что позволяет хранить этиопласты в жидком азоте. При освещении этиопластов наблюдается фототрансформация протохлорофилла со следующей последовательностью образования максимумов флуоресценции гидрированных продуктов: 679—680→684—687→680 нм. В отличие от этиолированных листьев формы 672—674 нм и 690—695 нм на первых стадиях освещения этиопластов не были обнаружены.

Этиопласты — протохлорофилл — фототрансформация пигментов.

Последовательность стадий превращения протохлорофилловых пигментов в процессе биосинтеза хлорофилла подробно изучена на целых листьях. Однако для исследования биохимических компонентов, включенных в этот процесс, и выяснения механизма отдельных его стадий необходимо разрушение структуры листьев и приготовление препаратов, обладающих свойствами, близкими к этиолированным листьям. Такими препаратами являются этиопласты, которые могут служить хорошей системой для исследования заключительных стадий биосинтеза хлорофилла в растениях.

Нарушение структуры этиолированных листьев растиранием в водной среде [1] или замораживанием — оттаиванием [2] приводит к существенным изменениям спектральных и фотохимических свойств получаемых препаратов. По сравнению с целыми этиолированными листьями уменьшается количество фотоактивного протохлорофилла с максимумом флуоресценции в области 655 нм, возрастает количество протохлорофилла формы 630—635 нм и наблюдается коротковолновый сдвиг максимума флуоресценции пигментов, образующихся при освещении. Добавление в среду для растирания листьев белков, цистеина или глицерина позволило получить препараты этиопластов [3] и протохлорофиллбелковый комплекс [4], обладающие фотоактивной формой протохлорофилла 655 нм.

Было обнаружено благотворное влияние АТФ [5, 6] и НАДФН [3, 7] на устойчивость этиопластов. В присутствии НАДФН в темноте наблюдали переход неактивных пигментных форм 630—635 нм в фотоактивный протохлорофилл 655 нм [7, 8].

В данной работе изучены условия хранения этиопластов, обладающих активной формой протохлорофилла с максимумом флуоресценции 655 нм, и особенности фототрансформации протохлорофилла в этиопластах по сравнению с аналогичными процессами в этиолированных листьях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этиолированные проростки пшеницы сорта Юбилейная выращивали в темноте при 18° на водопроводной воде. Для работы использовали 12—14-дневные растения. Этиопласты получали по методу Гриффитса [9] при 4° на зеленом свету низкой интенсивности. Среда для изоляции содержала: 0,5 М сахарозу, 0,2%-ный бычий сывороточный альбумин, 5 мМ цистеина, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЕДТА, pH 7,2. Для работы использовали этиопласты, суспендированные в среде для изоляции с добавлением различных количеств глицерина.

О структуре пигментного комплекса этиопластов судили по низкотемпературным спектрам флуоресценции (—196°), измеряемым регистрирующим спектрофлуориметром, собранным на основе ФЭУ-79. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутно-кварцевую лампу СВД-120А с светофильтрами ЗС-3 и УФС-2 (линия ртути 365 нм). Характеристикой состояния пигментного комплекса служило соотношение высоты максимумов флуоресценции при 655 и 635 нм в этиопластах до освещения и 675—687, 655 и 635 нм после действия света.

Для освещения использовали лампы накаливания (25, 650 и $1{,}35 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$). Во время освещения при температуре 20° для термостатирования использовали ультратермостат модели U-10. В опытах при температуре 2° образец помещали в лед. Нагревание образцов производили в течение 15 мин на водяной бане.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость активности этиопластов от температурного режима хранения и концентрации глицерина. Получаемые нами этиопласты содержали протохлорофилл, большая часть которого была представлена фотоактивной формой, флуоресцирующей при 655 нм. Стояние этиопластов при 2° в среде для изоляции (рис. 1, *А*) приводило к быстрому перераспределению высоты максимумов в спектре флуоресценции, понижению флуоресценции при 655 нм и возрастанию при 635 нм, т. е. приводило к уменьшению количеств фотоактивной формы пигмента. В качестве соединения, стабилизирующего пигментный комплекс этиопластов, был использован глицерин, применяемый для этих целей и ранее [6, 7].

Была изучена зависимость стабильности спектральных свойств этиопластов от концентрации глицерина. После добавления глицерина образцы выдерживали при 20° или 2°.

Опыты показали, что 10%-ный глицерин уже оказывает заметное стабилизирующее действие на структуру пигментного комплекса этиопластов. Максимальный эффект глицерина достигался при 40—60% его концентрации. В присутствии 50—60% глицерина этиопласты обладали стабильным спектром флуоресценции и не изменяли существенно спектральных свойств при хранении в жидком азоте в течение нескольких месяцев (рис. 1, *Б*), при температуре 2° — в течение 7—10 дней, при 20°— до 2 сут. В последнем случае после 48 ч хранения этиопластов при 20° максимум флуоресценции 655 нм в большинстве опытов оставался более высоким, чем 635 нм (рис. 1, *В*).

Замораживание — оттаивание препаратов этиопластов, содержащих 50—60% глицерина, в отличие от этиолированных листьев [2] не изменяло соотношения максимумов флуоресценции протохлорофилла и способности этого пигмента к фотопревращению. При меньших концентрациях глицерина замораживание этиопластов в жидком азоте и последующее оттаивание их приводило к возрастанию флуоресценции 635 нм и уменьшению максимума 655 нм.

Фототрансформация протохлорофилла. По схеме, предложенной Литвиным с соавт. [10], фотопревращение протохлорофилла в этиолированных листьях идет через две последовательные фотохимические реакции. При этом коротковолновая форма 675 нм на начальных стадиях зеленения образуется на свету низкой интенсивности, форма 684 нм — на свету низкой интенсивности и при низкой температуре [11].

Для понимания особенностей фотопревращения протохлорофиллового пигмента в этиопластах нами было проведено сравнительное исследование этого процесса в этиолированных листьях пшеницы и получен-

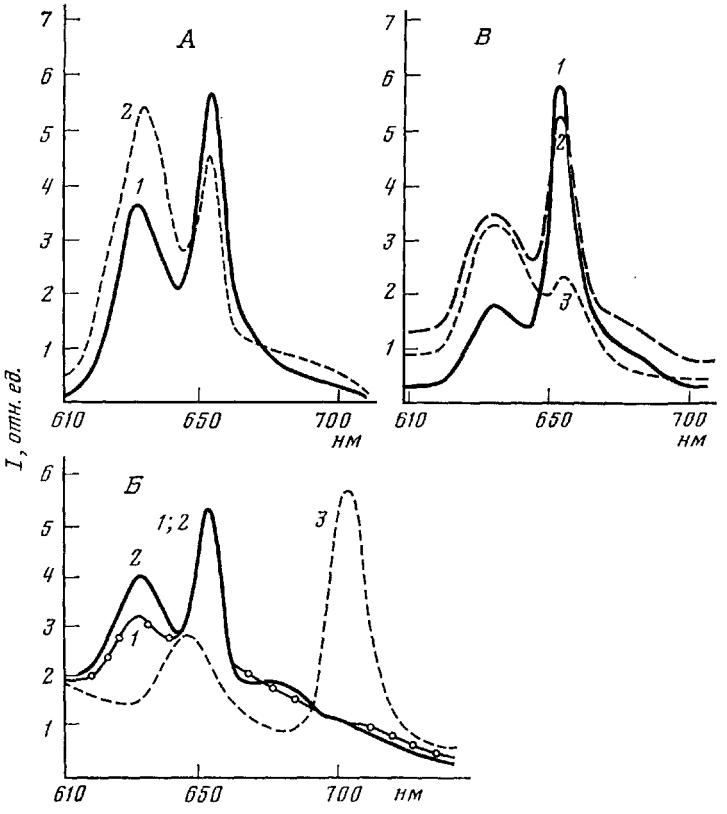


Рис. 1. Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции (—196°) при хранении этиопластов без глицерина (*А*) и в присутствии 50% глицерина (*Б*, *В*) при различной температуре

А — при 2°, *1* — исходные этиопласты, *2*—1 ч стояния; *Б* — при —196°, *1* — исходные этиопласты, *2* — после 12 месяцев хранения, *3*—2-й после 3 мин освещения при 20° (650 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$); *В* — при 20°, *1* — исходные этиопласты, *2*—2 сут хранения, *3*—8 сут хранения

ных из них этиопластах. С целью изучения промежуточных стадий фототрансформации протохлорофилла мы применяли освещение этиопластов светом разной интенсивности при комнатной и пониженной температуре.

Этиолированные листья. При освещении этиолированных листьев первый обнаруживаемый в наших условиях опыта максимум флуоресценции гидрированного продукта был расположен в области 670—680 нм и по мере дальнейшего освещения он смещался в длинноволновую сторону. Так, при использовании света 25 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ освещение в течение 5 с обусловливало образование максимума флуоресценции при 672—674 нм, который смещался до 692—695 нм за 10—15 мин освещения (рис. 2, *А*). При использовании света 650 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ (рис. 2, *Б*) максимум флуоресценции после 5 с освещения располагался при 688 нм и смещался до 692—695 нм за 1 мин. После образования максимума флуоресценции 692—695 нм дальнейшее освещение этиолированных листьев приводило к коротковолновому смещению этого максимума, которое, как указывалось ранее [12], ускоряется светом и зависит от его интенсивности.

Этиопласты. Форма протохлорофиллового пигмента 655 нм является активным компонентом протохлорофилл-белкового комплекса этиолированных листьев, быстро превращающимся под действием света. В соответствии с этим в наших препаратах этиопластов, обладающих высоким максимумом флуоресценции формы 655 нм, наблюдалось ее фотопревращение с образованием продукта хлорофилловой природы (рис. 3).

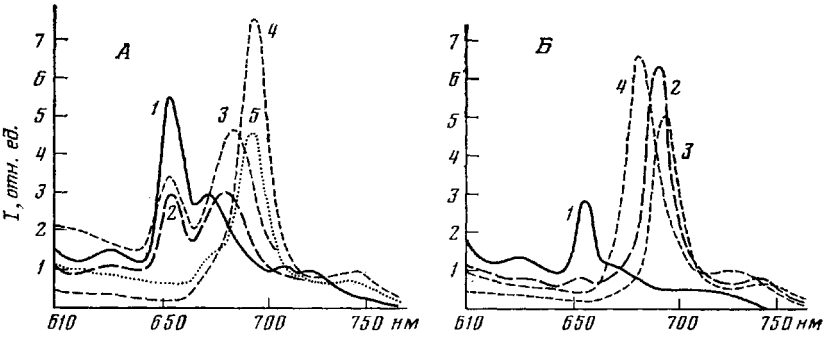


Рис. 2. Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции (—196°) при освещении этиолированных листьев светом 25 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ (*А*) и 650 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ (*Б*) при 20°

А: *1*—5 с, *2*—30 с, *3*—1 мин, *4*—15 мин, *5*—30 мин освещения; *Б*: *1* — неосвещенный лист, *2*—5 с, *3*—1 мин, *4*—30 мин освещения

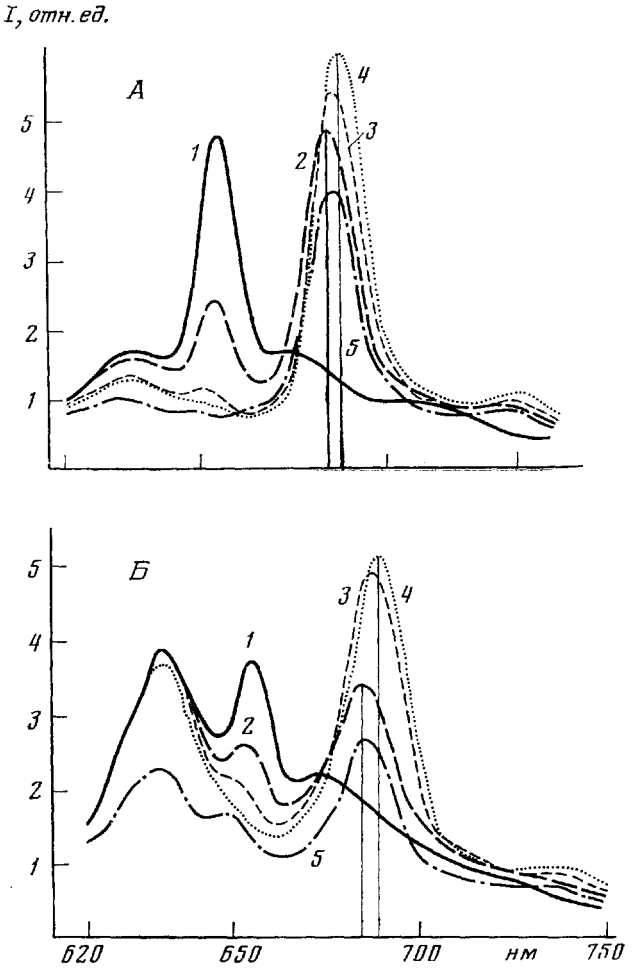


Рис. 3. Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции (—196°) при освещении этиопластов светом 650 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ при +20°

А: 50% глицерина добавлено сразу после получения этиопластов; *Б*: 50% глицерина добавлено через 1,5 ч стояния в темноте при 20°, *1* — до освещения; *2*—5 с, *3*—15 с, *4*—3 мин, *5*—20 мин освещения

Освещение этиопластов в течение 5 с, так же как и в опытах с этиолированными листьями, приводило к образованию коротковолнового максимума хлорофильного пигмента и последующему сдвигу этого максимума в длинноволновую сторону (рис. 3, *А*, *Б*). По мере освещения этиопластов наблюдалось чередование форм хлорофиллида 679—680→684—687→680 нм. Коротковолновых форм 672—675 нм и длинноволновых форм пигмента 690—695 нм, наблюдаемых в этиолированных листьях, мы не смогли обнаружить при освещении этиопластов.

Понижение интенсивности света и температуры при освещении этиопластов (рис. 3 и 4) вызывало торможение скорости фотопревращения протохлорофиллида. Сравнение скорости фотопревращения протохлорофилла в этиопластах, обладающих различными соотношениями максимумов флуоресценции 635 и 655 нм (рис. 4), показало, что короткие (до 5 мин) интервалы освещения этиопластов обусловливали понижение фотоактивной формы протохлорофилла 655 нм, оставляя неизменной высоту коротковолнового максимума флуоресценции. Однако при длительном действии света видно понижение максимума 635 нм, сопровождающееся ростом флуоресценции в области 670 нм. Это явление особенно отчетливо прослеживается при освещении препаратов этиопластов, обладающих соизмеримыми максимумами флуоресценции 635 и 655 нм (рис. 4, *Б*).

Можно полагать, что возрастание флуоресценции 670 нм является следствием фототрансформации протохлорофилла 635 нм. При торможении фотопревращения протохлорофилла 635 нм понижением температуры (рис. 4, *В*) возрастание интенсивности флуоресценции в области 670 нм отсутствовало. Ранее подобное фотопревращение протохлорофилла с образованием коротковолновой формы гидрированного пигмента наблюдалось нами в этиолированных листьях, выдержанных без кислорода и обладающих большими количествами коротковолновой формы протохлорофилла 635 нм [13].

Следует отметить, что необходимым условием фотопревращения протохлорофилла 635 нм в этиолированных листьях, выдержанных в вакууме, и в этиопластах является присутствие в их спектре флуоресценции формы протохлорофилла 655 нм. При полном ее отсутствии коротковолновая форма протохлорофилла на свету не испытывает превращения. Последнее, возможно, связано с торможением промежуточной стадии образования фотоактивной формы протохлорофилла 655 нм из коротковолновой 635 нм под действием света [14].

Опыты показали, что хранение этиопластов в указанных выше условиях не ведет к существенным изменениям стадий фототрансформации протохлорофилла. Однако при освещении этиопластов, хранящихся в жидком азоте в течение 12 месяцев, мы наблюдали образование максимума флуоресценции в длинноволновой области при 705 нм (рис. 1, *Б*). Подобный максимум флуоресценции наблюдался ранее в самом начале освещения этиолированных листьев [15] и приписывался первому промежуточному продукту превращения протохлорофилла.

Действие температуры изучали в интервале 10—90°. Нагревание этиопластов приводило к превращению форм протохлорофилла 655→635 нм и к уменьшению количества пигмента, способного к фототрансформации. Результаты опытов показали замедление скорости нарушающего действия нагревания в присутствии глицерина (рис. 5, *А*, *Б*).

В соответствии со сказанным выше при освещении этиопластов в среде с глицерином после предварительного нагревания образовывались бо́льшие количества хлорофилловых пигментов, чем при нагревании этиопластов без глицерина.

Влияние добавок АТФ, метилвиологена и диурона. Нам не удалось обнаружить благотворного влияния АТФ на стабилизацию состояния

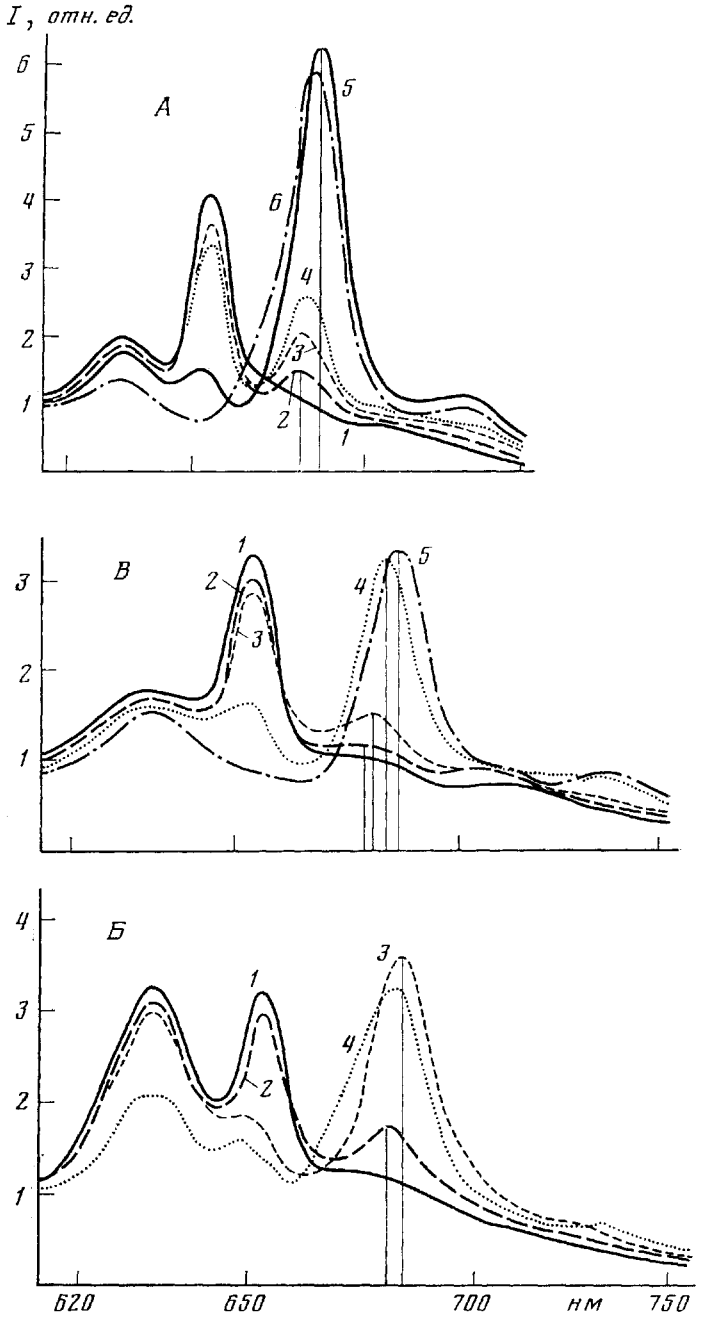


Рис. 4. Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции (—196°) при освещении этиопластов светом 25 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ при 20° (*А*, *Б*) и 2° (*В*)

А — 50% глицерина добавлено сразу после получения этиопластов, *1* — до освещения, *2*—5 с, *3*—15 с, *4*—30 с, *5*—5 мин, *6*—30 мин освещения; *Б* — 50% глицерина добавлено через 1,5 ч стояния в темноте при 20°, *1* — до освещения, *2*—30 с, *3*—5 мин, *4*—30 мин освещения; *В* — 50% глицерина добавлено сразу после получения, *1* — до освещения, *2*—5 с, *3*—30 с, *4*—5 мин, *5*—30 мин освещения

пигмента в этиопластах и его превращения, описанного ранее [6, 7]. Добавление АТФ в отсутствие глицерина вызывало даже более быстрый сдвиг 655→635 нм, чем у исходных этиопластов. В присутствии глицерина добавки АТФ не оказывали никакого видимого эффекта на спектральные свойства пигментов в этиопластах до и после освещения.

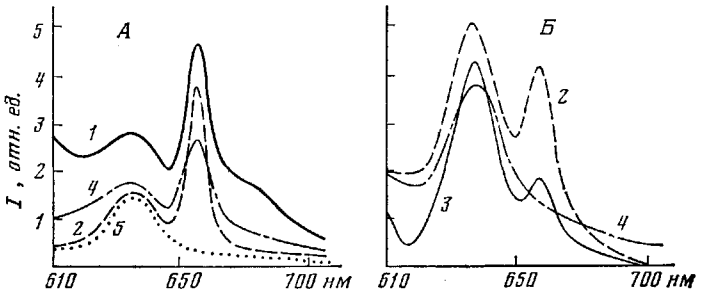


Рис. 5. Изменение низкотемпературных спектров флуоресценции (—196°) при действии нагревания на этиопласты

А — 50% глицерина, *Б* — без глицерина; *1* — исходные этиопласты; нагревание в течение 15 мин: *2* — при 20°, *3* — при 30°, *4* — при 40°, *5* — при 60°

Диурон в концентрации 10^{-5} М и метилвиологен в концентрации 10^{-4} М в наших препаратах этиопластов, содержащих 50—60% глицерина, не изменяли их спектральные свойства и не подавляли фотохимическое превращение.

Итак, в работе описаны условия хранения этиопластов, обладающих активной формой протохлорофиллида (протохлорофилла) и сохраняющих в течение длительного времени стабильные спектральные и фотохимические свойства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Фитольные и бесфитольные формы в листьях и гомогенатах.— Биохимия, 1963, т. 28, вып. 6, с. 524.
2. *Butler W. L., Briggs W. R.* The reaction between structure and pigments during the first stages of proplastid greening.— Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 112, № 1, p. 45.
3. *Griffiths W. T.* Protochlorophyll and protochlorophyllide as precursors for chlorophyll synthesis *in vitro*.— FEBS Letters, 1974, v. 49, № 2, p. 196.
4. *Николаева Л. Ф., Пивоварова Л. В., Казакова А. С., Кононенко А. А.* Получение и свойства пигмент-белкового комплекса (протохлорофиллид-голохрома) из листьев этиолированных проростков кукурузы.— Биохимия, 1981, т. 46, вып. 1, с. 22.
5. *Horton P., Leech R. M.* The effect of ATP on photoconversion of protochlorophyllide into chlorophyllide in isolated ethioplasts.— FEBS Letters, 1972, v. 26, № 1, p. 277.
6. *Horton P., Leech R. M.* The effect of ATP on the photoconversion of protochlorophyllide in isolated etioplasts of Zea mays.— Plant Physiol., 1975, v. 56, № 1, p. 113.
7. *Griffiths W. T.* Source of reducting equivalents for the *in vitro* synthesis of ohlorophyll from protochlorophyll.— FEBS Letters, 1974, v. 46, № 1, p. 301.
8. *Hamouri B. E., Sironval C.* NADP+/NADPH control of the protochlorophyllide-chlorophyllide-proteins in cucurber etioplasts.— Photobiochem. and Photobiophys., 1980, v. 1, № 4, p. 219.
9. *Griffiths W. T.* Some observation on chlorophyll(ide) synthesis by isolated etioplasts.— Biochem. J., 1975, v. 146, № 1, p. 17.
10. *Литвин Ф. Ф., Ефимцев Е. И., Игнатов Н. В., Беляева О. Б.* Доказательство существования двух фотохимических реакций в процессе биосинтеза хлорофилла и исследование переноса электрона между ними.— Физиол. растений, 1976, т. 23, вып. 1, с. 17.
11. *Литвин Ф. Ф.* Моделирование системы агрегированных форм хлорофилла и сопровождающих пигментов в растворах, пленках и мономолекулярных слоях.— В кн.: Биофизика и биохимия фотосинтеза. М.: Наука, 1965, с. 96.
12. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Влияние кислорода на промежуточные стадии образования хлорофилла в этиолированных листьях.— Докл. АН СССР, 1977, т. 232, № 1, с. 225.
13. *Воробьева Л. М., Назарова И. Г., Красновский А. А.* Влияние анаэробиоза на спектральные свойства пигментов этиолированных листьев и их фотопревращения.— Физиол. растений, 1981, т. 28, вып. 4, с. 727.
14. *Раскін В. І.* Механізм фотоаднаўлення протохларафіліду ў інтактных этыялірованых ліццях.— Весці АН БССР. Сер. біял. навук, 1976, № 5, с. 43.
15. *Doben A., Dujardin E., Frank F., Sironval C., Breston J., Roux E.* The first events of protochlorophyll(ide) photoreduction investigated in etiolated leaves by means of fluorescence at room temperature.— Photobiochem. and Photobiophys., 1981, v. 2, № 1—2, p. 35.

Поступила в редакцию
26.VII.1982

PHOTOTRANSFORMATIONS IN THE PROTOCHLOROPHYLL COMPLEX OF ISOLATED ETIOPLASTS AS AFFECTED BY STORAGE CONDITIONS

L. M. VOROBIEVA; I. G. NAZAROVA; A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The properties of the pigment complex of wheat leaf etioplasts were studied by measuring fluorescence spectra at —196°. The storage of etiopasts in water media at room temperature resulted in rapid conversion of photoactive protochlorophyll with a maximum at 655 nm into inactive form with a maximum at 635 nm. Glycerin added stabilized the pigment complex of etioplasts. Freeze-thawing in the presence of glycerin had no effect on spectral and photochemical properties, allowing the storage of etioplasts in liquid nitrogen. Upon etioplast illumination, a photoconversion of protochlorophyll was observed with the following sequence in the formation of fluorescence maxima of hydrogenated products: 679—680→684—687→680 nm. The 672—674 and 690—695 nm forms, found in etiolated leaves, were not observed at the first stages of illumination of etioplasts.

БИОФИЗИКА
Том XXVIII, вып. 3 1983

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

МАГНИТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МАРГАНЦА С АНИОН-РАДИКАЛОМ ФЕОФИТИНА И КАТИОН-РАДИКАЛОМ ХЛОРОФИЛЛА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМЫ II

КУЛИКОВ А. В., БОГАТЫРЕНКО В. Р., ЛИХТЕНШТЕЙН Г. И., АЛЛАХВЕРДИЕВ С. И., КЛИМОВ В. В., ШУВАЛОВ В. А., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Изучено влияние Mn на кривые насыщения спектров ЭПР $Фф^{-}$ и $П_{680}^{+}$ при 15—200 К на препаратах с различным содержанием Mn. На основании совместного анализа полученных результатов и данных по фотоиндуцированным изменениям выхода флуоресценции хлорофилла сделан вывод, что в донорной части фотосистемы II работает кластер из четырех атомов Mn, два из которых могут быть замещены на магний или другой двухвалентный металл. Оценены также расстояния Mn — Фф и Mn — $П_{680}$.

Окисление воды с образованием молекулярного кислорода при фотосинтезе в высших растениях и водорослях протекает с участием марганца (см. обзоры [1—4]). Существуют различные мнения о минимальном количестве Mn, необходимого для фотосинтетического выделения кислорода. Большинство авторов считают, что для работы фотосистемы II (ФС-II) необходимо ~6 атомов Mn на реакционный центр (РЦ), причем две трети его легко экстрагируются с полной инактивацией выделения O_2 [1—4]. Однако в [5] показано, что до 70% Mn может быть удалено из хлоропластов без существенной потери их способности к выделению O_2.

В работе [6, 18] была разработана методика мягкой экстракции практически всего (более 99%) Mn из ФС-II, после которой активность донорного участка ФС-II может быть восстановлена добавлением от одного до четырех ионов Mn^{2+}. До 80% активности, регистрируемой по фотоиндуцированным изменениям выхода флуоресценции хлорофилла, может быть восстановлено добавлением двух ионов Mn вместе с ионами Mg или добавлением четырех ионов Mn без Mg [6, 17, 18]. Выделение из ФС-II Mn-содержащего белка [7] и исследование его спектров ЭПР [8, 9] также указывает на участие двух или четырех атомов Mn в работе ФС-II.

В данной работе изучено магнитное диполь-дипольное взаимодействие Mn с такими компонентами РЦ ФС-II, как промежуточный акцептор электрона, феофитин (Фф) [10—13] и первичный донор электрона, пигмент $П_{680}$ [14—16] (экспериментально исследовалось влияние насыщения спектров ЭПР $Фф^{-}$ и $П_{680}^{+}$ при 15—200 К на препаратах с различным содержанием Mn). Совместный анализ результатов данной работы и работ [6, 17, 18] приводит к выводу, что в донорной части ФС-2 работает кластер из четырех атомов Mn, два из которых могут быть заменены на Mg^{2+} или другой двухвалентный металл. В данной работе оцениваются также расстояния Mn — Фф и Mn — $П_{680}$.

Методика. Обогащение хлоропластов гороха фотосистемой II осуществлялось, как описано ранее [6, 18], с помощью центрифугирования при 20 000 *g* суспензии хлоропластов, обработанных 0,4%-ным дигитонином и (0,05—0,15)%-ным тритоном X-100. Все эксперименты проводились на этих обогащенных частицах, обозначаемых далее, как ДТ-20. Частицы ДТ-20 содержат одну молекулу РЦ на 200—220 молекул хло-

рофилла (Хл) и менее одной молекулы $П_{700}$ на 10 000 молекул Хл [6, 17, 18]. Согласно данным атомно-абсорбционной спектроскопии [6, 17, 18] частицы ДТ-20 содержат $\approx$2 атома Mn на 1 РЦ ФС-II; в отдельных препаратах эта величина достигает 3—4. Частичное удаление Mn из ФС-II (до 0,6—0,7 атома Mn на 1 РЦ) и полное удаление Mn (до менее 0,02 атома Mn на 1 РЦ) проводили, как описано в работе [6, 18].

Для реконструкции ФС-II, из которой Mn был удален полностью или частично, $MnCl_2$ (10^{-8}—10^{-6} М) добавляли при 20° С в суспензию частиц ДТ-20 с концентрацией хлорофилла 10 мкг/мл ($5 \cdot 10^{-8}$ М РЦ), после чего частицы осаждали центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин [6, 18]. Для измерений ЭПР осадок разводили до концентрации Хл 1 мг/мл в буфере *трис*-HCl (0,02 М, pH 8), содержащем 0,035 М NaCl.

Анион-радикал $Фф^-$ получали с помощью освещения частиц ДТ-20 в течение 30 с при 295 К и потенциале среды $\sim$—450 мВ и последующего замораживания образцов в жидком азоте, как описано ранее [11—13]. Об образовании $Фф^-$ судили по характерным отрицательным изменениям выхода флуоресценции хлорофилла $\Delta Ф$ [10—13] и по появлению сигнала ЭПР с g=2,0033 и шириной линии $\approx$1035 А/м между точками максимального наклона [11—13]. При указанных условиях происходит фотонакопление состояния $[П_{680}\ Фф^-]Q^{2-}$ с диамагнитным дважды восстановленным акцептором Q [12, 13].

Катион-радикал $П_{680}^+$ получали освещением частиц ДТ-20 в присутствии 10^{-3} М феррицианида [15] или 10^{-6} М кремниймолибдата [16] в течение $\sim$1 мин при 20° С с замораживанием образца в жидком азоте во время последующих 20—30 с освещения. Концентрация кремниймолибдата была в 1000 раз меньше, чем в [16], так как предварительные измерения показали, что в присутствии 10^{-4}—10^{-3} М кремниймолибдата в частицах ДТ-20 наблюдается обратимое фотовыцветание до 10% Хл, вероятно, связанное с фотоокислением светособирающего пигмента, а не $П_{680}$.

Спектры ЭПР регистрировались на радиоспектрометре ЭПР-3 с частотой модуляции магнитного поля 20 кГц и клистроном мощностью $\approx$600 мВт. Регистрация кривых насыщения спектров ЭПР проводилась, как описано ранее [19, 20]. Максимальная напряженность СВЧ поля H_1 равна 73,2 А/м во вращающейся системе координат. Линейность аттенюатора проверялась регистрацией зависимости амплитуды спектра ЭПР ненасыщающегося образца хлорной меди от H_1; для получения истинных значений необходимо показания аттенюатора умножать на 1,08. При регистрации кривых насыщения использовалась модуляция магнитного поля 239 А/м. В отсутствие насыщения темновой сигнал ЭПР во всех образцах не превышал 25% от светового сигнала. Температуру образца поддерживали с точностью $\pm$0,5 К продуванием холодного газообразного гелия через кварцевую дьюаровскую трубку, вставленную в резонатор.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 изображены кривые насыщения спектров ЭПР $Фф^-$ и $П_{680}^+$ в различных препаратах. Кривые насыщения — зависимости амплитуды сигнала ЭПР от H_1 — характеризуются двумя параметрами H_1^* и H_1^{**} — напряженностями СВЧ-поля, при которых амплитуда сигнала ЭПР равна половине максимальной (см. рис. 1).

В опытах с $ФФ^-$ при 70 К было обнаружено, что частичное удаление Mn из частиц ДТ-20 приводит к уменьшению величины H_1^* до 24,0 дБ[1] по сравнению с 35,0 дБ для исходных частиц. Ошибки в измерении H_1^* составляют $\pm$0,5 дБ; отличия в H_1^* для различных партий частиц могут достигать 2 дБ. Изменение величины H_1^* после частичного удаления Mn можно объяснить магнитным взаимодействием между $Фф^-$ и Mn. Это взаимодействие исчезает, если полностью отмыть Mn

[1] Максимальной величине H_1 соответствует 0 дБ.

или к частично отмытым препаратам добавить $MnCl_2$ (≈ 1 атом Mn на РЦ) — значения H_1^* соответственно равны 35,0 и 26,0 дБ.

На рис. 2 показано влияние $MnCl_2$, добавляемого к полностью отмытым от Mn частицам ДТ-20, на параметр H_1^* для $Ф\phi^-$ и на величину фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла $\Delta\Phi$ (данные по $\Delta\Phi$ взяты из работ [6, 17, 18]). Если к частицам добавляется только $MnCl_2$, величина H_1^* зависит от отношения Mn/РЦ характерным образом (рис. 2, кривая *1*). Измерения величины $\Delta\Phi$ показывают, что в этом случае для реактивации донорной части ФС-II необходимо добавить четыре атома Mn на РЦ (рис. 2, кривая *3*).

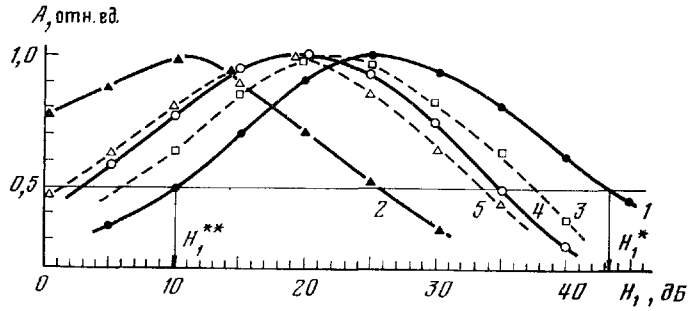


Рис. 1. Кривые насыщения спектров ЭПР $Ф\phi^-$ и $П_{680}^+$ в частицах ДТ-20; *1* — $Ф\phi^-$, исходные частицы, 20 К; *2* — $Ф\phi^-$ после частичного удаления Mn, 50 К; *3* — $П_{680}^+$ после полного удаления Mn, 77 К; *4* — $Ф\phi^-$, исходные частицы, 60 К; *5* — $Ф\phi^-$ после полного удаления Mn, 60 К

Подобную зависимость H_1^* от отношения Mn/РЦ, а также результаты опытов с частично отмытыми частицами можно объяснить магнитным взаимодействием $Ф\phi^-$ с кластером атомов Mn. Наличие двух минимумов на кривой *1* рис. 2 можно объяснить либо магнитным взаимодействием $Ф\phi^-$ с двумя биядерными Mn-содержащими центрами, либо с одним тетраядерным центром. Например, в случае тетраядерного центра последовательное встраивание атомов Mn в ФС-II приводит к образованию состояний РЦ с одним, двумя, тремя или четырьмя атомами Mn. Если атомы Mn находятся в одинаковой степени окисления, состояния с двумя или четырьмя атомами Mn должны быть диамагнитны-

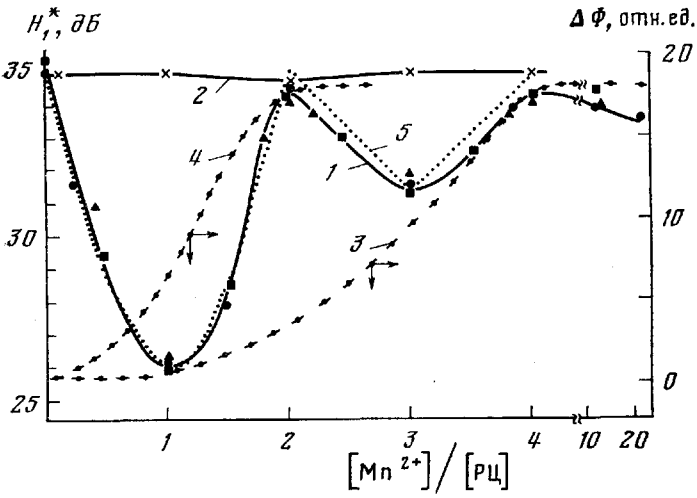


Рис. 2. Зависимости параметра H_1^* при 70 К (*1*, *2*) для $Ф\phi^-$ и величины $\Delta\Phi$ [6, 17, 18] (*3*, *4*) от отношения Mn/РЦ; *5* — теоретическая зависимость параметра H_1^* (см. текст); *1* — результаты трех опытов, *2* и *4* — $MnCl_2$ добавлялся в присутствии $3 \cdot 10^{-6}$ М $MgCl_2$ [17, 18]

ми вследствие спаривания спинов [8, 9]. В нашем случае в присутствии дитионита, добавляемого к ДТ-20 при получении $Фф^-$, Mn должен находиться в форме Mn^{2+}.

Если $MnCl_2$ добавляется к полностью отмытым частицам в присутствии в среде $3\cdot10^{-6}$ М $MgCl_2$ (Mg/РЦ=60), величина H_1^* не изменяется при добавлении Mn (рис. 2, кривая *2*). В то же время измерение величины $\Delta\Phi$ показывает, что ионы Mn^{2+} встраиваются в ФС-II, причем для реактивации необходимо добавить два иона Mn^{2+} на РЦ (рис. 2, кривая *4*). Эти факты можно объяснить тем, что в присутствии $MgCl_2$ ионы Mn^{2+} встраиваются в ФС-II лишь попарно.

Теоретическая зависимость H_1^* от отношения Mn/РЦ (рис. 2, кривая *5*) вычислена на ЭВМ в предположении, что константы связывания Mn с ФС-II велики и различны для всех четырех ионов. В ЭВМ вводились кривая насыщения спектра ЭПР $Фф^-$ в полностью отмытых частицах и экспериментально определенные сдвиги этой кривой при отношениях Mn/РЦ=1 и 3. Сама возможность опытов по титрованию ФС-II ионами Mn^{2+} свидетельствует о большой величине константы связывания Mn^{2+} с активным центром ФС-II, так как известно, что ионы Mn^{2+} неспецифично присоединяются в больших количествах к белкам и мембранам. Воспроизводимость величины H_1^* для частично отмытых препаратов свидетельствует о том, что один атом Mn связан более прочно, чем остальные.

Перейдем к определению расстояния между Mn и $Фф^-$. Согласно [19, 20], для определения расстояния r необходимо из сравнения кривых насыщения спектров ЭПР $Фф^-$ в двух образцах — с взаимодействием и без взаимодействия — вычислить увеличение скорости спин-решеточной релаксации радикала вследствие магнитного взаимодействия между Mn и $Фф^-$, а затем, зная некоторые магнитные параметры Mn, вычислить r. Параметры кривых насыщения H_1^* и $q=H_1^{**}/H_1^*$ и времена спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации для радикалов $Фф^-$ и $П_{680}^+$ приведены ниже (I — исходные частицы ДТ-20, II — частично отмытые от Mn):

Радикал	$Фф^-$						$П_{680}^+$			
T, К	40		77		120		77		100	
Препарат	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
$10^2\cdot H_1^*$, э	1,0	2,9	1,3	4,6	1,6	9,0	0,9	3,3	1,2	5,1
q	55	—	45	—	25	—	45	—	25	—5
T_1, мкс	130	15	90	7,5	110	3,5	190	13,5	200	10,5
T_2, нс	190	—	130	—	50	—	130	—	50	—
$10^{-5}\,\Delta(1/T_1)$, $с^{-1}$	0,6		1,2		2,7		0,7		0,9	

Величины T_1 и T_2 определялись из величин H_1^* и q, как описано в [19, 20]. Для образцов с взаимодействием параметр q невозможно измерить вследствие сильного сдвига кривых насыщения (см., например, рис. 1, кривая *2*). Для этих образцов величина q полагалась равной величине q для образцов без взаимодействия. Это можно делать, если $T_1 \gg T_2$ и взаимодействие сравнительно невелико [20].

Магнитное взаимодействие между Mn и $Фф^-$ может быть обменным или диполь-дипольным. Обменное взаимодействие проявляется лишь на близких расстояниях, и при расстояниях больше 10 Å им можно пренебречь по сравнению с диполь-дипольным. Диполь-дипольное взаимодействие между радикалом и парамагнитным ионом увеличивает скорость спин-решеточной релаксации радикала на величину [19, 20]

$$\Delta\frac{1}{T_1}=\frac{2}{15}\frac{\mu^2\gamma^2}{r^6}\left[\frac{\tau}{1+(\omega-\omega_0)^2\tau^2}+\frac{3\tau}{1+\omega_0^2\tau^2}+\frac{6\tau}{1+(\omega+\omega_0)^2\tau^2}\right], \qquad (1)$$

где μ, τ и ω — магнитный момент, время спин-решеточной релаксации и резонансная частота иона, ω_0 — резонансная частота радикала, γ — электронное гиромагнитное отношение.

Для определения расстояния по формуле (1) необходимо знать ряд параметров. Величина ω_0 равна частоте клистрона $5{,}9\cdot10^{10}$ рад/с (для

длины волны 3,2 см), величину μ для Mn^{2+}, обладающего электронным спином $S=5/2$, можно вычислить по формуле $\mu=2[S(S+1)]^{1/2}\mu_B=5{,}9\ \mu_B$, где μ_B — магнетон Бора. В данной работе не удалось зарегистрировать спектр ЭПР марганца в частично отмытых частицах вследствие низкой концентрации РЦ (1 мг/мл Хл соответствует $5\cdot10^{-6}$ М РЦ), поэтому оценка величин ω и τ по спектру ЭПР невозможна. Однако из литературных данных [21] известно, что для подавляющего большинства соединений Mn^{2+} спектр ЭПР состоит из шести линий с константой СТС $A=7200\pm800$ А/м и $g=2{,}00$. По величинам g и A можно вычислить, что третья и четвертая линии ЭПР Mn^{2+} отстоят от линии $Фф^-$ на величину $\omega-\omega_0=8{,}5\cdot10^8$ рад/с. Оценка τ для Mn^{2+} при 77 К по ширине линии ЭПР [20], а также импульсными методами [22] дает $\tau\sim10^{-9}$ с.

Такая большая величина τ позволяет исключить возможность обменного взаимодействия между Mn и $Фф^-$. Действительно, при такой величине τ по формуле (1) и таблицам, приведенным в [19, 20], можно оценить, что на расстояниях ~10 Å, при которых существенно обменное взаимодействие, диполь-дипольное взаимодействие было бы столь велико, что сдвиг кривой насыщения намного бы превышал экспериментально наблюдаемый.

При указанных величинах ω_0, ω и τ в формуле (1) существен только первый член, причем при наличии СТС в спектре ЭПР Mn^{2+} в случае быстрой релаксации ядер Mn необходимо суммирование по всем шести линиям ЭПР Mn^{2+}:

$$\Delta\frac{1}{T_1}=\frac{2}{15}\frac{\mu^2\gamma^2}{r^6}\sum_{i=1}^{6}\frac{\tau}{1+(\omega_i-\omega_0)^2\tau^2}. \qquad (2)$$

Температурные зависимости H_1^* (рис. 3) позволяют уточнить величину τ. В препаратах с одним ионом Mn^{2+} на РЦ (рис. 3, кривые *2* и *4*) максимум взаимодействия наблюдается при 100—150 К. Согласно формуле (2), зависимость $\Delta(1/T_1)$ от τ имеет максимум при $\tau\approx|\omega_3-\omega_0|^{-1}=1{,}2\cdot10^{-9}$ с. Для этого значения τ из величины $\Delta(1/T_1)=2{,}7\cdot10^5$ $с^{-1}$ при 120 К по формуле (2) можно вычислить расстояние между Mn и $Фф^-$ ($r=29$ Å).

Интересно отметить, что для образца с тремя атомами Mn на 1 РЦ (рис. 3, кривая *5*) максимум взаимодействия достигается при более низких температурах (~60 К), что свидетельствует о более быстрой релаксации Mn. Естественное объяснение этому факту заключается в том, что все три атома Mn находятся в одном кластере.

Величины T_1 для исходных частиц имеют минимум при ~77 К (см. выше); это может быть объяснено взаимодействием $Фф^-$ и $П_{680}^+$ с каким-либо быстро релаксирующим парамагнитным центром.

Результаты опытов с $П_{680}^+$ аналогичны данным для $Фф^-$ (рис. 4). Следует отметить, что, по мнению авторов [4], $П_{680}^+$ можно получить лишь освещением в присутствии кремниймолибдата. В наших опытах не было обнаружено различий в величинах H_1^* для $П_{680}^+$, полученных освещением в присутствии феррицианида и кремниймолибдата (рис. 4). Расчет, аналогичный расчету для $Фф^-$ дает расстояние между Mn и $П_{680}^+$, равное 34 Å.

Приведенная в данной работе оценка расстояния между Mn и Фф представляется более достоверной, чем оценка расстояния между Mn и $П_{680}$. В последнем случае под действием света в присутствии окислителей (феррицианида или кремниймолибдата) Mn может перейти в более окисленное состояние, чем Mn^{2+}. Отличие величин g и A и особенно величины спина S для окисленных состояний Mn от соответствующих величин для Mn^{2+} может уменьшить расстояние между Mn и $П_{680}$, вычисляемое по формуле (2). Следующие рассуждения также свидетельствуют о том, что расстояние между Mn и $П_{680}$, полученное в данной работе, слишком велико. Согласно последним представлениям [3, 4,

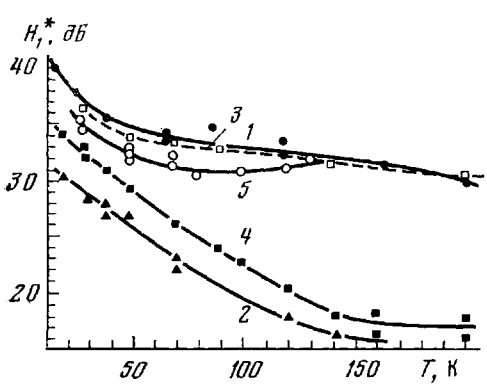


Рис. 3

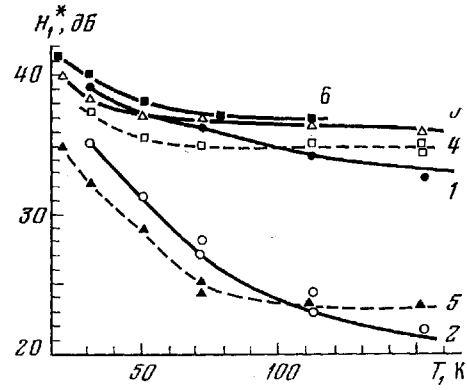


Рис. 4

Рис. 3. Зависимости параметра H_1* от температуры для $Ф\bar{ф}$ в различных препаратах: *1* — исходные частицы ДТ-20, *2* — после частичного удаления Mn, *3* — после полного удаления Mn, *4* и *5* — после добавления $MnCl_2$ к полностью отмытым от Mn частицам при Mn/РЦ=1 и 3 (см. методику)

Рис. 4. Зависимости параметра H_1* от температуры для $П^{+\cdot}_{680}$ в различных препаратах: *1, 4* — исходные частицы ДТ-20; *2, 5* — после частичного удаления Mn; *3* — после добавления Mn к частично отмытым от Mn частицам $MnCl_2$ при Mn/РЦ=1; *6* — после полного удаления Mn; *1, 2, 3* и *6* — $П^{+\cdot}_{680}$ получен освещением в присутствии феррицианида, *4* и *5* — в присутствии кремний-молибдата

10—13], интересующий нас участок цепи переноса электрона в ФС-II имеет вид Y·Д·$П_{680}$·Фф, где Y — Mn-содержащий белок, Д — вторичный донор, причем перенос электрона от Д к $П^{+\cdot}_{680}$ и от Y к $Д^+$ осуществляется за времена $\sim 10^{-5}$ с. Из [23] следует, что для переноса электрона с такими скоростями расстояния Y—Д и Д—$П_{680}$ не должны превышать 12 Å. Таким образом, расстояние Y—$П_{680}$ не должно превышать 24 Å.

Данные по зависимости величин H_1* и ΔФ от отношения Mn/РЦ (рис. 2), а также различие в температурных зависимостях величины H_1* для препаратов с одним и тремя атомами Mn на РЦ (рис. 3) позволяют сделать вывод, что в донорной части ФС-II работает кластер из четырех атомов Mn, два из которых могут быть заменены на магний или другой двухвалентный металл. (Согласно [6, 17, 18], два последних Mn^{2+} могут быть заменены на Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}; вероятно, эти двухвалентные ионы играют структурную роль.)

ЛИТЕРАТУРА

1. *Radmer R., Cheniae G.* In: Primary Processes of Photosynthesis/Ed. by Barber J. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1977, p. 303—349.
2. *Cheniae G.* Methods Enzymol., 1980, v. 69, p. 349.
3. *Vethuys B. R.* Ann. Rev. Plant Physiol., 1980, v. 31, p. 545.
4. *Goldfield M. G., Blumenfeld L. A.* Bul. Magn. Res., 1980, v. 1, p. 66—112.
5. *Mansfield R. W., Nakatani H. J., Barber J., Cammack R.* In: Abstracts of the 5-th International Congress on Photosynthesis. Greece, 1980, p. 258.
6. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Шувалов В. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 4.
7. *Spector M., Winget G. D.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1980, v. 77, p. 957.
8. *Dismukes G. C., Siderer Y.* Ibid., 1981, v. 78, p. 247.
9. *Dismukes G. C., Siderer Y.* FEBS Letters, 1980, v. 121, p. 78.
10. *Klimov V. V., Klevanik A. V., Shuvalov A. A., Krasnovsky A. A.* Ibid., 1977, v. 82, p. 183.
11. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1979, т. 249, с. 485.
12. *Klimov V. V., Dolan E., Ke B.* FEBS Letters, 1980, v. 112, p. 97.
13. *Klimov V. V., Dolan E., Shaw E., Ke B.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1980, v. 77, p. 7227.
14. *Doring G., Render G., Vater J., Witt H. T.* Z. Naturforsch., 1969, B. 246, S. 1139.
15. *Van Gorkom H. J., Pulles P. J., Wessels J. S. C.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 408, p. 331.

16. *Гольдфельд М. Г., Халилов Р. И., Хангулов С. В.* Мол. биол., 1979, т. 13, с. 324.
17. *Аллахвердиев С. И., Клеваник А. В., Климов В. В. и др.* Биофизика, 1983, т. 28, с. 5.
18. *Klimov V. V., Allakhverdiev S. I., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A.* FEBS Letters, 1982, v. 148, p. 307.
19. *Куликов А. В.* Мол. биол., 1976, т. 10, с. 132.
20. *Kulikov A. V., Likhtenstein G. I.* Advances in Molecular Relaxation and Interaction Processes, 1977, v. 10, p. 47—79.
21. *Альштулер С. А., Козырев Б. М.* ЭПР соединений элементов промежуточных групп. М.: Наука, 1972.
22. *Милов А. Д., Салихов К. М., Цветков Ю. Д.* Физ. тв. тела, 1973, т. 15, с. 1187.
23. *Лихтенштейн Г. И., Котельников А. И., Куликов А. В.* Докл. АН СССР, 1981, т. 257, № 3, с. 733.

Институт химической физики АН СССР,
Черноголовка (Московская область);
Институт фотосинтеза АН СССР, Пущино
(Московская область);
Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
17.V.1982

MAGNETIC INTERACTION OF MANGANESE WITH PHEOPHYTIN ANION — RADICAL AND CHLOROPHYLL CATION — RADICAL IN REACTION CENTRES OF PHOTOSYSTEM 2

KULIKOV A. V., BOGATYRENKO V. R., LIKHTENSTEIN G. I., ALLAKHVERDIEV S. I., KLIMOV V. V., SHUVALOV V. A., KRASNOVSKY A. A.

Branch of the Institute of Chemical Physics, Ac. Sci. USSR, Chernogolovka (Moscow region); Institute of Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region); A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

The influence of Mn on saturation curves of ESR spectra of $Ph^{\cdot-}$ and $P^{+\cdot}_{680}$ at 15—200K in samples with different content of Mn has been studied. An analysis of these data and those on photoinduced changes of fluorescence yield of chlorophyll leads to the conclusion that the Mn-containing centre in Photosystem 2 is a cluster of 4 Mn atoms, two of which can be replaced by Mg^{2+} or any other divalent metal. The distances between Mn and Ph as well as between Mn and P_{680} have been estimated.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 30, вып. 5 1983 г.

УДК 581.131 : 581.174.1

ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ В УСЛОВИЯХ ПОДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДВЫДЕЛЯЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

С. В. МАЛЬЦЕВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биологический факультет Московского государственного университета
Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Амперометрическим методом исследовали фотовыделение водорода (H_2) хлоропластами высших растений без введения в систему экзогенной гидрогеназы. При подавлении системы реакций выделения O_2 (выращиванием растений при дефиците марганца, обработкой хлоропластов трис-буфером, гидроксиламином, нагревании и др.) и введении экзогенных доноров электронов наблюдали фотовыделение H_2 хлоропластами с начальными скоростями, близкими к таковым у зеленых одноклеточных водорослей и цианобактерий. Наибольшие скорости фотообразования H_2 регистрировали при использовании хлоропластов, обработанных трис-буфером, и применении аскорбата и *n*-гидрохинона (4,2 мкмоль/мг хл·ч), ТМФД (1,5 мкмоль/мг хл·ч), ДХФИФ (1,2мкмоль/мг хл·ч). На основании полученных результатов сделан вывод о донировании электронов в электронтранспортную цепь хлоропластов при фотообразовании H_2 между системой фотоокисления воды и реакционным центром фотосистемы II.

Хлоропласты — подавление выделения кислорода — доноры электронов — фотообразование водорода.

В предыдущих работах мы исследовали фотовыделение и фотопоглощение молекулярного водорода (H_2) хлоропластами высших растений без введения в систему экзогенной гидрогеназы [1, 2], подтвердив первые наблюдения Е. А. Бойченко [3]. Нами было показано, что хлоропласты высших растений, так же как и зеленые одноклеточные водоросли [4], способны к переходу от выделения O_2 к выделению H_2 в зависимости от интенсивности света. На свету высокой интенсивности (1,0—5,0·10^5 эрг/см^2·с) первоначальное быстрое выделение H_2 сменялось его поглощением с использованием одновременно образующегося O_2 как акцептора электронов.

Полученные ранее результаты указывали на возможное участие фотосистемы (ФС) II и I в фотообразовании H_2 хлоропластами, тогда как в системе с экзогенной гидрогеназой реализуются преимущественно возможности ФС I [5].

В настоящей работе исследовалось фотообразование H_2 в условиях наиболее полного подавления фотовыделения кислорода (участка фотоокисления воды ЭТЦ) при возможном сохранении переноса электронов через ФС II и ФС I и последующей его реактивации путем введения искусственных доноров. В такой системе (донор электрона→ФС II→→ФС I→H_2) можно исключить влияние кислорода на фотообразование H_2 и исследовать механизм процесса при высоких интенсивностях света, что недоступно в экспериментах с необработанными хлоропластами.

Для ингибирования системы реакций выделения кислорода мы использовали известные методы обработки хлоропластов, приводящие к удалению ионов марганца из водоокисляющего комплекса: выращивание растений при дефиците марганца, обработку трис-буфером, гидро-

ксиламином, нагревание, инкубирование хлоропластов, при щелочных значениях pH, а также ингибирование карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном (Cl-CCP) [6].

МЕТОДИКА

Хлоропласты выделяли из листьев двухнедельных проростков гороха сорта Грибовский ранний по описанной ранее методике [1].

Техника термоинактивации. Нагревание хлоропластов проводили в течение 5 мин в темноте. В предварительно термостатированную при заданной температуре среду выделения (70 мМ К-Na-фосфатный буфер, 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 350 мМ маннита, pH 7,0) вводили шприцем плотную суспензию хлоропластов до концентрации хлорофилла около 300 мкг/мл. Инкубационную смесь в стеклянной термостатируемой кювете перемешивали магнитной мешалкой. После 5 мин инкубации смесь охлаждали до 5° и хлоропласты осаждали при 1000 g 10 мин.

Обработка трис-HCl-буфером. В работе [7] было показано, что непротонированная форма трис-HCl-буфера при pH>pK ингибирует ЭТЦ хлоропластов на участке между водой и ФС II, сохраняя их способность к фотовосстановлению НАДФ$^+$ при введении доноров электронов для ФС II и ФС I — *n*-гидрохинона, семикарбазида, восстановленных ДХФИФ и ТМФД и др. Инкубирование хлоропластов в 0,8 М трис-HCl-буфере pH 8,0 10 мин в темноте [7] позволяет ингибировать на 60—70% выделение O_2 в реакции Хилла за счет частичного удаления ионов марганца из водоокисляющего комплекса. Однако освобожденный таким способом во внутритилакоидное пространство марганец способен встраиваться обратно в темноте. Кроме того, время пассивной диффузии ионов марганца через мембрану тилакоида в инкубационную среду составляет более 2,5 ч [8]. Поэтому для более полного подавления фотообразования O_2 время инкубации в 0,8 М трис-HCl pH 8,0 увеличивали до 60 мин в соответствии с [9, 10]. Так как предполагаемой мишенью инактивирующего действия трис-(гидроксиметил)аминометана является S_2-состояние водоокисляющего комплекса [11], инкубирование проводили на свету 4000 лк (лампы ЛБУ-30) при 10°. Концентрация хлорофилла в среде инкубации — 300 мкг/мл. После инкубации хлоропласты осаждали центрифугированием при 2000 g 10 мин.

Обработку гидроксиламином ($NH_2OH \cdot HCl$, 2 мМ, pH 8,0) проводили в темноте, так как обработка на свету, ускоряя подавление фотообразования O_2, снижает способность ФС II фотоокислять искусственные доноры электронов [12].

Щелочную обработку проводили по методике, сходной с [13], в среде, содержащей 350 мМ маннита, 100 мМ KCl, 30 мМ глицин-NaOH-буфер, pH 9,3. После 10 мин инкубации (магнитная мешалка, 10°, темнота) среду нейтрализовали, используя 1 М трицин-NaOH-буфер pH 7,0. Хлоропласты осаждали центрифугированием при 1000 g 10 мин.

Марганецдефицитные растения выращивали методом водной культуры с использованием полной смеси Прянишникова на деионизованной воде с добавлением микроэлементов (в мг/л): FeЭДТА — 1, H_2MoO_4 — 0,25, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,25, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,25, H_3BO_3 — 0,25, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,025, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,001, pH 6,9. Освещенность 15 тыс. лк (лампы ЛБУ-30). Семядоли у марганецдефицитных растений отделяли после 2 сут роста.

Скорость фотовыделения H_2 и O_2 и фотопоглощения H_2 измеряли на описанной ранее амперометрической установке [1]. Интенсивность света (600—800 нм) — $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с. Реакционная среда содержала 30 мМ HEPES-NaOH, 100 мМ KCl, pH 7,0. В работе использовали трис, HEPES, трицин, Cl-CCP, диурон, НАДН, НАДФН, *l*-аксорбат натрия фирмы «Serva», ТМФД·HCl — «Sigma». Остальные реактивы квалификации о. с. ч. или х. ч. 1,5-дифенилкарбазид растворяли в горячем этаноле, *n*-гидрохинон — в этаноле, диурон — в смеси этанол — этиленгликоль (1 : 1 по объему). Концентрация этанола в реакционной смеси не превышала 0,5% и не изменяла результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выращивание растений при дефиците марганца. Исследование влияния дефицита марганца при выращивании зеленых одноклеточных водорослей привело к выводу о том, что при любой степени недостаточности этого элемента угнетается только та часть фотосинтеза, которая ответственна за образование кислорода. Фоторедукция, т. е. активность ФС I у марганецдефицитных водорослей, сохранялась на прежнем уровне в отличие от подавления выделения O_2 [14].

Хлоропласты, изолированные из листьев растений, выращенных в условиях глубокого дефицита марганца, снижали активность выделения кислорода в реакции Хилла с феррицианидом, измеренную в аэробных условиях (30,0 и 9,2 мкмоль O_2/мг хл·ч для хлоропластов контрольных и марганецдефицитных растений соответственно). С другой стороны,

скорость фотообразования H_2 прогретыми (55°, 5 мин) или обработанными трис-буфером хлоропластами марганецдефицитных растений в присутствии экзогенных доноров электронов (гидрохинон+аскорбат, ТМФД+аскорбат±диурон) не превышала 10% от скорости выделения H_2 хлоропластами контрольных растений в тех же условиях. По-видимому, снижение фотовыделения H_2 хлоропластами марганецдефицитных растений гороха связано с разносторонним участием марганца в процессе фотосинтеза, в частности со снижением содержания хлорофилла и резкой дезорганизацией мембранной структуры тилакоидов [15].

Влияние термоинактивации. Выделение кислорода в реакции Хилла с феррицианидом не регистрировалось после прогрева хлоропластов при 50° и выше (рис. 1, *а*, *б*). Фотовыделение H_2 в присутствии *п*-гидрохинона (ГХ), донора электронов для ФС II, не регистрировалось в интервале предварительного прогрева хлоропластов 25—50° и имело максимум

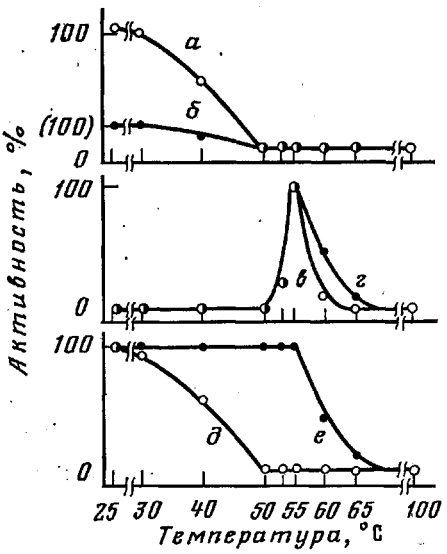


Рис. 1. Термоинактивация фотовыделения кислорода и водорода хлоропластами

а — выделение O_2, воздух, феррицианид — 0,5 мМ; 100% — 30 мкмоль/мг хл·ч; *б* — выделение O_2, аргон, феррицианид — 0,5 мМ; 100% — 6,2 мкмоль/мг хл·ч; *в* — выделение H_2, *п*-гидрохинон — 0,3 мМ, аскорбат — 1 мМ; 100% — 2,3 мкмоль/мг хл·ч; *г* — выделение H_2, ТМФД — 0,1 мМ, аскорбат — 1 мМ; 100% — 1,5 мкмоль/мг хл·ч; *д* — поглощение H_2, водород — 0,2 нмоль/мл; 100% — 0,3 мкмоль/мг хл·ч; *е* — выделение H_2, ТМФД — 0,1 мМ, аскорбат — 1 мМ, диурон — 10 мкМ; 100% — 1,5 мкмоль/мг хл·ч. Свет (600—800 нм) — $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с; температура 25°

при 55° (рис. 1, *в*). Выделение H_2 в присутствии ТМФД+аскорбат происходило после прогрева хлоропластов при 53° (20%) и было максимальным при 55° (рис. 1, *г*).

Кривая термоинактивации поглощения экзогенного H_2 в целом повторяла ход кривой термоинактивации выделения кислорода в реакции Хилла (рис. 1, *д*). Однако обращает на себя внимание значительная разница в максимальных скоростях поглощения экзогенного H_2 (100% активности соответствуют 0,3 мкмоль/мг хл·ч) и выделения H_2 (100% активности в присутствии ТМФД соответствуют 1,5 мкмоль/мг хл·ч). По-видимому, в данных условиях (состав реакционной среды, температура) равновесие фотовыделения H_2 — фотопоглощение H_2 сдвинуто в сторону большей активности выделения водорода.

В интервале предварительного прогрева хлоропластов 25—50° выделение H_2 в присутствии ТМФД+аскорбат не регистрировалось. Введение 10 мкМ диурона приводило к проявлению фотообразования H_2 в присутствии ТМФД в интервале 25—55° (рис. 1, *е*), причем скорость выделения H_2 сохранялась на постоянном уровне — 1,5 мкмоль/мг хл·ч. Предварительный прогрев хлоропластов при 55—65° приводил к резкому подавлению выделения H_2, причем ингибирование выделения H_2 в присутствии ГХ происходило быстрее, чем при использовании ТМФД (10% активности при 60° для ГХ и 10% активности при 65° для ТМФД, рис. 1, *в*, *г*).

Как видно из рис. 1, хлоропласты, прогретые при температуре 50°, не обнаруживали фотовыделения водорода или кислорода. По-видимому, это объясняется состоянием равновесия выделения и поглощения как водорода, так и кислорода. Поэтому при отсутствии доминирования в конкурентной реакции поглощения H_2 или O_2 ни один из одновременно образующихся газов не регистрируется.

Фотообразование H_2 хлоропластами, обработанными трис-буфером. На рис. 2 показано фотообразование H_2 хлоропластами, обработанными трис-буфером. Как видно из рисунка, на свету $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с выделение водорода необработанными хлоропластами не регистрируется.

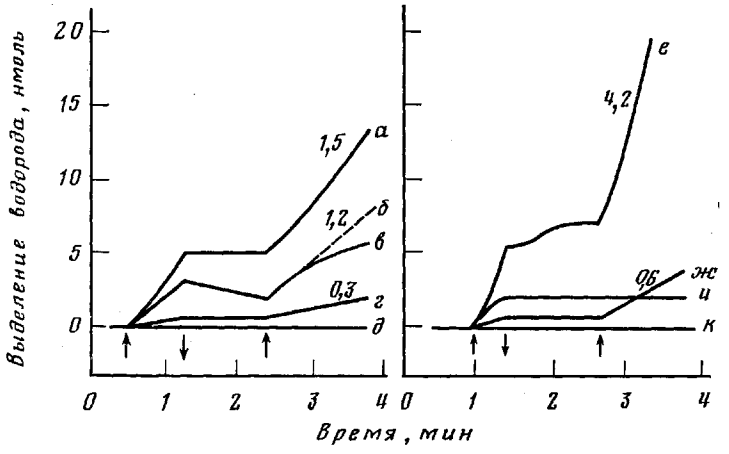


Рис. 2. Фотообразование водорода хлоропластами, обработанными трис-буфером *а* — хлоропласты — 50 мкг/мл хлорофилла, ТМФД — 0,1 мМ, аскорбат — 1 мМ, ±диурон — 10 мкМ; *б* — ДХФИФ — 0,1 мМ, аскорбат — 1 мМ, диурон — 10 мкМ; *в* — как *б*, но без диурона; *г* — 1,5-дифенилкарбазид — 0,5 мМ; *д* — необработанные хлоропласты: *е* — *п*-гидрохинон — 0,3 мМ, аскорбат — 1 мМ; *ж* — аскорбат — 1 мМ; *и* — *п*-гидрохинон — 0,3 мМ; *к* — *п*-гидрохинон — 0,3 мМ, аскорбат — 1 мМ, диурон — 10 мкМ. Свет — $5{,}4 \cdot 10^5$ эрг/см^2·с. Стрелка вверх — включение, вниз — выключение света. Цифры около кривых означают выделение водорода в мкмоль/мг хл·ч

Введение восстановленных аскорбатом доноров электронов — ДХФИФ или ТМФД приводит к слабому выделению H_2, которое подавляется через 1—2 мин освещения. В отличие от этого трис-обработанные хлоропласты в присутствии доноров электронов не обнаруживали подавления в течение времени измерения (до 20 мин).

Скорость фотовыделения H_2 хлоропластами варьировали в зависимости от используемых доноров электронов. ДФК (1,5-дифенилкарбазид) способен служить донором электронов для ФС II хлоропластов, обработанных трис-буфером [16]. Сравнительно низкая скорость фотовыделения H_2 хлоропластами в присутствии ДФК (рис. 2, *г*) связана, по-видимому, с условиями проведения опыта (100 мМ KCl, pH 7,0), так как реакция ДФК→ФС II→ДХФИФ для трис-обработанных хлоропластов имеет оптимум при низких значениях pH и низкой ионной силе реакционной смеси [16]. Нельзя исключить также конкурирующего влияния ДФКО (1,5-дифенилкарбазон) — акцептора ФС I, образующегося при окислении ДФК [17]. Близкие по величине скорости фотовыделения H_2 трис-обработанными хлоропластами (около 0,6 мкмоль/мг хл·ч) были получены при использовании 1 мМ известных доноров электронов для ФС II [18, 19] — аскорбата, KI, NH_2OH, K-ферроцианида и $MnCl_2$. Необходимо отметить, что фотообразование H_2 в присутствии экзогенного $MnCl_2$ подавлялось через 2 мин освещения, по-видимому, за счет реактивации выделения O_2. Трис-обработанные хлоропласты выделяли H_2 на свету в присутствии 1 мМ восстановленных пиридиннуклеотидов—

НАДН и НАДФН со скоростью 0,8 и 0,6 мкмоль/мг хл·ч соответственно. Способность НАДН служить донором электронов для выделения H_2, восстанавливая пластохинон в ЭТЦ, была показана ранее для зеленой водоросли *Chlamydomonas* [20].

Хлоропласты, обработанные трис-буфером, выделяли H_2 на свету в присутствии восстановленных аскорбатом доноров электронов для ФС I — ТМФД и ДХФИФ (1,5 и 1,2 мкмоль/мг хл·ч соответственно, рис. 2, *а*, *б*). В отличие от линейного выделения H_2 в присутствии ТМФД реакция с ДХФИФ прекращалась через 2 мин освещения, по-видимому, из-за конкурентной реакции образования O_2, так как известно, что промывание трис-обработанных хлоропластов шпината в среде с ДХФИФ+ +аскорбат на 100% реактивирует выделение O_2 [8]. В присутствии 10 мкМ диурона подавления фотовыделения H_2 в присутствии $ДХФИФН_2$ не происходило (рис. 2, *б*), что подтверждает способность $ДХФИФН_2$ реактивировать выделение кислорода у трис-обработанных хлоропластов.

Наибольшие скорости фотовыделения H_2 трис-обработанными хлоропластами (до 4,2 мкмоль/мг хл·ч, рис. 2, *е*) наблюдали при использовании в качестве донора электрона *п*-гидрохинона. Хиноны относятся к классу липофильных соединений, хорошо проникающих в мембрану хлоропластов. Так, *п*-бензохинон служит акцептором электронов в реакции Хилла, его восстановленная форма (ГХ) способна специфично донировать электрон в области реакционного центра ФС II. Следует отметить, что в концентрации 10^{-6} М диурон полностью подавляет фотовосстановление $НАДФ^+$ в системе ГХ→ФС II→ФС I→$НАДФ^+$ [21]. Из рис. 2 видно, что фотовыделение H_2 в присутствии ГХ без аскорбата происходит только в первую минуту освещения и подавляется, по-видимому, за счет конкурирующего влияния образующегося окисленного бензохинона. Действительно, введение аскорбата, поддерживающего ГХ в восстановленном состоянии, препятствует подавлению выделения H_2 (рис. 2).

Необходимо отметить, что в отличие от других использованных нами доноров электронов для ФС II и ФС I в случае пары ГХ+аскорбат наблюдается слабое послесветовое выделение H_2 (рис. 2), связанное, вероятно, со способностью хинонов активировать темновое восстановление компонентов ЭТЦ, как это было описано для пары хинон—цитохром *С* [22].

Щелочная обработка. Хлоропласты, обработанные в глицин-NaOH-буфере при pH больше 9,0 снижали активность выделения O_2 в реакции H_2O→ФС II→ДХФИФ, измеренную при pH 7,0. Эффект ингибирования выделения O_2 ускорялся при введении в среду инкубации 10—20 мМ $MgCl_2$ или 100—300 мМ KCl за счет вытеснения ионов марганца, менее прочно связанных с белком в щелочных условиях [13]. О низкой устойчивости системы фотоокисления воды в щелочных условиях свидетельствуют также данные о снижении температуры термоинактивации выделения кислорода от 45 до 33° при pH 6,0—7,4 и pH 8,5 соответственно [23].

Хлоропласты, инкубированные при pH 9,3, не обнаруживали выделения H_2 в присутствии доноров электронов и выделения O_2 в реакции Хилла с феррицианидом в реакционной среде с pH 7,0. По-видимому, инкубирование хлоропластов при высоких значениях pH не обладает специфичным действием на систему фотоокисления воды, но затрагивает другие участки электронтранспортной цепи.

Обработка гидроксиламином. Гидроксиламин представляет собой слабое основание (pK_a=6,04 при 20°) и существует в растворе в протонированной или непротонированной форме (pH>6,3). В работе [12] было показано, что непротонированная форма NH_2OH ответственна за инактивацию выделения O_2 хлоропластами шпината. Хлоропласты, обработанные в темноте NH_2OH (2 мМ), сохраняли способность восста-

навливать метилвиологен (МВ) в реакциях: $NH_2OH \rightarrow$ ФС II$\rightarrow$ФС I$\rightarrow$МВ и ДХФИФH_2+диурон$\rightarrow$ФС I$\rightarrow$МВ. Мы использовали предложенную методику [12] для изучения фотовыделения H_2 хлоропластами в условиях подавления O_2-выделяющей системы. Хлоропласты, инкубированные в среде с 2 мМ $NH_2OH \cdot HCl$, 350 мМ маннита, pH 8,0, 10 мин при 10° в темноте, не выделяли H_2 на свету в присутствии ГХ или ТМФД. Увеличение температуры в среде инкубации до 20—25° (температурный коэффициент процесса инактивации выделения O_2 гидроксиламином — $Q_{10}=2{,}43$ [12]) или увеличение концентрации NH_2OH до 10 мМ также не приводило к выделению H_2 в присутствии доноров электронов, что объясняется, по-видимому, неполным подавлением выделения O_2 в данных условиях. (Остаточная активность выделения O_2 хлоропластами, обработанными гидроксиламином, в реакциях $H_2O \rightarrow$ФС II$\rightarrow$Фц составляла 20—25% [12] и 30—40% в системе $H_2O \rightarrow$ФС II$\rightarrow$ФС I$\rightarrow$МВ [24].)

Ингибирование карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном (Cl-CCP). Известно, что Cl-CCP в концентрациях 10^{-7}—10^{-5} М подавляет фотофосфорилирование, не затрагивая линейный транспорт электронов ($H_2O \rightarrow$ФС II$\rightarrow$ФС I$\rightarrow$НАДФ$^+$). Более высокие концентрации Cl-CCP (10^{-5}—10^{-4} М) ингибируют выделение O_2 в реакции Хилла, сохраняя активность ФС I (ДХФИФ$H_2 \rightarrow$ФС I$\rightarrow$НАДФ$^+$) [6]. Подавление выделения O_2 связывается с действием Cl-CCP на участке фотоокисления воды ЭТЦ хлоропластов [18] за счет дезактивации *S*-состояний водоокисляющего комплекса [25]. Для ингибирования выделения O_2 мы использовали Cl-CCP в концентрациях 10^{-5}—10^{-3} М. В этом диапазоне концентраций хлоропласты выделяли H_2 в присутствии аскорбата с ГХ, ТМФД и ДХФИФ с низкой скоростью (до 10% от скорости выделения H_2 хлоропластами, обработанными трис-буфером); причем через 5—7 мин освещения выделение H_2 прекращалось, по-видимому, в результате реактивации выделения O_2 на свету.

Необходимо отметить, что обработка хлоропластов Cl-CCP, приводящая к значительному снижению активности реакции Хилла, почти не изменяет содержания марганца в хлоропластах в отличие от нагревания, обработки трис-буфером или гидроксиламином [18]. Прямо пропорциональная зависимость скорости реактивации выделения кислорода от интенсивности света в присутствии Cl-CCP показана для зеленых водорослей, способных выделять H_2 [26]. Выделение O_2 хлоропластами шпината в реакции $H_2O \rightarrow$ФС II$\rightarrow$ФС I$\rightarrow$МВ лишь на 10% подавлялось в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М Cl-CCP [24]; более высокие концентрации Cl-CCP обладают деструктивным действием на мембраны [26].

Влияние анаэробных условий. На рис. 1 показано выделение O_2 хлоропластами в реакции Хилла с феррицианидом (Фц) в аэробных и анаэробных условиях. Как видно из рисунка, выделение O_2 хлоропластами при 25° после 3 мин продувки аргоном меньше в 5 раз (рис. 1, *б*), чем в аэробных условиях (воздух, рис. 1, *а*). Создание анаэробных условий методом «раздельного продувания» инертным газом [4], т. е. без барботирования газа через суспензию хлоропластов, позволяет исключить возможность повреждающего действия потока газа на выделение O_2 хлоропластами. Замена аргона на азот той же ступени чистоты не изменяла результатов. Таким образом, снижение скорости выделения O_2 в анаэробных условиях связано не с типом газа или способом его продувания, а с собственно анаэробиозом.

Для зеленых водорослей и хлоропластов шпината снижение выхода O_2 в анаэробных условиях (азот) в сравнении с аэробными связывается с восстановлением пула пластохинонов [27] за счет гидрогеназы [28]. Однако в присутствии Фц, акцептирующего электроны в ЭТЦ на участках пластохинон$\rightarrow$цитохром *f*$\rightarrow$Фц или пластохинон$\rightarrow$цитохром $b_{559}\rightarrow$ $\rightarrow$Фц (в присутствии дибромтимохинона) [29], пул пластохинонов, по-видимому, находится в окисленном состоянии. Поэтому ингибирующее

влияние анаэробных условий на выделение O_2, вероятно, связано с действием анаэробиоза непосредственно на систему фотоокисления воды.

Описанное нами ранее [1] отсутствие стимулирующего влияния хлористого аммония (5 мМ) на скорость фотообразования H_2 свидетельствовало о разобщении транспорта электронов и фотофосфорилирования у хлоропластов, по-видимому, из-за низкого осмотического давления реакционной среды. В работе [30] описано влияние анаэробных условий на восстановление феррицианида частицами хлоропластов шпината и гороха, полученных осмотическим шоком. Эффект снижения скорости фотовосстановления феррицианида частицами хлоропластов гороха в анаэробных условиях зависел от степени сопряжения транспорта электронов с фотофосфорилированием. Разобщенные с помощью 1 мМ NH_4Cl частицы на 70% снижали скорость восстановления Фц в анаэробных условиях и сохраняли лишь 5% исходной активности при повторной замене газовой фазы с азота на воздух.

ОБСУЖДЕНИЕ

Альтернативный характер фотообразования водорода и кислорода и возможность смещения динамического равновесия этих функций путем внешнего воздействия на объект (интенсивностью и качеством света, температурой проведения реакции, добавлением доноров электронов и ингибиторов ЭТЦ) были исследованы у зеленых одноклеточных водорослей [3]. Описанные нами ранее [1, 2] результаты свидетельствовали о сходстве механизмов фотообразования H_2 хлоропластами высших растений и зелеными одноклеточными водорослями.

Среди использованных нами методов обработки хлоропластов, ингибирующих участок фотоокисления воды ЭТЦ и, по-видимому, не влияющих на другие ее звенья и этап формирования водорода, наиболее эффективными были нагревание и обработка трис-буфером. В настоящей работе мы использовали метод реконструкции ЭТЦ хлоропластов, заменив естественный донор электронов (воду) на искусственные доноры, окисление которых не приводит к образованию кислорода (рис. 3).

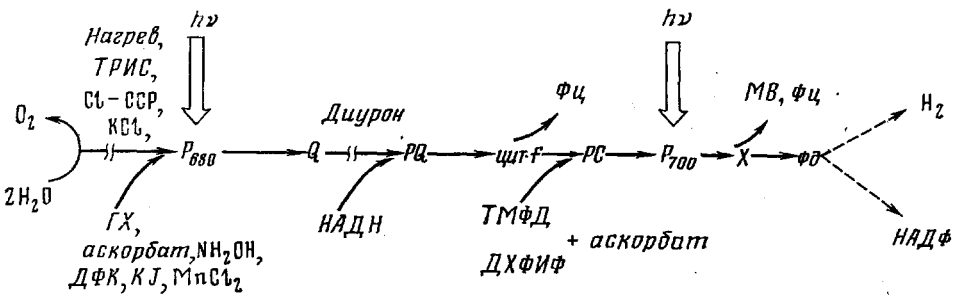


Рис. 3. Схема модификации электронтранспортной цепи хлоропластов

Наибольшие скорости фотообразования H_2 хлоропластами наблюдали при использовании в качестве донора электронов пары *п*-гидрохинон + аскорбат, в присутствии которых для фотообразования H_2 реализуются возможности двух фотосистем (ГХ→ФС II→ФС I→H_2). Максимальные в данных условиях скорости фотообразования H_2 в присутствии ГХ были различны для трис-обработанных и прогретых хлоропластов (4,2 и 2,3 мкмоль/мг хл·ч, рис. 2, *е* и рис. 1, *в* соответственно). С другой стороны, фотообразование H_2 в присутствии ТМФД + аскорбат (т. е. в системе ТМФД + аскорбат→ФС I→H_2) происходило со скоростью 1,5 мкмоль/мг хл·ч, как у прогретых при 55° (рис. 1, *г*), ингибированных диуроном (рис. 1, *е*) или трис-обработанных хлоропластов (рис. 2, *а*).

Следовательно, нагревание (30—55°), как и обработка трис-буфером, не влияет на активность ФС I (ТМФД→ФС I→H_2), но в 2 раза снижает скорость выделения H_2 в системе ГХ→ФС II→ФС I→H_2. По-видимому, нагревание хлоропластов нарушает транспорт электронов между фотосистемами либо снижает доступность донора (ГХ) для ФС II.

Измерения фотообразования H_2 хлоропластами показали, что применение доноров электронов для ФС II приводит к более эффективному выделению водорода (рис. 1, 2). В согласии с этим следует указать, что исследование выделения водорода синхронной культурой *Scenedesmus* привело к выводу об участии в этом процессе двух фотосистем, причем скорость фотообразования H_2 была в 2—3 раза большей при освещении клеток монохроматичным светом с длиной волны 640 нм, поглощаемым преимущественно ФС II, чем при возбуждении ФС I (704 нм) [31].

Таким образом, одним из мест донирования электронов в ЭТЦ при фотообразовании H_2 хлоропластами является участок между системой фотоокисления воды и реакционным центром ФС II. Следует отметить, что мы жестко разграничиваем понятия «участок фотоокисления воды» и «фотосистема II», так как часто термин «фотосистема II» употребляется как синоним системы выделения кислорода. Так, например, ингибирование с помощью диурона выделения кислорода приводит к блокированию и места донирования электронов для фотообразования H_2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у хлоропластов высших растений, так же как и у зеленых водорослей, ингибирование одной из конкурирующих функций (фотовыделение кислорода) при других постоянных внешних условиях приводит к увеличению регистрируемых количеств другой (фотообразование водорода). Необходимо подчеркнуть, что «конкурирующей» с фотовыделением H_2 функцией при высокой интенсивности света является не выделение O_2, а поглощение H_2 с использованием одновременно образующегося O_2 как акцептора электронов.

Описанная нами ранее [1, 2] зависимость скорости поглощения экзогенного H_2 (широкий оптимум при pH 5,5—7,5 и ингибирование при pH>7,5) объясняется, видимо, снижением скорости выделения O_2 (в щелочных условиях), который служит акцептором электронов при поглощении H_2. Кроме того, описанное там же активирующее влияние хлористого калия на фотообразование H_2 связано, вероятно, в большей степени с ингибирующим влиянием ионов калия на выделение O_2, чем с катион-активируемым перераспределением энергии между фотосистемами. Действительно, промывание хлоропластов в среде с 100 мМ KCl приводит к вытеснению двухвалентных катионов (в том числе марганца) из мембран тилакоидов [32], блокируя тем самым участок фотоокисления воды [33]. В соответствии с этим замена хлористого калия на хлористый натрий в среде выделения и реакционной среде при прочих равных условиях приводила к увеличению скорости выделения O_2 в реакции Хилла с феррицианидом (около 250 мкмоль/мг хл·ч в присутствии ионов натрия и лишь 30 мкмоль/мг хл·ч в присутствии ионов калия в аэробных условиях).

Из рассмотренных данных следует, что хлоропласты высших растений способны выделять H_2 без введения в систему экзогенной гидрогеназы. В условиях наиболее полного подавления системы фотоокисления воды и при введении соответствующего донора электронов для ФС II можно наблюдать фотовыделение водорода с начальными скоростями, близкими к таковым у зеленых водорослей и цианобактерий.

Благодарим проф. М. В. Гусева за постоянное внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мальцев С. В., Красновский А. А.* Выделение и поглощение молекулярного водорода изолированными хлоропластами высших растений.— Физиол. растений, 1982, т. 29, вып. 5, с. 951.
2. *Красновский А. А., Мальцев С. В.* Фотовыделение и фотопоглощение водорода хлоропластами без экзогенной гидрогеназы.— Докл. АН СССР, 1982, т. 267, № 2, с. 506.
3. *Бойченко Е. А.* Выделение водорода изолированными хлоропластами.— Докл. АН СССР, 1946, т. 52, № 6, с. 525.
4. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* Исследование выделения водорода при освещении водорослей.— Физиол. растений, 1972, т. 19, вып. 5, с. 1090.
5. *Krasnovsky A. A., Ni C. V., Nikandrov V. V., Brin G. P.* Efficiency of hydrogen photoproduction by chloroplast-bacterial hydrogenase systems.— Plant Physiol., 1980, v. 66, № 5, p. 925.
6. *de Kiewiet D. Y., Hall D. O., Jenner E. L.* Effect of carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazone on the photochemical reactions of isolated chloroplasts.— Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 109, № 1, p. 284.
7. *Yamashita T., Butler W. L.* Photoreduction and photophosporylation with tris-washed chloroplasts.— Plant Physiol., 1968, v. 43, № 12, p. 1978.
8. *Blankenship R. E., Babcock G. T., Sauer K.* Kinetic study of oxygen evolution parameters in tris-washed, reactivated chloroplasts.— Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 387, № 1, p. 165.
9. *Arnon D. I., Tsujimoto H. Y., Tang G. M.-S.* Photoreduction of ferredoxin by chloroplasts with or without an accompanying photoreduction of the bound iron-sulfur centers.— FEBS Letters, 1980, v. 120, № 1, p. 119.
10. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Шувалов В. А., Красновский А. А.* Действие обратимой экстракции марганца на световые реакции препаратов фотосистемы II.— Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 4, с. 1001.
11. *Frasch W. D., Cheniae G. M.* Flash inactivation of oxygen evolution. Identification of S_2 as the target of inactivation by TRIS.— Plant Physiol., 1980, v. 65, № 4, p. 735.
12. *Cheniae G. M., Martin I. F.* Effects of hydroxylamine on photosystem II. 1. Factors affecting the decay of O_2 evolution.— Plant Physiol., 1971, v. 47, № 2, p. 568.
13. *Maison-Peteri B., Vernotte C., Briantais J.-M.* Modifications of the functioning of photosystem II induced in the dark by alcaline pH in the presence of cations.— Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 637, № 2, p. 202.
14. *Kessler E.* Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth.— In: Algal physiology and biochemistry. Botanical monograph. v. 10. Oxford: Blackwell, 1974, p. 456.
15. *Homann P. H.* Studies on the manganese of the chloroplast.— Plant Physiol., 1967, v. 42, № 7, p. 997.
16. *Vernon L. P., Shaw E. R.* Oxydation of 1,5-diphenylcarbazide as a measure of PS2 activity in subchloroplast fragments.— Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1969, v. 36, № 6, p. 878.
17. *Vernon L. P., Shaw E. R.* Diphenylcarbazone: a reagent for PS1 activity in chloroplas fragments.— Plant Physiol., 1972, v. 49, № 5, p. 862.
18. *Kimimura M., Katoh S., Ikegami I., Takamiya A.* Inhibitory site of carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazone in the electron transfer system of the chloroplasts.— Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 234, № 1, p. 92.
19. *Trebst A.* Measurement of Hill reactions and photoreduction.— In: Methods in enzymology, v. 24. Photosynthesis and nitrogen fixation, part B. N. Y.— L.: Acad. Press, 1972, p. 146.
20. *Ben-Amotz A., Gibbs M.* H_2 metabolism in photosynthetic organisms. 2. Light-dependent H_2 evolution by preparations from *Chlamydomonas, Scenedesmus* and spinach.— Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1975, v. 64, № 1, p. 355.
21. *Yamashita T., Butler W. L.* Inhibition of Hill reaction by TRIS and restoration by electron donation to PS2.— Plant Physiol., 1969, v. 44, № 3, p. 435.
22. *Красновский А. А., Михайлова Е. С.* Фотосенсибилизация хлорофиллом превращений цитохрома *С*: активирующее действие хинонов.— Докл. АН СССР, 1974, т. 215, № 3, с. 727.
23. *Weis E.* The influence of metal cations and pH on the heat sensitivity of photosynthetic oxygen evolution and chlorophyll fluorescence in spinach chloroplasts.— Planta, 1982, v. 154, № 1, p. 41.
24. *Sharp R. R., Yocum C. F.* Factors influencing hydroxylamine inactivation of photosynthetic water oxydation.— Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 635, № 1, p. 90.
25. *Renger G., Eckert H. J.* Studies on the functional organization of photosystem II. The effect of protein-modifying procedures and of ADRY agents on the reaction pattern of photosystem II in TRIS-washed chloroplasts.— Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 638, № 1, p. 161.
26. *Kaltwasser H., Stuart T. S., Gaffron H.* Light-dependent hydrogen evolution by *Scenedesmus*.— Planta, 1969, v. 89, № 4, p. 309.
27. *Diner B. A.* Dependence of the deactivation reactions of photosystem 2 on the redox state of plastoquinone pool A varied under anaerobic conditions.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 460, № 2, p. 247.

28. *Бойченко В. А.* Действие аноксии на активность фотосистемы II у хлореллы: роль гидрогеназной системы.— Физиол. растений, 1980, т. 27, вып. 1, с. 42.
29. *Barr R., Melhem R., Lezotte A. L., Crane F. L.* Stimulation of electron transport from photosystem II to photosystem I in spinach chloroplasts.— J. Bioenerg. and Biomembr., 1980, v. 12, № 3—4, p. 197.
30. *King D., Erbes D. L., Gibbs M.* Inhibition of ferrycyanide reduction in chloroplast particles by anaerobicity.— Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1977, v. 78, № 2, p. 734.
31. *Senger H., Bishop N. I.* Observations on the photohydrogen producing activity during the synchronous cell cycle of *Scenedesmus obliquus*.— Planta, 1979, v. 145, № 1, p. 53.
32. *Nakatani H. Y., Barber J., Forrester J. A.* Surface charges on chloroplast membranes as studied by particle electrophoresis.— Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 504, № 1, p. 215.
33. *Shneyour A.* On the site of electron donation to the photosynthetic electron transport chain by 1,5-diphenylcarbazide.— Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1973, v. 51, № 2, p. 391.

Поступила в редакцию
22.XII.1982

PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN BY CHLOROPLASTS ON SUPPRESSION OF OXYGEN-EVOLVING SYSTEM

S. V. MALTSEV, A. A. KRASNOVSKY

M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty;
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The production of hydrogen in higher plant chloroplasts was studied by amperometric method without introducing exogenous hydrogenase into the system. On a suppression of O_2-evolving system (by growing plants under manganese deficit, or by treating chloroplasts with tris-buffer, hydroxylamine or by heating), a production of hydrogen by chloroplasts was observed with initial rates similar to those occuring in green unicellular algae and cyanobacteria. The greatest rates of hydrogen production were registered in chloroplasts treated with tris-buffer, and by using ascorbate and *p*-hydroquinone (4.2 μ mole/mg chl·h) with tetramethyl-*p*-phenylenediamine (1.5 μ mole/mg chl·h) or with dichlorophenol indophenol (1,2 μ mole/mg chl·h). The results have led to the conclusion on a donation of electrons into the electron transport chain during H_2 production in the site between the water photolysis system and photosystem II reaction center.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА ЧАСТИЦАМИ ПЕРВОЙ ФОТОСИСТЕМЫ

НИКАНДРОВ В. В., АРИСТАРХОВ А. И., КРАСНОВСКИЙ А. А.

В последние годы большое внимание уделяется исследованию фотообразования водорода хлоропластами, которые сопряжены с бактериальными гидрогеназами [1]. Наиболее эффективное образование водорода в такой системе было достигнуто при исполь-

Скорости образования водорода и фотовосстановления МВ и МК сенсибилизированного частицами ФС-I (w_i) или хлоропластами (w_i'), мкэкв/мг хлорофилла в 1 ч

Доноры электрона	w_{H_2}	w'_{H_2}	$w_{МВ}$	$w'_{МВ}$	$w_{МК}$	$w'_{МК}$
дитиотреитол	3,9	34,2	0,0	19,7	4,4	35,0
аскорбат	1,7	5,1	0,0	0,0	4,4	55,0
аскорбат+дихлорфенолиндофенол	3,2	2,5	0,0	0,0	65,2	173,2

зовании экзогенных доноров электронов и диурона, т. е. в том случае, когда в реакции участвовала только первая фотосистема хлоропластов [1, 2]. Представляло интерес выяснить возможность использования выделенных из хлоропластов частиц фотосистемы I (ФС-I) для фотосенсибилизации образования водорода.

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков гороха сорта «Победитель» по методу, описанному в [3], и использовали сразу после получения или после хранения в присутствии 10%-ного глицерина в жидком азоте. Частицы ФС-I выделяли после обработки хлоропластов 0,4%-ным дигитонином и 0,05%-ным тритоном X-100 [4]. Для получения препаратов бактериальной гидрогеназы замороженные в жидком азоте клетки Clostridium butyricum 30 мин оттаивали под током аргона, а затем центрифугировали 30 мин при 13 000 g. Супернатант наносили на колонку ДЭАЭ целлюлозы фирмы «Реанал», уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером (pH 6,5). Гидрогеназу отмывали методом ступенчатой элюции при увеличивающихся концентрациях NaCl. Для опыта брали элюируемый при 0,3 М препарат гидрогеназы активности 120 мкл H_2/мл в количестве 0,1 мл.

Выделение водорода определяли газохроматографическим методом [5]. Восстановление метилового красного и метилвиологена определяли по изменению оптической плотности при 460 и 605 нм соответственно. Опыты проводили в анаэробных условиях в трубках Тунберга. Для освещения использовали лампу накаливания 300 Вт, выделяя область 600—800 нм, при интенсивности света $5 \cdot 10^{-3}$ Дж/см^2·с. Реакционная среда содержала: $35 \cdot 10^{-3}$ М NaCl; $2 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$; 0,15 М фосфатный буфер pH 7,0. При определении фотообразования водорода в реакционную среду добавляли 0,1 мл гидрогеназы, а при определении фотовосстановления метилового красного (МК) или метилвиологена (МВ) их концентрация в среде была 10^{-4} М. Во всех опытах концентрацию хлорофилла доводили до 20 мкг/мл. В реакционную среду добавляли: дитиотреитол — $5 \cdot 10^{-2}$ М; аскорбат натрия — $5 \cdot 10^{-2}$ М; дихлорфенолиндофенол — 10^{-4} М.

При освещении суспензии частиц ФС-I, содержащей доноры электронов и препараты гидрогеназы, в анаэробных условиях наблюдается образование молекулярного водорода (см. таблицу), однако скорость реакции оказалась значительно ниже, чем при использовании хлоропластов в аналогичных условиях. Фотосенсибилизированное частицами ФС-I восстановление метилового красного дитиотреитолом или аскорбатом также протекает менее эффективно, чем реакция, сенсибилизированная хлоропластами. Причиной этого может быть низкая эффективность донирования электронов дитиотреитолом и аскорбатом. Липофильный переносчик электронов — дихлорфенолиндофенол — значительно увеличивает эффективность донирования, что видно по увеличению скорости фотовосстановления метилового красного как ФС-I, так и хлоропластами, но в случае фотообразования водорода не оказывает такого действия, по-видимому, из-за способности дихлорфенолиндофенола акцентировать электроны от гидрогеназы и тем самым замыкать цикл.

Показателен эффект действия МВ на скорость образования водорода частицами ФС-I: эту реакцию (на 1—2 порядка) в отличие от хлоропластов или хлорофилла, значительно активирующий, метилвиологен в 2 раза снижает скорость образования водорода в системе, содержащей частицы ФС-I, дитиотреитол и гидрогеназу. Соответственно при использовании частиц ФС-I не наблюдается накопления восстановленного МВ в отличие от хлоропластов, у которых в присутствии диурона стационарная скорость фотовосстановления МВ дитиотреитолом весьма значительна.

Ранее было показано, что всякое нарушение структурной целостности мембран хлоропластов приводит к уменьшению скорости фотовосстановления МВ из-за увеличения циклического транспорта электронов в ФС-I [6]. Можно предположить, что в реакциях, сенсибилизированных частицами ФС-I, не происходит накопления восстановленного МВ по той же причине, т. е. вследствие эффективного «восприятия» электронов активным центром ФС-I (П-700) от восстановленного МВ, так как воздействие детергентами при выделении частиц ФС-I на хлоропласты ведет к разрушению мембран.

Таким образом, частицы ФС-I не способны сенсибилизировать фотообразование водорода так же эффективно, как хлоропласты. Это, по-видимому, связано с тем, что у частиц ФС-I, лишенных естественного переносчика электронов — пластоцианина, не обеспечивается активного притока электронов к П-700. И кроме того, недостаточно сопряжение частиц ФС-I с гидрогеназой, а метилвиологен (эффективно сопрягающий хлоропласты с гидрогеназой) в данном случае приводит лишь к снижению скорости образования водорода из-за циклического транспорта электрона.

Авторы выражают благодарность Г. П. Брин и С. А. Никифоровой за выращивание культуры Cb. butyricum и помощь в получении препаратов очищенной гидрогеназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Photosynthesis in relation to model systems. Ed. by Barber J. Ch. 9, Else, Amsterdam. Elsevier, North-Holland Biomedical Press.
2. *Krasnovsky A. A., Chan Van Ni, Nikandrov V. V., Brin G. P.* Plant Physiol., 1980, v. 66, p. 925.
3. *Walker D. H.* Methods of Enzimol., 1971, v. 23, p. 211.
4. *Шутилова Н. И., Климов В. В., Шувалов В. А., Кутюрин В. М.* Биофизика, 1975, т. 20, с. 844.
5. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* Прикл. биохимия и микробиол., 1974, т. 10, с. 760.
6. *Никандров В. В., Чан Ван Ни, Брин Г. П., Красновский А. А.* Мол. биол., 1978, т. 12, с. 1278.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
31.V.1982

PHOTOSENSITIZED FORMATION OF HYDROGEN BY THE PARTICLES OF PHOTOSYSTEM I

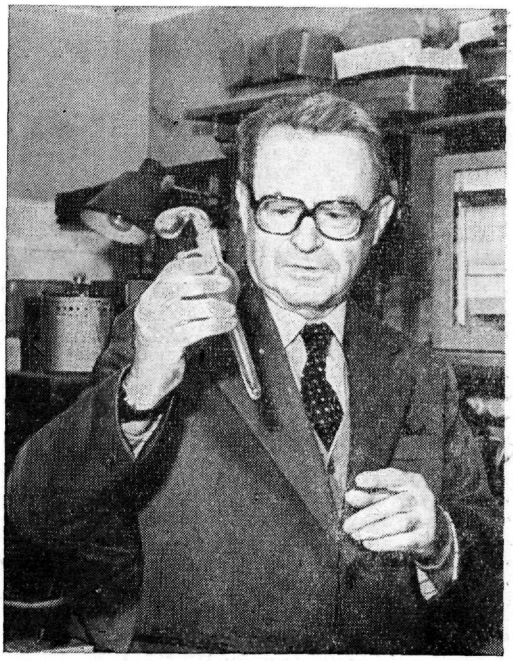
NIKANDROV V. V., ARISTARKHOV A. I., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Photosensitized formation of molecular hydrogen by the particles of chloroplast Photosystem 1 was shown to proceed with the rate up to 4 mkmole H_2 per mg of chlorophyll in an hour in the presence of electron donors and hydrogenase of Clostridium butirycum. Under similar conditions photoformation of hydrogen by chloroplasts is more efficient. When the particles of Photosystem 1 are used in contrast to chloroplasts no accumulation of photoreduced methylviologen is observed. Low efficiency of the particles of Photosystem 1 as sensitizers of hydrogen photoformation and methylviologen photoreduction is explained by an insufficiently active influx of electrons to P 700 and by an increase of the cyclic transport of electrons realized by methylviologen.

Том XXVIII вып. 4 1983

А. А. КРАСНОВСКИЙ
(к 70-летию со дня рождения)



26 августа 1983 г. исполнилось 70 лет академику Александру Абрамовичу Красновскому.

А. А. Красновский — крупный советский ученый, создатель нового направления исследований — фотобиохимии — пограничного между биофизикой, биохимией и фотохимией. Почти 40 лет своей жизни в науке А. А. Красновский работает в Институте биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, куда он был принят в докторантуру по представлению академиков А. Н. Баха и А. Н. Теренина. В 1948 г. он защитил докторскую диссертацию на тему «Исследование фотохимических реакций при фотосинтезе». В 1962 г. он был избран членом-корреспондентом, а в 1976 г.— действительным членом Академии наук СССР.

А. А. Красновским выполнены фундаментальные исследования принципов биологического и фотохимического преобразования солнечной энергии, которые легли в основу современных представлений о механизме первичных процессов фотосинтеза и оказали решающее влияние на дальнейшее развитие работ по фотосинтезу и фотобиологии в СССР. А. А. Красновский открыл принципиально важное свойство возбужденных светом хлорофилловых пигментов — их способность к фотохимическому переносу электрона. Эта реакция, известная в мировой науке как «реакция Красновского», была использована для объяснения механизма функционирования хлорофиллов в реакционных центрах фотосинтезирующих организмов. Обнаружение А. А. Красновским разных форм хлорофилла в листе нашло свое развитие в современных представлениях о фотосистемах, связанных с различным набором пигментов. Принципиальные результаты были получены при выяснении структуры и механизма функционирования реакционных центров — главного звена фотосинтеза: первичное разделение зарядов происходит между хлорофиллом и другим акцептором электрона порфириновой природы (феофитин и др.). А. А. Красновским были предложены оригинальные модели фотосистем, основанные на использовании изолированных пигментов, неорганических фотокатализаторов и ферментов, выделенных из бактериальных клеток. Эти модели привлекают внимание в связи с разработкой проблем биотехнологии. В последние годы научные интересы А. А. Красновского связаны с изучением эволюции фотосинтеза и путей биологического использования солнечной энергии.

Большая исследовательская работа А. А. Красновского сочетается с активной педагогической деятельностью. Почти 30 лет он профессор Московского государственного университета, им создан первый в СССР курс молекулярной фотобиологии. Особое внимание А. А. Красновский уделяет введению в науку талантливой молодежи: он воспитал многочисленную школу учеников и последователей, которые успешно развивают заложенные им направления.

Имя А. А. Красновского и его работы широко известны за рубежом. Он — член иностранных Академий и Научных обществ, много лет участвует в сотрудничестве со странами СЭВ, широко пропагандирует достижения советской науки.

А. А. Красновский ведет большую научно-организационную работу по руководству Научными советами АН СССР, он член редколлегий советских и международных журналов, а с 1977 г.— главный редактор нашего журнала.

Строгая принципиальность, талант научного предвидения, внимание к воспитанию молодежи, присущие Александру Абрамовичу, гармонично дополняются его личным обаянием и доброжелательностью, которые ощущают не только сотрудники, ученики, но и коллеги, работающие в смежных областях науки.

Редколлегия журнала «Биофизика» поздравляет А. А. Красновского и желает ему доброго здоровья и дальнейших творческих успехов.

Юбилеи ученых



ПРЕЗИДЕНТУ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР АКАДЕМИКУ В. А. АМБАРЦУМЯНУ — 75 ЛЕТ

За заслуги в развитии советской науки и в связи с 75-летием со дня рождения президент Академии наук Армянской ССР академик Виктор Амазаспович АМБАРЦУМЯН Указом Президиума Верховного Совета СССР от 16 сентября 1983 г. награжден орденом Октябрьской Революции.

АКАДЕМИКУ А. А. КРАСНОВСКОМУ — 70 ЛЕТ



Указом Президиума Верховного Совета СССР от 25 августа 1983 г. академик Александр Абрамович КРАСНОВСКИЙ за заслуги в развитии биологической науки, подготовке научных кадров и в связи с 70-летием со дня рождения награжден орденом Дружбы народов.

Одному из крупнейших ученых — специалистов в области фотосинтеза и фотобиологии растений А. А. Красновскому принадлежат выдающиеся достижения в изучении процессов первичного преобразования энергии света при фотосинтезе, широко признанные в Советском Союзе и за рубежом. Его работы в этой важной области естествознания создали основу для формирования и развития современных представлений о молекулярных механизмах фотосинтеза и других фотобиологических процессов. Фундаментальный вклад он внес в изучение возбужденных квантом света молекул хлорофилла, его аналогов и производных. Обнаруженное им неизвестное ранее явление — способность возбужденного хлорофилла к переносу электрона и обратимому фотохимическому восстановлению — получило название «реакция Красновского». Это открытие стало основой современного учения о фотохимическом участии хлорофилла в фотосинтезе.

Трудно переоценить значение работ А. А. Красновского по изучению состояния и превращения пигментов в фи-

логенетическом аспекте и в процессе формирования фотосинтетического аппарата у растений. Представления о существовании в растительных организмах различных форм хлорофилла и их функциональных отличиях были выдвинуты ученым задолго до появления общепринятой ныне гипотезы о наличии в растениях двух форм фотореакций, управляемых разными пигментными системами. Много внимания он уделяет эволюции фотосинтеза путем сравнительного изучения пигментного аппарата фотосинтезирующих бактерий, водорослей и высших растений, а также моделирования путей предбиологической эволюции.

Большой цикл исследований А. А. Красновского посвящен биологическому использованию солнечной энергии. Он разработал модельные системы фотообразования водорода, а также выделения и поглощения кислорода, что открывает перспективы для создания принципиально новых фотобиотехнологических процессов.

Плодотворна педагогическая и научно-организационная деятельность А. А. Красновского. Он профессор Московского университета, председатель Научного совета АН СССР по эволюционной биохимии и проблеме возникновения жизни, главный редактор журнала «Биофизика».

Президиум Академии наук СССР направил юбиляру приветственный адрес, где отметил его научные заслуги и выразил пожелания доброго здоровья и новых творческих успехов на благо советской науки.

ЧЛЕНУ-КОРРЕСПОНДЕНТУ АН СССР Л. М. ГАТОВСКОМУ — 80 ЛЕТ



За заслуги в развитии экономической науки, подготовке кадров и в связи с 80-летием со дня рождения член-корреспондент АН СССР Лев Маркович ГАТОВСКИЙ Указом Президиума Верховного Совета СССР от 25 июля 1983 г. награжден орденом Дружбы народов.

Л. М. Гатовский широко известен как крупный ученый-экономист, автор многих капитальных работ по политической экономии, теории и практике народнохозяйственного планирования, экономической и социальной эффективности, экономике научно-технического прогресса. Им дан ряд важных научных разработок проблем хозяйственного механизма, экономического прогнозирования, воспроизводства, военной экономики, развития и взаимодействия производительных сил и производственных отношений, системы экономических законов и практики их использования. Он соавтор и соредактор всех изданий учебника «Политическая экономия», где впервые в литературе дано систематическое изложение политической экономии социализма. За монографию «Экономические законы и строительство коммунизма» ему присуждена Академией наук СССР премия им. Н. Г. Чернышевского.

В приветственном адресе Президиум Академии наук СССР, отметив научные заслуги юбиляра, пожелал ему доброго здоровья, долгих лет жизни, новых творческих успехов.

Том XXVIII вып. 2 1983

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФОТОВОЗБУЖДЕННОГО ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ С МЕТИЛВИОЛОГЕНОМ

УМРИХИНА А. В., БУБЛИЧЕНКО Н. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

При фотохимическом взаимодействии хлорофилловых пигментов с метилвиологеном методом ЭПР установлено образование катион-радикалов бактериохлорофилла *a*, бактериохлорофилла *c*, хлорофилла *a* и протохлорофилла; одновременно с катион-радикалами пигментов образуются радикалы восстановленного акцептора электронов — метилвиологена. Обнаружена возможность агрегации ион-радикалов метилвиологена в условиях высокой концентрации и низких температур. Образование пары ион-радикалов при взаимодействии возбужденного хлорофилла и его аналогов с акцептором электрона, имеющим $E_0 = -0{,}44$ В (значение, близкое к потенциалу ферредоксина), моделирует фотоакт в первой фотосистеме.

Согласно современным представлениям, первичным актом фотосинтеза является реакция возбужденного светом пигмента с акцептором электрона в реакционных центрах (см. обзор [1]). В модельных системах взаимодействие фотосинтетических пигментов с акцепторами электрона типа хинонов хорошо изучено: обнаружены катион-радикалы практически всех пигментов и анион-радикалы акцепторов электрона [2]. В то же время взаимодействие пигментов с акцепторами электрона, имеющими более отрицательный окислительно-восстановительный потенциал (ферредоксин), исследовано недостаточно; такие реакции моделируют фотоакт в фотосистеме I. В модельных системах в качестве аналога ферредоксина широко используется метилвиологен (Мв), обладающий близким к ферредоксину окислительно-восстановительным потенциалом.

Метилвиологен применяли в качестве акцептора электрона при исследовании сенсибилизированных хлорофиллом (Хл) и его аналогами реакций окисления аскорбиновой кислоты [3], пиридиннуклеотидов [4], гидрохинона [5]. Обнаружено фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена цистеином и тиомочевиной в мицеллах детергентов [6], аскорбиновой кислотой в липосомах [7]. При исследовании взаимодействия бактериофеофитина с метилвиологеном спектральными методами показано образование радикальной пары [8]. На возможность одноэлектронного взаимодействия хлорофилла и других пигментов в возбужденном синглетном состоянии с метилвиологеном указывают данные по тушению флюоресценции пигмента этим акцептором [9]. Механизм взаимодействия возбужденного светом пигмента с метилвиологеном изучали также методом импульсной спектроскопии [10, 11].

Однако, несмотря на широкое использование метилвиологена в исследовании механизма первичных процессов фотосинтеза и в модельных системах, прямое взаимодействие фотосинтетических пигментов с метилвиологеном и свойства возникающих в реакции свободных радикалов $Хл^{+\cdot}$ (и других пигментов) и $Мв^{+\cdot}$ методом ЭПР до сих пор не изучены.

Метилвиологен представляет собой двойную галогенную соль 1,1′-диметил-4,4′-дипиридила. Он легко растворим в воде и других поляр-

ных растворителях, содержащих воду, и находится в растворе в форме дикатиона [12]. Присоединение одного электрона в $Мв^{2+}$ приводит к образованию катион-радикала $Мв^{+\cdot}$. Для системы $Мв^{2+}/Мв^{+\cdot}$ значение $E_0 = -0{,}44$ В не зависит от pH в пределах 8÷13 [13]. Полувосстановленная свободнорадикальная форма метилвиологена окрашена в синий цвет, в ее спектре присутствуют два максимума поглощения в видимой области ~400 и ~600 нм; появление синего окрашивания свидетельствует о протекании одноэлектронного окисления — восстановления и соответственно об образовании радикальной пары. Спектр ЭПР $Мв^{+\cdot}$, измеренный в условиях высокого разрешения, характеризуется сверхтонкой структурой из 153 линий, каждая шириной не более 8 А/м [14].

Мы исследовали методом ЭПР фотоокисление бактериохлорофилла *а*, бактериохлорофилла *с* (бактериовиридина), хлорофилла *а* и протохлорофилла метилвиологеном в этаноле. Спектры ЭПР регистрировали на модифицированном радиоспектрометре типа РЭ-1301. Образцы освещали непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра фокусированным светом ксеноновой лампы ДКСШ-250 через светофильтры КС-19, КС-10, ОС-13 для бактериохлорофилла *а*, бактериохлорофилла *с* и хлорофилла *а* и протохлорофилла соответственно.

Действие света на растворы бактериохлорофиллов *а* и *с*, хлорофилла *а*, протохлорофилла с метилвиологеном в этаноле при температуре от —120 до 0° С приводило к возникновению синглетных сигналов ЭПР с $g = 2{,}0025$ и шириной 1035, 875, 676 и 761 А/м для перечисленных пигментов соответственно (рис. 1, *а*). Параметры сигналов ЭПР не менялись при всех исследованных температурах и полностью соответствовали параметрам сигналов ЭПР катион-радикалов пигментов, измеренных в реакциях фотоокисления хлорофилла и его аналогов *п*-бензохиноном и убихиноном [2, 15]. Следовательно, при фотоокислении хлорофилла и его аналогов метилвиологеном в диапазоне температур —120÷÷0° С мы наблюдали образование катион-радикальных форм пигментов.

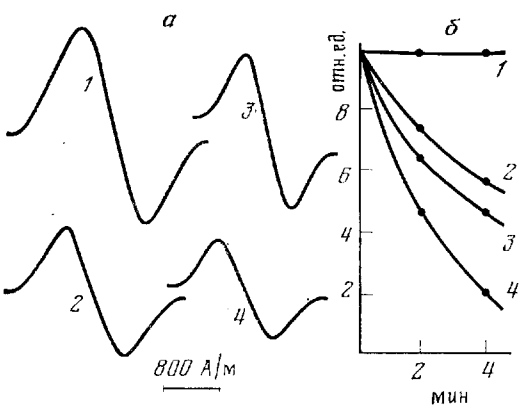


Рис. 1. Фотоиндуцированные сигналы ЭПР (*а*) и кинетика исчезновения их в темноте (*б*) при фотоокислении метилвиологеном (10^{-3} М): *1* — бактериохлорофилл *а*, *2* — бактериохлорофилл *с*, *3* — хлорофилл *а*, *4* — протохлорофилл (10^{-4} М), —100° С, этанол, вакуум

На рис. 1, *б* показана кинетика исчезновения в темноте при —100° С сигналов ЭПР, возникающих при фотоокислении пигментов метилвиологеном. Из рисунка видно, что катион-радикал бактериохлорофилла *а* долго живет в условиях опыта, радикалы бактериохлорофилла *с* и хлорофилла *а* менее стабильны и наименьшей устойчивостью отличается свободнорадикальная форма протохлорофилла. При повышении температуры от —100 до 0° С длительность жизни свободных радикалов пигментов уменьшается. Так, сигнал ЭПР катион-радикала протохлорофилла исчезает после выключения света уже при —90° С. Наибольшей стабильностью при всех температурах характеризуется катион-радикальная форма бактериохлорофилла *а*. По устойчивости катион-радикальных форм пигменты можно расположить в следующий ряд: бактериохлорофилл *а* > бактериохлорофилл *с* > хлорофилл *а* > протохлорофилл.

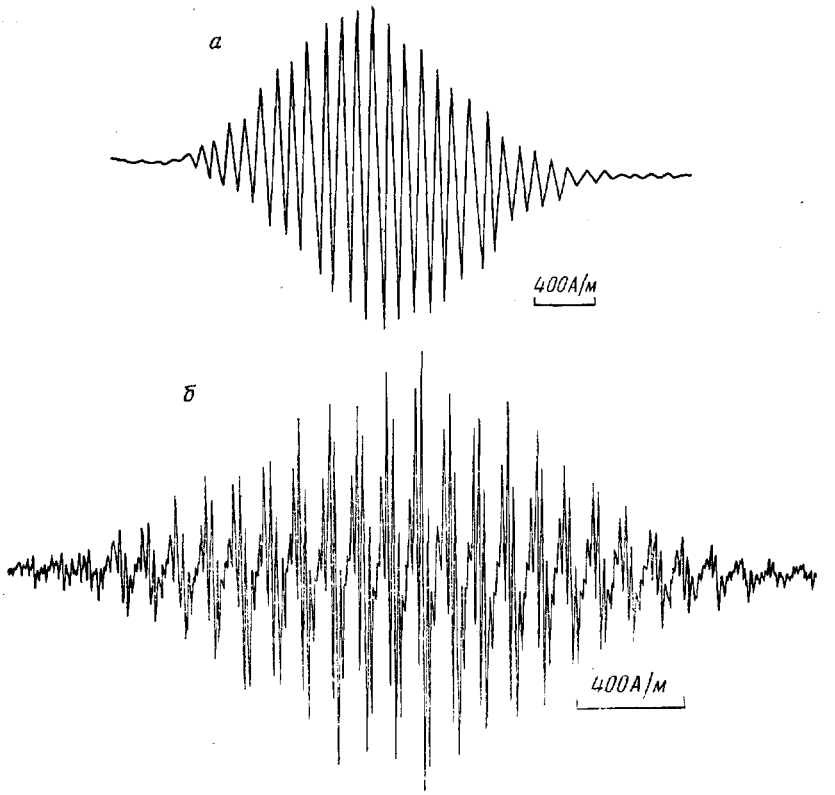


Рис. 2. Спектр ЭПР катион-радикала метилвиологена, измеренный при действии красного света на растворы бактериохлорофилла *с*, хлорофилла *а*, протохлорофилла (10^{-4} М) и метилвиологена (10^{-3} М) в этаноле, а также при действии ультрафиолетового света на растворы метилвиологена в этаноле (10^{-3} М), +20° С, вакуум (*а*); спектр $Мв^{+\cdot}$, измеренный в условиях высокого разрешения на радиоспектрометре фирмы Brucker (*б*)

Таким образом, общая тенденция в изменении стабильности катион-радикалов пигментов с изменением степени восстановленности пигмента в ряду порфин — хлорин — бактериохлорин при использовании метилвиологена в качестве акцептора электрона та же, что и при фотоокислении хлорофилловых пигментов *п*-бензохиноном [2]. Однако следует отметить, что в системе с метилвиологеном катион-радикалы всех пигментов более долго живут по сравнению с системами, включающими другие акцепторы электрона. Так, при фотоокислении протохлорофилла *п*-бензохиноном нам не удалось зарегистрировать сигнал ЭПР катион-радикала этого пигмента [16], тогда как при фотоокислении его метилвиологеном мы наблюдали возникновение катион-радикальной формы протохлорофилла в широком диапазоне температур.

Если растворы хлорофилла и его аналогов с метилвиологеном в этаноле освещали при температуре выше 0° С, то наблюдали сигнал ЭПР катион-радикала метилвиологена со сверхтонкой структурой из ~40 линий (рис. 2, *а*). Исключение составляет система бактериохлорофилл *а* — метилвиологен, для которой даже при положительных температурах характерно появление на свету синглетного сигнала ЭПР катион-радикала бактериохлорофилла *а*, что обусловлено его высокой устойчивостью в широком диапазоне температур [17].

При взаимодействии $Мв^{2+}$ с исследованными нами пигментами как при положительных, так и при отрицательных температурах удается регистрировать только один тип радикала: $Хл^{+\cdot}$ или $Мв^{+\cdot}$, хотя согласно уравнению

$$Хл + Мв^{2+} \overset{h\nu}{\rightleftarrows} Хл^{+\cdot} + Мв^{+\cdot}$$

в реакции образуется два радикала. Следует отметить, что оба радикала несут одноименный заряд. В связи с этим рекомбинация их затруднена. Исчезновение радикалов, по-видимому, может осуществляться в результате реакции диспропорционирования и реакции более глубокого окисления — восстановления образующихся радикалов. Возможность наблюдения радикала $Мв^{+\cdot}$ при положительных температурах определяется нестабильностью пигментных радикалов (за исключением $Бхл^{+\cdot}$) в этих условиях. При низких температурах, когда мы регистрируем только пигментные радикалы, отсутствие в спектре ЭПР сигнала $Мв^{+\cdot}$ может быть обусловлено тем, что сигнал ЭПР катион-радикала $Мв^{+\cdot}$ насыщается по мощности (см. ниже) и не регистрируется.

Для установления того, что в интервале —120÷0° С наблюдается не сигнал катион-радикала метилвиологена, а сигналы катион-радикалов пигментов, мы исследовали изменение структуры сигнала ЭПР катион-радикала метилвиологена, полученного в системе без пигмента, в зависимости от температуры.

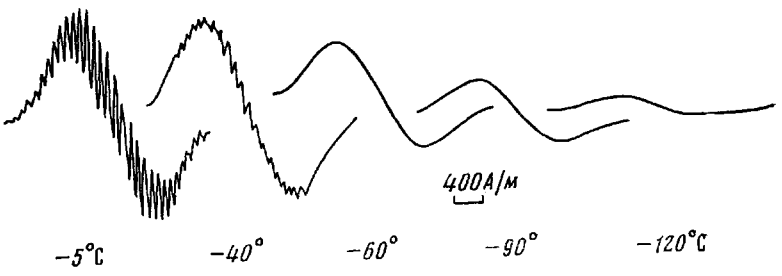


Рис. 3. Изменение структуры фотоиндуцированного ультрафиолетовым светом сигнала ЭПР метилвиологена в зависимости от температуры; 10^{-3} М, этанол, вакуум

Катион-радикал метилвиологена можно получить несколькими способами. В растворах щелочей и органических оснований (пиридин, пиперидин, пирролидин) наблюдается самопроизвольное образование синей, полувосстановленной формы метилвиологена [18], катион-радикал метилвиологена образуется при одноэлектронном восстановлении его дитионитом натрия [19], электрохимически [20], действием ультрафиолетового (или солнечного) света на растворы метилвиологена в воде или этаноле [14]. В последнем случае предполагается, что в образовании катион-радикала метилвиологена принимает участие молекула растворителя — воды или спирта [21].

Мы индуцировали образование катион-радикала метилвиологена, освещая его растворы в этаноле ультрафиолетовым светом. При этом раствор приобретал синюю окраску, обусловленную появлением катион-радикалов метилвиологена. Спектр ЭПР такого раствора при температуре выше 0° С характеризовался сверхтонкой структурой из ~40 линий. Тот же спектр, измеренный в условиях высокого разрешения[1], имел сверхтонкую структуру из ~150 линий (см. рис. 2, *а* и *б*). Для растворов метилвиологена ~10^{-3} М при понижении температуры от 0 до —60° С наблюдалось постепенное сглаживание сверхтонкой структуры до синглетной линии с $g=2{,}0029$ и $\Delta H \sim 1353$ А/м, что гораздо шире, чем для синглетных сигналов ЭПР катион-радикалов пигментов (см. выше); при —120° С наблюдали практически полное исчезновение сигнала ЭПР (рис. 3).

Для растворов метилвиологена ~10^{-2} М было обнаружено исчезновение сверхтонкой структуры при понижении температуры от 0 до —100° С и при температуре ниже —70° С появление узкого синглетного сигнала ЭПР с $\Delta H \sim 80$ А/м и $g=2{,}0029$ (рис. 4, *а*). Повышение темпе-

[1] Спектр измерен на радиоспектрометре фирмы Brucker М. К. Пулатовой, которой авторы выражают глубокую благодарность.

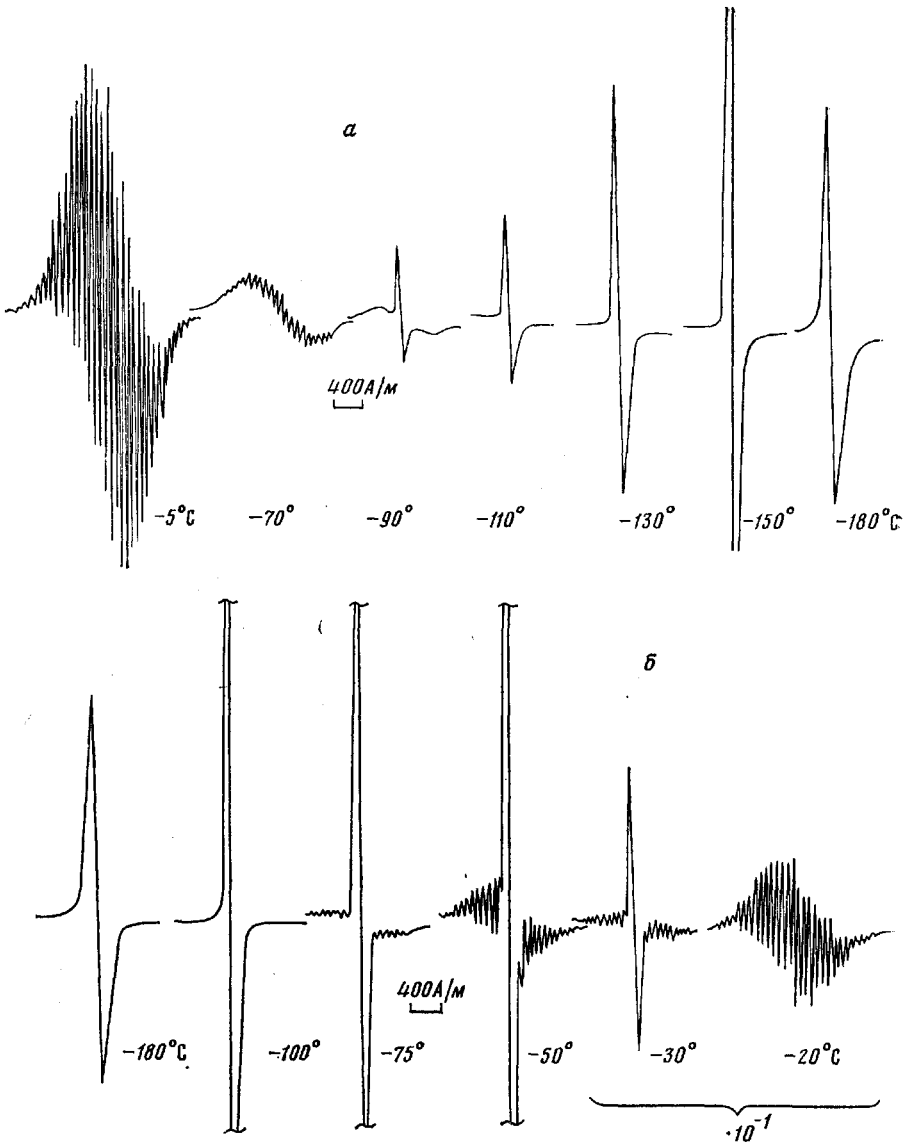


Рис. 4. Изменение структуры фотоиндуцированного ультрафиолетовым светом сигнала ЭПР метилвиологена при понижении (*а*) и при повышении температуры (*б*), 10^{-2} М, этанол, вакуум

ратуры от —180 до —20° С приводило к постепенному появлению сверхтонкой структуры и исчезновению узкого сигнала ЭПР при —20° С (рис. 4, *б*). Исчезновение сверхтонкой структуры и появление узкого синглетного сигнала в спектре ЭПР $Мв^{+\cdot}$ при переходе от положительных температур к отрицательным сопровождается изменением окраски раствора от синей до красно-фиолетовой. Имеется указание, что изменение цвета семихинонной формы метилвиологена может быть связано с переходом молекулы $Мв^{+\cdot}$ в димерное состояние, которое, по-видимому, представляет собой бирадикал [19]. Предполагается существование равновесия: $(Мв^{+\cdot})_2 \rightleftarrows 2Мв^{+\cdot}$. Наши измерения спектров ЭПР свидетельствуют о том, что измененная форма $Мв^{+\cdot}$, окрашенная в красно-фиолетовый цвет и наблюдающаяся при температуре ниже —100° С, также является радикалом. Однако узость линии ЭПР (80 А/м) позволяет предполагать образование не димера, а агрегатов более высокого порядка. Аналогичное сужение линии ЭПР наблюдалось нами [22] и другими авторами [23] при образовании свободнорадикальных состояний в агрегированных формах пигментов.

Таким образом, при фотохимическом взаимодействии пигментов с метилвиологеном происходит образование катион-радикалов пигментов: бактериохлорофилла *a*, бактериохлорофилла *c*, хлорофилла *a*, которые характеризуются синглетными линиями ЭПР с параметрами, сходными с ранее наблюдавшимися для пигментных радикалов in vivo и in vitro. Следует отметить, что сигнал ЭПР катион-радикала протохлорофилла (ΔH=716 А/м, g=2,0025) ранее не был описан. Одновременно с катион-радикалами пигментов образуются свободные радикалы акцептора электронов метилвиологена. В связи с тем что метилвиологен находится в растворе в форме дикатиона, в реакции с пигментом образуется не анион-радикал, как это обычно наблюдается, а катион-радикал акцептора электрона (метилвиологена). Образование при взаимодействии пигментов с метилвиологеном одноименно заряженных ион-радикалов, по-видимому, оказывает влияние на кинетику прямой и обратной реакций. В целом как свободнорадикальные формы пигментов, так и свободные радикалы метилвиологена гораздо более устойчивы по сравнению, например, с аналогичными радикалами в системе пигмент — *n*-бензохинон [2]. На основании полученного экспериментального материала можно прийти к заключению, что механизм взаимодействия фотовозбужденного хлорофилла и его аналогов определяется переносом одного электрона и сопряжен с образованием пары ион-радикалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* Биофизика, 1981, т. 26, № 3, с. 544.
2. *Красновский А. А., Умрихина А. В., Бубличенко Н. В.* В кн.: Спектроскопия фотопревращений в молекулах. Л.: Наука, 1977, с. 106.
3. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1965, т. 163, № 3, с. 761.
4. *Красновский А. А., Брин Г. П., Никандров В. В.* Там же, 1975, т. 220, № 5, с. 1214.
5. *Darwent J. R., Kalyanasundaram K.* Proc. Roy. Soc., L., 1980, v. 379, № 1753, p. 179.
6. *Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967, т. 174, № 1, с. 221.
7. *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.* Там же, 1982, т. 262, № 2, с. 469.
8. *Holten D., Windsor M. W., Parson W. W., Gouterman M.* Photochem. Photobiol., 1978, v. 28, № 6, p. 951.
9. *Красновский А. А., Дроздова Н. Н.* Докл. АН СССР, 1966, т. 167, № 4, с. 928.
10. *Чибисов А. К., Карякин А. В., Евстигнеев В. Б.* Биофизика, 1966, т. 11, с. 983.
11. *Kalyanasundaram K., Porter J.* Proc. Roy. Soc., L., 1978, v. A 364, p. 29.
12. *Михаэлис Л.* Окислительно-восстановительные потенциалы и их физиологическое значение. М.: ОНТИ, Главная редакция хим. лит., 1936, с. 134.
13. *Michaelis L., Hill E. S.* J. General Physiol., 1933, № 6, p. 664.
14. *Bruin F., Heineken F. W., Bruin M., Zahlan A.* J. Chem. Phys., 1962, v. 36, № 7, p. 2783.
15. *Ким В. А., Возняк В. М., Евстигнеев В. Б.* Биофизика, 1974, т. 19, № 6, с. 992.
16. *Бубличенко Н. В., Умрихина А. В., Красновский А. А.* Там же, 1979, т. 24, № 4. с. 588.
17. *Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Бегичев В. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1975, т. 221, № 4, с. 974.
18. *Corwin A. H., Arellan R. R., Chivvis A. B.* Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 162, p. 533.
19. *Kosower E. M., Cotter J. L.* J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 24, p. 5524.
20. *Elobson R. M., Edsbeay R. L.* Canad. J. Chem., 1957, v. 35, № 7, p. 646.
21. *Щеголева И. С.* Химия высоких энергий, 1976, т. 10, № 5, с. 398.
22. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Умрихина А. В.* Докл. АН СССР, 1977, т. 235, № 1, с. 232.
23. *Холмогоров В. Е., Теренин А. Н.* Там же, 1961, т. 137, № 1, с. 199.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва;

Институт фотосинтеза АН СССР, Пущино
(Московская область)

Поступила в редакцию
21.IV.1982

FREE RADICALS DURING INTERACTION OF PHOTOSTIMULATED CHLOROPHYLL AND ITS ANALOGS WITH METHYLVIOLOGEN

UMRIKHINA A. V., BUBLICHENKO N. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow;
Institute of Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region)

It has been found by ESR method that during photochemical interaction between chlorophyll pigments and methylviologen cation-radicals of bacteriochlorophyll *a*, bacteriochlorophyll *c*, chlorophyll a and protochlorophyll are formed. Simultaneously with the cation-radicals of the pigments radicals of a reduced electron acceptor — methylviologen are formed. Possibility of aggregation of methylviologen ion-radicals at high concentration and low temperature was found. Formation of the ion-radical pair when stimulated chlorophyll and its analogs interact with the electron acceptor having $E_0 = -0.44$ v (close to ferredoxin potential) models the photoevents in the Photosystem *1*.

РОЛЬ ЛИПИДОВ В ОРГАНИЗАЦИИ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ИЗ RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

ХОТЧЕНКОВ В. П., ДРОЗДОВА Н. Н., ВЫЧЕГЖАНИНА И. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

При выделении реакционных центров (РЦ) из бактериальных фотосинтетических мембран в некоторых случаях отмечается потеря определенных компонентов комплекса. При выделении РЦ из Rhodospirillum rubrum в присутствии 0,275% лаурилдиметиламиноксида и 0,2 М NaCl происходит потеря тяжелой белковой субъединицы и отмечается уменьшение отношения липид/белок [1]. Выделение РЦ из Rps. sphaeroides на целитовой колонке [2] позволяет получить препарат, в котором остается только одна молекула хинона при уменьшенном отношении липид/белок до 4 молей фосфолипида на моль РЦ. Роль фосфолипидов в организации фотоактивных пигмент-белковых комплексов недостаточно изучена. Большинство авторов считает, что они необходимы для стабилизации комплексов РЦ [1—3]. В связи с этим нами было проведено исследование роли липидов в организации РЦ, выделенных из Rps. viridis.

Выращивание клеток Rps. viridis и выделение из них РЦ проводили по методу [4]. Для литической обработки РЦ использовали проназу Е (Serva) и панкреатическую липазу (Реахим), очищенную по методу [5]. Опыты с проназой проводили в 50 мМ *трис*-HCl-буфере (pH 7,1) при 25° С, а с липазой — 5 мМ *трис*-HCl-буфере (pH 8,1), содержащем 3 мМ $CaCl_2$ при 37° С. Конечные концентрации проназы и липазы были равны 96 и 40 мкг/мл соответственно. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Hitachi EPS3T, а спектры КД — на спектрополяриметре «Jasco 40 AS.». Обратимые фотоиндуцированные изменения поглощения при 960 нм регистрировали на однолучевом, дифференциальном спектрофотометре [6]. Освещение образцов проводили через светофильтр КС-19 в течение 3—5 с. Концентрацию бактериохлорофилла *b* определяли по поглощению при 830 нм, используя $\varepsilon_м = 300 \pm 65$ $мМ^{-1} \cdot см^{-1}$ [4].

При действии панкреатической липазы на РЦ появляется хлорофиллоподобный продукт с максимумом поглощения при 680 нм (рис. 1, *А*), что свидетельствует о разрушении пигмент-белкового комплекса РЦ. В то же время происходит падение поглощения фотоактивных форм Р830 и Р960, сдвиг последней в коротковолновую сторону и появление нового максимума при 785—790 нм, который обусловлен бактериофеофетином *b* [7]. Кроме того, при действии липазы происходит увеличение мутности, связанное с появлением в растворе нерастворимых частиц. Осадок, полученный после центрифугирования, дает положительную реакцию с биуретовым реактивом, что свидетельствует о его белковой природе. Спектры поглощения РЦ после обработки проназой (не показаны) совпадают со спектрами РЦ, обработанных липазой. Отличие между ними в том, что в препаратах с проназой нет образования осадка.

танная по формуле $[\theta]_{222}=3030\ f_н - 2340$ (*8*), уменьшается с 0,52 до 0,18. Кинетика темнового изменения поглощения при 960 нм также меняется при действии липазы

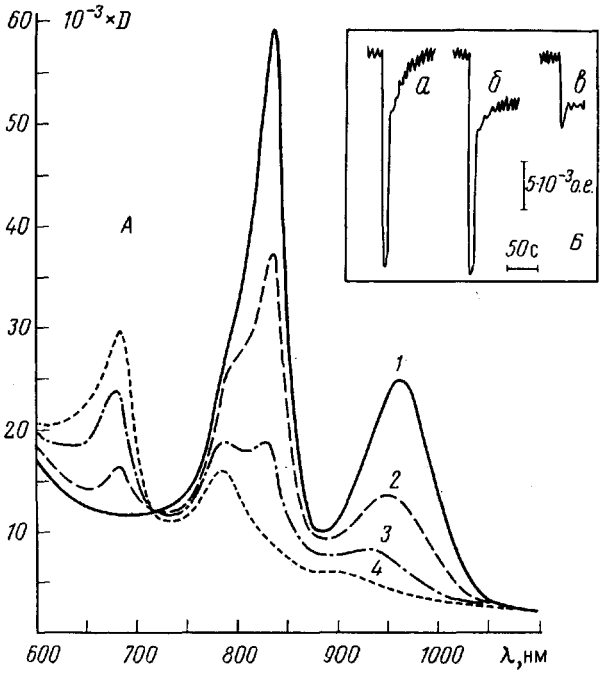


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения (*А*) и обратимое фотоокисление Р960 (*Б*) при действии панкреатической липазы на РЦ; время инкубации: *1* — 0, *2* — 10, *3* — 40, *4* — 90; *а* — 0, *б* — 2,5, *в* — 83 мин

Рис. 2. Спектры КД препарата РЦ до обработки (*1*) и после обработки (*2*) панкреатической липазой; время инкубации: *1* — 0, *2* — 90 мин

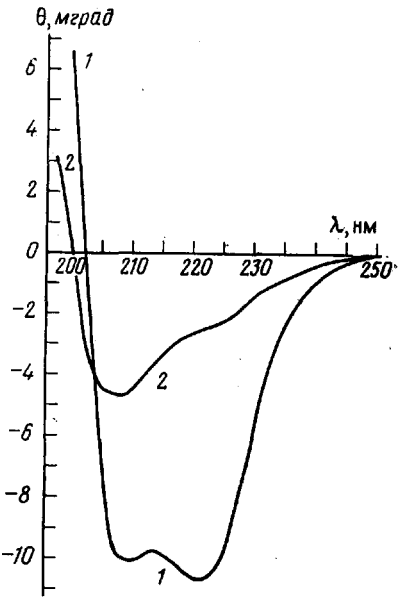


Рис. 2

(рис. 1, *Б*). Уже в первые минуты резко меняется характер медленной компоненты сигнала. Это может быть связано с потерей вторичного хинона при частичном разрушении липидов [2, 3] или с нарушением белковой структуры цитохромного звена b—c_2 — фотосинтетической цепи переноса электрона [9]. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что фосфолипиды играют значительную роль в организации бактериальных РЦ, что выражается в создании ими определенного гидрофобного окружения белковых субъединиц РЦ и, возможно, в связывании хинонов.

1. *Snozzi M., Bachofen R.* Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 546, № 2, p. 236.
2. *Kendall-Tobias M. W., Seibert M.* Arch. Biochem. Biophys., 1982, v. 216, № 1, p. 255.
3. *Kendall-Tobias M. W., Celis A., Crofts A. R.* Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 635, № 3, p. 585.
4. *Clayton R. K., Clayton B. J.* Ibid., 1978, v. 501, № 3, p. 478.
5. *Lagocki J. W., Law J. H., Kezdy F. J.* J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 2, p. 580.
6. *Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Биофизика, 1963, т. 8, № 1, с. 191.
7. *Thornber J. P., Dutton P. L., Fajer J. et al.* In: Proceedings of the Fourth International Congress on Photosynthesis. L., 1977, p. 55.
8. *Chen Y.-H., Yang J. T., Martinez H. M.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 22, p. 4120.
9. *Yu Chang-An, Yu Linda.* Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 639, № 2, p. 99.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
7.I.1983

ROLE OF LIPIDS IN THE ORGANIZATION OF REACTION CENTRE OF RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

KHOTCHENKOV V. P., DROZDOVA N. N., VICHEGZANINA I. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Treatment of the reaction centre (RC) from Rps. viridis with pancreatic lipase brings about marked changes in the absorbance and CD spectra. The complete destruction of RC as observed in the absorbance spectra coincides with the sharp changes in the CD spectra of protein (the ratio of α — helical structure decreases from 0.52 to 0.18). At the same time changes of the kinetics dark reduction of P960 occur. So, phospholipids take part in the molecular organization of bacterial RC.

Photobiochemistry and Photobiophysics, 6 (1983) 101–107
Elsevier

PHO 00216

Titanium dioxide as photocatalyst in hydrogen production

V.V. Nikandrov, G.P. Brin and A.A. Krasnovsky

A.N. Bach Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

Received November 25, 1982
Accepted January 15, 1983

Summary

Photoproduction of hydrogen in aqueous suspensions of titanium dioxide was studied in the presence of organic electron donors. Hydrogen evolved when the following electron donors were used: tris(oxymethyl)aminomethane, triethanolamine, ethanol, glycerol, glucose and EDTA. The quantum yields reached $5 \cdot 10^{-3}$ H_2 molecules per quantum. With cysteine, dithiotreitol, methylamine, and urea no photoproduction of hydrogen was observed, but hydrogen evolved when bacterial hydrogenase was introduced into the system.

The efficiency of hydrogen photoproduction was compared to that of the methylviologen photoreduction sensitized by TiO_2. When electron donors efficient in hydrogen photoproduction were used methylviologen was reduced to the level of the dipyridyl dihydroform, which indicated the generation of a reduction potential up to -0.8 V. If cysteine, dithiothreitol, or methylamine was used as electron donor, methylviologen was reduced only to the level of the blue cation radical ($E_0' = -0.446$ V); in this case hydrogenase was required for hydrogen evolution.

hydrogen production; titanium dioxide; electron donors; hydrogenase; methylviologen

Introduction

The organic semiconductors (TiO_2, ZnO, etc.) are capable to generate an electron and a hole as a result of excitation by a light quantum. When the above mentioned catalysts were used the evolution of oxygen [1] and photoreduction of methylviolo-

0165-8646/83/$03.00 © 1983 Elsevier Science Publishers B.V.

gen [2] were observed. We also observed the photoproduction of hydrogen in aqueous suspensions of TiO_2 and ZnO in the presence of bacterial hydrogenase [3]. There are reports on the photoproduction of H_2 in suspensions of platinized TiO_2 in H_2SO_4 with methanol [4] and in the absence of electron donors [5]. Formation of traces of hydrogen after illumination of a TiO_2 sample with water vapour adsorbed in the absence of catalysts (hydrogenase or platinum) was described [6,7]. In this case the yield of H_2 increased when ferric compounds were introduced into TiO_2 [7] or when RuO_2 and activated carbon were added [8]. Recently, the photoproduction of H_2 has been reported on $SrTiO_3$ crystals in saturated alkali solutions [9].

The aim of the present paper is to study the ability of TiO_2 to photosensitize the evolution of hydrogen in the presence of organic electron donors, the process considered a simple model of photosystem I [11].

Materials and Methods

Dispersion powders of TiO_2 (anatase) were used. Hydrogen evolution was measured with a gas chromatograph [10]. A suspension of 10 mg TiO_2 in 1 ml distilled water was placed in a glass cell, argon-bubbled, stirred, then illuminated with a high-pressure mercury lamp DRSh-250 (Hg lines 334 nm and 365 nm, intensity $5 \cdot 10^4$ erg $\cdot$ cm$^{-2} \cdot$ s^{-1}). During illumination the gaseous phase was periodically transferred from the cell into the column of the gas chromatograph. Methylviologen was photoreduced in the Thunberg glass vacuum tube (optical path 0.4 cm); in most experiments a sample of 4 mg TiO_2 in 5 ml of distilled water was illuminated in vacuum with 365 nm mercury line ($2 \cdot 10^4$ erg $\cdot$ cm$^{-2} \cdot$ s^{-1}). During illumination the vacuum tube was placed into the Ulbricht sphere of a SF-10 spectrometer and absorbance at 605 nm was measured. Light intensity was recorded by means of ferrioxalate actinometry. Hydrogenase was isolated from phototrophic bacteria (*Thiocapsa roseopersicina* or *Clostridium butyricum*).

Results

Hydrogen photoproduction in the system: TiO_2–electron donor

As electron donors organic compounds not coagulating TiO_2 suspension in water were employed. The maximum quantum yields of hydrogen photoproduction in TiO_2 suspensions with certain electron donors are presented in Table I. The most efficient electron donors found were tris(oxymethyl)aminomethane (Tris), ethanolamine, triethanolamine, glucose, and glycerol. Evolution of hydrogen was not obtained when methylamine, diethylamine, thiazineamine, urea or thiourea were applied. Cysteine and dithiothreitol were also inefficient, though in the case of H_2 photoproduction sensitized by chlorophyll or chloroplasts in the presence of hydrogenase they were effective electron donors [12]. In the control experiment where the organic compounds were illuminated without TiO_2 no hydrogen evolution was observed.

TABLE I

QUANTUM YIELDS OF HYDROGEN PHOTOPRODUCTION AND METHYLVIOLOGEN PHOTOREDUCTION ON TiO_2

Electron donors (0.1 M)	Molecule/quantum × 100		
	Evolution of hydrogen	Reduction of methylviologen	
		to cation radical	to dihydrodipyridyl
1 Tris(oxymethyl)-aminomethane	0.50	10.1	0.29
2 Triethanolamine	0.05	5.4	0.05
3 Ethanolamine	0.10	2.3	0.04
4 Methylamine	0	0.8	0
5 Glycerol	0.08	3.8	0.03
6 Glucose	0.06	1.2	0.01
7 Ethanol, 10%	0.03	–	–
8 EDTA·NH_4	0.03	0.05	0.01
9 Glycine	0.01	1.5	0.03
10 Cysteine	0	0.8	0
11 Dithiothreitol	0	1.9	0
12 Control	0	0.3	0

Fig. 1 shows the dependence of the illumination time upon the rate of hydrogen photoproduction in the presence of Tris or glycerol (curves 1 and 2). The primary increase in the rate of hydrogen evolution may be attributed to the reduction of the residual traces of oxygen dissolved or adsorbed on TiO_2. Upon a prolonged illumination a decrease in the rate of hydrogen evolution was observed with all electron donors used. In the presence of the electron donors efficient in hydrogen evolution after a prolonged illumination of TiO_2 the suspension darkened. However, if air was subsequently bubbled through the cell the original color of the sample was

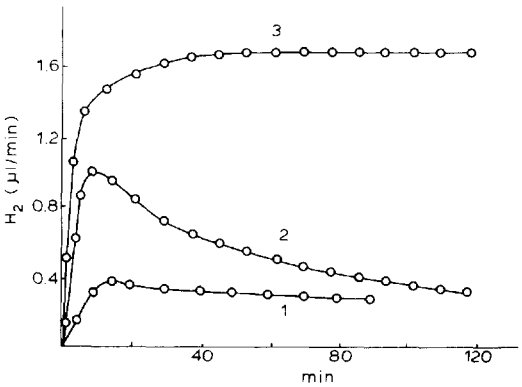


Fig. 1. The rate of hydrogen photoproduction by TiO_2 as dependent on illumination time in the presence of 0.1 M tris(oxymethyl)aminomethane (1); 1.0 M glycerol (2); 0.1 M cysteine; $5 \cdot 10^{-4}$ M methylviologen and 0.1 ml hydrogenase with the activity of 50 μl H_2/ml per min (3).

restored. Under further bubbling of argon and subsequent illumination the rate of hydrogen evolution came rather close to the initial value. It was earlier shown [13] that the darkening of TiO_2 surface observed after ultraviolet illumination in vacuo (it disappeared when oxygen was added) may be due to the reduction of Ti^{4+} to Ti^{3+}. Thus, it may be assumed that a decrease in the rate of hydrogen evolution during a long period of illumination may be also related to the excessive reduction of the semiconductor interface. The evolution rate seems to decrease with the growing concentration of Tris in suspension, exceeding 0.1 M (Fig. 2, curve 1) due to the same reason. The phenomenon was not observed in the case of glycerol as a less efficient electron donor (Fig. 2, curve 2).

If ferricyanide or methylviologen were added to the suspension (Table II) the photoproduction of H_2 was suppressed and the electron acceptors were reduced. Ferricyanide and methylviologen are supposed to be able to compete with protons in obtaining photogenerated electrons from the TiO_2/water interface.

Hydrogen photoproduction in the system: electron donor–TiO_2–hydrogenase

When hydrogenase was added to TiO_2 without exogenous electron donors hydrogen photoproduction activated by methylviologen was observed (Table II), which was described elsewhere [3]. The possibility cannot be excluded that the organic constituents of the hydrogenase preparation act as electron donors. If glucose or glycerol were added the evolution of H_2 proceeded more intensively than in the previous experiments where either electron donors alone or with hydrogenase and methylviologen were applied. It should be noted that in the case of dithiothreitol or cysteine hydrogen evolution was observed only in the presence of hydrogenase and methylviologen. The rate of hydrogen photoproduction in the system cysteine–hydrogenase–methylviologen did not decrease for 2 h of illumination (Fig. 1, curve 3), in contrast to experiments performed without the enzyme. In this case the quantum yield of hydrogen evolution was 0.01 molecule per quantum.

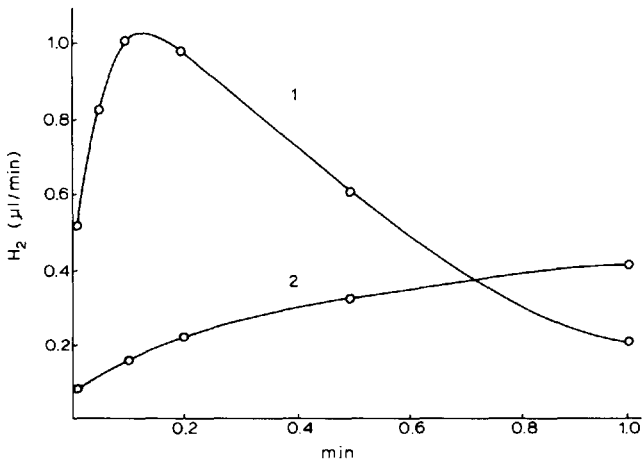


Fig. 2. The rate of hydrogen photoproduction by TiO_2 dependent on concentration of tris(oxymethyl)aminomethane (1); and glycerol (2).

TABLE II

EFFECT OF HYDROGENASE ON PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN ON TiO_2

Activity of hydrogenase is 20 μl H_2/ml per min.

Electron donors (0.01 M)	μl H_2/min $\times$100			
	Without additives	Methylviologen ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	Hydrogenase (0.01 ml)	Methylviologen ($5 \cdot 10^{-4}$ M)+ hydrogenase (0.1 ml)
Control	0	0	0.7	23
Glucose	6	0.6	4	128
Glycerol	8	1.0	–	73
Cysteine	0	–	12	132
Dithiothreitol	0	–	24	113

Photoreduction of methylviologen in the system: TiO_2–electron donor

The study of methylviologen photoreduction was carried out in order to understand various properties of the electron donors used for hydrogen evolution. All the electron donors used accelerated the reduction of methylviologen to the cation radical ($MV^{+\cdot}$) as compared to TiO_2 suspensions without exogenous electron donors.

The rate and depth of the reaction increased in good agreement with our previous data [2]. It should be emphasized that in the presence of the efficient electron donors further reduction of methylviologen to the dipyridyl dihydroform (MV°) (Fig. 3, curve 3) took place. Formation of dihydrodipyridyl was indicated by the disappearance of the blue color of the methylviologen cation radical as a result of prolonged illumination, according to the reaction: $MV^{+\cdot} + e^- \rightarrow MV°$. Moreover, the

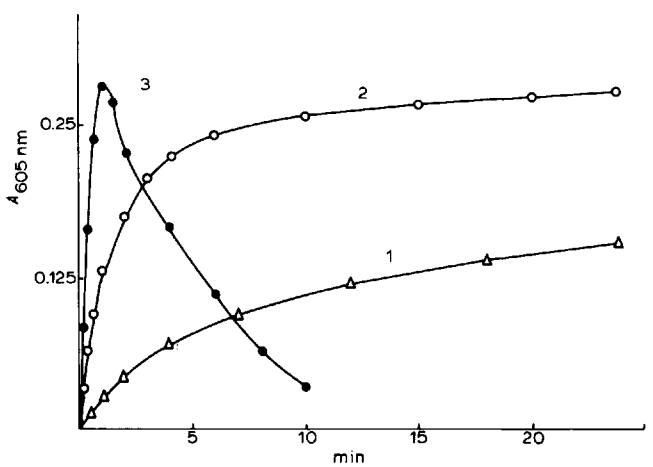


Fig. 3. Kinetic curves of photoreduction of $6 \cdot 10^{-5}$ M methylviologen on TiO_2 in the absence of electron donors (1); in the presence of 1.0 M cysteine (2); 0.1 M tris(oxymethyl)aminomethane (3).

formation of dihydrodipyridyl was confirmed by the formation of the blue MV cation radical upon the addition of oxidized methylviologen to the suspension decolorized by prolonged illumination under anaerobic conditions, according to the equation: $MV^{\circ} + MV^{2+} \rightarrow 2\ MV^{\cdot}$ [13].

Discussion

The present data demonstrate the possibility of hydrogen photoproduction on titanium dioxide in the presence of the following organic compounds: tris(oxymethyl)aminomethane, triethanolamine, ethanolamine, ethanol, glycerol, glucose, and EDTA. However, no evolution of hydrogen occurs in the case of cysteine, dithiothreitol, methylamine, urea and some others.

The comparison of methylviologen photoreduction to the hydrogen photoproduction allows to identify the reasons which influence the efficiency of hydrogen photoproduction. In the presence of efficient electron donors methylviologen was reduced to the dipyridyl dihydroform, having an E_0' value of -0.8 V [13]. It is also known that for TiO_2 the reduction of the crystalline lattice surface layer and the discharge of H_3O^+ accompanied by the evolution of H_2 are possible at redox potentials between -0.8 and -1.0 V [14]. Therefore, in the presence of organic compounds such as Tris, glycerol, and glucose a reduction potential is generated (up to -0.8 V) in TiO_2 suspensions. This determines the ability of these compounds to be electron donors in the reaction of H_2 photoreduction. When cysteine, dithiothreitol, and methylamine were used methylviologen was reduced only to the level of the blue cation radical ($E_0' = -0.446$ V). In this case the photoproduction of hydrogen occurs upon introduction of bacterial hydrogenase into the system.

If cysteine and hydrogenase are used the obtained quantum yield of hydrogen photoproduction is that of methylviologen in TiO_2 suspension with the same electron donor. In the absence of enzyme the quantum yields of hydrogen evolution are close to those of methylviologen photoreduction to the dihydroform (Table I). The mechanism of the reactions is as follows: Upon the photoexcitation of the semiconductor a charge separation takes place, the holes oxidize the organic electron donors or water molecules. The products of water oxidation (OH radicals?) may react with the organic compounds. The electrons reduce hydrogen ions; Ti^{3+} may be involved in the process. To maintain the reduced state of the photocatalyst surface and the redox potential of -0.8 V compounds like Tris, glycerol or glucose are required. Using electron donors like cysteine and dithiothreitol a redox potential close to that of the hydrogen electrode is generated. In this case the presence of a hydrogenase as catalyst is necessary for hydrogen evolution.

Acknowledgement

The authors are grateful to Dr. I.N. Gogotov for the skilled assistance in hydrogenase preparation.

References

1 Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin (1961) Dokl. Akad. Nauk SSSR *139*, 142–145.
2 Krasnovsky, A.A. and G.P. Brin (1973) Dokl. Akad. Nauk SSSR *213*, 1431–1434.
3 Krasnovsky, A.A., G.P. Brin and V.V. Nikandrov (1976) Dokl. Akad. Nauk SSSR *229*, 990–993.
4 Bendersky, V.A., Ya. M. Zolotovizky, Ya. L. Kogan, M.L. Khidekel and D.M. Shub (1975) Dokl. Akad. Nauk SSSR *222*, 606–608.
5 Bulatov, A.V. and M.L. Khidekel (1976) Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., *8*, 1062–1063.
6 Basov, L.L., Yu. P. Efimov and Yu. P. Solonizin (1974) Uspekhi fotoniki (Achievements Photonics) *4*, 12–18.
7 Schrauser, G.N. and T.D. Guth (1977) J. Am. Chem. Soc. *99*, 7189–7193.
8 Kawai, T. and T. Sakata (1979) Nature *282*, 283–284.
9 Wagner, F.T. and G.A. Somoijai (1982) Nature *285*, 559–560.
10 Oshchepkov, V.P. and A.A. Krasnovsky (1974) Prikl. Biokhim. i. Mikrobiol. *10*, 760–764.
11 Krasnovsky, A.A. (1979) *in*: Photosynthesis in Relation to Model Systems, (Barber, J., ed.), pp. 281–289. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
12 Krasnovsky, A.A., Chan Van Ni, V.V. Nikandrov and G.P. Brin (1980) Plant Physiol. *66*, 925–930.
13 Kurbon, A.M., M. Formenti, F. Jouet, A.A. Lisachenko, J. Marten and O.J. Teschner (1973) Kinetika i Kataliz *14*, 110–117.
14 Elofson, R.M. and R.L. Edsberg (1957) Can. J. Chem. *35*, 646–653.
15 Paleolog, E.E. and A.Z. Fedotova (1969) Electrokhimiya *5*, 1336–1339.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 18 1984 Вып. 1

УДК 577.345 : 579.81

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ФИКОБИЛИСОМ СИНЕЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛИ *NOSTOC MUSCORUM**

О. Д. БЕКАСОВА, И. А. МУСЛИМОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Выделены фикобилисомы из синезеленой водоросли *Nostoc muscorum*, которые содержат восемь спектральных форм фикобилиновых пигментов. Два типа частиц (42S и 34S) выделены из ФБС, подвергнутых действию осмотического шока или перепада температур. Частица 42S обогащена ФЦ, частица 34S — АФЦ и содержит фракцию белка, флуоресцирующую в области 400—500 нм. Частица 42S при повторном воздействии перепада температур или осмотического шока распадается на отдельные пигменты ($ФЭ_{571}$, $ФЦ_{620}$, $ФЦ_{633}$, АФЦ), а частица 34S — на субчастицы I и II. Субчастица I содержит $ФЭ_{571}$, $ФЦ_{620}$, АФЦ, АФЦ В; субчастица II включает $ФЭ_{557}$, ФЭЦ, $ФЦ_{633}$, АФЦ, АФЦ С. Целостность ФБС и субструктур контролировали по эффективности миграции энергии в них. Показано, что периферические ряды ФБС могут различаться по пигментному составу. ФБС из *Nostoc muscorum* включают периферические ряды трех типов: один ряд состоит из $ФЭ_{558}$, ФЭЦ, $ФЦ_{633}$; два ряда содержат $ФЭ_{571}$ и $ФЦ_{620}$; три ряда — $ФЦ_{620}$ и $ФЦ_{633}$. Предложена модель ФБС, включающая различные спектральные формы фикобилиновых пигментов.

Фикобилисомы — органеллы синезеленых и красных водорослей, функционируют как светособирающие комплексы и включают пигменты трех классов: фикоэритрины, фикоцианины, аллофикоцианины. Все фикобилиновые пигменты в ФБС находятся в виде тримеров и гексамеров; согласно данным рентгеноструктурного анализа тримеры представляют собой диски толщиной 3 нм и диаметром 12 нм, а гексамеры — двойные диски толщиной 6 нм [1]. ФБС большинства видов водорослей имеют полудисковидную или полусферическую форму.

Гантт и соавт., исследуя диссоциацию ФБС на отдельные пигменты, пришли к выводу, что ФЭ расположен на периферии ФБС, АФЦ образует ядро, а ФЦ находится между ФЭ и ФЦ [2]. Моршель и соавт. [3] подтвердили периферийное расположение ФЭ и ФЦ, обнаружив, что при диссоциации ФБС образуются короткие ряды, состоящие из ФЭ и ФЦ в том же отношении, что и в ФБС. Методом линейного дихроизма показано, что плоскости дисков АФЦ и ФЦ взаимноперпендикулярны, плоскости дисков АФЦ лежат в плоскости ФБС, а АФЦ В — в плоскости тилакоидной мембраны [4]. Исследования целых и диссоциированных ФБС при помощи электронной микроскопии, а также иммунохимическим и спектральными методами позволяют представить ФБС в виде ядра, образованного гексамерами АФЦ с расходящимися от него лучами, которые состоят из гексамеров ФЭ и ФЦ [3—6]. Структура ФБС поддерживается гидрофобными и ионными взаимодействиями между фикобилиновыми пигментами, а также низкомолекулярными полипептидами-связками [7]. Предполагается, что к тилакоидной мембране ФБС прикрепляются при помощи полипептида с молекулярной массой 80 кД, содержащего хромофор билиновой природы [6].

Набор фикобилиновых пигментов, включенных в ФБС, определяется видом водорослей, а относительное содержание пигментов в ФБС зависит от возраста и условий выращивания водорослей [8—10]. Поэтому

* Принятые сокращения: ФБС — фикобилисомы, ФЭ — фикоэритрин, ФЭЦ — фикоэритроцианин, ФЦ — фикоцианин, АФЦ — аллофикоцианин, АФЦ В — аллофикоцианин В, АФЦ С — аллофикоцианин С. Нижний индекс у названий пигментов указывает длину волны максимального поглощения, верхний — длину волны максимальной флуоресценции.

спектры поглощения, а также производные поглощения изолированных ФБС в значительной мере различаются, отражая различия в наборе и соотношении пигментов [10—12]. В фикобилисомах могут содержаться две формы фикоэритрина [13], фикоэритроцианин [1], две формы фикоцианина [14], три формы аллофикоцианина [15], аллофикоцианин B [16]. Данные о молекулярной организации столь большого числа пигментных форм в ФБС отсутствуют. Более того возможность одновременного присутствия большого числа пигментных форм в ФБС остается невыясненной. Вместе с тем детальное изучение структурной организации ФБС необходимо для лучшего понимания функций фикобилиновых пигментов в фотосинтезе. В связи с этим настоящая работа посвящена дальнейшему изучению организации ФБС путем анализа пигментного состава ФБС и ее фрагментов, получаемых в процессе фракционирования ФБС.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение ФБС проводили по методу Грей и соавт. [17] с некоторыми модификациями, заключающимися в добавлении к 0,6 М Na-K-фосфатному буферу (pH 7,0) 10%-ного полиэтиленгликоля (мол. масса 3000), изменении режима центрифугирования, введении дополнительной процедуры по очистке ФБС от хлорофилла. Схема выделения представлена на рис. 1.

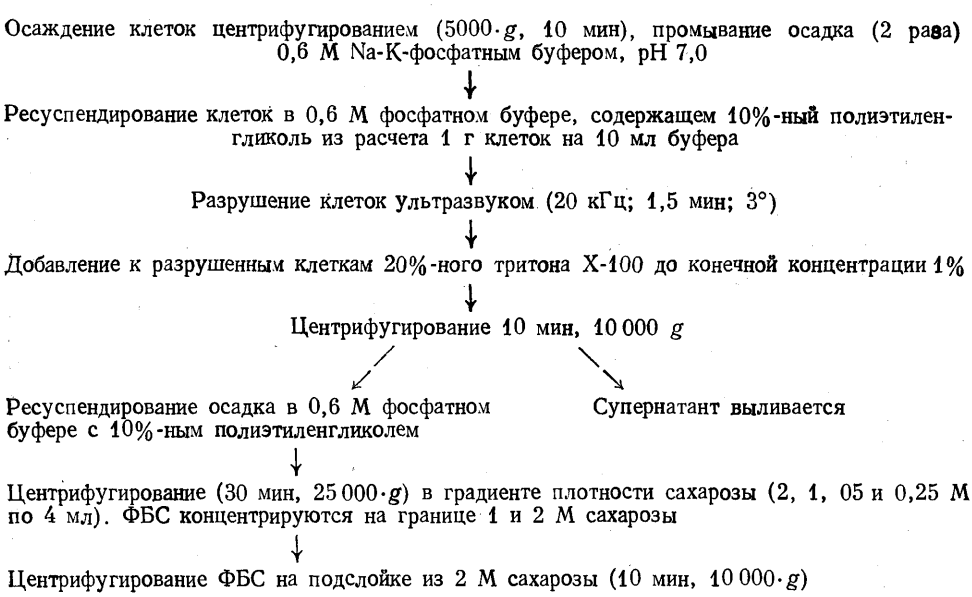


Рис. 1. Схема выделения ФБС

ФБС выделяли при 2—5° из 7—8-дневной культуры *N. muscorum*, выращенной на среде Кратца и Майерса [18] в сосудах, продуваемых воздухом с примесью CO_2 (~2%), при непрерывном освещении люминесцентными лампами ДС-80 (освещенность на поверхности сосудов 1000 лк).

Дезагрегацию ФБС достигали различными способами: действием ультразвука (20 кГц, 1,5 мин); замораживанием в жидком азоте с последующим оттаиванием; осмотическим шоком (диализ в течение суток против 0,05 М Na-K-фосфатного буфера).

Фракционирование дезагрегированных ФБС на компоненты осуществляли центрифугированием в течение 3 ч с ускорением 150 000 *g* в градиенте плотности 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 М растворов сахарозы в 0,6 М фосфатном буфере с полиэтиленгликолем или создавая двухфазную систему путем добавления к ФБС 20% от насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$. При этом частицы 34 S концентрировались в 0,1 М сахарозе, а частицы

42 S — в верхней половине слоя 0,4 М сахарозы, свободные пигменты оставались в наслаиваемом объеме, целые ФБС осаждались. В двухфазной системе частицы 34 S концентрировались в нижнем слое, а частицы 42 S — верхнем, на фазовой границе — целые ФБС. С целью дальнейшего фрагментирования частицы подвергали повторному диализу или замораживанию — оттаиванию, либо повышали значение pH до 9—10. затем их центрифугировали в течение 16 ч при 50 000·g в градиенте плотности 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 М растворов сахарозы, взятых в равных объемах, либо разделяли хроматографически на колонках, заполненных сефадексом G-200, $Ca_3(PO_4)_2$ или DEAE-целлюлозой DE-52. Колонки уравновешивали 0,005 М фосфатным буфером, pH 7,0. Этим же буфером элюировали компоненты ФБС с колонок, заполненных G-200 и $Ca_3(PO_4)_2$. Для элюции с DEAE-целлюлозы DE-52 использовали линейный градиент фосфатного буфера от 0,005 до 0,2 М.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре «Specord UV Vis» (ГДР) при +20° и —196°. Для измерения низкотемпературных спектров поглощения использовали прозрачные образцы, получаемые замораживанием объекта в 60%-ном глицерине.

Спектры флуоресценции измеряли на флуориметре MPF-4 «Hitachi» (Япония) при 20° в 1-см кварцевой кювете и при —196° — в капиллярах, при этом максимальное поглощение образцов не превышало 0,2 ед. А. В спектры излучения вводили поправку на спектральную чувствительность ФЭУ. Эффективность миграции энергии возбуждения оценивали по низкотемпературным спектрам излучения флуоресценции согласно модифицированному методу Литвина и соавт. для линейной модели [19]. Интенсивности флуоресценции отдельных пигментов находили в результате приближенного разложения суммарного спектра на известные полосы индивидуальных пигментов. При расчетах были сделаны следующие допущения: квантовые выходы собственной флуоресценции всех фикобилиновых пигментов одинаковы [13]; возбуждающий свет (530 нм) поглощается ФЭ, а доля поглощения другими пигментами пренебрежимо мала (до 5%).

Концентрацию ФЭ, ФЦ, АФЦ рассчитывали по уравнениям Беннета и Богорада [20]. При оценке молекулярной массы ФБС пользовались значениями молекулярных весов фикобилиновых пигментов, приведенных в обзоре [21]. Молекулярный вес АФЦ С принимали равным молекулярному весу активного хромопротеида. Содержание хлорофилла определяли флуориметрически.

Коэффициенты седиментации целых ФБС и отдельных фрагментов определяли при 20° двумя способами: а) при центрифугировании на аналитической ультрацентрифуге «Spinco» (40 мин при 48 000 об/мин) образцов, характеризующихся поглощением ~0,3 в области 280 нм и б) по распределению в линейном градиенте плотности сахарозы (20%—60%) при центрифугировании концентрированных образцов ($\lambda_{макс} \geqslant 2{,}0$) в течение 3 ч с ускорением 145 000 q; при расчетах пользовались таблицами, составленными для частиц с плотностью 1,4 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интактные ФБС. Описанным способом были получены стабильные ФБС, спектральные свойства которых практически не изменялись при хранении в течение месяца при +8°. Спектр поглощения ФБС при 20° (рис. 2, *А*, *1*) характеризуется полосами поглощения ФЭ (570 нм), ФЦ (625 нм) и АФЦ (плечо ~650 нм). По низкотемпературному спектру поглощения (рис. 2, *А*, *2*) кроме ФЭ (571 и 558 нм), ФЦ (620 и 633 нм), АФЦ (656 нм) обнаруживаются ФЭЦ (602 нм), АФЦ В (671 нм) и пигмент, характеризующийся максимумом поглощения при 682 нм (пигмент-682). Спектр флуоресценции ФБС при 20° имеет максимум при 676 нм (рис. 2, *Б*, *1*), т. е. совпадает по положению с максимумом флуоресценции АФЦ В. Однако поскольку полуширина полосы излучения ФБС значительно превосходит полуширину максимума флуоресценции АФЦ В,

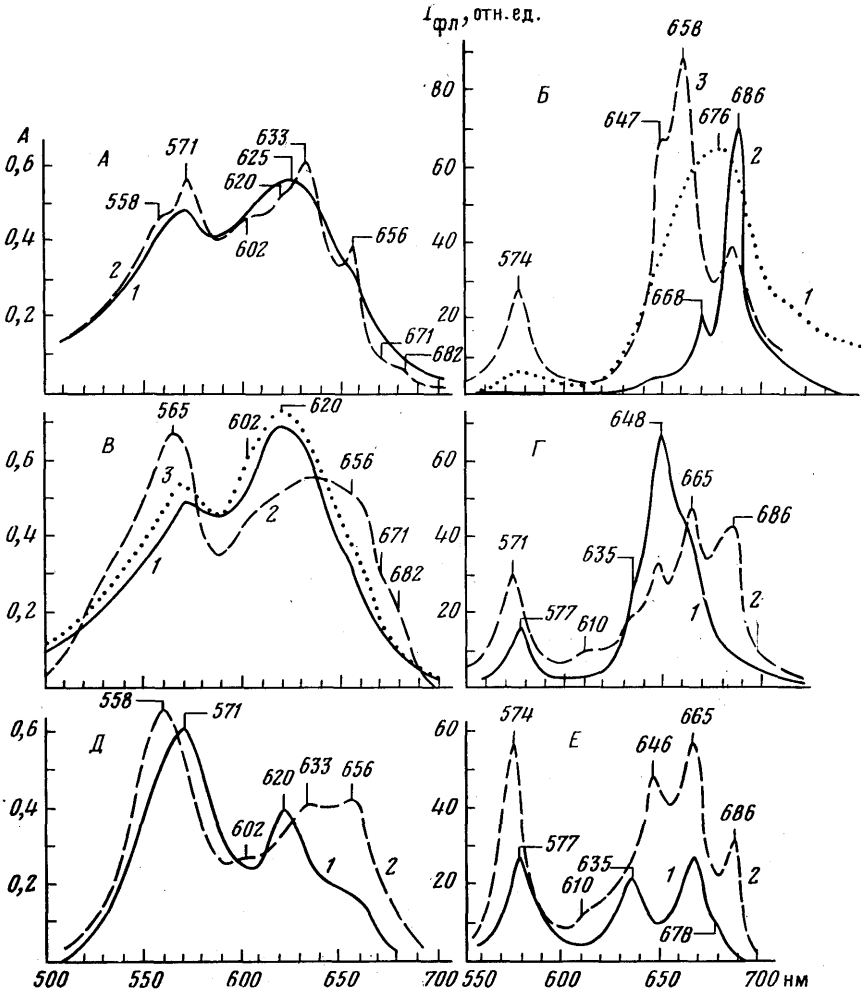


Рис. 2. Спектральные характеристики целых ФБС (*А*, *Б*), частиц (*В*, *Г*) и субчастиц (*Д*, *Е*). Целые ФБС: *А* — спектры поглощения, *Б* — спектры флуоресценции, $\lambda_{возб}$ 530 нм, *1* — +20°, *2* — —196°, *3* — низкотемпературный спектр флуоресценции разрушенных ФБС. Частицы ФБС: *В* — спектры поглощения (+20°), *Г* — спектры флуоресценции $\lambda_{возб}$ 530 нм (—196°); *1* — частицы 42S; *2* — частицы 34S; *3* — целые ФБС (для сравнения). Субчастицы ФБС: *Д* — спектры поглощения (+20°), *Е* — спектры флуоресценции $\lambda_{возб}$ 530 нм (—196°); *1* — субчастица I, *2* — субчастица II

следует думать, что максимум излучения в спектре флуоресценции ФБС обусловлен суммированием излучения ФЦ, АФЦ, АФЦ В и пигмента-682. В низкотемпературном спектре ФБС доминирует флуоресценция при 686 нм (рис. 2, *Б*, *2*). Нельзя исключить возможность, что поглощение при 682 нм и флуоресценция при 686 нм обусловлены хлорофиллом. Однако флуоресценцию хлорофилла не удалось измерить в препаратах ФБС, так как примесь хлорофилла, 10^{-9} М, составляет <1 молекулы на 10 фикоболисом или 3500 фикобилинов, а квантовый выход флуоресценции хлорофилла значительно ниже по сравнению с ФБС. В спектре возбуждения флуоресценции ФБС при 710 нм отсутствует максимум ~430 нм, характерный для хлорофилла, тогда как полоса при ~680 нм явно выражена. По этим причинам мы полагаем, что пигмент, поглощающий при 682 нм и флуоресцирующий при 686 нм, отличен от хлорофилла. В то же время ни максимум поглощения (682 нм), ни флуоресценции (686 нм) этого пигмента не совпадают с известными для фикобилиновых пигментов. Не исключено, что этот пигмент, условно названный нами АФЦ С, представляет собой еще одну форму аллофикационина, которая по спектральным свойствам занимает промежуточное положе-

ние между АФЦ В и активным хромопротеидом [23]. Даже при кратковременном нагревании до 40° полоса излучения при 686 нм в низкотемпературном спектре флуоресценции исчезает, что может быть связано как с лабильностью АФЦ С, так и с нарушением его связи с другими пигментами.

Судя по спектрам излучения и возбуждения флуоресценции (рис. 2, *Б, 3*) в изолированных ФБС осуществляется эффективная миграция энергии возбуждения на АФЦ С. Согласно расчетам коэффициенты эффективности миграции энергии между отдельными пигментами в ФБС изменяются в пределах 0,8—1,0. В спектре поглощения ФБС, подвергнутых действию перепада температур ((20°—(—196°)—(+20°)), ультразвука или осмотического шока, возрастает максимум при 625 нм, по-видимому, за счет накопления продукта распада АФЦ. Одновременно с этим в спектре флуоресценции наблюдается перераспределение интенсивностей излучения по длинам волн: флуоресценция ФЭ (576 нм), ФЦ (647 нм), АФЦ(658 нм) увеличивается, тогда как флуоресценция при 686 нм уменьшается (рис. 2, *Б*, *3*), хотя в спектре возбуждения длинноволновой флуоресценции ($\lambda_{рег}$~710 нм) обнаруживаются полосы всех присутствующих фикобилиновых пигментов. ФБС под воздействием перечисленных факторов, по-видимому, разваливаются на составные части. Это подтверждается и тем, что подобные ФБС (50S) удается разделить центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, а также в двухфазной системе на частицы (42S и 34S), различающиеся спектральными свойствами (рис. 2, *В*, *Г*).

Частицы 42S и 34S. Как следует из рис. 2, *В*, *Г*, в спектре поглощения частиц 42S, подобно интактным ФБС, доминирует максимум фикоцианина, тогда как в спектре поглощения частиц 34S основной максимум обусловлен фикоэритрином, и явно выражена полоса поглощения АФЦ. Кроме этого, спектры поглощения различаются тем, что в спектре частиц 34S проявляются полосы поглощения всех фикобилиновых пигментов, присущих изолированным ФБС, а в спектре частиц 42S отсутствуют полосы поглощения ФЭЦ, АФЦ В и АФЦ С, максимум поглощения ФЭ смещен к 571 нм. Судя по спектрам поглощения, частицы 42S независимо от способа получения обогащены ФЦ, а частицы 34S — АФЦ.

Спектр флуоресценции частиц 42S характеризуется максимумами ФЦ, ФЭ, АФЦ, тогда как в спектре флуоресценции частиц 34S обнаруживаются полосы излучения всех фикобилиновых пигментов (рис. 2, *Г*). В спектре флуоресценции частиц 42S есть доминирующая полоса излучения (обусловленная ФЦ), а в спектре флуоресценции частиц 34S наблюдается четыре приблизительно одинаковой интенсивности максимума: АФЦ, АФЦ С+В, ФЭ и ФЦ.

Спектры излучения (рис. 2, *Г*) и возбуждения флуоресценции (рис. 3) свидетельствуют о том, что в изолированных частицах 42S и 34S миграция энергии возбуждения сохраняется, хотя эффективность процесса несколько снижается по сравнению с целыми ФБС. В частности, значения α для частиц 42S лежат в пределах 0,4—0,9, а для частиц 34S — 0,6—1. Наблюдаемое уменьшение величины α может быть связано с частичным нарушением нативности субструктур ФБС при их фракционировании.

Частицы 34S в отличие от частиц 42S, кроме фикобилиновых пигментов содержат белки, флуоресцирующие в области 400—500 нм, что указывает на их сложный состав. При хроматографическом разделении частиц 34S, а также разрушенных ФБС, эти белки первыми элюируются с $Ca_3(PO_4)_2$, но они не отделяются от фикобилипротеидов при пропускании целых ФБС через хроматографическую колонку. Это свидетельствует о том, что фракция белков, флуоресцирующих при 400—500 нм входит в состав ФБС и не может рассматриваться как загрязнение ФБС посторонними белками. Содержание их в ФБС весьма стабильно.

Фракционирование частиц 42S и 34S. Воздействие осмотическим шоком на выделенные частицы приводит к распаду частицы 42S на от-

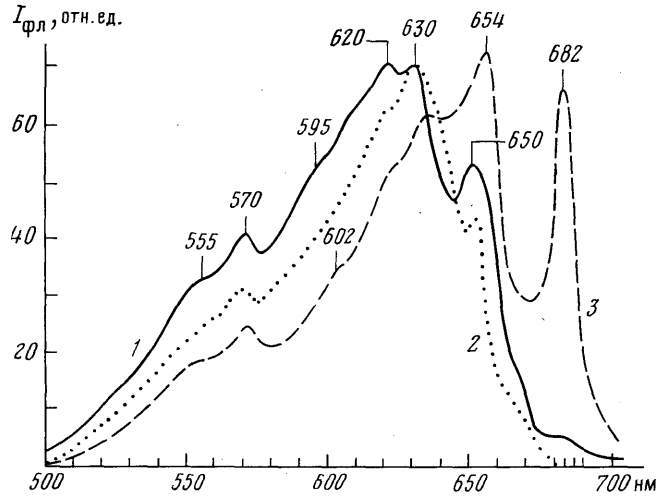


Рис. 3. Спектры возбуждения флуоресценции интактной ФБС (*1*), частицы 42S (*2*) и частицы 34S (*3*). $\lambda_{рег}$ 710 нм

дельные пигменты, а частицы 34S — на 2 неодинаковые субчастицы и фракцию белков, флуоресцирующих при 400—500 нм.

При хроматографическом разделении на ДЕАЕ-целлюлозе развалившихся частиц 42S были получены $ФЭ_{571}$, $ФЦ_{620}$, $ФЦ_{633}$ и видоизменившейся $АФЦ_{630, 656}$.

Субчастицы I и II, на которые разваливаются частицы 34S, удалось разделить при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Из сравнения спектров поглощения субчастиц (рис. 2, *Д*) следует, что субчастица содержит ФЭ с длинно-(571 нм) и ФЦ с коротковолновым (620 нм) максимумом поглощения, а субчастица II, наоборот, включает ФЭ с коротко-(558 нм) и ФЦ с длинноволновым (633 нм) максимумом поглощения и дополнительно ФЭЦ (602 нм). Обе субчастицы содержат АФЦ. Кроме перечисленных пигментов, субчастица I включает АФЦ В, а субчастица II — АФЦ С. Эти пигменты не обнаруживаются по спектрам поглощения субчастиц, но в низкотемпературных спектрах флуоресценции проявляются их полосы излучения при 678 нм (АФЦ В) и 686 нм (АФЦ С) (рис. 2, *Е*).

Спектры излучения и возбуждения флуоресценции, а также соответствующие расчеты указывают, что в субчастицах происходит миграция энергии возбуждения, но значения α снижаются (0,3—0,7 для субчастиц I и 0,4—0,9 для субчастиц II) по сравнению с величиной α для частицы 34S (0,6—1).

Фракция белков, флуоресцирующих при 400—500 нм, была отделена от фикобилиновых пигментов при хроматографическом разделении частиц 34S на колонках, заполненных $Ca_3(PO_4)_2$. Эти белки элюируются с $Ca_3(PO_4)_2$ первыми и определяются по флуоресценции. При этом спектр флуоресценции зависит от длины волны возбуждающего света (рис. 4, *А*) и не изменяется при понижении температуры до —196°. В спектре возбуждения флуоресценции наблюдаются полосы при 340, 360, 440, 450 и 460 нм. Соотношение полос зависит от длины волны регистрации (рис. 4, *Б*). Зависимость вида спектра излучения от $\lambda_{возб}$, а также возбуждения флуоресценции от $\lambda_{рег}$, указывает на сложный состав фракции непигментных белков. Три компонента проявляются по спектрам флуоресценции. Один из них характеризуется максимумом излучения при 400 нм, другой — при 440 нм, третий обнаруживает два максимума флуоресценции при 502 и 520 нм. В присутствии феррицианида калия флуоресценция при 440 нм тушится, а при 502 и 520 нм — возгорается (рис. 5). При этом в спектре возбуждения флуоресценции ($\lambda_{рег}$ 500 нм) интенсивность полос при 340 и 410 нм понижается, а при 630, 460 и 470 нм — увеличивается. Дитионит вызывает противоположное действие: туше-

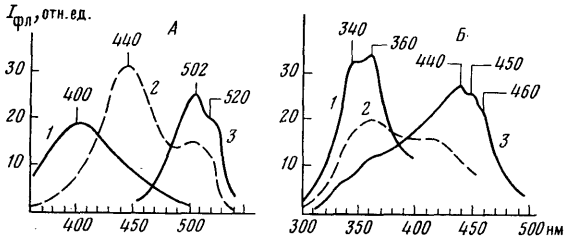


Рис. 4

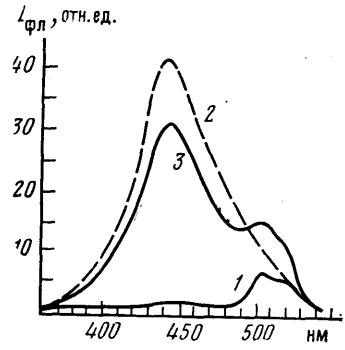


Рис. 5

Рис. 4. Спектры излучения (*А*) и возбуждения флуоресценции (*Б*) непигментных белков. *А* — $\lambda_{возб}$ 340 (*1*), 380 (*2*), 430 нм (*3*), *Б* — $\lambda_{рег}$ 410 (*1*), 460 (*2*), 500 нм (*3*)

Рис. 5. Спектры флуоресценции непигментных белков в присутствии феррицианида (*1*), дитионита (*2*) и в их отсутствие (*3*). Добавки вносили при +20°, спектры записывали при —196°, $\lambda_{возб}$ 380 нм

ние длинноволновой (502 и 520 нм) и возгорание коротковолновой флуоресценции (440 нм) (рис. 6). При добавлении ацетона (до конечной концентрации 80%) из белков экстрагируются флуоресцирующие компоненты, по-видимому, простетические группы. Спектр флуоресценции ацетонового экстракта подобен спектру излучения фракции непигментных белков с той лишь разницей, что максимум излучения смешен от 440 к 453 нм. Ацетоновые экстракты претерпевают изменения флуоресценции в присутствии феррицианида, хинона, дитионита, аналогичные описан-

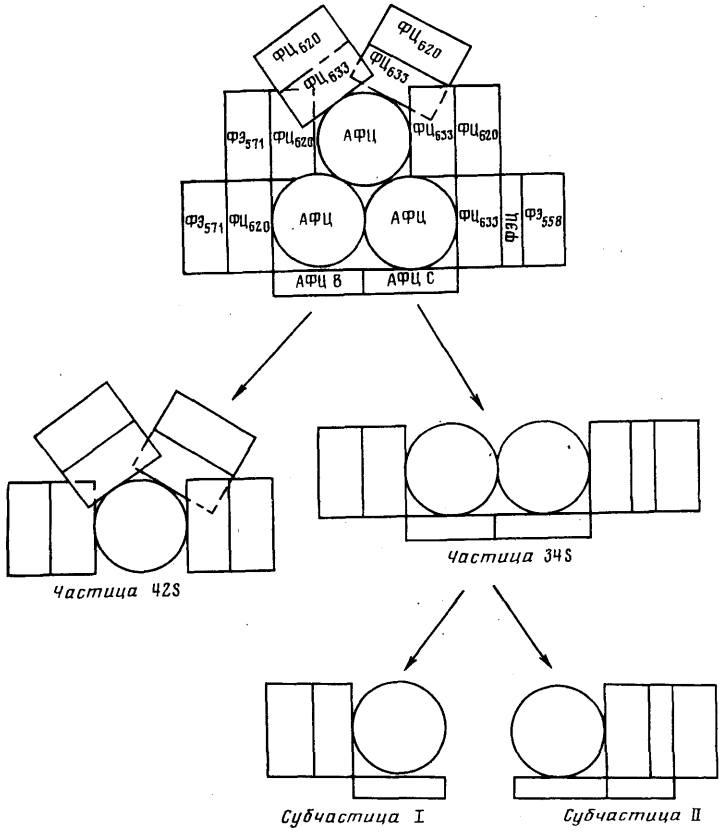


Рис. 6. Гипотетическая модель молекулярной организации и путей распада ФБС

ным для непигментных белков. Тушение флуоресценции раствора $NADP \cdot H_2$ («Reanal» Венгрия) феррицианидом подобно наблюдаемому при 440—450 нм в спектре флуоресценции фракции белков и их ацетоновых экстрактов.

Полученные данные указывают на возможность присутствия в частицах 34S NADP-связывающего белка в восстановленном состоянии (максимум флуоресценции при ~440 нм) и белка, содержащего флавин в окисленной форме (полоса флуоресценции ~500 нм).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фикобилисомы, выделенные из *N. muscorum*, включают две формы ФЭ, ФЭЦ, две формы ФЦ, АФЦ, АФЦ В и пигмент, условно названный АФЦ С. Множественность форм фикобилиновых пигментов в изолированных ФБС удалось наблюдать, по-видимому, благодаря использованию для выделения ФБС среды, содержащей полиэтиленгликоль. Расчет соотношения концентраций ФЦ и АФЦ, ФЦ и ФЭ для изолированных ФБС по результатам 16 повторностей дает величину ФЦ/АФЦ=1,5, ФЦ/ФЭ=3. Из этого следует, что на шесть гексамеров АФЦ приходится девять гексамеров ФЦ и три гексамера ФЭ. Допустив, что концентрация индивидуальных форм фикоэритринов и фикоцианинов коррелирует с величиной поглощения при $\lambda_{макс}$, получили примерно одинаковое содержание спектральных форм: четыре молекулы $ФЦ_{620}$ и пять молекул $ФЦ_{633}$; одна молекула $ФЭ_{558}$ и две — $ФЭ_{571}$. По данным Браинта и соавт. [5] в каждой ФБС имеется одна молекула АФЦ В. Судя по спектрам поглощения, АФЦ С и ФЭЦ также содержатся в минимальном количестве.

Согласно расчетам с указанными допущениями, пигментный состав ФБС *N. muscorum* может быть представлен в следующем виде: $ФЭ^{571}_{558}$ (1), $ФЭ^{576}_{571}$ (2), $ФЭЦ^{610}_{602}$ (1), $ФЦ^{633}_{620}$ (5), $ФЦ^{648}_{633}$ (4), $АФЦ^{665}_{656}$ (6), $АФЦ\ В^{678}_{671}$ (1), $АФЦ\ С^{686}_{682}$ (1) (в скобках указано количество молекул, входящих в каждую ФБС). Предполагаемая молекулярная масса $\sim 4{,}1 \cdot 10^6$ Д, а с учетом непигментных белков (до 15% от веса ФБС [6]) $4{,}8 \cdot 10^6$ Д, т. е. в пределах молекулярных масс, указываемых для ФБС, выделенных из синезеленых водорослей [5]. Коэффициент седиментации ФБС — 50S.

Для выяснения расположения пигментов в ФБС был применен традиционный подход к изучению организации ФБС — фракционирование. Использование полиэтиленгликоля позволило нам наблюдать развал ФБС на частицы более крупные, чем описаны в литературе [2, 3]. Существенно, что применение различных методов дезагрегации в сочетании с разными способами фракционирования приводило к выделению частиц двух типов с постоянным пигментным составом, в которых сохранялась миграция энергии. Эти данные указывают на то, что, по-видимому, интактные ФБС действительно состоят из двух неодинаковых частиц (42S и 34S). Частица 34S в свою очередь распадается на две субчастицы с характерным пигментным составом. Результаты анализа спектров поглощения, излучения и возбуждения флуоресценции ФБС на всех стадиях фракционирования вплоть до отдельных пигментов и расчеты, аналогичные приведенным для целых ФБС, позволяют представить состав частиц и субчастиц следующим образом:

2S частица: $ФЭ_{571}$ (1), $ФЦ_{620}$ (4), $ФЦ_{633}$ (3), АФЦ (2);

434S частица: $ФЭ_{558}$ (1), $ФЭ_{571}$ (1), ФЭЦ (1), $ФЦ_{620}$ (1), $ФЦ_{633}$ (1), АФЦ (4), АФЦ В (1), АФЦ С (1) и белки, флуоресцирующие в области 400—500 нм;

субчастица I: $ФЭ_{571}$ (1), $ФЦ_{620}$ (1), АФЦ (2), АФЦ В (1);

субчастица II: $ФЭ_{558}$ (1), ФЭЦ (1), $ФЦ_{633}$ (1), АФЦ (2), АФЦ С (1)

(в скобках указано количество молекул). Присутствие АФЦ во всех фрагментах ФБС указывает на распад ядра при фракционировании, а неодинаковый пигментный состав частиц и субчастиц свидетельствует,

что периферические ряды ФБС различаются по включенным в них формам. Обогащение частицы 34S АФЦ, а также наличие в ней АФЦ В и АФС С, через которые наиболее вероятен контакт ФБС с хлорофиллом, свидетельствуют о том, что частица 34S представляет собой основание ФБС (рис. 6). Обогащение 42S частицы ФЦ и наличие в ней АФЦ позволяет представить частицу 42S как верхнюю часть ФБС (рис. 6). Однако наши данные не дают информацию о том, в каком из верхних рядов содержится молекула $ФЭ_{571}$. Наблюдается структурная асимметрия ФБС.

Предполагаемая молекулярная масса 42S частицы — $2{,}11 \cdot 10^6$ Д, 34S частицы — $1{,}95 \cdot 10^6$ Д (без учета непигментных белков). Существенные различия в коэффициентах седиментации вместе с предполагаемыми довольно близкими значениями молекулярных масс указывают на неодинаковость размеров и форм выделенных частиц, что согласуется с нашими представлениями о частицах 42S и 34S.

В соответствии с архитектоникой ФБС [3—6] и учитывая, что в них осуществляется направленная миграция энергии возбуждения, гипотетическое взаимное расположение частиц и субчастиц в ФБС можно представить, как показано на рис. 6. При построении модели мы руководствовались известными моделями [4, 5], учитывая при этом полученные данные о пигментном составе ФБС *Nostoc muscorum*. Модель ФБС изображена в виде сечения параллельного плоскости ФБС. Диски АФЦ в сечении представлены окружностями диаметром 12 нм, а диски всех других пигментов — в виде прямоугольников 6×12 нм, которые соответствуют гексамерам ФЭ, и ФЦ, и 3×12 нм, соответствующие тримерам ФЭЦ, АФЦ В и АФЦ С. Модель вписывается в полудиск с основанием 51×17 и высотой 33 нм, что соответствует приводимым в литературе размерам ФБС [6]. Пигменты в периферических рядах расположены в соответствии с их спектральными характеристиками таким образом, чтобы обеспечивать направленную эффективную миграцию энергии возбуждения. Обе длинноволновые формы АФЦ изображены в основании ФБС, т. е. могут граничить с тилакоидной мембраной, поскольку на АФЦ С и АФЦ В происходит сток энергии и при фрагментировании частицы 34S они оказываются в разных субчастицах.

Модель отличается от известных тем, что включает восемь (вместо трех) спектральных форм фикобилиновых пигментов, в основании ФБС расположены две длинноволновые формы АФЦ, периферические ряды различаются между собой по пигментному составу и два верхних периферических ряда расположены в различных плоскостях в соответствии с расчетами.

Предлагаемая модель согласуется с данными рентгеноструктурного анализа, электронной микроскопии и линейного дихроизма, отвечает требованиям эффективной миграции энергии возбуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bryant D. A., Glazer A. N., Eiserling F. A.* Arch. Microbiol., 1976, *110*, 61—75.
2. *Gantt E., Lipschultz C. A., Zilinskas B.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, *430*, 375—388.
3. *Mörschel E., Koller K. P., Wehrmeyer W., Schneider H.* Cytobiologie, 1977, *16*, 118—129.
4. *Гуляев Б. А., Тетенькин В. А., Бекасова О. Д.* Изв. АН СССР, сер. биол., 1981, *№ 2*, с. 188—201.
5. *Bryant D. A., Guglielmi G., Tandeau de Marsac N., Castets A. M. Cohen-Bazire G.* Arch. Microbiol., 1979, *123*, 113—127.
6. *Gantt E.* Annual Rev. Plant Physiol., 1981, *32*, 327—347.
7. *Mörschel E.* Planta, 1982, *154*, 251—258.
8. *Ley A. C., Butler W. L., Bryant B. A., Glazer A. N.* Plant Physiol., 1977, *59*, 974—980.
9. *Grabowski J., Gantt E.* Photochem. Photobiol., 1978, *28*, 47—54.
10. *Gantt E., Lipschultz C. A., Grabowski J, Zimmerman B. K.* Plant Physiol., 1979, *63*, 615—620.
11. *Бекасова О. Д., Шубин Л. М., Евстигнеев В. Б.* Изв. АН СССР, сер. биол., 1979, № 2, 198—207.
12. *Ерохина Л. Г., Шубин Л. М., Красновский А. А.* Физиол. раст., 1980, *27*, 756—765.

13. *Grabowski J., Gantt E.* Photochem. Photobiol., 1978, *28*, 39—45.
14. *Gray B. H., Cosner J., Gantt E.* Photochem. Photobiol., 1976, *24*, 299—302.
15. *Zilinskas B. A., Zimmerman B. K., Gantt E.* Photochem. Photobiol., 1978, *27*, 587—595.
16. *Glazer A. N., Bryant D. A.* Arch. Microbiol., 1975, *104*, 15—22.
17. *Gray B. H., Lipshultz C. A., Gantt E.* J. Bacteriol., 1973, *116*, 471—478.
18. *Kratz W. A., Myers J.* Amer. J. Bot., 1955, *42*, 282—287.
19. *Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Шубин В. В.* Биофизика, 1976, *21*, 669—671.
20. *Bennett A., Bogorad L.* J. Cell Biol., 1973, *58*, 419—435.
21. *Krogmann D. W.* In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, 1977, *5*, 625—636.
22. *McEwen C. R.* Analyt. Biochem., 1967, *20*, 114—149.
23. *Pjon C. J., Fujita Y.* Plant Cell Physiol., 1974, *15*, 789—797.

Поступила в редакцию
9.XII.1982

FRACTIONATION OF PHYCOBILISOMES FROM BLUE-GREEN ALGA *NOSTOC MUSCORUM*

O. D. BEKASOVA, I. A. MUSLIMOV, A. A. KRASNOVSKI

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Phycobilisomes (PBS) isolated from *Nostoc muscorum* contain eight spectral forms of phycobiliproteins. PBS partially dissociated by osmotic or temperature shock, were separated into 42S and 34S particles by centrifugation in sucrose density gradient. The 42S particles are enriched with phycocyanin, the 34S ones — with allophycocyanin. The 42S particles dissociate to free pigments by repeated osmotic or temperature shock and the 34S ones dissociate to subparticles I and II having the constant pigments composition. The integrity of PBS and isolated substructures is controlled by the yield of energy transfer between pigment molecules. PBS from *Nostoc muscorum* was found to contain the rods of three different types. The model PBS containing different spectral forms of biliproteins is proposed.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 18 1984 Вып. 4

УДК 576.8.098

ФОТОХИМИЯ ФИКОБИЛИСОМ: ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА *

О. Д. БЕКАСОВА, И. А. МУСЛИМОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Обнаружена способность фикобилисом (ФБС) фотосенсибилизировать восстановление, метилвиологена в присутствии дитиотреитола, и исследована ее зависимость от структурной целостности ФБС, природы и pH среды и концентрации реагентов. Измерен спектр действия и определен квантовый выход реакции. Исследовано тушение флуоресценции ФБС метилвиологеном. Показано, что максимальная скорость фотосенсибилизированного ФБС переноса электрона наблюдается в 0,6 М Na—K-фосфатном буфере, содержащем 30%-ный глицерин, pH 9,5. Насыщение реакции достигается при концентрации $МВ^{2+}$ $2 \cdot 10^{4}$ М. В этих условиях активность ФБС достигает 0,5 мкМ $МВ^{+\cdot}$/мг ФБС·ч, а после предварительного нагревания реакционной смеси в течение 5 мин при 35° С возрастает на два порядка. При фотосенсибилизированном восстановлении $МВ^{2+}$ активен свет в диапазоне 520—680 нм. Квантовый выход реакции достигает 2%. Фикобилиновые пигменты в структурах более эффективные сенсибилизаторы, чем в растворах, при этом наивысшая активность наблюдается у частицы, содержащей длинноволновые формы аллофикоцианина (34S частица). Обсуждается механизм реакции.

Согласно общепринятой точке зрения, фикобилиновые пигменты локализуются в специальных структурах — фикобилисомах и функционируют в качестве светособирающей антенны, передающей энергию возбуждения на хлорофилл. Когда реакционные центры фотосистемы 2 открыты, 50% энергии, поглощенной фикобилиновыми пигментами, передается на фотосистему 1, при закрытых реакционных центрах эффективность переноса возрастает до 90—95% [1].

Вместе с тем имеются данные, позволяющие думать, что функции фикобилиновых пигментов не ограничиваются поглощением энергии света и передачей ее на хлорофилл путем индуктивного резонанса [2—10]. Изолированные ФБС обнаруживают способность к обратимым фотоиндуцированным изменениям поглощения и флуоресценции в присутствии экзогенных доноров и акцепторов электрона; при этом наибольшие изменения претерпевают аллофикоцианин и его длинноволновые формы [11, 12], которые являются конечными акцепторами энергии в ФБС [13, 14].

В данной работе изучали способность фикобилиновых пигментов фотосенсибилизировать восстановление низкопотенциального акцептора электрона ($МВ^{2+}$), моделируя таким образом перенос электрона в фотосистеме 1. Подобные модели для хлорофилловых пигментов, хлоропластов и фотосистем подробно исследовались ранее [15—19].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Фотосенсибилизирующее действие фикобилиновых пигментов ($4 \cdot 10^{-6}$ М) исследовали на примере реакции восстановления метилвиологендихлорида, $2 \cdot 10^{-4}$ М, в анаэробных условиях в 0,6 М Na—K-фосфатном буфере, содержащем 30%-ный глицерин. В качестве сенсибилизато-

* Принятые сокращения: ФБС — фикобилисома, $МВ^{2+}$ — метилвиологен окисленный, $МВ^{+\cdot}$ — восстановленный.

ра использовали целые ФБС, их фрагменты (частицы 34 и 42S) и растворы индивидуальных пигментов: фикоэритрина, фикоцианина и аллофикоцианина, выделенные из цианобактерии *Nostoc muscorum* описанными ранее способами [2, 20]. В качестве донора электрона использовали дитиотреитол ($3 \cdot 10^{-2}$ М), аскорбат натрия (10^{-3} М) и их смесь.

Кинетику фотосенсибилизированного восстановления $МВ^{2+}$ изучали по возрастанию оптической плотности в максимуме поглощения $МВ^{+\cdot}$ при 395 нм, так как характерный максимум его при 600 нм, определяющий синий цвет восстановленной формы, перекрывается полосой поглощения фикоэритрина. О сенсибилизирующем действии судили по разности количеств $МВ^{+\cdot}$ в присутствии и в отсутствие сенсибилизатора.

Концентрацию $МВ^{+\cdot}$ определяли спектрофотометрически, исходя из того, что 0,1 А при 395 нм соответствует $3{,}4 \cdot 10^{-9}$ М [21]. Реакционную смесь освещали светом $\lambda \geqslant 500$ нм и интенсивностью $\sim 10^3$ Дж$\cdot$М$^{-2}\cdot$с$^{-1}$. При измерении спектра действия восстановления $МВ^{2+}$ интенсивность действующего света выравнивали по энергии (числу квантов) при ширине выделяемого спектрального интервала ~ 10 нм.

Влияние предварительного нагревания на скорость фотосенсибилизированного восстановления $МВ^{2+}$ исследовали, инкубируя сенсибилизатор в буферном растворе либо в реакционной среде при заданной температуре (в пределах 20—80° С с интервалом 5—10° С) в течение 5 мин.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР); спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метилвиологен восстанавливается дитиотреитолом при освещении в присутствии ФБС, если кислород предварительно удален из реакционной среды. Как видно из рис. 1, накоплением $МВ^{+\cdot}$, окрашенного в синий

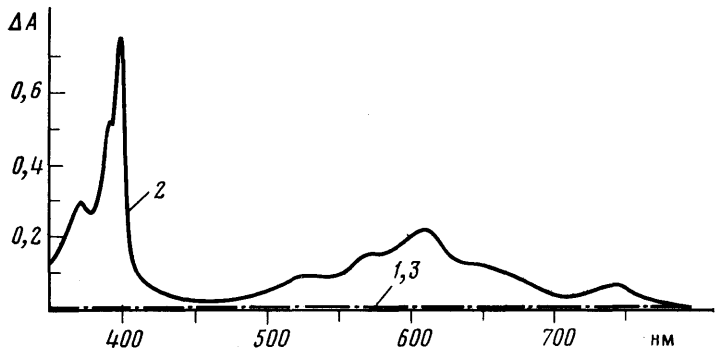


Рис. 1. Дифференциальный спектр фотовосстановления метилвиологена дитиотреитолом (в присутствии ФБС минус в отсутствие ФБС) в 0,6 М фосфатном буфере, содержащем 30%-ный глицерин, pH 8,7: *1* — до освещения; *2* — после 10 мин освещения; *3* — после впуска воздуха

цвет, сопровождается увеличением поглощения при освещении; присутствие воздуха приводит к полному окислению $МВ^{+\cdot}$. Совпадение спектров поглощения до освещения и после впуска воздуха указывает, что ФБС не претерпевает видимых изменений в процессе фотосенсибилизации. После хранения реакционной смеси в вакууме в течение суток при комнатной температуре кинетика сенсибилизированного переноса электрона не изменяется.

Глицерин в количестве до 30% увеличивает скорость реакции; при дальнейшем повышении содержания глицерина возрастает скорость не только сенсибилизированного, но также и прямого восстановления метилвиологена дитиотреитолом.

Кинетика фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена описывается уравнением первого порядка; константа скорости реакции $3 \cdot 10^{-9}$ мин$^{-1}$.

Зависимость сенсибилизированного ФБС фотовосстановления MB^{2+} от природы донора электрона представлена на рис. 2. Как следует из рисунка, аскорбат натрия не эффективен в исследуемой реакции (кривая *2*) и добавление его в дитиотреитол сопровождается уменьшением скорости восстановления метилвиологена (кривая *3*).

Сенсибилизирующее действие ФБС наблюдается при pH 6,0 и выше, оптимальное значение pH 9,5 (рис. 3). При pH выше 9,0 наблюдается прямое фотовосстановление MB^{2+}, о чем свидетельствуют контрольные опыты в отсутствие ФБС.

Скорость и глубина фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена увеличиваются при изменении его концентрации от 10^{-6} до $2 \cdot 10^{-4}$ М, а при более высоком содержании остаются постоянными.

Спектр действия фотосенсибилизированного ФБС восстановления метилвиологена совпадает со спектром поглощения ФБС с той лишь разницей, что увеличивается вклад фикоэритрина $_{558}$ и аллофикоцианинов B и C (рис. 4). Квантовый выход фотосенсибилизированной ФБС реакции в 0,6 М фосфатном буфере, содержащем 30%-ный глицерин, pH 9, составляет $\sim 2\%$.

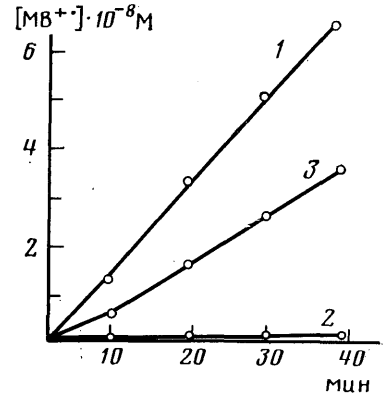


Рис. 2

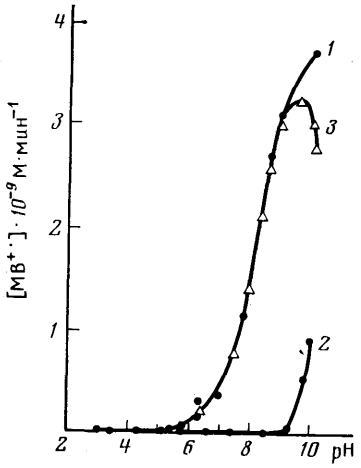


Рис. 3

Рис. 2. Кинетика фотосенсибилизированного ФБС восстановления метилвиологена: *1* — дитиотреитолом; *2* — аскорбатом натрия; *3* — их смесью в соотношении 1 : 1. Концентрация доноров электрона 10^{-3} М, pH 8,2

Рис. 3. Влияние pH на скорость фотосенсибилизированного ФБС восстановления метилвиологена дитиотреитолом: *1* — в присутствии ФБС; *2* — в отсутствие ФБС, *3* — разность между кривыми *1* и *2*

Сопоставление фотовосстановления метилвиологена в присутствии целых ФБС, фрагментов и индивидуальных пигментов показало, что субструктура ФБС, содержащая аллофикоцианины B и C (34S частица), обнаруживает наивысшую активность (рис. 5, кривая *1*). Скорость реакции, сенсибилизированной субструктурой, лишенной аллофикоцианинов B и C (42S частица), ниже, чем для целых ФБС (кривые *2* и *3*). Фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин в растворах — еще менее эффективные сенсибилизаторы (кривые *4—6*). Частицы и индивидуальные пигменты, подобно целым ФБС, полностью инертны при pH $\leqslant$ 6,0 и малоэффективны в нейтральной среде. Оптимум pH для восстановления метилвиологена смещается к 10, когда в качестве сенсибилизатора использовали субструктуры ФБС.

Предварительное нагревание сенсибилизатора влияет на скорость реакции. Как показано на рис. 6, максимальное увеличение скорости

сенсибилизированной реакции в опытах с ФБС и частицами 34S наблюдается после 5 мин прогревания их при 35° С, тогда как частицы 42S необходимо выдерживать при 45° С, а аллофикоцианин — при 40° С для достижения наибольшего эффекта. Оптимальная температура зависит от продолжительности предварительного нагревания.

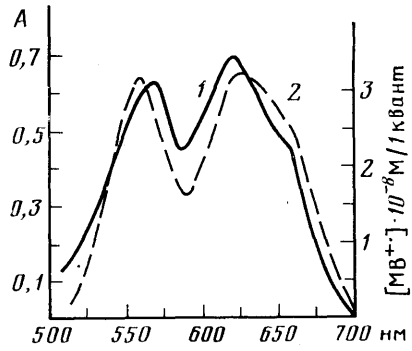


Рис. 4

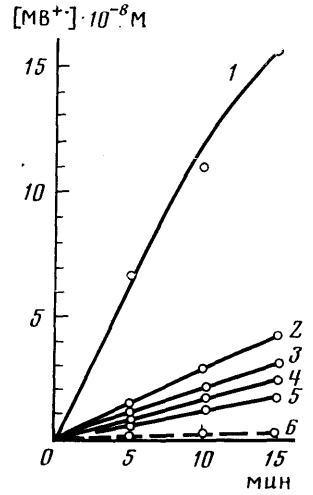


Рис. 5

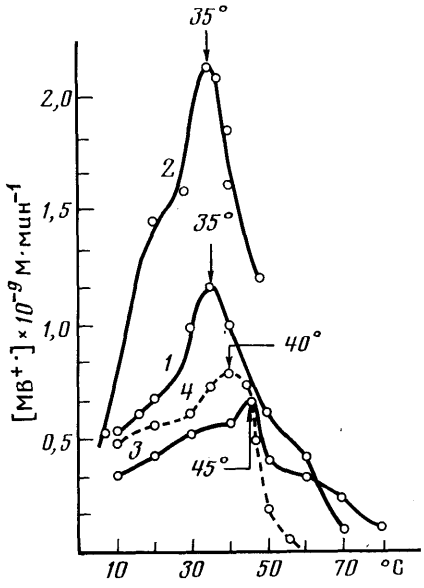


Рис. 6

Рис. 4. Спектр действия фотосенсибилизированного ФБС восстановления метилвиологена дитиотреитолом (*1*) и спектр поглощения ФБС (*2*) при 20° С

Рис. 5. Кинетика фотовосстановления метилвиологена дитиотреитолом в присутствии 34S частиц (*1*), целых ФБС (*2*), 42S частиц (*3*), фикоэритрина (*4*), аллофикоцианина (*5*) и фикоцианина (*6*), pH 8,55

Рис. 6. Влияние предварительного нагревания сенсибилизатора на скорость восстановления $МВ^{2+}$ в присутствии ФБС (*1*), 34S частиц (*2*), 42S частиц (*3*), аллофикоцианина (*4*). На кривых указана температура, после действия которой в течение 5 мин наблюдалась максимальная скорость сенсибилизированной реакции

Еще большее ускорение реакции вызывает слабое прогревание реакционной смеси. Например, активность ФБС меняется следующим образом: в контрольном опыте без предварительного прогревания ФБС она составляет 0,5 мкМ $МВ^{+\cdot}$/мг ФБС·ч, после нагревания ФБС в буфере — возрастает до 0,83 мкМ $МВ^{+\cdot}$/мг ФБС·ч, а после нагревания до 35° С полной реакционной смеси достигает 50 мкм $МВ^{+\cdot}$/мг ФБС·ч.

Влияние температуры на нативность ФБС и изолированных субструктур наблюдали по соответствующим изменениям спектров флуоресценции. После 5 мин нагревания ФБС и 34S частиц до 35° С флуоресценция увеличивается по всему спектру. Прогревание ФБС при 50° С существенно увеличивает флуоресценцию в области излучения аллофикоцианина и фикоцианина, тогда как флуоресценция фикоэритрина

возрастает незначительно. Воздействие температуры $\geqslant 50°$ С на 34S и 42S частицы вызывает сильное тушение флуоресценции, особенно в области излучения фикоцианина и аллофикоцианина.

Метилвиологен в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М тушит флуоресценцию ФБС по всему спектру приблизительно на 30%, т. е. с большей эффективностью, чем наблюдалось в опытах с хлорофиллом и хлоропластами [19]. Дитиотреитол малоэффективен в тушении флуоресценции ФБС. Добавка его к ФБС в присутствии метилвиологена сопровождается возгоранием флуоресценции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о том, что фикобилиновые пигменты обладают способностью к фотосенсибилизации восстановления метилвиологена, окислительно-восстановительный потенциал которого (—0,446 В) близок к потенциалу ферредоксина — акцептору электрона фотосистемы 1. Кинетику процесса определяют природа донора электрона, степень нативности ФБС, природа и реакция среды, концентрация реагентов.

Максимальные скорость ($2{,}2 \cdot 10^{-8}$ М$\cdot$с$^{-1}$) и глубина фотосенсибилизированной ФБС реакции наблюдались в 0,6 М Na—К-фосфатном буфере, содержащем 30%-ный глицерин, при pH 9,5 после предварительного прогревания реакционной смеси при 35° С в течение 5 мин в присутствии избыточных концентраций донора и акцептора электрона.

Катион-радикал метилвиологена удается наблюдать спектрофотометрически при использовании необратимо окисляющегося донора электрона — дитиотреитола ($E_0 = -0{,}336$ В, pH 8,1). Отсутствие видимого фотовосстановления MB^{2+} аскорбатом, так же как в мицеллярных растворах хлорофилла [17], и ингибирование реакции, когда донором служила комбинация дитиотреитол+аскорбат, по-видимому, обусловлены тем, что дегидроаскорбат (окисленная форма аскорбата) восстанавливается $MB^{+\cdot}$. Это согласуется с тем, что аскорбиновая кислота активна как донор электрона при сенсибилизированном ФБС фотовосстановлении метилового красного [11].

Главным фактором, определяющим влияние предварительного нагревания сенсибилизатора, является, по-видимому, стабилизация ФБС при температуре $\leqslant 35°$ С и их деструкция при $\geqslant 50°$ С, обусловливающие соответственно увеличение и падение скорости сенсибилизированной реакции. Возрастание скорости связано со стабилизацией ФБС, а замедление реакции — с уменьшением концентрации активного сенсибилизатора. Стабилизацию ФБС при 30° С отмечали и другие исследователи [22]. Зависимость положения кажущегося температурного оптимума от продолжительности наблюдений объясняется в случае структур увеличением степени воздействия на нековалентные межмолекулярные взаимодействия, а в случае свободных пигментов — усилением смещения диссоциационного равновесия, возрастанием деструкции как индивидуальных пигментов, так и надмолекулярных структур.

Возрастание скорости и глубины фотосенсибилизированного восстановления MB^{2+} при переходе от индивидуальных пигментов к субструктурам и к целым ФБС в качестве сенсибилизатора, а также корреляция данных по влиянию температурных воздействий на нативность структуры и активность сенсибилизатора делают очевидным, что организация пигментов в структуры способствует их стабилизации и проявлению фотосенсибилизирующей способности. Из сопоставления этих данных видно также, что аллофикоцианины В и С являются наиболее активными сенсибилизаторами среди пигментов ФБС.

Совпадение спектра сенсибилизированного восстановления MB^{2+} со спектром поглощения ФБС означает, что в реакции эффективно используется свет, поглощенный всеми пигментами, включенными в ФБС. Эффективная миграция энергии на терминальные акцепторы энергии — аллофикоцианины В и С [13, 14], а также тот факт, что наиболее ак-

тивными сенсибилизаторами являются 34S частицы, содержащие эти пигменты, позволяет думать, что именно аллофикоцианины B и C непосредственно участвуют в фотохимическом акте сенсибилизации.

Ранее отмечалась возможность двух путей фотосенсибилизации фикобилиновыми пигментами окислительно-восстановительных реакций: окислительного и восстановительного в отношении пигмента с образованием промежуточных лабильных форм пигмента радикальной природы [2]. Зависимость скорости и глубины фотосенсибилизированного восстановления $МВ^{2+}$ от pH среды (оптимум в щелочной области), наличие в системе сильного восстановителя, потенциал которого возрастает с увеличением pH (в отличие от значения E_0 пары $МВ^{2+}/МВ^{+\cdot}$, которое не зависит от реакции среды), указывают, что первичным фотохимическим актом сенсибилизации может быть образование промежуточной лабильной фотовосстановленной формы пигмента радикальной природы. Образование свободных радикалов при фотовосстановлении аллофикоцианина B показано в работе Шубина и соавт. [23]. Однако, поскольку времена жизни возбужденного состояния для индивидуальных пигментов в ФБС лежат в пределах 10^{-10}—10^{-12} с, а эффективность образования триплетного состояния у билирубина не превышает 0,05—0,08 [24], вполне вероятной представляется миграция энергии и фотохимическая реакция с участием синглетных возбужденных уровней, что согласуется со значительным возрастанием интенсивности фотосенсибилизации в условиях, благоприятствующих лучшему контактированию реагентов (нагревание до 35° C). Тушение флуоресценции ФБС метилвиологеном указывает на возможность одноэлектронного взаимодействия пигментов в возбужденном состоянии с $МВ^{2+}$. По-видимому, оба механизма (окислительный и восстановительный) могут иметь место при фотосенсибилизированном восстановлении $МВ^{2+}$.

Вопрос о возможной связи свойства ФБС сенсибилизировать восстановление низкопотенциального акцептора электрона с функциями фикобилиновых пигментов в фотосинтезе требует выяснения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ley A. C., Butler W. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, *73*, 3957—3960.
2. *Евстигнеев В. Б., Бекасова О. Д.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1979, *3*, 344—356.
3. *Бекасова О. Д., Кащенцева Е. М., Евстигнеев В. Б.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1978, *4*, 558—564.
4. *Бекасова О. Д., Евстигнеев В. Б.* Биофизика, 1977, *22*, 429—435.
5. *Ilani A., Berns D. S.* J. Membrane Biol., 1972, *8*, 333—356.
6. *Kumbar M., McColl R.* Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 1975, *11*, 627—636.
7. *Vernon L. P.* Acta Chem. Scand., 1961, *15*, 1651—1659.
8. *Krogmann D. W.* In: Encyclopedia of Plant Physiology New Series/Eds Trebst A., Avron M., Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer-Verlag, 1977, *5*, 625—636.
9. *Fujita Y., Pjon C., Suzuki R.* Plant Cell Physiol., 1974, *15*, 779—787.
10. *Pullin C. A., Brown R. G., Evans E. H.* FEBS Letters, 1979, *101*, 110—112.
11. *Бекасова О. Д., Бухов Н. Г., Карапетян Н. В.* Биохимия, 1981, *46*, 287—294.
12. *Ерохина Л. Г., Шубин Л. М., Климов В. В., Бекасова О. Д., Красновский А. А.* Биофизика, 1981, *26*, 132—134.
13. *Синещеков В. А., Муслимов И. А., Бекасова О. Д.* Мол. биол., 1984, *18*, 1.
14. *Бекасова О. Д., Муслимов И. А., Синещеков В. А.,* Биофизика, 1984, *20*, 2.
15. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1965, *163*, 761—764.
16. *Красновский А. А., Чан Ван Ни, Никандров В. В., Брин Г. П.* Мол. биол., 1980, *14*, 287—298.
17. *Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967, *174*, 221—224.
18. *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.* Докл. АН СССР, 1982, *262*, 469—472.
19. *Красновский А. А., Дроздова Н. Н.* Докл. АН СССР, 1966, *167*, 928—930.
20. *Бекасова О. Д., Муслимов И. А., Красновский А. А.* Мол. биол., 1984, *18*, 1.
21. *Furrington J. A., Ebert M., Land E. J., Fletcher K.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, *314*, 372—381.
22. *Zilinskas B. A., Glick R. E.* Plant Physiol., 1981, *68*, 447—452.
23. *Шубин Л. М., Ерохина Л. Г., Проскуряков И. И., Красновский А. А.* Биофизика, 1982, *27*, 724—726.
24. *Sloper R. W., Truscott T. G.* Photochem. Photobiol., 1980, *31*, 445—450.

Поступила в редакцию
8.VII.1983

PHYCOBILISOME PHOTOCHEMISTRY: PHOTOSENSITIZED REDUCTION OF METHYLVIOLOGEN

O. D. BEKASOVA, I. A. MUSLIMOV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The ability of phycobilisomes (PBS) to photosensitize the reduction of methylviologen by dithiothreitol has been shown. This reaction has been studied in dependence on the structural integrity of PBS, nature and pH of the medium, and concentration of reagents. The action spectrum of the reaction has been measured, and its quantum yield has been detected. The quenching of PBS fluorescence by methylviologen has been studied. The maximum rate of electron transfer photosensitized by PBS is observed in 0.6 M phosphate buffer containing 30% of glycerine, pH 9.5. The saturation occurs at methylviologen concentration of $2 \cdot 10^{-4}$ M. Under these conditions the PBS activity reaches 0,3 μmol/mg PBS.h and increases 100 times after preliminary heating of the reaction mixture for 5 min. at 35° C. The light in the range of 520—680 nm is active for the photosensitized reduction of methylviologen. The quantum yield of the reaction is about 2%. In structures phycobiliproteins are more effective sensitizers than in solutions. The highest activity is observed for the substructure of PBS which contains allophycocyanin B and allophycocyanin C (34S particle). The possible mechanisms of the reaction are under consideration.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 31, вып. 1 1984 г.

УДК 581.132.1

ОБРАЗОВАНИЕ ФОТОАКТИВНЫХ ФОРМ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ КИСЛОРОДА

Л. М. ВОРОБЬЕВА, И. Г. НАЗАРОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Под влиянием удаления и повторного пуска кислорода обнаружены обратимые перестройки низкотемпературных спектров флуоресценции этиолированных листьев, свидетельствующие о дезагрегации пигментного комплекса, сопряженной с обратимой инактивацией предшественника хлорофилла. Полученные данные указывают на участие кислорода в формировании фотоактивных длинноволновых форм протохлорофиллида (655 нм) и хлорофиллида (690—695 нм).

Протохлорофиллид — протохлорофилл — фототрансформация — влияние кислорода.

В этиолированных листьях присутствует несколько форм предшественника хлорофилла. Доминирующий в низкотемпературном спектре флуоресценции этиолированных листьев максимум при 655 нм принадлежит форме, наиболее активной в процессе фотохимического образования хлорофиллида. Эта длинноволновая форма представлена в основном бесфитольным пигментом протохлорофиллидом [1]. Низкий максимум в более коротковолновой области спектра при 628—635 нм принадлежит в основном пигменту, обладающему фитолом,— протохлорофиллу, превращающемуся на свету с низкой скоростью или вообще неспособному к фототрансформации [2]. Для удобства изложения мы обозначаем пигменты протохлорофилловой природы (протохлорофиллид и протохлорофилл) как ПХЛ.

Сравнение активностей отдельных форм ПХЛ в процессе образования хлорофилла и взаимопревращения этих форм важно для понимания особенностей формирования структуры пигментного комплекса фотосинтезирующих организмов и механизма фотопревращения пигментов в процессе биосинтеза хлорофилла. Под влиянием различных воздействий на пигментную и белковую части пигментно-белкового комплекса этиолированных листьев [3—5], при нарушении целостности структуры листьев путем растирания в водных средах [2] или замораживанием — оттаиванием [6] наблюдается относительное возрастание коротковолновых форм ПХЛ и снижение его способности к фототрансформации.

Обнаружена обратимость повреждающего воздействия: из коротковолновой формы ПХЛ, получаемой при нагревании этиолированных листьев [3], обработке их H_2S [4] и растирании в водных средах [7, 8], а также при действии паров диэтилового эфира [5] можно вновь получить длинноволновую форму ПХЛ, способную к фототрансформации. Дюжарден [3] полагает, что нагревание может обусловливать обратимую денатурацию белка-носителя ПХЛ, однако длительное время, необходимое для наблюдения обратимости (минуты), не исключает возможности нового синтеза белка. Гассман [4] объясняет наблюдаемое им действие H_2S на пигментный комплекс этиолированных листьев обратимыми конформационными изменениями, обусловленными уменьшением дисульфидных связей в белке. При изучении фотопревращения ПХЛ в этиолированных листьях, обладающих большими количествами коротковолновой формы пигмента, было показано [9], что ее превра-

щение в хлорофиллид идет через промежуточное образование длинноволновой фотоактивной формы ПХЛ 655.

Имеются свидетельства о том [10, 11], что кислород является фактором, регулирующим формирование структуры пигментного комплекса у этиолированных и зеленеющих листьев. Присутствие кислорода необходимо для образования фотохимически активной формы ПХЛ, для осуществления промежуточных световых [11] и темновых [10] реакций на пути биосинтеза хлорофилла. Без кислорода происходит дезагрегация ПХЛ в белковом комплексе, ведущая к накоплению в этиолированных листьях фотохимически малоактивного пигмента с максимумом флуоресценции при 635 нм и образованию при освещении коротковолновой формы хлорофиллида с флуоресценцией в области 675—680 нм [11].

В данной работе изучали условия обратимости спектральных нарушений, имеющих место при выдерживании этиолированных листьев без воздуха. Полученные результаты кратко описаны ранее [12].

МЕТОДИКА

Для опытов использовали этиолированные листья 7—10-дневных проростков фасоли и кукурузы, выращенных в темноте при 20° на среде Кнопа. Листья прикрепляли к влажной фильтровальной бумаге и помещали в вакуумную трубку. Воздух удаляли масляным вакуумным насосом. После откачивания воздуха листья выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение разного времени.

В отдельных опытах исследовали влияние длительности откачки воздуха на наблюдаемый в работе эффект изменения спектральных свойств этиолированных листьев. Обнаружено, что увеличение времени откачки с 10 до 30 мин ускоряет спектральные изменения при последующей инкубации листьев в темноте. Описанные в работе опыты проведены после 30-мин откачки.

Для фотопревращения ПХЛ этиолированные листья освещали при 20° лампой накаливания ($3 \cdot 10^4$ Вт·см$^{-2}$).

Для выяснения обратимости спектральных изменений после выдерживания листьев в вакууме мы пускали воздух или кислород при +20 и —196°. В последнем случае после измерения спектра флуоресценции, не трогая лист с места, под лучом возбуждающего света пускали воздух (или кислород) и регистрировали интенсивность флуоресценции в максимуме ПХЛ или хлорофиллида. После выхода интенсивности флуоресценции на стационарный уровень записывали спектр флуоресценции. При пуске кислорода использовали газ из баллона.

В опытах с H_2S воздух из вакуумной трубки с этиолированным листом удаляли 3-мин откачкой, после чего в вакууме приливали раствор соляной кислоты к сухому сульфиду натрия ($Na_2S \cdot 9H_2O$) и обрабатывали этиолированный лист в течение разного времени выделяющимся H_2S. Для проверки обратимости спектральных изменений, обусловленных воздействием H_2S, производили его откачку из вакуумной трубки в течение 3—5 мин, после чего пускали воздух при 20°.

О структуре пигментного комплекса судили по соотношению максимумов в низкотемпературных спектрах флуоресценции при —196°, измеряемых с помощью фотоэлектрического флуориметра с использованием фотоумножителя ФЭУ-79. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутно-кварцевую лампу СВД 120 А со светофильтрами УФС-2, ЗС-3 (линия ртути 365 нм).

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-14 при —196°.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пуск воздуха (кислорода) при комнатной температуре

Мы сравнили спектры флуоресценции этиолированных листьев в следующих вариантах опытов: 1) контрольный лист без обработки; 2) 1 мин освещения в присутствии воздуха; 3) после стояния в вакууме; 4) 1 мин освещения без воздуха после стояния в вакууме; 5) пуск воздуха (кислорода) при 20° после стояния в вакууме; 6) 1 мин освещения после стояния в вакууме и пуска воздуха.

В соответствии с результатами, полученными ранее [11], опыты подтвердили, что по мере выдерживания этиолированных листьев в вакууме при комнатной температуре происходит постепенное превращение форм ПХЛ 655→ПХЛ 635 (рис. 1 и 2) и коротковолновое смещение

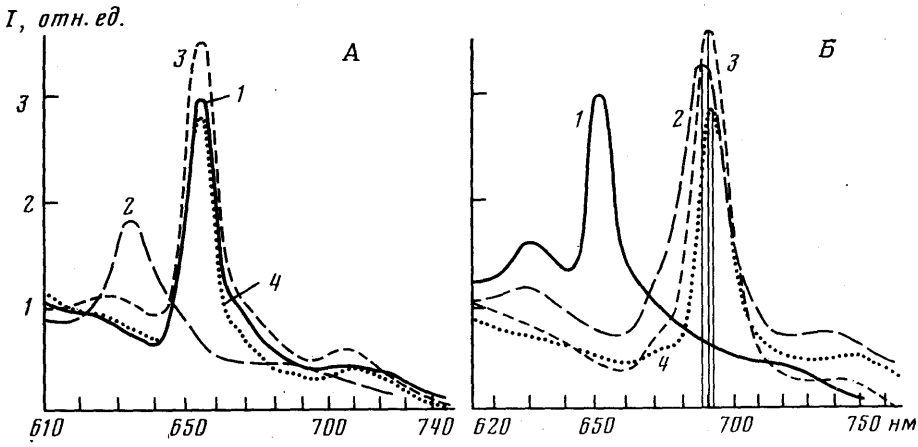


Рис. 1. Обратимые перестройки спектров флуоресценции (—196°) этиолированных (*А*) и зеленеющих (*Б*) листьев кукурузы при удалении и пуске кислорода при +20°

А: *1* — этиолированный лист на воздухе, *2* — 4 ч без воздуха, *3* — 4 ч без воздуха, пуск O_2, 2 с в темноте при 20°, *4* — как 3, но 30 мин в темноте при 20°. *Б*: *1* — этиолированный лист 4 ч без воздуха, *2*—*4* ч без воздуха, 1 мин освещения; *3* — 4 ч без воздуха, пуск O_2, 1 мин освещения, *4* — этиолированный лист 1 мин освещения на воздухе

максимума флуоресценции пигмента, образуемого под действием света, за счет роста интенсивности флуоресценции в области 674—680 нм (рис. 3).

Пуск воздуха при комнатной температуре к этиолированным листьям, обладающим после стояния в вакууме измененным спектром флуоресценции, приводил к обратимости спектральных изменений (рис. 1, *А*). При этом наблюдали переход ПХЛ 635→ПХЛ 655 и в соответствии с этим возрастало количество фотоактивного ПХЛ, превращающегося при освещении. Максимум флуоресценции пигмента, образуемого на свету, после пуска воздуха располагался в более длинноволновой области, чем при освещении листа, выдержанного в вакууме (рис. 1, *Б*). Эффект обратимости перестройки пигментного комплекса проявлялся немедленно после пуска воздуха (2—5 с лист выдерживали при 20° для диффузии воздуха в ткань листа).

Как указывалось ранее [11] и видно на рис. 2, *Б*, *В*, скорость возрастания коротковолновой формы ПХЛ 635 без воздуха при комнатной температуре зависит от физиологического состояния листьев.

Степень обратимости изменений в спектрах флуоресценции при пуске воздуха при 20° уменьшалась или отсутствовала вовсе при стоянии этиолированного листа в вакууме в течение нескольких часов после полного перехода ПХЛ 655→ПХЛ 635. Сходное уменьшение степени обратимости спектральных перестроек вследствие длительного пребывания ПХЛ в виде коротковолновой формы ранее наблюдалось при воздействии на этиолированные листья H_2S [4]. Такое уменьшение указывает на участке в перестройках пигментных форм ПХЛ конформационных изменений белковой части комплекса. Можно полагать, что на обратимой стадии эти конформационные изменения имеют локальный характер, допускающий возвращение в исходное состояние связей пигмента и белка. При длительном выдерживании этиолированного листа без кислорода происходят глубокие нарушения, исключающие эту возможность.

Спектральные перестройки при выдерживании этиолированных листьев в вакууме, наблюдаемые нами с помощью флуоресцентной методики, коррелировали с изменениями в спектрах поглощения. При стоянии без воздуха происходило падение максимума поглощения активной

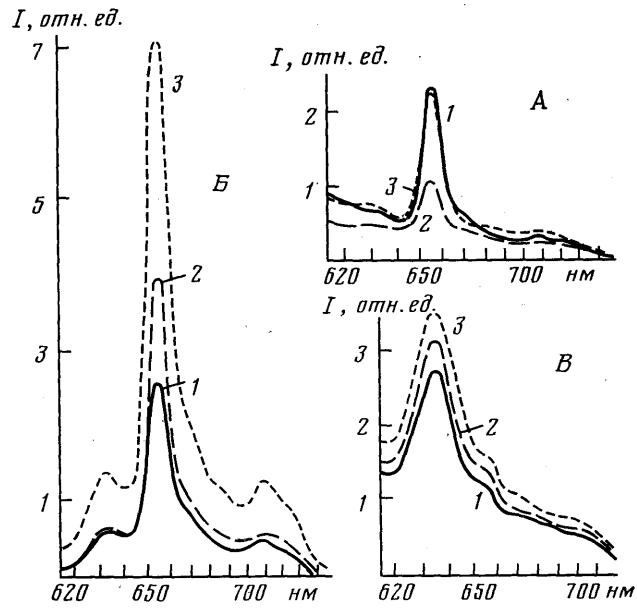


Рис. 2. Изменение спектров флуоресценции (—196°) этиолированных листьев кукурузы при удалении кислорода и его пуске при —196°

А: *1* — этиолированный лист на воздухе, *2* — 30 мин откачки, *3* — пуск O_2 к *2*. *Б* и *В*: (листья разных растений): *1* — 4 ч без воздуха, *2* — пуск к *1* 0,3% O_2, *3* — пуск к *2* O_2 до 21%

формы ПХЛ при 650 нм (флуоресценция 655 нм) и образование после освещения хлорофиллида, поглощающего короче 680 нм, тогда как освещение в присутствии воздуха приводило к появлению максимума поглощения этого пигмента при 684—685 нм (флуоресценция 695 нм) [13, 14]. Пуск воздуха к этиолированным листьям, выдержанным в вакууме приводил при последующем освещении к появлению максимума поглощения хлорофиллида при 684—685 нм.

Пуск воздуха (кислорода) при —196°

Этиолированные листья. Как известно, откачка воздуха из этиолированного листа не вызывает существенных изменений вида спектра флуоресценции и соотношения максимумов [11], но, как видно из рис. 2, *А*, приводит к понижению интенсивности флуоресценции по всему спектру. Пуск воздуха при —196° в этом случае вызывал увеличение интенсивности флуоресценции по всему спектру. Сходные изменения флуоресценции наблюдались в опытах с этиолированными листьями, длительно выдержанными без воздуха, в спектре флуоресценции которых обнаруживалась лишь форма ПХЛ 635 (рис. 2, *В*).

При частичном переходе форм ПХЛ 655→ПХЛ 635 пуск небольших количеств воздуха (0,3% кислорода) приводил к увеличению флуоресценции главным образом при 655 нм, тогда как возрастание флуоресценции при 635 нм было гораздо меньшим или вообще не наблюдалось (рис. 2, *Б*). Дальнейшее увеличение количеств кислорода приводило к возрастанию интенсивности флуоресценции по всему спектру. Насыщение возрастания флуоресценции ПХЛ в этиолированных листьях наступало при пуске 0,6—0,8% кислорода.

Регистрация изменений интенсивности флуоресценции в максимуме ПХЛ 655 при пуске кислорода (—196°) показала, что кинетика возрастания флуоресценции в большинстве опытов обладает двумя составля-

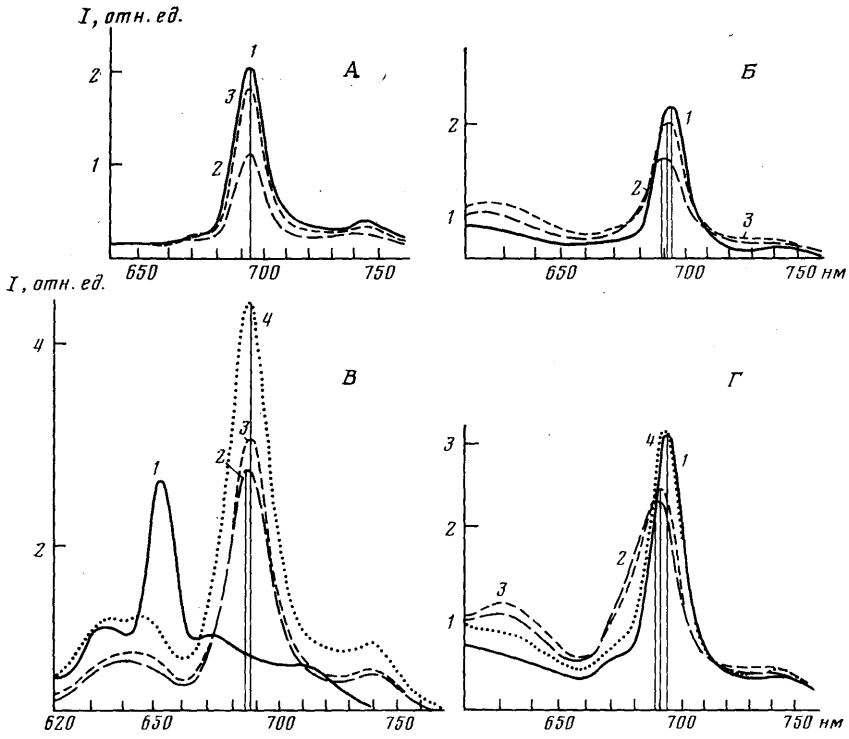


Рис. 3. Изменения спектров флуоресценции (—196°) освещенных при 20° этиолированных листьев кукурузы под влиянием удаления и пуска кислорода

А: *1* — этиолированный лист на воздухе, 4 мин освещения, *2* — 30 мин откачки, 4 мин освещения, *3* — пуск O_2 к 2 при —196°. *Б*: *1* — этиолированный лист на воздухе, 1 мин освещения, *2* — 2 ч без воздуха, 1 мин освещения; *3* — пуск O_2 к 2 при —196°. *В*: *1*— этиолированный лист 4 ч без воздуха, *2* — 4 ч без воздуха, 1 мин освещения, *3* — пуск 0,3% O_2 к 2 при —196°, *4* — пуск O_2 до 21% к 3 при —196°. *Г*: *1* — этиолированный лист на воздухе, 1 мин освещения, *2* — 5 ч без воздуха, 1 мин освещения, *3* — пуск O_2 к 2 при —196°, *4* — 5 ч без воздуха, 1 мин освещения, пуск O_2 при 20°

ющими — быстрой (1—2 с) стадией подъема сразу после пуска воздуха (кислорода) и более продолжительной (10—20 с) стадией постепенного подъема флуоресценции. Можно полагать, что скорость и кинетические особенности увеличения интенсивности флуоресценции в этих опытах зависят от скорости диффузии кислорода в замороженный лист.

Этиолированные листья, освещенные в вакууме при 20°. Картина наблюдаемых спектральных изменений, обусловленных пуском воздуха при —196°, зависела от времени пребывания этиолированного листа без воздуха и длительности освещения в вакууме при комнатной температуре. При освещении этиолированного листа в течение 1—5 мин сразу после откачивания спектр флуоресценции по виду существенно не отличался от спектра листа, освещенного на воздухе, но обладал более низким максимумом образованного на свету хлорофиллида. Пуск воздуха при —196° в этом случае вызывал возрастание интенсивности флуоресценции по всему спектру без изменения положения и соотношения максимумов (рис. 3, *А*).

После нескольких часов пребывания этиолированного листа в вакууме и возрастания максимума флуоресценции 635 нм освещение в течение 1—5 мин вызывало образование максимума хлорофиллида, расположенного в области спектра короче 692—695 нм. Пуск воздуха при —196° в этом случае приводил помимо возрастания флуоресценции по всему спектру к смещению максимума флуоресценции образованного

на свету пигмента на несколько нанометров в длинноволновую сторону и в большинстве опытов к уменьшению флуоресценции в области 673—680 нм (рис. 3, *Б—Г*).

При освещении этиолированных листьев в вакууме в течение длительного времени (60 мин и более) пуск воздуха при —196° приводил к смещению максимума флуоресценции не в длинноволновую, а в коротковолновую сторону спектра.

Наблюдаемое возрастание флуоресценции при пуске воздуха к этиолированным и освещенным в вакууме листьям при —196° можно объяснить образованием флуоресцирующего комплекса пигмента с кислородом и стабилизацией этого комплекса при низкой температуре [15].

Влияние сероводорода на этиолированные листья

При замене в вакуумной трубке воздуха на H_2S в соответствии с данными Гассмана [4] наблюдалось быстрое превращение форм ПХЛ: уменьшение флуоресценции при 655 нм и возрастание при 635 нм. Следует указать на меньшую скорость этого превращения в наших опытах по сравнению с описанной [4]. Возможно, что это объясняется тем, что Гассман измерял спектры поглощения, а мы использовали флуоресцентную методику, не исключающую миграцию энергии от коротковолновых форм ПХЛ и ПХЛ 655.

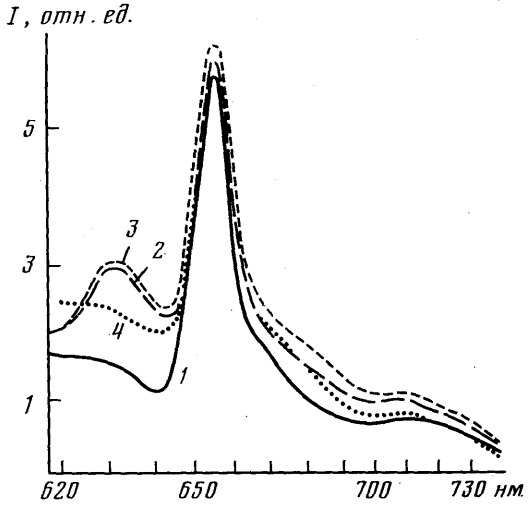


Рис. 4. Изменение спектров флуоресценции (—196°) этиолированных листьев кукурузы при воздействии и последующем удалении сероводорода

1—этиолированный лист на воздухе, *2* — 3 мин откачки, 5 мин обработки H_2S, *3* — 3 мин откачки, 5 мин обработки H_2S, 3 мин откачки, *4*—3 мин откачки, 5 мин обработки H_2S, 3 мин откачки, пуск O_2 при 20°

Удаление H_2S из трубки откачкой в вакууме не приводило к обратимости спектральных изменений. По-видимому, дезагрегация и инактивация пигментного комплекса этиолированных листьев под действием H_2S не связаны с обратимым взаимодействием последнего с белком-носителем ПХЛ, ведущим к уменьшению дисульфидных связей, предполагаемым Гассманом [4].

При пуске воздуха после откачки H_2S происходило частичное превращение форм ПХЛ 635→ПХЛ 655 (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Схема превращения нативных пигментных форм (максимумы флуоресценции в нм при —196°) в процессе зеленения этиолированных листьев, предложенная Литвиным с соавт. [13, 14], включает две последовательно идущие фотореакции: ПХЛ 655 $\xrightarrow{hvI}$ ХЛ 684 $\xrightarrow{hvII}$ ХЛ 695→ХЛ 683, где ХЛ обозначает и хлорофилл и хлорофиллид. Форма ХЛ 675 нм,

наблюдаемая под действием света низкой интенсивности, по этой схеме образуется в темноте из ХЛ 684 нм.

Аналогичная схема Торне [16] также описывает две фотореакции с несколько отличной последовательностью пигментных форм: ПХД 655 $\xrightarrow{h\nu I}$ промежуточный продукт 674 $\xrightarrow{h\nu II}$ ХД 687 → ХД 694 → ХЛ 680 (ПХД — протохлорофиллид, ХД — хлорофиллид, ХЛ — хлорофилл), в которой первый стабильный продукт обладает флуоресценцией при 674 нм.

Результаты, полученные в данной работе и ранее [10, 11] свидетельствуют о том, что на спектральные свойства этиолированных листьев и последовательность смены форм пигментов в процессе биосинтеза хлорофилла влияет кислород. Его удаление ведет к превращению ПХЛ в коротковолновую фотохимически малоактивную форму. Хлорофиллид, образующийся из него на свету, также обладает коротковолновым максимумом флуоресценции [11], фитолизации хлорофиллида не происходит [10]. Пуск кислорода (воздуха) при 20° к листьям, обладающим измененным пигментным комплексом, приводит к появлению длинноволновых форм. Скорость наблюдаемых спектральных изменений при пуске кислорода указывает на то, что эти изменения, по-видимому, обусловливаются не энзиматическими реакциями, а являются следствием непосредственного взаимодействия пигмента с кислородом. Наиболее доказательными в этом плане являются результаты опытов с зеленеющими листьями, у которых перераспределение высоты максимумов в спектре флуоресценции вызывает пуск кислорода при —196° при исключении каких-либо энзиматических реакций.

Наблюдаемые нами перестройки в низкотемпературных спектрах флуоресценции коррелировали с изменениями соотношения форм ПХЛ в спектрах поглощения. Это свидетельствует о том, что изменения в спектрах флуоресценции отражают действительные обратимые перестройки связей пигмента в белково-липидной матрице, связанные с удалением кислорода из пигментного комплекса, или взаимодействием этого комплекса с кислородом при его пуске. Этот вывод подтверждается результатами опытов по обработке этиолированных листьев H_2S — спектральные изменения, наблюдаемые нами по спектрам флуоресценции и по спектрам поглощения в опытах Гассмана [4], идентичны. Проведенное нами исследование показало, что спектральные изменения и обратимая инактивация ПХЛ в опытах с H_2S обусловлены структурными превращениями пигментного комплекса под действием удаления и пуска кислорода. Можно полагать, что H_2S в этиолированных листьях служит восстановителем связанного с пигментом кислорода, обусловливая нарушение нативной структуры комплекса.

Является ли взаимодействие пигмента и кислорода темновым или для его осуществления необходим свет? Этот вопрос относится ко всем исследованиям, посвященным изучению пигментного комплекса фотосинтезирующих организмов спектральными методами, в которых предусматривается освещение образца измеряющим светом. Тот факт, что превращение коротковолновых форм ПХЛ в листьях [9] и гомогенатах [8] в длинноволновый ПХЛ активируется освещением, может указывать на необходимость фотоактивации реакции пигмента с кислородом.

Этот вопрос возникает также в связи с обсуждением механизма формирования длинноволновых форм хлорофиллида 690—695 нм. Образование в этиолированных листьях на свету низкой интенсивности или в самом начале процесса зеленения [13, 14, 16] коротковолновой формы хлорофиллида 675 нм, зависимость спектрального сдвига 675 → 690—695 от интенсивности света [14] и отсутствие этого превращения в вакууме, по-видимому, указывают на то, что этот длинноволновый сдвиг является следствием фотохимической реакции между пигментом и кислородом, имеющей пороговую интенсивность света.

В модельных опытах показано, что длинноволновые формы всех основных пигментов фотосинтезирующих организмов являются правильно упакованными структурами, у которых в качестве соединительных мостиков встроены молекулы воды или других низкомолекулярных соединений [17, 18]. Известны реакции окислительной полимеризации олефинов с кислородом, приводящие к образованию полимерных перекисей или димеров, содержащих соединительные мостики из молекул кислорода [19, 20].

Предполагается, что в отличие от длинноволновых форм ПХЛ и хлорофиллида у коротковолновых форм этих пигментов, образующихся в этиолированных и зеленеющих листьях при нарушении их структуры, отсутствует агрегация молекул [6]. Можно думать, что она отсутствует и у коротковолновых форм этих пигментов, образующихся в отсутствие кислорода, а пуск кислорода ведет к образованию упорядоченных структур. Полученные в работе данные позволяют предположить, что длинноволновые формы ПХЛ 655 в этиолированных и хлорофиллида 695 нм в зеленеющих листьях являются агрегированными формами, у которых в качестве соединительных мостиков между молекулами встроены молекулы кислорода.

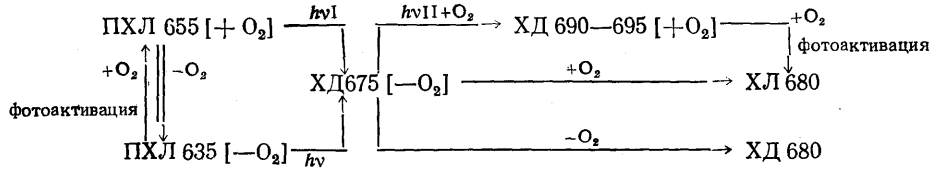


Рис. 5. Предполагаемая схема участия кислорода в превращениях нативных форм пигментов в процессе биосинтеза хлорофилла *а* в этиолированных листьях (максимумы флуоресценции при —196° в нм)

ПХЛ — протохлорофиллид, ХД — хлорофиллид, ХЛ — хлорофилл

Коротковолновые формы ПХЛ в этиолированных и хлорофиллида в зеленеющих листьях, возникающие в вакууме, по-видимому, лишены кислорода. Все изложенное выше позволяет высказать предположение, что хлорофиллид 675 нм, образующийся в этиолированных листьях при их освещении на воздухе, также лишен связанного с ним кислорода, который встраивается в структуру пигментного комплекса позже путем второй фотохимической реакции [13, 14, 16], приводя к образованию длинноволновой формы хлорофиллида 690—695 нм.

При растирании этиолированных листьев в водных средах для превращения коротковолновой формы пигмента в ПХЛ 655 и возвращения способности ПХЛ к фотопревращению требуется присутствие энзиматической системы, генерирующей образование НАДФН [7]. Это позволило Гриффитсу [21] предположить существование в этиолированных листьях энзиматического комплекса, содержащего ПХЛ и НАДФ·Н-оксидоредуктазу. Полученные нами данные позволяют предположить, что в этот комплекс в качестве необходимого компонента входит длинноволновая форма ПХЛ, структурно связанная с кислородом. Предполагается [22], что у ряда оксидаз и оксигеназ атом железа фермента связан с молекулой кислорода и переход таких ферментов в активную форму происходит при переносе электрона с железа на молекулу кислорода с образованием супероксидного иона. Образование активного комплекса ПХЛ при взаимодействии с кислородом, показанное в данной работе, позволяет предполагать участие кислорода в фотохимических реакциях, включенных в процесс биосинтеза хлорофилла.

На основании изложенных выше результатов и известных литературных данных [8—11, 13, 14, 16] мы предлагаем гипотетическую схему участия кислорода в превращениях нативных форм пигментов в про-

цессе биосинтеза хлорофилла (рис. 5). На схеме в скобках указано предполагаемое нами наличие или отсутствие кислорода, связанного с данной формой пигмента.

Без кислорода можно наблюдать фотопревращение лишь небольшой части ПХЛ, в то время как переход ПХЛ 635 в фотоактивную форму ПХЛ 655, образование длинноволнового хлорофиллида 695 нм, фитолизация хлорофиллида 695 нм и сопровождающий ее коротковолновый сдвиг происходят с участием кислорода. Можно предположить, что наблюдаемая низкая активность ПХЛ 635 также обусловлена присутствием следов кислорода. Перечисленные реакции, включенные в процесс биосинтеза хлорофилла, являются фотохимическими и не идут у высших растений без света (ПХЛ 655→ХД 675; ХД 675→ХД 690—695) [13, 14, 16], нуждаются в фотоактивации (ПХЛ 635→ПХЛ 655) [8, 9] или ускоряются освещением (ХД 695→ХД 680) [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Сорокина А. Д.* Фракционирование различных пигментных форм в гомогенатах этиолированных и освещенных листьев.— Докл. АН СССР, 1961, т. 136, № 6, с. 1227.
2. *Воробьева Л. М., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Фитольные и бесфитольные формы пигментов в листьях и гомогенатах.— Биохимия, 1963, т. 28, вып. 3, с. 524.
3. *Dujardin E.* Reversible transformation of the $P_{657-650}$ form into $P_{633-628}$ in etiolated bean leaves.— Plant Sci. Letters, 1976, v. 7, № 2, p. 91.
4. *Gassman M. L.* A reversible conversion of phototransformable protochlorophyll(ide)$_{650}$ to photoinactive protochlorophyll(ide)$_{623}$ by hydrogen sulfide in etiolated bean leaves.— Plant Physiol., 1973, v. 51, № 1, p. 139.
5. *Воробьева Л. М., Щербакова И. Ю., Красновский А. А.* Действие паров органических растворителей на протохлорофилловый комплекс этиолированных листьев. Условия обратимого и необратимого повреждения.— Биохимия, 1979, т. 44, вып. 5, с. 880.
6. *Butler W. L., Briggs W. R.* The relation between structure and pigments during the first stages of proplastid greenings.— Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 112, № 1, p. 45.
7. *Griffiths W. T.* Source of reducing equivalents for the *in vitro* synthesis of chlorophyll from protochlorophyll.— FEBS Letters, 1974, c. 46, № 1, p. 301.
8. *Николаева Л. Ф., Раскин В. И., Закиров А.* Об эффективности фотовосстановления и превращения форм протохлорофиллида в присутствии никотинамидадениндинуклеотидфосфата.— Научн. докл. высш. школы. Биол. науки, 1972, № 4, с. 70.
9. *Раскин В. И., Акулович Н. К., Годнев Т. Н., Орловская К. И* Спектр действия превращения протохлорофиллид-голохрома 634 в хлорофиллид — голохром 673— В кн.: Метаболизм и строение фотосинтетического аппарата. Минск: Наука и техника, 1970, с. 23.
10. *Воробьева Л. М., Красновский А. А.* Влияние кислорода на промежуточные стадии образования хлорофилла в этиолированных листьях.— Докл. АН СССР, 1977, т. 232, № 1, с. 225.
11. *Воробьева Л. М., Назарова И. Г., Красновский А. А.* Влияние анаэробиоза на спектральные свойства пигментов этиолированных листьев и их фотопревращения.— Физиол. растений, 1981, т. 28, вып. 4, с. 727.
12. *Воробьева Л. М., Назарова И. Г.* Обратимые перестройки пигментного комплекса листьев.— Тез. докл. симпозиума специалистов стран-членов СЭВ: Исследование биогенеза, структуры и функции фотосинтетического аппарата в связи с преобразованием солнечной энергии. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1981, с. 11.
13. *Литвин Ф. Ф., Ефимцев Е. И., Игнатов Н. В., Беляева О. Б.* Доказательство существования двух фотохимических реакций в процессе биосинтеза хлорофилла и исследование переноса энергии между ними.— Физиол. растений, 1976, т. 23, вып. 1, с. 17.
14. *Литвин Ф. Ф.* Моделирование системы агрегированных форм хлорофилла и сопровождающих пигментов в растворах, пленках и мономолекулярных слоях.— В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза. М.: Наука, 1966, с. 96.
15. *Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н.* Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск: Наука и техника, 1968, с. 483.
16. *Thorne S. W.* The greeing of etiolated bean leaves. I. The initial photoconversion process.— Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 226, № 1, p. 113.
17. *Красновский А. А., Быстрова М. И.* Перестройка агрегированных форм хлорофилла и бактериохлорофилла.— Докл. АН СССР, 1967, т. 174, № 2, с. 480.
18. *Быстрова М. И., Мальгошева И. Н., Красновский А. А.* Изучение молекулярной организации агрегированных форм хлорофилла и его аналогов.— Молек. биол., 1976, т. 10, вып. 1, с. 193.

19. *Хавкинс Э. Дж.* Органические перекиси, их получение и реакции. М.: Химия, 1964, с. 343.
20. *Могилевич М. М.* Окислительная полимеризация винильных мономеров.— Успехи химии, 1979, т. 48, вып. 2, с. 362.
21. *Griffiths T.* Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes.— Biochem. J., 1978, v. 174, № 3, p. 681.
22. *Косаганова Н. Ю., Рихирева Г. Т., Пулатова М. К.* Обнаружение методом ЭПР комплексов Fe^{2+} ... O_2 и измерение их содержания в тканях животных при патологии и экстремальных физиологических условиях.— Studia Biophysica, 1982, v. 91, № 3, p. 201.

Поступила в редакцию
29.III.1983

THE PRODUCTION OF PHOTOACTIVE FORMS OF PROTOCHLOROPHYLLIDE AS AFFECTED BY OXYGEN

L. M. VOROBIEVA, I. G. NAZAROVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Some reversible changes in the low-temperature fluorescence spectra of etiolated leaves were observed on removing and reentering oxygen. They provided evidence for a disaggregation of the pigment complex related to the reversible inactivation of the chlorophyll precursor. The results obtained indicate that oxygen is involved in the formation of photoinduced long wavelength species of protochlorophyllide (655 nm) and chlorophyllide (690—695 nm).

БИОФИЗИКА

Том XXIX, вып. 1 1984

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

АКТИВНОСТЬ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS ПРИ НАГРЕВАНИИ И ИЗМЕНЕНИИ pH

ДРОЗДОВА Н. Н., ВЫЧЕГЖАНИНА И. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследована зависимость функциональной активности реакционных центров (РЦ) от структурных нарушений пигмент-белкового комплекса, вызванных изменением кислотности среды и нагреванием. Показано, что повышение температуры до 50° вызывает увеличение светоиндуцированного сигнала при $\lambda=960$ нм, сменяющееся затем резким уменьшением ΔA_{960}. Инактивация РЦ, вызванная дальнейшим нагреванием, сопровождается существенными изменениями в спектрах поглощения и КД, которые свидетельствуют об уменьшении количества фотоактивных форм бактериохлорофилла *б* и о конформационных изменениях белкового компонента. Дезагрегация димера Р960, наступающая при нарушении связи пигмента с белком, ведет к необратимому окислению мономерного пигмента до хлорофиллоподобного продукта «680». Изменения ΔA_{960}, ультрафиолетовых спектров флуоресценции, спектров поглощения и КД зависят от pH среды. В кислой области pH изменения происходят при более низких температурах, чем в щелочной и нейтральной средах. Высказано предположение, что нарушение конформации связанного с пигментом белка вызывает изменение функциональной активности и стабильности РЦ и что появление окисленного продукта «680» может служить указанием на изменение нативного состояния пигмент-белкового комплекса.

Реакционные центры фотосинтезирующих бактерий представляют пигмент-белковые структуры, в которых происходит первичное преобразование энергии света. В РЦ осуществляется перенос электрона от димера бактериохлорофилла к первичному акцептору электрона [1, 2]. РЦ, выделенные из мембран хроматофоров бактерий Rhodopseudomonas viridis, представляют собой комплекс бактериохлорофилла *б*, бактериофеофитина *б* и некоторых редокскофакторов со специфическим белком [3, 4]. Изучение РЦ, содержащих в качестве первичного донора электрона димер БХл *б* (Р960), представляет особый интерес в связи с тем, что бактерии Rh. viridis используют для фотосинтеза инфракрасное излучение до 1 микрона. Фотоокисление Р960 приводит к выцветанию полосы при 960 нм, смещению полосы при 830 нм в синюю область спектра и появлению новой полосы при 1300 нм, соответствующей катион-радикалу Р960, образующемуся при первичном разделении заряда [3, 5, 6]. В работах, проведенных с РЦ из Rhodopseudomonas sphaeroides, указывается на возможность конформационных превращений белков РЦ в процессе переноса электрона к хинонам [7], а также влияние pH на скорость переноса электрона от первичного акцепторного комплекса на вторичные хиноны [8, 9].

В настоящей работе с целью выяснения условий оптимизации функционирования РЦ изучалось влияние кислотности среды и нагревания.

Материалы и методы. РЦ из бактерий Rh. viridis были выделены из хроматофоров с использованием детергента лаурилдиметиламиноокида (ЛДАО) с последующей хроматографией на гидроксилапатите и осаждением сульфатом аммония [10]. Гидроксилапатит получен по методу [11]. Образцы РЦ хранились в замороженном состоянии в 0,01 М *трис*-буфере pH 8,1, содержащем 10% глицерина и 0,1%-ный раствор ЛДАО и ресуспендировались в соответствующем буфере непосредственно перед опытом. Для получения растворов с pH 4—8 применяли *трис*-

HCl-буферные смеси, а с pH>11 в буфер добавляли раствор NaOH. Опытную смесь выдерживали при определенном pH 1 ч, затем образцы использовали для измерений. Нагревание препаратов от 20° до 70° в течение 2 мин проводили в ультратермостате. После термостатирования образцы охлаждали до комнатной температуры и производили измерения. Все измерения проводили в аэробных условиях при высоких значениях окислительно-восстановительного потенциала среды (порядка 400—450 мВ). О действии факторов, влияющих на состояние пигмент-белкового комплекса РЦ, судили по изменению величины светоиндуцированного сигнала при $\lambda=960$ нм (ΔA_{960}), спектров флуоресценции, поглощения и КД. Ультрафиолетовые спектры флуоресценции записывали

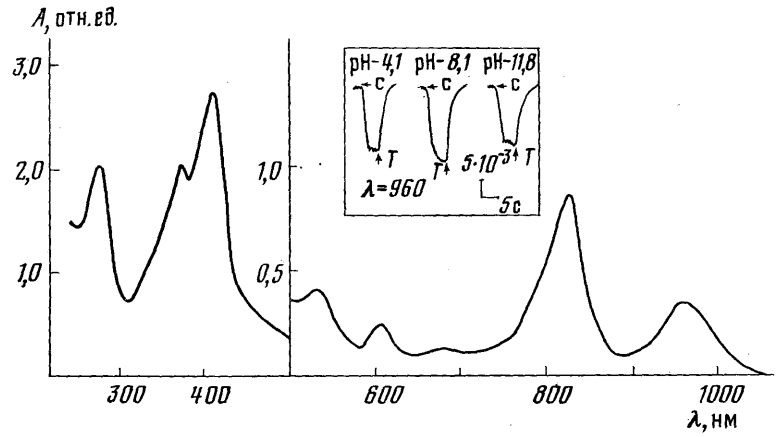


Рис. 1. Спектр поглощения РЦ из Rhodopseudomonas viridis и обратимое изменение оптической плотности при $\lambda=960$ нм в препаратах РЦ при стационарном освещении при разных pH: С — включение света, Т — выключение света

на спектрофлуориметре «Perkin Elmer MPF-44B», спектры поглощения — на спектрофотометре «Hitachi EPS-3T», спектры КД — на спектрополяриметре «JASCO-40 AS» и дифференциальные спектры — на спектрофотометре «Perkin Elmer 554». Обратимые фотоиндуцированные изменения поглощения при 960 нм регистрировали на однолучевом спектрофотометре [12]. Освещение растворов производили светом кинолампы (750 Вт) через конденсор и светофильтр КС-19. Интенсивность света — порядка 10^5 эрг/см^2.

Результаты. Влияние pH. На рис. 1 изображен спектр поглощения РЦ, использованных в работе. Для этих препаратов отношение поглощения при 280 нм к поглощению при 830 нм (K) было 2,3. Наиболее чистые препараты имели $K=2{,}1$ [10]. Интересно отметить, что РЦ этого вида бактерий отличаются более высокой величиной K по сравнению, с РЦ, содержащими бактериохлорофилл *а* [13]. Внутренняя часть рисунка показывает кинетику обратимого изменения оптической плотности при 960 нм в РЦ при стационарном освещении без экзогенных кофакторов при разных pH. При выключении света происходит двухфазное восстановление окисленного димера БХл *б*. Величина ΔA_{960} зависит от концентрации водородных ионов, она максимальна в области pH 7,5—8 и уменьшается при переходе как в кислую, так и щелочную область pH.

Из сравнения первых производных спектров поглощения белковой части РЦ с производными спектра поглощения триптофана видно, что в производных спектра РЦ присутствуют в основном триптофановые компоненты, небольшой максимум при 275 нм может служить указанием на присутствие тирозина (табл. 1). Поскольку спектр поглощения триптофана слабо зависит от pH среды [14], не наблюдали изменений в положении максимумов первой и второй производной спектра поглощения РЦ при изменении концентрации водородных ионов. Существенные изменения, характеризующие различные состояния белка РЦ при раз-

Таблица 1

Положение (λ_d) и полуширина ($\Delta\lambda_{1/2}$) основных максимумов первой производной спектров поглощения РЦ, триптофана и тирозина

Объект	λ_d	$\Delta\lambda_{1/2}$	Объект	λ_d	$\Delta\lambda_{1/2}$
РЦ	291 284 275	7 4—5 —	Триптофан * Тирозин *	290,5 283 284,5 277	6,5 3,6 6 —

* Данные из [14].

ных pH, заметны из рассмотрения ультрафиолетовых спектров флуоресценции ($\lambda_{возб}$ 285 нм) (рис. 2) и спектров КД (табл. 2). На рис. 2 приведены также спектры возбуждения флуоресценции РЦ и водного раствора *l*-триптофана. Совпадение спектров возбуждения подтверждает, что ультрафиолетовая флуоресценция преимущественно происходит в результате возбуждения триптофана. Положение максимума и полуширина спектра флуоресценции ($\lambda_{макс}$=330 нм, $\Delta\lambda$=48—50 нм) позволяет предположить, что триптофановая флуоресценция обусловлена в основном остатками триптофана, принадлежащими к классу I [15]. Следует отметить, что при изменении ионного состояния хромофорных групп, вызванного изменением pH, наблюдается тенденция к красному сдвигу максимума и увеличению полуширины спектра при переходе к высоким значениям pH. Уменьшение отрицательно заряженных групп в белке за счет их протонирования в кислой области pH приводит к значительному тушению флуоресценции, а увеличение отрицательного заряда белковой глобулы за счет депротонирования в щелочной среде вызывает рост интенсивности и квантового выхода. В то же время изменение pH среды не влияет на спектр РЦ в области поглощения пигмента. Спектры КД, записанные в области 200—250 нм при разных pH, свидетельствуют об изменении вторичной структуры белкового компонента, связанной с увеличением степени α-спиральности при уменьшении концентрации водородных ионов в среде.

Таблица 2

Определение спиральности белка РЦ из $[\theta]_{222}$ нм при разных pH. $[\theta]_{222} = -30300 f_H - 2430$, где f_H — содержание α-спиралей [16]

pH	$[\theta]_{222}$, град·см²·дмоль	f_H
4,3	—6,186	0,12
8,1	—7,305	0,16
11,8	—8,473	0,21

Влияние температуры. Существенно, что при повышении температуры в пределах от 20° до 50° происходило постепенное увеличение ΔA_{960} на 12—15%; дальнейшее незначительное нагревание вызывало резкое уменьшение ΔA_{960}. Изменения ΔA_{960} зависят от концентрации водородных ионов. На рис. 3 приведено изменение ΔA_{960}, выраженное в процентах, в препаратах РЦ, инкубированных в растворах с разным pH, при повышении температуры от 20° до 70°. В области pH 8 максимальное уменьшение оптической плотности при 960 нм наступает при 55°, при pH>11 при 45°, а при pH<5 увеличение ΔA_{960} наступало уже при температуре 40°. Резкое уменьшение ΔA_{960} в кислой области наблюдали уже при 45—48°, при pH, равном 8, в области 58—60° и при pH>11 при 50—52°. В этих же интервалах температур происходило изменение соотношения компонент в кинетике темнового восстановления $P960^+$. При температурах, соответствующих увеличению ΔA_{960}, наблюдали увеличение вклада быстрой компоненты, с максимальной величиной при температуре наибольшего увеличения ΔA_{960}. При температурах резкого уменьшения величины ΔA_{960} увеличивался вклад медленной компоненты. Спектральные изменения, вызванные нагреванием, свидетельствова-

ли о постепенном разрушении фотоактивных форм БХл *б* (Р960 и Р830), идущим, по-видимому, путем образования мономерного пигмента и последующим его окислением до хлорофиллоподобного продукта «680». Изменениям в области длинноволнового поглощения пигмента соответствовали спектральные изменения в области полосы Соре и в области поглощения белкового компонента. Изменение спектра КД белка РЦ при нагревании говорит о конформационных превращениях, связанных

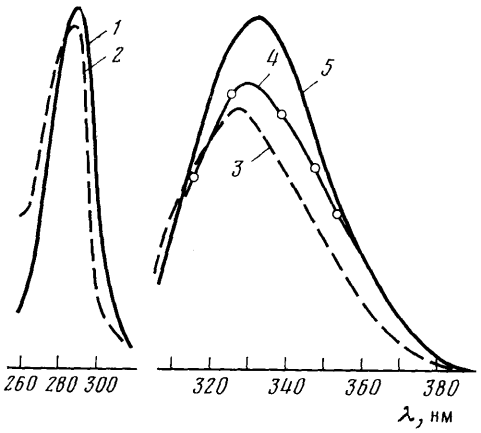


Рис. 2

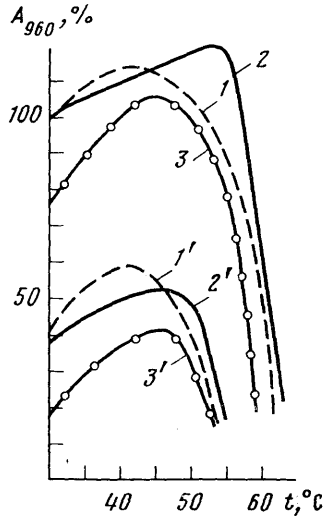


Рис. 3

Рис. 2. Спектры возбуждения флуоресценции РЦ (*1*) и *l*-триптофана (*2*) в водном растворе при pH 8,1 и ультрафиолетовые спектры флуоресценции РЦ при разных pH: *3* — 4,3; *4* — 8,1; *5* — 11,8

Рис. 3. Зависимость изменения ΔA_{960} (*1, 2, 3*) и соотношения быстрой и медленной компонент ($\Delta A_{960\ быстр}/\Delta A_{960\ медл}$) темнового восстановления Р960+ (*1′, 2′, 3′*), выраженное в процентах, от температуры при разных pH: *1, 1′* — 4,3; *2, 2′* — 8,1; *3, 3′* — 11,8. ΔA_{960} при 20° принято за 100%

с изменением доли α-спиралей в структуре белка. Наибольшие изменения имели место в кислой области pH (рис. 4). По-видимому, изменение конформации белка, вызванное нагреванием, ведет к ослаблению связи Р960 с белком, что способствует дезагрегации димера и необратимому окислению пигмента до продукта «680». Это явление детально было изучено в реакциях фотоокисления БХл *б* различными акцепторами электрона [17].

Обсуждение. Проведенное исследование функциональной активности и стабильности РЦ фотосинтезирующих бактерий Rh. viridis в зависимости от структурных нарушений пигмент-белкового комплекса, вызванных изменением кислотности среды и нагреванием, показало, что величина фотоиндуцированного сигнала при λ=960 нм (ΔA_{960}) зависит от факторов, действующих на структуру комплекса. При повышении температуры до определенного предела наступает активация — увеличение ΔA_{960}, сменяющееся затем значительным ингибированием. При температурах активации РЦ при всех pH не наблюдалось спектральных изменений в области поглощения пигмента, а имело место лишь незначительное увеличение α-спиральности белка РЦ. Однако не ясно связано ли с этим увеличение фотохимической активности. При инактивации происходят существенные изменения в спектрах поглощения, КД и флуоресценции, которые свидетельствуют об изменениях как в белковой части спектра, так и в области поглощения пигмента. Так, например, ингибирование функциональной активности РЦ при повышении температуры сопровождается уменьшением количества фотоактивных форм БХл *б* (Р960 и Р830) и одновременным изменением вторичной структуры белкового компонента. По-видимому, нагревание вызывает

ослабление пигмент-пигментного взаимодействия, ведущее к образованию коротковолновых и мономерных форм пигмента, аналогично тому как было показано для агрегатов бактериохлорофилла *a* [18]. Также возможна дезагрегация димера при нарушении связи P960 с белком в результате изменения конформации белковой глобулы при нагревании. И в том и в другом случае происходит необратимое окисление мономерного пигмента до хлорофиллоподобного продукта «680». Появление этого продукта может быть критерием начала денатурации белка РЦ.

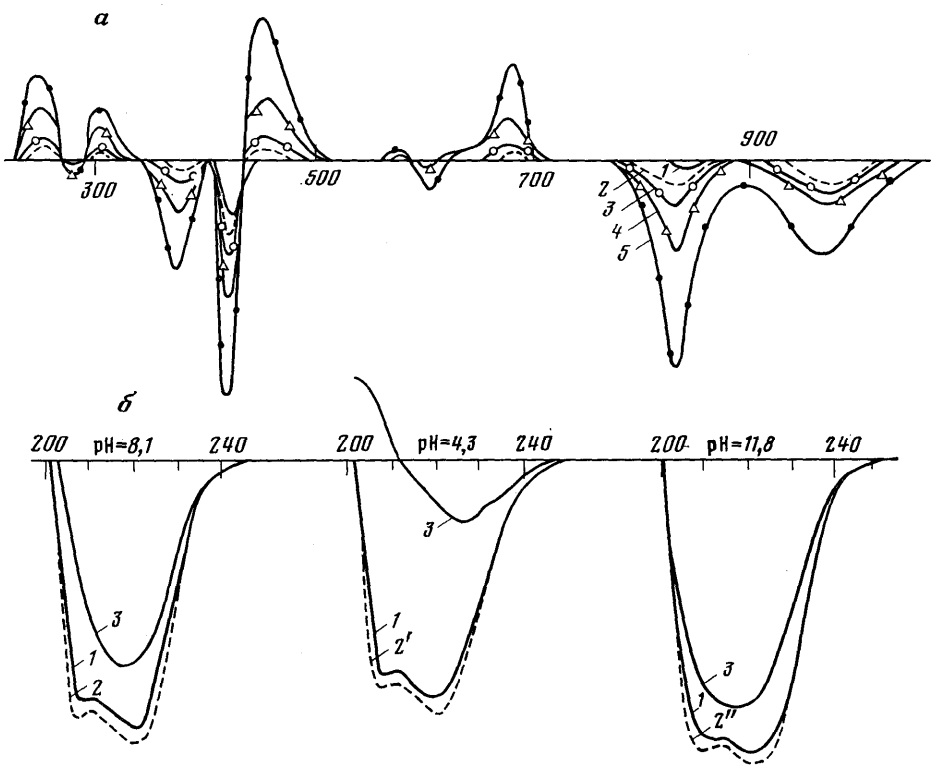


Рис. 4. Дифференциальный спектр поглощения РЦ при нагревании при pH=11,8: *1*—50°; *2*—55°; *3*—60°; *4*—65°; *5*—70° (*а*) и изменение спектра КД в области 200—250 нм при нагревании при разных pH (*б*); *1*—исходный спектр—20°, *2*, *2'*, *2''*—температура активации: *2*—55°; *2'*—40°; *2''*—45°; *3*—инактивация—70°

Изменения функциональной активности и стабильности РЦ зависят от кислотности среды. В кислой области pH изменения происходят при более низких температурах, чем в щелочной, и особенно в среде, близкой к нейтральной. Так, при pH<5 появление продукта «680» происходит уже при 45—48°, при pH>11 — при 55°, в то время как при pH 8 этот продукт появляется при нагревании препаратов до 65°. Обнаруженные различия в нейтральной, кислой и щелочной средах могут быть объяснены структурными особенностями состояния белка в этих средах. Действительно, анализ УФ-спектров флуоресценции и КД при разных pH показывает, что изменение баланса полярных групп, вызванного изменением концентрации водородных ионов в окружающей среде, обуславливает различные конформационные состояния белка. Так, состояние, соответствующее кислым значениям pH, характеризуется значительным уменьшением α-спиралей в структуре белка (до 12%) и соответственно меньшим квантовым выходом флуоресценции по сравнению с слабощелочным pH. По-видимому, это обуславливает высокую чувствительность данной конформации к температуре, в то время как конформационное состояние белкового компонента в слабощелочной среде обладает большей способностью защищать фотоактивные формы БХл *б* от разрушения при нагревании.

Итак, можно предположить, что в результате изученных воздействий происходят конформационные изменения связанного с пигментом белка, что влияет на пространственное расположение молекул пигментов в отчошении друг друга, а также в отношении других компонентов акцепторно-донорной системы; это вызывает изменения функциональной активности и стабильности РЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bolton J. R., Clayton R. K., Reed D. W.* Photochem. Photobiol., 1969, v. 9, p. 209.
2. *McElroy J. D., Feher G., Mauzerall D. C.* Biochim. Biophys. Acta, 1972, v. 267, p. 363.
3. *Thornber J. P., Dutton P. L., Fajer J., Holton D., Olson J. M., Parson W. W., Prince R. C., Tiede D. M., Windsor W. W.* Proceedings of the Fourth International Congress on Photosynthesis 1977, Printed in Great Britain, p. 55—70.
4. *Pucheu N. L., Kerber N. L.* Garcia Arch. Microbiol., 1976, v. 109, p. 301.
5. *Shuvalov V. A., Krakhmaleva J. N., Klimov W. W.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 597.
6. *Trosper T. L., Benson D. L., Thornber J. P.* Biochim. Biophys. Acta, 1977. v. 460, p. 318.
7. *Шинкарев В. И., Венедиктов И. С., Кононенко А. А., Рубин А. Б.* Молек. биол., 1980, т. 14, 3, с. 624.
8. *Фабиани М., Захарова Н. И., Чаморовский С. К., Кононенко А. А.* Молек. биол., 1980, т. 14, 3, с. 624.
9. *Prince R. C., Tiede D. M., Thornber J. P., Dutton P. L.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 462, p. 467.
10. *Clayton R. K., Clayton B. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 501, p. 478.
11. *Ziegelman H. W., Wiecsorek G. A., Turner B. C.* Analyt. Biochem., 1965, v. 13, N 4, p. 402.
12. *Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Биофизика, 1963, т. 8, с. 191.
13. *Clayton R. K., Clayton B. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 501, p. 470.
14. *Демченко А. П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев: Наук. думка, 1981.
15. *Бурштейн Э. А.* Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 7. Собственная люминесценция белка. М.: ВИНИТИ, 1977.
16. *Chen Y. H., Yang J. T., Martiner H. M.* Biochemistry. 1972, v. 11, № 22, p. 4102.
17. *Бокучава Е. М., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Биохимия, 1974, т. 39, вып. 1, с. 186.
18. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Умрихина А. В.* Докл. АН СССР, 1977, т. 235, № 1, с. 232.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР,
Москва

Поступила в редакцию
12.V.1983

ACTIVITY OF REACTION CENTRES OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS AT HEATING AND pH CHANGE

DROSDOVA N. N., VICHEGSHANINA I. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

The dependence of functional activity of reaction centers (RC) on structural changes of pigment — protein complex due to varying pH and temperature has been studied. Heating up to 50° causes an increase in reversible absorbance changes at $\lambda=960$ nm. If the temperature is above 50° ΔA_{960} decreases. Inactivation of the reaction centers is accompanied by essential changes in absorption and CD spectra, which point to a decrease in the amount of photoactive forms of Bchl b and conformation changes of protein component. Dimer P960 desaggregation after changes of pigment — protein bond leads to irreversible oxidation of monomeric pigment to chlorophyll — like product having absorbtion maxima at 680 nm. The changes of ΔA_{960}, ultraviolet fluorescence spectra, absorption and CD spectra depend on pH of the medium. Under acidic pH the changes occur at lower temperatures than in alkaline and neutral medium. It has been assumed that conformation changes of the protein bound to the pigment lead to some changes of functional activity and stability of RC.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 18 1984 Вып. 4

УДК 577.355.2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФЕОФИТИНА *a* В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ДЕТЕРГЕНТОВ

А. Н. ЛУГАНСКАЯ, Н. Н. ЛЕБЕДЕВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Измерены спектры поглощения, излучения и возбуждения флуоресценции феофитина *a*, а также их вторые производные в водных растворах Тритона X-100, додецилсульфата натрия и хлористого цетилпиридиния при различных концентрациях детергентов и pH среды после достижения системой равновесного состояния. Показано, что при низких концентрациях детергентов (меньших критической концентрации мицеллообразования) и в их отсутствие пигмент образует конгломераты, содержащие преимущественно димерные, а также единичные мономерные формы, между которыми происходит эффективный перенос энергии. Исследование взаимодействия молекул пигмента и детергента позволило обнаружить перенос энергии с детергента на пигмент. При концентрациях детергента, бóльших критической концентрации мицеллообразования, феофитин *a* находится в мицелле детергента в мономерной форме при нейтральных и кислых значениях pH раствора и алломеризуется при щелочных значениях pH среды. Заряд детергента не оказывает существенного влияния на спектральные характеристики димеров феофитина в конгломерате и алломеризованного пигмента в мицелле детергента.

При исследовании первичных реакций фотосинтеза широкое применение находят растворы поверхностно-активных веществ. Способность фотосинтетических пигментов, встроенных в мицеллы детергентов, к фотосенсибилизирующей активности известна давно [1—7]. Эта активность зависит от характера межмолекулярных взаимодействий пигмента, на что в свою очередь могут оказывать влияние природа и свойства солюбилизирующего пигмент детергента, электростатический заряд мицеллы и pH среды.

Спектральные свойства пигментов, солюбилизированных в водных растворах детергентов, изучались разными исследователями [8—16]. Согласно имеющимся в настоящее время данным, фотосинтетические пигменты могут находиться в мицеллах детергентов как в мономерной, так и в агрегированной формах.

Ранее мы исследовали спектральные свойства различных аналогов хлорофилла (хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, хлорофилла *c*, протохлорофилла, бактериохлорофилла и феофитина *a*) в водных растворах Тритона X-100, додецилсульфата натрия и бромида цетилтриметиламмония [15]. В отличие от предыдущих авторов мы изучали спектры поглощения и люминесценции пигментов не только при изменении концентрации детергентов, но и при изменении pH среды. Измерения проводили сразу после введения пигмента в раствор детергента и спустя 2—3 ч. Однако было обнаружено, что этого времени недостаточно для достижения равновесной солюбилизации пигментов. Фактор времени существен также и потому, что при проведении фотохимических опытов, а также при разрушении клеточного материала с использованием детергентов пигменты часами, а порой и сутками находятся в контакте с последними. Поэтому точная информация о спектральных свойствах равновесного состояния пигментов в растворах детергентов необходима.

При исследовании фотосинтетических пигментов внимание исследователей обычно привлекает основной пигмент высших растений — хлорофилл. Однако в последнее время получен целый ряд данных о важной роли в первичных процессах фотосинтеза другого фотосинтетического

пигмента — феофитина *a*, входящего, как полагают, в состав реакционных центров [17—20].

В связи с этим мы провели детальное исследование спектров поглощения и флуоресценции феофитина *a* в водных растворах неионогенного (Тритон X-100), катионного (хлористый цетилпиридиний) и анионного (додецилсульфат натрия) детергентов при изменении концентрации детергентов и pH после достижения равновесного состояния пигмента в растворе.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Феофитин *a* получали из хлорофилла *a* путем обработки его эфирного раствора 10%-ной HCl и последующей хроматографией пигмента на бумаге с использованием в качестве хроматографической смеси диэтилового и петролейного эфиров и этанола (30 : 30 : 0,5). В результате был получен пигмент, спектр которого соответствовал литературным данным [21] и флуоресценция которого не зависела от длины волны возбуждающего света.

Концентрация поверхностно-активных веществ в воде варьировала в пределах от 10^{-6} до 1%. Использовали Тритон X-100 («Ferak», ФРГ), додецилсульфат натрия и хлористый цетилпиридиний («Reanal», ВНР).

Измерение спектров поглощения и их вторых производных осуществляли на спектрофотометре «Perkin-Elmer 554» (США). Измерение спектров излучения и возбуждения флуоресценции, а также их вторых производных проводили на собранной нами установке, состоящей из двух светосильных монохроматоров МДР-2, ксеноновой лампы ДКсШ-250, фотоумножителя ФЭУ-79, усилителя постоянного тока ЛПУ-01 или У5-9, микропроцессора «DCSU-2» («Perkin-Elmer», США) и двухкоординатного графопостроителя Н306. Измерения проводили при комнатной температуре в режиме автоматической коррекции фона и нулевой линии. Точность определения положения максимумов в спектрах поглощения ± 1 нм, в спектрах флуоресценции ± 2 нм.

Определение квантового выхода и измерение поляризации флуоресценции проводили при возбуждении в полосе Соре. Квантовый выход рассчитывался путем сопоставления интенсивности флуоресценции мономера и агрегата пигмента в растворах детергентов с интенсивностью флуоресценции мономера пигмента в диэтиловом эфире, имеющем величину 0,25 [22]. Интенсивность излучения определяли как сумму излучений главного и колебательного переходов. Интенсивность испускания каждой из полос рассчитывали как произведение интенсивности свечения в максимуме на полуширину полосы.

Метод солюбилизации. В водный буферный (буфер боратно-щелочной или бура — борная кислота) раствор с детергентом или без него вносили несколько капель концентрированного раствора пигмента в ацетоне («VEB Laborchemie» Apolda, ГДР) с таким расчетом, чтобы конечная концентрация пигмента в растворе составляла $0{,}3 \cdot 10^{-5}$ М.

Добавление раствора пигмента в ацетоне к водному раствору детергента вызывает солюбилизацию пигмента. Однако вначале даже при заведомо большей концентрации Тритона X-100, чем критическая концентрация мицеллообразования, в спектре поглощения феофитина *a* наряду с максимумом мономерной формы (при 667 нм) наблюдаются максимумы агрегированных форм пигмента (при 691—693 нм). Чем больше концентрация пигмента в ацетоне, тем выше отношение агрегированных максимумов к мономерному при данной концентрации детергента. Следует отметить, что при уменьшении концентрации детергента в растворе возрастает количество агрегированной формы и соответственно уменьшается количество мономерной формы.

Однако было обнаружено, что концентрация пигмента в органическом растворителе влияет только на первоначальный спектр пигмента в поверхностно-активном веществе. Со временем (через 1—2 сут) устанавливается равновесное состояние феофитина *a* для данной концентрации детергента, не зависящее от спектра пигмента, возникающего в

момент добавления его раствора в ацетоне к водному раствору детергента. Следует отметить, что исходная концентрация феофитина *а* в ацетоне влияет на скорость установления этого равновесия: чем она меньше, тем быстрее спектр пигмента становится неизменным.

Контроль за концентрацией пигмента и детергента осуществляли по спектрам поглощения. Измерения проводили через 1—2 сут после приготовления образца (после достижения системой равновесия, на что указывала неизменность спектров поглощения пигмента).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Феофитин *а* в водном буферном растворе. В отсутствие детергента в водном буферном растворе при pH 8 пигмент находится в агрегированной форме с главным максимумом поглощения при 690 нм, коротковолновым плечом в районе 667 нм и длинноволновым поглощением, слабо проявляющимся во второй производной спектров в области 700—

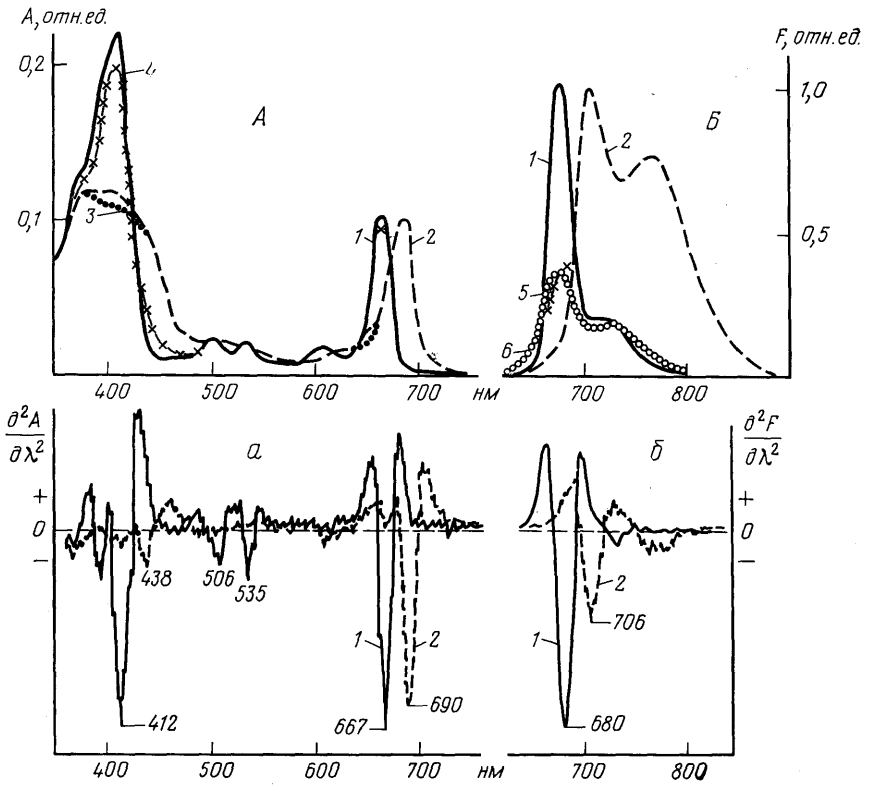


Рис. 1. Спектры поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) (возбуждение при 450 нм) и их вторые производные (*а, б* соответственно) феофитина *а* при pH 8: *1* — в водном растворе 1%-ного Тритона X-100; *2* — в воде. Спектры возбуждения флуоресценции агрегатов феофитина *а*: *3* — регистрация при 776 нм, *4* — при 667 нм; *5* — спектр флуоресценции агрегата пигмента при 410 нм; *6* — дифференциальный спектр флуоресценции агрегата феофитина *а* при 400 и 450 нм. Концентрация пигмента $2 \cdot 10^{-6}$ М, 20° С, боратный буфер

720 нм. В области полосы Соре наблюдается значительное уменьшение относительной интенсивности поглощения при 390 и 410 нм (приблизительно двукратное по сравнению с раствором в органическом растворителе) и появление новой полосы в районе 438 нм. Интенсивность полосы при 370 нм практически не меняется (рис. 1, *А*).

В спектре флуоресценции этого образца, имеющей квантовый выход 0,003, главный максимум расположен при 706 нм и интенсивная широкая длинноволновая полоса находится в районе 770 нм (рис. 1, *Б*). Положение этих полос и их относительная интенсивность практически

не зависят от длины волны возбуждающего света, однако при возбуждении в области поглощения мономера (390—410 нм) на коротковолновом склоне главной полосы наблюдается плечо с максимумом (во второй производной) в районе 670 нм. Построение дифференциального спектра флуоресценции при возбуждении в области 400 и 450 нм показывает, что коротковолновое плечо принадлежит полосе, аналогичной полосе флуоресценции мономера (рис. 1, *Б*).

Спектр возбуждения длинноволновых полос флуоресценции феофитина *а* имеет максимумы при 380 и 440 нм в области полосы Соре и при 690 нм в красной области и близок к спектру поглощения образца. Обращает на себя внимание некоторое уменьшение интенсивности полос в районе 410 и 666 нм в спектрах возбуждения флуоресценции по сравнению со спектрами поглощения. При регистрации флуоресценции в области коротковолнового плеча в спектре возбуждения наблюдаются максимумы в районе 400 и 660 нм.

Судя по интенсивности флуоресценции мономерной и агрегированной форм, выход флуоресценции коротковолновой формы составляет ~2% от ожидаемого для мономерной формы пигмента в растворе. Это позволяет предположить, что мономерная форма пигмента в растворе не является свободной, а образует комплекс с агрегатом, внутри которого осуществляется высокоэффективный перенос энергии с мономера на агрегат. На существование такого переноса энергии указывает также полная деполяризация флуоресценции коротковолновой полосы ($\leqslant$0,03), тогда как флуоресценция длинноволновой полосы имеет относительно высокую величину поляризации (0,14).

Влияние Тритона Х-100 на спектральные характеристики пигмента. Введение в водный буферный раствор пигмента небольших (домицеллярных) концентраций детергента не оказывает существенного влияния на формы спектров поглощения и флуоресценции пигмента. Однако детальное измерение дифференциального спектра поглощения феофитина *а* в присутствии Тритона Х-100 (концентрация в растворе 10^{-3}%) и без него показало небольшое уменьшение поглощения в области мономерной формы (при 400 и 665 нм), сопровождающееся увеличением поглощения в области агрегатов (при 685—704 нм) (рис. 2, кривая *1*).

Аналогичные спектры поглощения феофитина *а* наблюдаются при добавлении его концентрированного раствора в ацетоне к раствору Тритона Х-100 в буфере при pH 8, когда концентрация детергента не превышает критической концентрации мицеллообразования.

Измерение в ультрафиолетовой области спектров возбуждения агрегатов пигмента в присутствии детергента показывает наличие полос, аналогичных наблюдаемым в спектрах возбуждения собственной флуоресценции Тритона Х-100 и характерных для фенольного кольца последнего. В отсутствие детергента аналогичные полосы в спектрах возбуждения флуоресценции агрегатов феофитина *а* зарегистрировать не удается. Отсюда можно заключить, что добавление небольших (домицеллярных) концентраций детергента в водный раствор пигмента приводит к образованию комплекса между Тритоном Х-100 и агрегатом феофитина *а*.

При концентрациях Тритона Х-100 выше критической концентрации мицеллообразования (для Тритона Х-100 она равна $(2—5)\cdot10^{-2}$) [23] и применяемых нами концентрациях пигмента ($3\cdot10^{-6}$ М) феофитин *а* находится в полностью солюбилизированном состоянии и его спектры поглощения и флуоресценции аналогичны спектрам поглощения и флуоресценции пигмента в диэтиловом эфире (рис. 1, *А*, *Б*).

Образование мономерной формы феофитина *а* из агрегированной формы при добавлении к водному раствору пигмента раствора детергента в конечной концентрации, равной 1%, происходит, как было показано ранее [12], с изобестическими точками, по-видимому, без каких-либо промежуточных форм. Однако измерение кинетики исчезновения полосы при 692 нм и возрастании полосы при 667 нм показывает, что между логарифмами концентраций агрегата и мономера пигмента

не существует линейной зависимости (рис. 3), аналогичной обнаруженной ранее для агрегата бактериофеофитина в спиртоглицериновых средах [24]. Вероятно, димеры феофитина *а* в водной среде образуют конгломераты, скорость распада которых зависит от числа димеров, входящих в них.

Влияние pH среды. В отсутствие детергента и при его концентрации в среде ниже критической концентрации мицеллообразования главные максимумы в спектрах поглощения и флуоресценции феофитина *а* в растворах с низким (4—6) pH расположены при 370, 440, 660, 692 нм и соответственно при 706 и 666 нм, т. е. там же, где они находятся в спектрах пигмента при нейтральном значении pH раствора. Однако с понижением pH в среде уменьшается относительная величина поглощения при 400—410 и 660 нм, а также соответственно уменьшается интенсивность коротковолнового плеча (при 666 нм) в спектре флуоресценции пигмента.

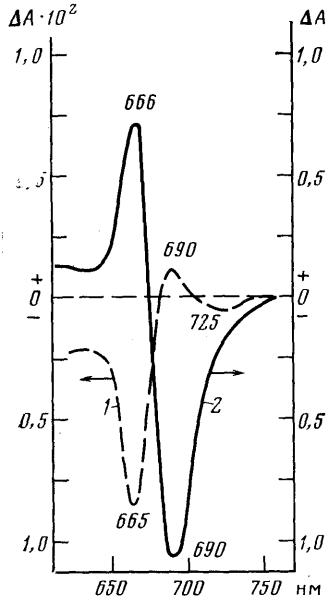


Рис. 2

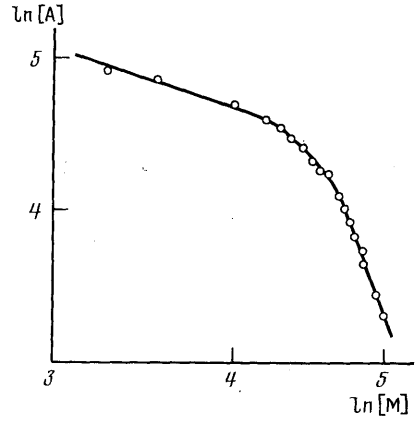


Рис. 3

Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения феофитина *а* в водном растворе Тритона X-100 и в воде при pH 8: *1* — 10^{-3}%-ный Тритон X-100; *2* — 1%-ный Тритон X-100 (остальные условия см. на рис. 1)

Рис. 3. Превращение агрегированной (*A*) формы феофитина *а* в мономерную (M) форму при pH 8 при добавлении к водному раствору пигмента Тритона X-100 (конечная концентрация детергента 1%, остальные условия см. на рис. 1)

Возрастание величины pH раствора не оказывает влияния на положение максимумов полос агрегатов феофитина *а*, но ведет к увеличению относительной интенсивности полос, характерных для мономерной формы пигмента. Видимо, относительная величина мономерной формы пигмента, входящей в конгломерат, уменьшается при нейтрализации протонами поверхностного заряда агрегата, который, как полагают [8], имеет отрицательный знак.

При концентрациях Тритона X-100 выше критической концентрации мицеллообразования форма спектров поглощения и флуоресценции мономеров феофитина *а* не изменяется при смещении pH среды в кислую область до pH 4. В противоположность этому при щелочных значениях pH растворов наблюдаются характерные изменения спектров пигмента. При pH 12 главные максимумы в спектре поглощения феофитина *а* в мицеллярном растворе Тритона X-100 расположены при 378, 401, 606 и 661 нм, а в спектре флуоресценции при 672 нм.

Обращают на себя внимание значительное уменьшение относительной интенсивности полос поглощения при 535 и 608 нм, а также снятие расщепления в полосе Соре, свидетельствующее о возрастании симметрии молекулы пигмента. В спектре флуоресценции феофитина *а* при pH 12 кроме коротковолнового смещения главного максимума наблюдаются уменьшение относительной интенсивности и расщепление колебательного подуровня на два, соответствующие наблюдаемым в

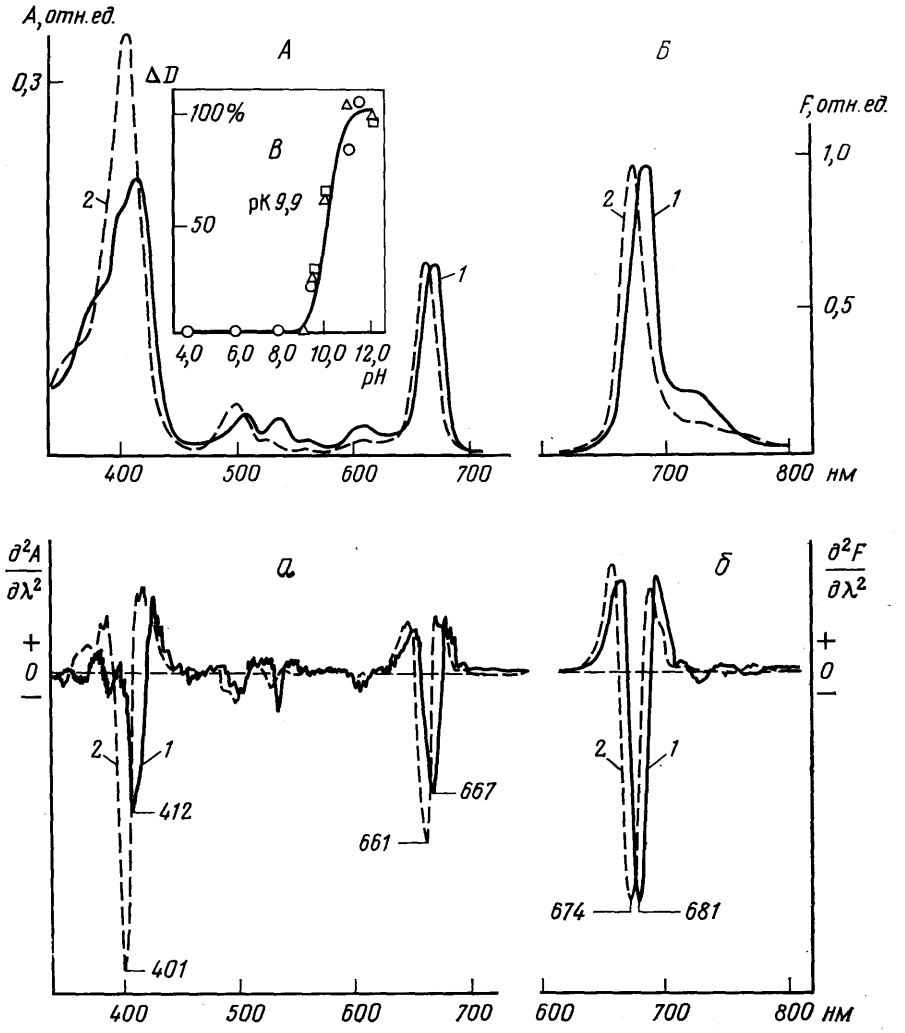


Рис. 4. Спектры поглощения (*А*), спектры флуоресценции (*Б*) и их вторые производные (*а, б* соответственно) феофитина *а* в водном растворе 1%-ного Тритона X-100: *1* — при pH 8; *2* — при pH 12. *В* — зависимость изменений в различных участках спектра поглощения феофитина *а* от pH раствора (остальные условия см. на рис. 1)

спектре поглощения пигмента (рис. 4, *А*, *Б*). Квантовый выход флуоресценции пигмента при этом pH близок выходу обычной мономерной формы пигмента и равен 0,2.

Измерение спектральных превращений в различных участках спектра молекулы показывает, что они происходят одновременно и имеют величину pK 9,9, характерную для отщепления протона от кислорода фенильной группы (рис. 4, *В*). Однако спектральные изменения молекулы лишь частично обратимы при увеличении концентрации протонов до pH 3, что свидетельствует о более глубоких изменениях в молекуле пигмента, чем отрыв протона.

Влияние заряда мицеллы детергента. В ионных детергентах солюбилизация феофитина *а* происходит значительно слабее, нежели в Три-

тоне Х-100, однако общие закономерности солюбилизации пигмента похожи на наблюдаемые в Тритоне Х-100: вначале при добавлении концентрированного раствора пигмента в ацетоне к мицеллярным растворам додецилсульфата натрия и хлористого цетилпиридиния наряду с мономерными формами наблюдаются агрегированные формы пигмента. Со временем происходят переупаковка и частичная дезагрегация феофитина *а*, однако в гораздо меньшей степени, нежели в Тритоне Х-100.

При концентрации додецилсульфата, равной 1% (больше критической концентрации мицеллообразования), и после достижения равновесной солюбилизации пигмента при pH 4—8 наряду с максимумом при 672 нм имеется максимум агрегированной формы пигмента при 694 нм, превышающий по амплитуде первый. При величине pH раствора, равной 12, дезагрегация пигмента наиболее существенна: максимум при 694 нм относительно мал по сравнению с максимумом мономера пигмента, расположенного в этом случае при 663 нм. Следовательно, и в додецилсульфате натрия наблюдается картина, аналогичная возникающей у феофитина *а* в Тритоне Х-100 при pH 12.

При концентрациях додецилсульфата натрия меньших, чем его критическая концентрация мицеллообразования, у солюбилизированного пигмента наблюдаются относительное увеличение максимума агрегированных форм, смещение его к 696 нм и сдвиг коротковолнового максимума к 666 нм.

В хлористом цетилпиридинии при его концентрациях в растворе, больших критической концентрации мицеллообразования, также не происходит полной солюбилизации пигмента: при pH раствора, равном 4, наряду с максимумом при 667 нм наблюдается максимум при 692 нм, а при pH 8 — максимумы при 663 и 692 нм. При pH 12 в этом детергенте также наблюдается сдвиг мономерного максимума пигмента к 663 нм, причем он происходит быстрее, чем в других детергентах. Следует отметить, что положение максимумов поглощения пигмента при pH 12 в разных детергентах с точностью до 2—3 нм одинаково, что говорит о незначительном влиянии заряда мицеллы на спектральные характеристики измененного в щелочной среде пигмента.

Уменьшение концентрации этого детергента в растворе ниже критической концентрации мицеллообразования влечет за собой, как и в додецилсульфате натрия, относительный рост агрегированных максимумов феофитина *а* по сравнению с максимумом мономерной формы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Совокупность данных по спектрам поглощения, излучения и возбуждения флуоресценции *а* позволяет заключить, что в отсутствие детергента в водном (буферном) растворе пигмент образует как агрегированные (с измененными в результате межмолекулярных взаимодействий спектральными характеристиками), так и мономерные формы, возникающие в водном растворе вследствие введения в него пигмента в минимальном количестве органического растворителя.

Характерное расщепление в спектре кругового дихроизма с симметричным расположением компонентов по отношению к длинноволновой полосе агрегата и отсутствие аналогичного расщепления в области коротковолновой мономерной полосы указывают, что мономерная форма не входит непосредственно в элементарную ячейку агрегата. С другой стороны, увеличение полуширины полосы излучения и коротковолновое смещение максимумов в спектре возбуждения флуоресценции мономерной формы говорят о том, что эта форма не является свободной, а чрезвычайно низкий квантовый выход ее собственной флуоресценции указывает на высокоэффективный перенос энергии с мономера на агрегат, что возможно только при их относительно близком пространственном расположении.

Введение небольших количеств Тритона Х-100 (ниже критической концентрации мицеллообразования) приводит к адсорбции детергента

на агрегате пигмента и облегчает димеризацию мономерных молекул, находящихся на агрегате, вероятно, в результате увеличения размеров гидрофобной зоны. Взаимодействие детергента с агрегатом пигмента на молекулярном уровне обнаруживается по переносу энергии, проявляющемуся в спектрах возбуждения флуоресценции феофитина *а* в растворе Тритона Х-100 домицеллярной концентрации в ультрафиолетовой области.

Дальнейшее увеличение концентрации Тритона Х-100 в растворе (выше критической концентрации мицеллообразования) приводит к распаду агрегатов и солюбилизации молекул феофитина *а* в мицеллах детергента в мономерной форме. Следует отметить, что в осуществленных ранее работах [7, 8, 12] наблюдалась смешанная солюбилизация феофитина *а*: наряду с максимумом мономерной формы пигмента присутствовали и максимумы агрегированных форм. В свете полученных нами данных эти результаты могут быть объяснены тем, что равновесная солюбилизация феофитина *а* в мицеллах Тритона Х-100 не была достигнута.

Судя по наличию изобестических точек в спектрах поглощения пигмента при превращении агрегата в мономер, а также по двукратному уменьшению экстинкции в полосе Соре в спектре поглощения агрегата и симметричному экситонному расщеплению красной полосы в спектрах кругового дихроизма [25], основная элементарная ячейка состоит из димеров пигмента. Кинетика дезагрегации пигмента (рис. 3) свидетельствует о сложном превращении агрегата в мономер, проходящем, возможно, в несколько этапов. Наиболее вероятно, что конгломерат феофитина *а* в водных растворах состоит из собранных вместе димерных молекул пигмента, на поверхности которых находятся одиночные молекулы мономера.

Из сопоставления спектров поглощения феофитина *а* при pH 12 в различных детергентах следует, что заряд мицеллы не оказывает существенного влияния на его спектральные свойства. Изменение pK спектра пигмента в Тритоне Х-100, близкое pK фенильной группы, а также частичная обратимость этого превращения, сопровождающаяся деструкцией пигмента, могут свидетельствовать об отрыве протона от молекулы пигмента. Однако спектры поглощения мономерного феофитина *а* в щелочных растворах близки к наблюдающимся у алломеризованного хлорофилла *а* [26]. Скорее всего в растворах детергентов при щелочных значениях pH у пигмента происходит разрыв циклопентанового кольца молекулы. Активную роль в этом процессе играет сам детергент. Увеличение скорости такого превращения пигмента при высоких pH в катионоактивном хлориде цетилпиридиния подтверждает это предположение. Возможно, положительно заряженные ионы этого детергента могут взаимодействовать с отрицательно заряженными функциональными группировками пигмента, в том числе и с карбонильным кислородом циклопентанового кольца феофитина *а*. Возникающее при этом напряжение связи C(9)—C(10) молекулы пигмента облегчает ее разрыв. Следует отметить, что параллельно с разрывом циклопентанового кольца пигмента увеличивается тенденция к его дезагрегации, что легко объяснимо в свете представлений о роли карбоциклического кольца пигментов при агрегации [27].

Лучшую солюбилизацию феофитина *а* в Тритоне Х-100 по сравнению с другими исследованными детергентами можно объяснить дополнительным связыванием молекулы пигмента с кислородом полиоксиэтилированных цепей молекулы Тритона Х-100 в мицелле детергента. Скорее всего солюбилизация пигмента протекает не только за счет возникновения гидрофобных взаимодействий между фитолом молекулы пигмента и углеводородными цепями мицелл поверхностно-активных веществ, но и путем образования водородных и координационных связей между молекулами пигмента и детергента.

Полученные данные указывают на то, что взаимодействие феофитина *а* с детергентами осуществляется не только в мицеллярных, но и в

домицеллярных растворах поверхностно-активных веществ. Солюбилизация феофитина *а* — процесс, протекающий во времени, его стационарное состояние достигается через 1—2 сут. После установления этого равновесного состояния пигмента в детергенте обнаруживается строго ограниченное количество форм, зависящее только от концентрации детергента в среде.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1948, *63*, 163—165.
2. *Брин Г. П., Красновский А. А.* Биохимия, 1957, *22*, 776—788.
3. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1965, *163*, 761—764.
4. *Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967, *174*, 221—224.
5. *Красновский А. А., Михайлова Е. С.* Докл. АН СССР, 1969, *185*, 938—941.
6. *Луганская А. Н., Красновский А. А.* Мол. биол., 1970, *4*, 848—859.
7. *Шапошникова М. Г., Красновский А. А.* Биохимия, 1973, *38*, 193—201.
8. *Massini P., Voorn G.* Biochim. Biophys. Acta, 1968, *153*, 589—601.
9. *Hochapfel A., Journeaux R., Viovy R.* J. Chem. Phys., 1969, *66*, 1467—1473.
10. *Kim W. S.* Biochim. Biophys. Acta, 1966, *112*, 392—396.
11. *Шапошникова М. Г., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Биохимия, 1971, *36*, 704—711.
12. *Зенькевич Э. И., Лосев А. П., Гуринович Г. Г.* Мол. биол., 1972, *6*, 824—833.
13. *Csatorday K., Lehoczki E., Salay L.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, *376*, 268—273.
14. *Lehoczki E., Csatorday K.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, *396*, 86—92.
15. *Красновский А. А., Луганская А. Н.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1976, № 2, 182—192.
16. *Il'ina M. D., Borisov A. Yu.* Biochim. Biophys. Acta, 1981, *637*, 540—545.
17. *Shuvalov V. A., Klimov V. V., Dolan E., Parson W. W., Ke B.* FEBS Letters, 1980, *118*, 279—282.
18. *Klimov V. V., Klevanik A. V., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A.* FEBS Letters, 1977, *82*, 183—186.
19. *Клеваник А. В., Климов В. В., Шувалов В. А., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1977, *236*, 241—244.
20. *Klimov V. V., Dolan E., Ke B.* FEBS Letters, 1980, *118*, 97—100.
21. *Pennington F. C., Strain H. H., Svec W. A., Katz J. J.* J. Amer. Chem. Soc., 1964, *86*, 1418—1425.
22. *Гуринович Г. П., Пацко А. И., Севченко А. М.* Докл. АН СССР, 1967, *174*, 873—876.
23. *Шенфельд Н.* Неионогенные моющие средства. М.: Химия, 1965, 107.
24. *Шубин В. В., Дроздова Н. Н., Вычегжанина И. В., Карапетян Н. В., Красновский А. А.* Мол. биол., 1981, *15*, 359—367.
25. *Зенькевич Э. И., Саржевская М. В., Витовцева Т. В., Кочубеев Г. А.* Мол. биол., 1981, *15*, 145—153.
26. *Paavo H.* Hynninen Z. Naturforsch., 1981, *36b*, 1010—1016.
27. *Katz J. J., Closs J. L., Pennington F. C., Thomas M. R., Strain H. H.* J. Amer. Chem. Soc., 1963, *85*, 3801—3809.

Поступила в редакцию
30.V.1983

MOLECULAR ARRANGEMENT OF PHEOPHYTIN *A* IN DETERGENT-WATER SYSTEMS

A. N. LUGANSKAYA, N. N. LEBEDEV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Absorption, fluorescence and exitation fluorescence spectra of pheophytin *a* have been measured in aqueous solutions of nonionic (Triton X-100), anionic (sodium lauril sulphate) and cationic (Cetyl pyridinium chlorid) detergents at different concentrations and pH after system relaxation. By measuring the second derivative and differential spectra, it has been shown, that if detergent concentrations are lower than critical micelles concentration, or if the detergent is completely absent, the pigment forms conglomerates containing both dimeric and monomeric forms with an efficient energy transfer between them. If detergent concentrations are higher than critical micelles concentration, pheophytine *a* localizes in detergent micelle in monomeric form at neutral and acidic pH, and allomerizes at alcaline pH. The spectral characteristics of pheophytin *a* dimers in the conglomerate and its monomers in micelles poorly (if at all) depend on the sign of the detergent molecule charge.

SOME REMARKS ON THE ORIGIN AND EVOLUTION OF PHOTOSYNTHESIS

A. A. Krasnovsky
Institute of Biochemistry USSR
Academy of Sciences
Moscow, U.S.S.R.

The contemporary life of the Earth depends on the conversion and storage of solar energy by plants. Photosynthesis not only provides with food and oxygen all forms of life, but also protect them from damage by short-wave UV solar radiation as the ozone layer in the upper atmosphere is probably formed from oxygen originated in plant photosynthesis.

The origin of life is closely related to the origin of photosynthesis as mechanisms of self-reproduction require energy. Let us summarize the main sources of information to solve the problem.

Space exploration could not yet reveal any forms of life on the planets. Precambrian geology discovered blue-green algae in ancient rocks dated 2-3 billion years. Comparative and evolutionary biology provide us with ample information on the evolution of the organisms which exist on our earth still.

Impressive model experiments discovered in test tube a vast variety of organic compounds which could serve as brickstones of primary metabolism, but primitive self-reproducing cells are not constructed yet and the origin of genetic code is unclear.

We can imagine the possible appearance of various types of primitive cells - autotrophic, having pigments converting solar energy; heterotrophic, using abiogenic organic matter; intermediate types when light activated

Origins of Life 14 (1984) 649–651. 0302-1688/84/0141-0649$00.45
© 1984 *by D. Reidel Publishing Company.*

the enzymatic metabolism and excited coenzymes may serve as precursors of excited porphyrines and chlorophylls.

Now I will to illustrate that possibility by some model experiments performed in our laboratory. The photoexcitation of flavines is well known; I will present some data on the photoactivation of such an universal electron carrier as NADH and NADPH having pronounced absorption maxima at 340 nm. First of all these compounds are able to form not only singlet excited states (fluorescence maxima at 470 nm) but also longlived excited triplet states as we reveals their phosphorescence having maxima in green part of visible spectrum at 560 nm with lifetime 100 - 150 msec [1].

Excited NADH and NADPH are strong reductants: they are able to reduce many metabolic substances [2,3], most interesting is their ability to reduce methyl-viologen and ferredoxin [4]; in the presence of bacterial hydrogenase hydrogen gas is evolved [5]. So redox potential of excited NADH exceeds greatly that of hydrogen electrode. The question arises whether this ability is realized in heterotrophic cells. We have studied the action of UV on hydrogen evolution of Clostridium butyricum having active hydrogenase and have found that under action of UV hydrogen evolution is enhanced and afterwards suppressed. The phenomenon depends on the time of inoculation: young cultures are activated by UV, old ones - inhibited [6]. The action spectrum of activation is roughly measured and lies in the region 320-360 nm; may be NADH photo-activation takes place but we could not exclude the activation of flavines as porphyrines are not found in this culture.

So model experiments demonstrate the possibility of activation by light some ancient heterotrophic cells which may be intermediate forms on the way to photoautotrophy.

May I mention here some our recent experiments which concern to this problem. The chloroplasts are able to evolve hydrogen under action of light when oxygen evolution by photosystem II is inhibited by different methods - heating up to 50-55°, Tris treatment, etc. [7].

These data are in line with the hypothesis on the path of photosynthetic evolution from redox potential of hydrogen electrode to that of oxygen [8].

REFERENCES

[1] V.V.Nikandrov, A.A.Krasnovsky. Biofizika 23, 721-723 (1978)
[2] A.A.Krasnovsky, G.P.Brin. Doklady AN SSSR 158, 225-228 (1964)
[3] A.A.Krasnovsky, G.P.Brin. In "Problems of evolution and technical biochemistry", "Nauka" Publ.House p.p.221-231 (1964)
[4] V.V.Nikandrov, G.P.Brin, A.A.Krasnovsky. Biokhimiya 43, 636-645 (1978)
[5] A.A.Krasnovsky. In "Topics in photosynthesis", Ed. J. Barber, Elsevier, Amsterdam, vol. III, p.p. 281-298 (1979)
[6] L.V.Zhukova, V.V.Nikandrov, A.A.Krasnovsky. Biofizika 25, 1095-1096 (1980)
[7] A.A.Krasnovsky, S.V.Maltzev. Doklady AN SSSR 267, 506-509 (1982)
[8] H.Baltsheffsky, Origins of Life 5, 387-395 (1974)

PHOTOCHEMICAL REDUCTION OF PROTOCHLOROPHYLLIDE IN DETERGENT MICELLES WITH THE FINAL CHLOROPHYLLIDE FORMATION

A.A. KRASNOVSKY, M.I. BYSTROVA, I.A. SAFRONOVA

Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The photoreduction of protochlorophyllide is the final photochemical stage of chlorophyll formation in plants. This stage is dependent on the specific native state of protochlorophyllide, which is associated with the lipoprotein molecules in etioplast membranes.

The modelling of the in vivo state and photoconversions of the chlorophyll precursor is an approach to the study of its structural and functional organization in plants. In order to model the natural state of the chlorophyll precursor the different systems as solutions of protochlorophyll pigments in nonpolar solvents (1-3), solid films of protochlorophyll (4-6), its solutions in detergent micelles (7), and the others were used succesfully. We expected aqueous solutions of protochlorophyllide in detergent micelles would be most suitable for modelling of photoconversions of this pigment.

In general, aqueous micellar solutions of photosynthetic pigments in detergents as the systems modelling properties and the state of native pigment-protein-lipid complexes have been always attractive.

The present study describes the photochemical reduction of isolated protochlorophyllide in the aqueous solution of Triton X-100. The final photohydrogenation of protochlorophyllide occurs at the site of the semiisolated double bond in the pyrrol ring IV. The yield of chlorophyllide obtained was up to 20% of the total amount of the initial pigment, being quite effective as compared to the reduction of protochlorophyll in the same conditions of the experiment.

C. Sironval and M. Brouers (eds.); Protochlorophyllide Reduction and Greening. ISBN 90 247 2954 8
© 1984, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster. Printed in The Netherlands.

Protochlorophyllide was isolated from 10-12-d-old etiolated leaves of wheat (var. "Iubileinaya") in the following way. Leaves were extracted by 80% cooled acetone. The extract was repeatedly washed with hexane and heptane successively to remove protochlorophyll and carotenoids. These stages were rather near to the technique described previously (8). Then we transferred protochlorophyllide into diethyl ether. Beforehand, the pH of water-acetone solution had been adjusted to pH 7 by saturated solution of KH_2PO_4. Thus, without purification by chromatography, we obtained the pigment which was identical to protochlorophyll by absorption and luminescence spectra of its solutions in polar organic solvents.

Protochlorophyll was isolated from inner coats of pumpkin seeds by the method used in our laboratory. Protopheophorbide was prepared via protochlorophyllide pheophytinization in 1% aqueous solution of Triton X-100 at pH 3. Such acidity was obtained by adding of ascorbic acid up to 10^{-2}M. Chlorophyllide was prepared from chlorophyll a by the procedure described earlier (9).

Photoreduction was carried out after the vacuum pumping of samples in Thunberg tubes ajusted to install them into the cell compartment of Perkin-Elmer MPF-44B Spectrofluorometer. Reaction systems were illuminated with incandenscent lamp through the colored glass filter OS-13 which transmits light in the range 600-800 nm ($5 \cdot 10^4$ergs/cm^2. sec). All runs were made at 18-20°C. Progress of the photoconversion was controlled by fluorescence spectra recorded in the course of illumination. It took about 2 minutes to record a fluorescence spectrum, and so the illumination of samples was interrupted in all our experiments. When the photoprocess was over, air was admitted into the system, and spectra were recorded during the back dark reaction of reduced intermediates.

Photoreduction of protochlorophyllide was carried out in 1% solution of Triton X-100 with the admixture of 5% pyridine and 10^{-2}M of ascorbic acid. Under the action of light

the decline of the initial luminescence of protochlorophyllide rapidly occured. After 2-5 minutes of illumination a new maximum appeared at 672-675 nm, which increased during the subsequent illumination, while protochlorophyllide luminescence continued to decline but more slowly than in the begining of the process. Usually, in 7-8 minutes of the interrupted illumination, light saturation took place, and a luminescence peak near 674 nm reached its maximum. Very peculiar is that in the dark the intensity of the newly formed longwave maximum increased significantly after the admitting of air into the tube and usually reached up to 10-15% of the initial value of the main protochlorophyllide luminescence maximum as the result of the reversible oxidation of intermediate photoreduced forms. The course of a typical protochlorophyllide photoreduction sequence under described conditions is traced in Fig. 1.

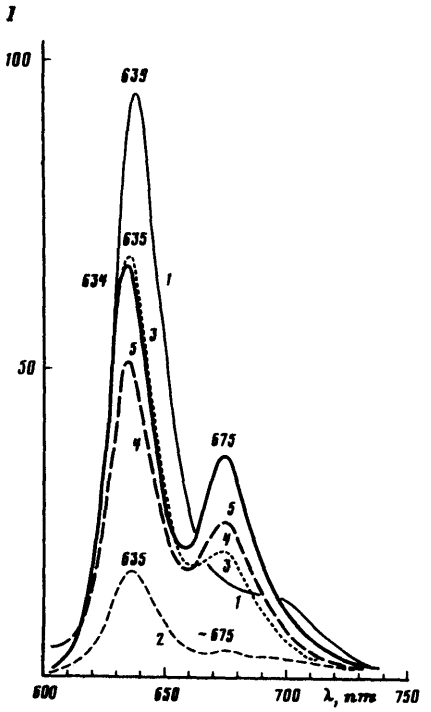


FIGURE 1. Photoreduction of protochlorophyllide in 1% Triton X-100 aqueous solution in the presence of 10^{-2} M ascorbic acid and 5% of pyridine. Fluorescence spectra ($\lambda_{ex.}$ 440 nm): 1, initial; 2-4, during photoreduction, after 2-12 min. illumination; 5, after the back reaction in the presence of air. (Spectra 1, 2 were recorded at the sensitivity 1 /in arbitrary units of measurement/; the sensitivity for 3, 4 spectra is x10; and the sensitivity for spectrum 5 is x3).

The maximum of 674 nm is assigned to the quite stable product which can remain in the reaction system for a long time after photoconversion. The fluorescence spectra of the system after photoreaction have been compared with the fluorescence spectra of an artifical mixture, taken before and after illumination. This mixture was composed of the equal amounts ($0.2 \cdot 10^{-6}$ M) of protochlorophyllide and chlorophyllide a in the reaction medium (Fig. 2). This allowed to estimated the yield of photoproduct with the maximum at 674 nm as about 20% of protochlorophyllide initial content and identify the product as chlorophyllide a.

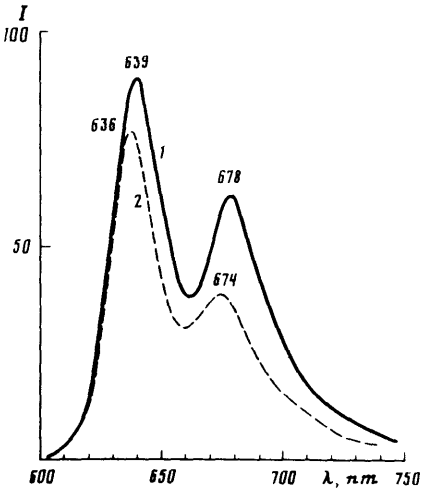


FIGURE 2. Fluorescence spectra of protochlorophyllide ($0.2 \cdot 10^{-6}$ M)+chlorophyllide a ($0.2 \cdot 10^{-6}$ M) mixture in 1% Triton X-100 aqueous solution in the presence of 10^{-2} M ascorbic acid and 5% of pyridine: 1, initial; 2, after 10 min. illumination.

Thus, in the micellar detergent solution the semiisolated double bond in the pyrrole ring IV of protochlorophyllide is reduced on illumination. It should be emphasized that protochlorophyll is much less reduced at the 7, 8-bond than protochlorophyllide under the same conditions. In case of the protochlorophyll reduction the photodestruction is too strongly pronounced to create the sufficient yield of the final long-wave product (with fluorescence at 668-670 nm); the yield of this product does not exceed 5% of initial protochlorophyll.

Under the same conditions of experiments with protopheophorbide (magnesiumless derivate of protochlorophyllide) no

stable reduced product at the site of semiisolated double bonds appears. The photoreduction of protopheophorbide results in a reversible formation of a photoproduct having fluorescence maximum about 690 nm (Fig. 3).

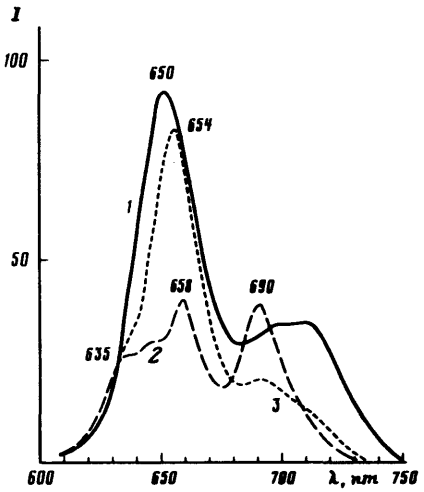


FIGURE 3. Photoreduction of protopheophorbide in 1% Triton X-100 aqueos solution in the presence of $2 \cdot 10^{-2}$ M ascorbic acid and 5% of pyridine. Fluorescence spectra ($\lambda_{ex.}$ 420 nm): 1, initial; 2, after 9 min. illumination; 3, after the back reaction in the presence of air.

These data indicate that such features of protochlorophyllide structure as the presence of a central magnesium atom and a free propionic group in the 7^{-th} C-atom are essential for the effective reduction of semiisolated bonds in the micellar detergent solution as in etiolated leaves (10).

Kinetics of photoprocess indicates that the chlorophyllide formation is not a single reaction; it proceeds stepwise and includes several stages. Among them there are both the actually photochemical and dark reactions; it reminds of the situation in etiolated leaves to a certain extent too. In detergent micelles the initial photochemical reaction leads to formation of nonfluorescence intermediates, it is another analogy with that in leaves. The mentioned intermediates are the photoproducts which have maxima near 480 nm and 530 nm as far as we can judge from absorption spectra. They appear, probably, from initial pigment successively as a result of the primary reduction at the site of the system of conjugated

double bonds /P480/ (11), and then at the site of the 7, 8-double bond /P530/ in protochlorophyllide molecules. The oxidation converts P530 to chlorophyllide. The simplified scheme is given below.

$$\text{PChde639} \xrightarrow[D]{h\nu} \text{reduced products} \longrightarrow \text{Chde675}$$

(PChde, protochlorophyllide; Chde, chlorophyllide; D, electron /hydrogen/ donor; the numerials denote the positions of the main fluorescence maxima).

Probably, this is the principal pathway of the chlorophyllide formation in micellar detergent solutions. It corresponds to the phototransformation of protochlorophyll into chlorophyll in pyridine, investigated in our previous studies (12-14), and in the study (15), as well as to the photoreduction of Zn-derivatives of porphyrins and Zn-protopheophytin (16-18).

The highest yield of chlorophyllide (up to 20% of the initial pigment) was observed in the presence of 5% of pyridine. The clorophyllide formation diminished with the decrease of the pyridine content up to 1%, and became negligible small in the absence of pyridine. However, the rate of the reaction became slower and the yield of chlorophyllide fell, when we used pyridine without detergent as the reaction medium. Using ethanol-pyridine and water-pyridine solutions one could observed no formation of chlorophyllide under prolonged illumination. Thus, protochlorophyllide shows most completely its capasity for reduction of semiisolated double bonds in the micellar detergent solution. When we used in our experiments phosphate buffers in the pH range from 4 to 9, the effectiveness of the chlorophyllide formation greatly decreased. The increase to 5-10 fold in the amount of ascorbic acid in the system had analogous effect. Therefore, one may assume that in the detergent micelles protochlorophyllide posesses a peculiar molecular organization which is associated with the state of the detergent micelles and may determine protochlorophyllide photoreactivity. Indeed, in the aqueous solution of Triton X-100 (0.1-1%) at 20° C, the absorption and

luminescence spectra of protochlorophyllide differ from protochlorophyll spectra in displacement of maxima by 4-6 nm to the long-wave side (Fig. 4). The difference between fluorescence spectra of protochlorophyllide and protochlorophyll remains at -196° C, but at the same time the freezing causes a short-wave shift of the both pigment maxima.

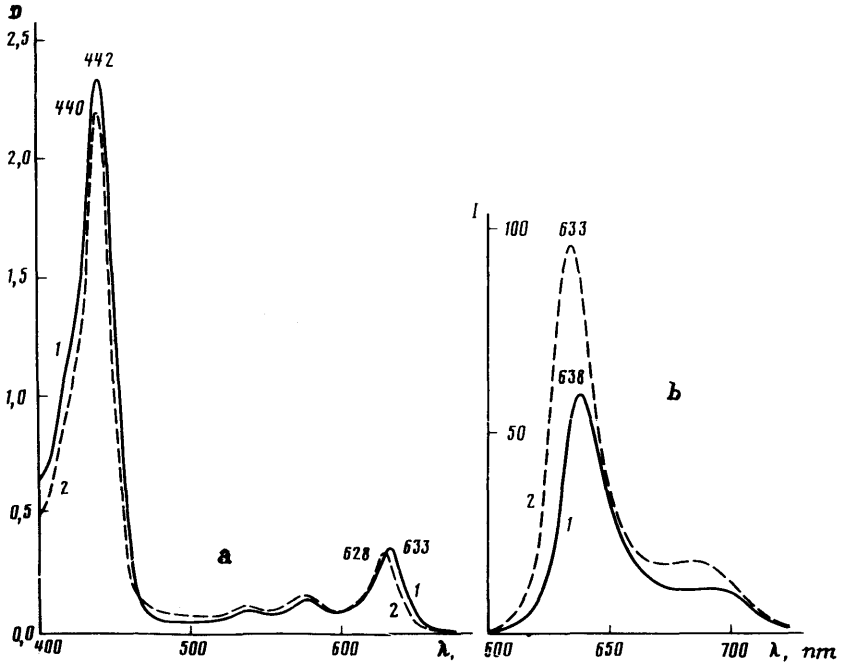


FIGURE 4. Absorption (a) and fluorescence (b) spectra of pigments in 1% Triton X-100 aqueous solution: 1, protochlorophyllide; 2, protochlorophyll.

The comparative study of photochemical destructive oxidation of pigments in Triton X-100 by oxygen revealed a faster rate of the protochlorophyllide oxidation in comparison with that of protochlorophyll.

The study of pheophytinization in micellar solution of Trition X-100 showed that in the case of protochlorophyllide the replacement of magnesium by hydrogen ions occurs much more rapidly than in protochlorophyll; halflife-time for conversion into pheophytin takes 30-40 min. for protochlo-

rophyllide and 8.5-9 h. for protochlorophyll.

The resultes obtained may indicated the existence of a specific interaction between protochlorophyllide molecules and detergent micelles. This interaction is important for the manifestation of protochlorophyllide photochemical activity. At the same time a coordination binding of pigment molecules to nitrogen base molecules appears to be very significant for the photoreduction of protochlorophyllide into chlorophyllide a.

The system studied may be considered as a simple functional model of protochlorophyllide-holochrome.

Summary

Under the action of light protochlorophyllide is reduced in 1% solution of Triton X-100 in the presence of pyridine (5%) and ascorbic acid (10^{-2} M) with the final formation of the photoproduct having fluorescence maximum at 675 nm. This product was indentified as chlorophyllide a, its yield reached up to 20% of the initial amount of protochlorophyllide. Photochemical behaviour of protochlorophyllide differs from that of its analogs such as protochlorophyll and protopheophorbide.

REFERENCES

1. Seliskar C.J., Ke B. 1968. Protochlorophyllide aggregation in solution and associated spectral changes. Biochim. Biophys. Acta, 153, 685-691.
2. Brouers M. 1972. Optical properties of in vitro aggregates of protochlorophyllide in non-polar solvents. 1. Visible absorption and fluorescence spectra. Photosynthetica, 6 (4), 415-423.
3. Rasquain A., Houssier C., Sironval C. 1977. The dimerization of protochlorophyll pigments in non-polar solvents. Biochim. Biophys. Acta, 462, 622-641.
4. Krasnovsky A.A., Bystrova M.I., Lang F. 1971. The modelling of the different forms of protochlorophyll pigments in solid films and etiolated leaves treated by δ-ALA. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 201, 1485-1488.
5. Böddi B., Soós J., Láng F. 1980. Protochlorophyll forms with different molecular arrangements. Biochim. Biophys. Acta, 593, 158-165.

6. Bystrova M.I., Safronova I.A., Krasnovsky A.A. 1982. The study of molecular arrangement of protochlorophyll aggregated forms in solid films. Mol. Biol. USSR, 16, 291-301.
7. Böddi B., Kovács K., Láng F. 1983. Spectroscopic properties of protochlorophyll forms in Triton X-100 detergent micelles. Biochim. Biophys. Acta, 722, 320-326.
8. Bombart P., Dujardin E. 1980. A new method for the purification of protochlorophyllide. Abstracts of 5th International Congress on Photosynthesis, Greece, p. 76.
9. Mapleston R.E., Griffiths W.T. 1980. Light modulation of the activity of protochlorophyllide reductase. Biochem. J., 189, 125-133.
10. Griffiths W.T. 1980. Substrate-spesifity studies of protochlorophyllide reductase in barley (Hordeum vulgare) ethioplast membranes. Biochem. J., 186, 267-278.
11. Krasnovsky A.A., Voinovskaya K.K. 1949. Photochemical characteristics of protochlorophyll. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 66, 663-666.
12. Krasnovsky A.A., Bystrova M.I. 1962. Spectral and photochemical properties of protochlorophyll pigments in model systems. Biochimiya. USSR, 27, 958-968.
13. Bystrova M.I., Umrikhina A.V., Krasnovsky A.A. 1966. Photoreduction of protochlorophyll and protopheophytin. Biochimiya. USSR, 31, 83-92.
14. Krasnovsky A.A., Bystrova M.I., Lang F. 1970. The study of photoreduction of protochlorophyll to chlorophyll in the solution. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 194, 1441-1444.
15. Suboch V.P., Losev A.P., Gurinovitch G.P. 1974. Photoreduction of protochlorophyll and its derivatives. Photochem. Photobiol., 20, 183-189.
16. Seely G.R., Talmadge K. 1964. Photoreduction of zinc porphin by ascorbic acid. Photochem. Photobiol., 3, 195-206.
17. Sidorov A.N. 1964. Spectroscopic investigation of Zn-TPP photoreduction. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 158, 973-976.
18. Suboch V.P., Losev A.P., Gurinovitch G.P., Sevchenko A.N. 1970. Photochemical hydrogenation of porphyrin metallocomplexes, protochlorophyll derivatives. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 194, 723-726.

БИОФИЗИКА

Том XXX, вып. 6 1985

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ОБРАТИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

БЕЛЯЕВА О. Б., БЫСТРОВА М. И., САФРОНОВА И. А., ЛИТВИН Ф. Ф., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Изучены фотоиндуцированные изменения флуоресценции протохлорофилла при 77 К в системах, содержащих мономерные и агрегированные формы пигмента. Установлено, что оба типа пигментных форм обнаруживают под действием света падение интенсивности флуоресценции, обратимое после повышения температуры. Сделан вывод, что наблюдаемые фотореакции, по-видимому, связаны с протеканием элементарного фотовосстановления протохлорофилла и моделируют начальные стадии фотобиогенеза хлорофилла (хлорофиллида). При 77 К в 10^{-4} М растворе протохлорофилла в этаноле, содержащем агрегированную форму с максимумом флуоресценции при 651 нм, наряду с фотоиндуцированным падением флуоресценции обнаружено образование нефлуоресцирующего фотопродукта с поглощением в области 685—695 нм, аналогичного одному из промежуточных соединений (Х690) в процессе фотобиогенеза хлорофилла. Обосновано предположение о существенной роли межмолекулярного пигмент-пигментного взаимодействия в элементарном фотовосстановлении протохлорофиллового пигмента.

Заключительная фотохимическая стадия образования хлорофилла в растениях представляет собой сложный многоступенчатый процесс, промежуточные реакции которого хорошо прослеживаются по изменению спектров флуоресценции освещаемых этиолированных листьев при низкой температуре.

В ряде работ [1—7] было установлено, что одна из первых стадий в фотопревращении предшественника хлорофилла в листьях растений характеризуется резким уменьшением квантового выхода флуоресценции исходного протохлорофиллида, которое частично обратимо при повышении температуры. Для выяснения молекулярного механизма первичных реакций фотовосстановления предшественника хлорофилла (хлорофиллида) представляет интерес изучение элементарных фотопревращений изолированного протохлорофилла.

В данной работе обнаружены и исследованы фотоиндуцированные при 77 К обратимые изменения флуоресценции протохлорофилла в растворах и твердых пленках, подобные процессам, протекающим в этиолированных листьях.

Материалы и методы. Протохлорофилл выделяли из семян тыквы сорта «Столовая» по методу, близкому к описанному в работе [8]. Объектами исследования служили растворы протохлорофилла (10^{-6}—10^{-4} М) в органических растворителях (этиловый спирт, диэтиловый эфир, пиридин, гептан) и мицеллярном растворе неионогенного детергента тритона Х-100, а также твердые пленки пигмента. Твердые пленки получали по методу, описанному в работе [9]. Образцы исследовали в стеклянных запаянных ампулах, из которых предварительно удаляли воздух с помощью форвакуумного насоса (10^{-2} мм рт. ст.).

Спектры флуоресценции регистрировали на установке со светосильным монохроматором и фотоумножителем. Источником возбуждающего света служила 500-ваттная ртутно-кварцевая лампа со светофильтрами,

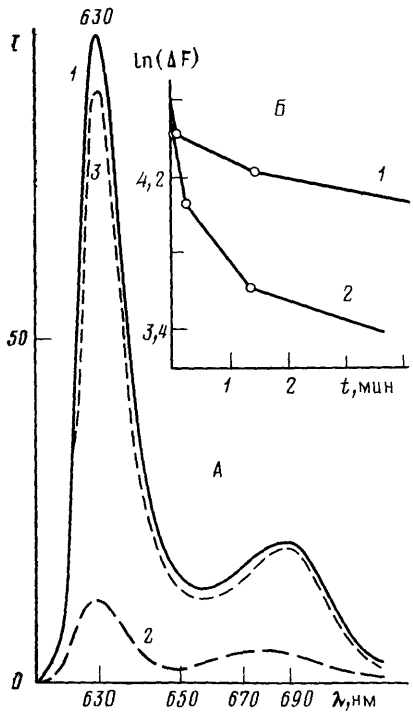


Рис 1

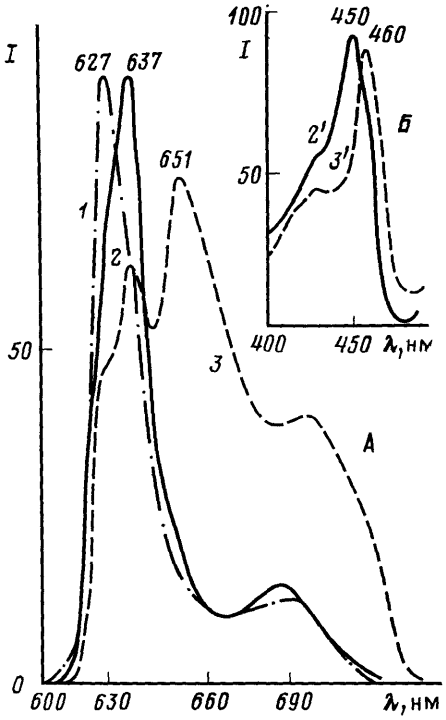


Рис. 2

Рис. 1. Действие света ($\sim 10^2$ Дж/см^2·с) на флуоресценцию протохлорофилла при 77 К: *А* — спектры флуоресценции 10^{-6} М раствора протохлорофилла в 1%-ном тритоне X-100 (*1*), после 1 мин освещения (*2*) и после последующего повышения температуры до 273 К (*3*); *Б* — кинетика фотоиндуцированного падения интенсивности флуоресценции 10^{-6} М раствора протохлорофилла в диэтиловом эфире (*1*) и твердой пленки протохлорофилла (*2*)

Рис. 2. Спектры флуоресценции (*А*) и возбуждения флуоресценции (*Б*) растворов протохлорофилла в этаноле при 77 К: *1* — 10^{-6}; *2*, *2'* — 10^{-5}; *3*, *3'* — 10^{-4} М

выделяющими область 350—500 нм. Та же лампа служила источником действующего света (интенсивность $\sim 10^2$ Дж/см^2·с). Спектры возбуждения измеряли на флуоресцентном спектрофотометре MPF-44B (фирмы «Perkin-Elmer», США). Низкотемпературные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-18.

Результаты и обсуждение. Изменения флуоресценции протохлорофилла в разбавленных растворах. Разбавленные (10^{-6} М) растворы протохлорофилла в водном 1%-ном тритоне X-100 и органических растворителях (этаноле, диэтиловом эфире, пиридине, гептане) содержат главным образом мономерную (сольватированную) форму пигмента с основной полосой флуоресценции при 624—630 нм (в зависимости от растворителя). Освещение таких растворов при 77 К приводит к резкому уменьшению интенсивности флуоресценции без появления новых полос в области 600—700 нм (см. рис. 1). Повышение температуры исследуемых образцов (после освещения) до 253—273 К приводит к увеличению интенсивности флуоресценции до исходного уровня (рис. 1, *А*, спектр *3*), следовательно, наблюдаемый фотопроцесс обратим.

Кинетические кривые фотопроцесса включают три фазы (рис. 1, *Б*): быструю (<30 с), промежуточную (1—2 мин) и медленную (>10 мин). Скорости фотопроцесса в этаноле, эфире, пиридине соизмеримы; время уменьшения флуоресценции протохлорофилла на 50% ($\tau_{1/2}$) в этих растворителях составляет 2—4 мин. В тритоне X-100 фотопроцесс протекает несколько медленнее ($\tau_{1/2} \sim 10$ мин), в неполярном гептане его эффективность значительно меньше ($\tau_{1/2} > 30$ мин).

Во всех исследованных растворителях фотоиндуцированное падение низкотемпературной флуоресценции мономерного протохлорофилла бы-

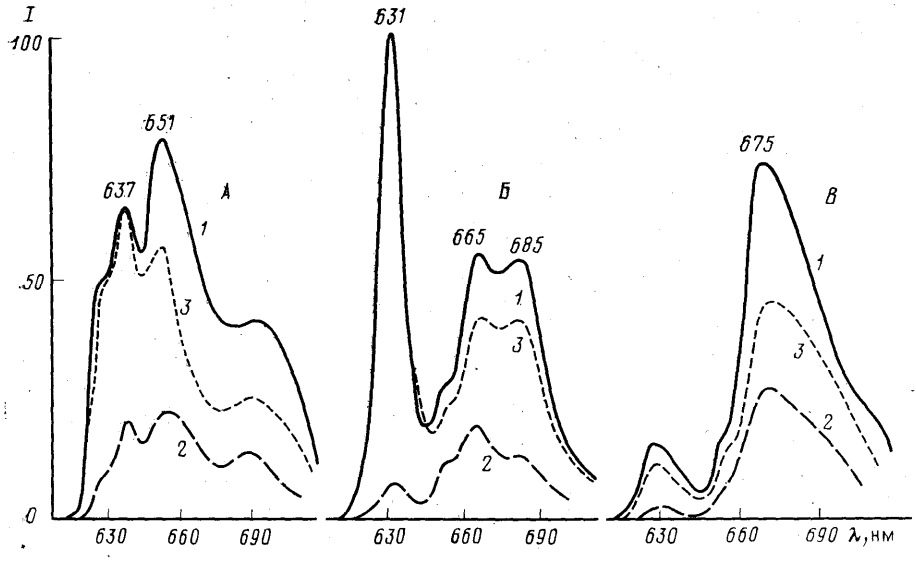


Рис. 3. Действие света (~10^2 Дж/см^2·с) на спектры низкотемпературной (77 К) флуоресценции 10^{-4} М раствора протохлорофилла в этаноле (*А*); 10^{-4} М раствора протохлорофилла в 0,06%-ном тритоне Х-100 (*Б*) и твердой пленки протохлорофилла (*В*): до освещения (*1*), после освещения в течение 10 мин (*2*) и после последующего повышения температуры до 273 К (*3*)

ло практически полностью обратимым при повышении температуры до 253—273 К. Скорость и глубина фотопревращения протохлорофилла не изменялись в присутствии кислорода воздуха. Добавление доноров электрона (аскорбиновой кислоты, аскорбата натрия, фенилгидразина) снижало значение $\tau_{1/2}$ в несколько раз. Обратимые изменения низкотемпературной флуоресценции наблюдались и при освещении образцов красным светом (светофильтр ОС-11).

Для растворов протохлорофиллида и протофеофитина в этаноле и 1%-ном тритоне Х-100 обнаружены аналогичные фотоиндуцированные ($\tau_{1/2}$~2—4 мин) изменения флуоресценции. Хлорофилл *а* по сравнению с протохлорофилловыми пигментами менее фотоактивен: скорость падения его флуоресценции в этаноле при 77 К в несколько раз меньше.

Изменения флуоресценции протохлорофилла в концентрированных растворах и твердых пленках. Исследование фотопроцесса в системах с агрегированным пигментом представляет особый интерес в связи с тем, что в растениях фотоактивностью, по-видимому, обладают именно агрегированные формы предшественника хлорофилла. Фотопревращения агрегированных форм протохлорофилла при 77 К изучали в концентрированных (10^{-4} М) растворах пигмента в этаноле и тритоне Х-100 (0,06%), а также в твердых пленках.

В низкотемпературных спектрах флуоресценции спиртовых растворов протохлорофилла наряду с полосой мономера (627 нм) обнаруживаются максимумы при 637 и 651 нм, которые резко возрастают при повышении концентрации пигмента (рис. 2, *А*). Четко выраженная зависимость интенсивности максимумов от концентрации указывает на то, что они принадлежат агрегированным формам. Этим максимумам соответствуют полосы около 635 и 645 нм в низкотемпературном спектре поглощения. Спектры возбуждения флуоресценции, измеряемой при 637 и 651 нм, имеют максимумы при 450 и 460 нм соответственно (рис. 2, *Б*), что характеризует агрегаты как самостоятельно люминесцирующие центры.

При освещении спиртовых растворов протохлорофилла с концентрацией 10^{-4} М было обнаружено резкое падение интенсивности всех максимумов флуоресценции, обратимое после повышения температуры до 253—273 К. Максимум 651 нм под действием света уменьшается с боль-

шей скоростью, чем максимум 637 нм, тогда как степень обратимости после повышения температуры для более длинноволнового максимума значительно ниже (рис. 3, *А*).

Агрегированная форма протохлорофилла с максимумом флуоресценции при 665 нм, образующаяся в водном 0,06%-ном растворе тритона X-100 [10], также фотоактивна при 77 К (рис. 3, *Б*) (значение $\tau_{1/2} \sim 1$—10 мин, т. е. соизмеримо со временем полупревращения мономеров). Обратимость процесса после повышения температуры (50—70%) менее выражена, чем у мономерных форм. Более длинноволновые формы протохлорофилла с максимумами флуоресценции в области 675—685 нм в твердых пленках (рис. 3, *В*) характеризуются высокой скоростью ($\tau_{1/2} \sim 15$—45 с) фотоиндуцированного изменения флуоресценции при 77 К, соизмеримой со скоростью фотопроцесса в этиолированных листьях в тех же условиях освещения. Кинетические кривые фотопревращения агрегированных форм протохлорофилла, как и мономерных форм, имеют трехфазный характер (рис. 1, *Б*, 2). Эти данные соответствуют результатам, полученным при изучении фотопроцесса в этиолированных листьях [11].

Фотоиндуцированные изменения поглощения протохлорофилла при 77 К. С целью выяснения природы фотопроцесса, лежащего в основе обратимых изменений флуоресценции, параллельно (на тех же образцах) были исследованы фотоиндуцированные изменения спектров поглощения протохлорофилла в этаноле при 77 К. В разбавленных растворах пигмента (10^{-6}—10^{-5} М) не наблюдали уменьшения максимумов поглощения, соизмеримого с изменением флуоресценции, так же как и заметного увеличения поглощения в области 600—700 нм. Однако в концентрированном (10^{-4} М) спиртовом растворе, где наблюдается фотоиндуцированное (частично обратимое) падение флуоресценции при 651 нм, обнаружено уменьшение полос поглощения при 625, 635 и 645 нм и появление новой полосы в области 685—695 нм (рис. 4).

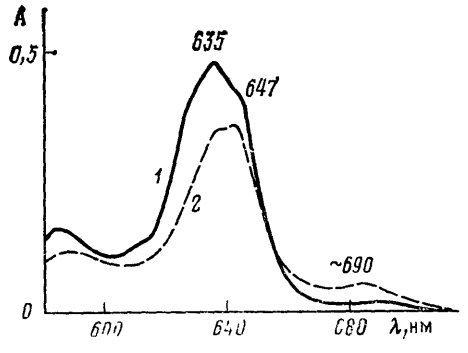


Рис 4 Низкотемпературные (77 К) спектры поглощения 10^{-4} *М* раствора протохлорофилла до освещения (*1*) и после освещения в течение 20 мин (*2*)

Таким образом, фотопроцесс, протекающий при 77 К с участием агрегированного протохлорофилла, приводит к образованию длинноволнового продукта. Этот продукт не превращается в исходный протохлорофилл при повышении температуры. По спектральным свойствам и условиям образования он сходен с промежуточным продуктом X690, который возникает в этиолированных листьях под действием света при 77 К параллельно с тушением флуоресценции фотоактивной формы предшественника хлорофилла (хлорофиллида) [1—7].

Возможно, наблюдаемые фотореакции протохлорофилла и его аналогов в растворах — результат происходящего под действием света донорно-акцепторного взаимодействия между молекулами пигмента и растворителя. В [12, 13] наблюдали фотоиндуцированное обратимое изменение поглощения хлорофилла в замороженных растворах. Относительно агрегированных форм протохлорофилла (в твердых пленках в первую очередь) можно сделать предположение о фотоиндуцированном взаимодействии донорно-акцепторного типа между соседними молекулами пигмента.

По-видимому, обнаруженные обратимые изменения флуоресценции протохлорофилла в разных системах отражают элементарные стадии фотовосстановления, связанные с переносом электрона от растворителя, соседних молекул пигмента или экзогенных доноров. С этим предполо-

жением согласуются следующие установленные в работе факты: 1) экзогенные доноры электрона активируют процесс, тогда как акцепторы электрона такого действия не оказывают; 2) скорость фотопроцесса в пиридине и этаноле выше, чем в тритоне X-100, который в сильной степени благоприятствует фотоокислению пигментов [14]; 3) эффективность фотопроцесса в растворах протохлорофилла в несколько раз выше, чем в растворах хлорофилла *а*, более склонного к фотоокислению [15].

При сравнении описанных выше результатов с полученными на этиолированных листьях обращает на себя внимание сходство процесса в модельных и живых системах. В обоих случаях обнаруживается фотоиндуцированное падение интенсивности флуоресценции при низкой температуре, не сопровождающееся появлением новых полос и обратимое после повышения температуры. Фотопроцессы в модельных системах и листьях соизмеримы по эффективности, для них характерна трехфазная кинетика.

У агрегированных форм протохлорофилла обнаруживается бо́льшее сходство с живыми системами, чем у мономерных. Скорости фотоиндуцированного изменения флуоресценции протохлорофиллового пигмента в твердых пленках и этиолированных листьях при одной и той же интенсивности света практически совпадают и выше скорости фотопроцесса для мономерного пигмента в несколько раз. Кроме того, только в системах с агрегированным пигментом отчетливо наблюдается образование фотопродукта (фотопродуктов) с длинноволновым (690 нм) поглощением, аналогичного интермедиату X690, обнаруженному при образовании хлорофилла (хлорофиллида) в интактных листьях. По-видимому, агрегация молекул протохлорофилла способствует образованию длинноволнового продукта и его стабилизации.

Недавно [16] с помощью нано- и пикосекундной спектроскопии в освещаемых этиолированных листьях были обнаружены элементарные быстро протекающие фотореакции, предшествующие образованию интермедиата X690, на существование которых указывали и данные [17, 18].

Можно предположить, что наблюдаемое нами тушение флуоресценции мономерного протохлорофилла связано с протеканием аналогичных элементарных фотореакций. Одной из таких реакций может быть образование на свету лабильного нефлуоресцирующего комплекса с растворителем (возможно, комплекса с переносом заряда), который по спектру поглощения заметно не отличается от исходного пигмента. В агрегированных структурах, формирующихся в концентрированных спиртовых растворах, образование подобного комплекса может быть начальной стадией фотопроцесса, приводящего к образованию более стабильных длинноволновых продуктов.

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о возможности воспроизведения начальных стадий фотобиосинтеза хлорофилла в модельных системах и о важной роли межмолекулярного пигмент-пигментного взаимодействия для осуществления элементарных фотореакций восстановления протохлорофилла.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Раскин В. И.* Весці АН БССР. Сер. биял. навук, 1976, т. 5, с. 43.
2. *Раскин В. И.* Фотовосстановление протохлорофиллида. Минск: Наука и техника, 1981.
3. *Dujardin E., Correa M.* Photobiochemist. Photobiophys., 1979, v. 1, p. 25.
4. *Dujardin E.* In: Protochlorophyllide Reduction and Greening/Ed. Sironval C., Brouers M. The Hague: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1984, p. 87.
5. *Лосев А. П., Ялькова Н. Л.* Молекуляр. биология, 1979, т. 13, № 4, с. 837.
6. *Беляева О. Б., Литвин Ф. Ф.* Биофизика, 1980, т. 25, в. 4, с. 617.
7. *Belyaeva O. B., Litvin F. F.* Photosynthetica, 1981, v. 15, p. 210.
8. *Houssier C., Sauer K.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 172, p. 476.
9. *Быстрова М. И., Сафронова И. А., Красновский А. А.* Молекуляр. биология, 1982, т. 16, № 2, с. 291.
10. *Böddi B., Katalin Kovacs, Lang F.* Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 423, p. 479.

11 *Correa M, Dujardin E* Photobiochem Photobiophys, 1983, v 5, p 281
12 *Linschitz H, Rennert J* Nature, 1952, v 169, p 193
13 *Livingston R, Ryan V A* J Amer Chem Soc, 1953, v 75, p 2176
14 *Шапошникова М Г, Красновский А А* Биохимия, 1973, т 38, № 1, с 193
15 *Дроздова Н Н, Красновский А А* Там же, 1965, т 30, № 3, с 605
16 *Iwai J, Ikeuchi M, Inoue Y, Kobayashi T* In Protochlorophyllide Reduction and Greening/Ed Sironval C, Brouers M The Hague Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, 1984, p 99
17 *Литвин Ф Ф, Игнатов Н В* Докл АН СССР, 1980, т 250, № 6, с 1463
18 *Litvin F F, Ignatov N V, Belyaeva O B* Photobiochem Photobiophys, 1981, v 2, p 233

Биологический факультет
Московского государственного
университета им М В Ломоносова,
Институт биохимии им А Н Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
4 III 1985

PHOTOINDUCED REVERSIBLE CHANGES OF PROTOCHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN THE MODEL SYSTEMS

BELYAEVA O B, BYSTROVA M I, SAFRONOVA I A, LITVIN F F, KRASNOVSKY A A

Biological Department M V Lomonosov Moscow State University, A N Bakh Institute of Biochemistry Ac Sci USSR Moscow

Photoinduced changes of protochlorophyll fluorescence at 77° K were studied in the systems containing monomeric and aggregated forms of the pigment Both types of the pigment forms under light effect show a fall of fluorescence intensity which is reversible after the temperature increase The photoreactions observed seem to be related to elementary photoreduction of protochlorophyll, they model the initial stages of photobiogenesis of chlorophyll (chlorophyllid) In 10^{-3} M solution of protochlorophyll in ethanol at 77° K containing the aggregated form with the fluorescence maximum at 651 nm along with the photoinduced fall of fluorescence non fluorescing photoproduct with the adsorption in the region of 685—695 nm was observed This photoproduct was similar to an intermediate compound (X690) of chlorophyll photobiogenesis A hypothesis is substantiated concerning an essential role of molecular pigment — pigment interaction in elementary phototransformations of protochlorophyll pigment

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 19 1985 Вып. 4

УДК 577.355.3

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГРЕГАЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА

М. И. БЫСТРОВА, И. А. САФРОНОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Протохлорофиллид, изолированный из этиолированных листьев, образует в твердых пленках агрегированные формы с основными максимумами поглощения при 630 (ПХд630) и 638 нм (ПХд638) и максимумами флуоресценции соответственно при 633 и 640 нм. Под действием паров аммиака каждая из форм перестраивается в структуру с поглощением при 655 нм и флуоресценцией около 658 нм. Самосборка ПХд655 наблюдается также в водных растворах пигмента в присутствии гидроокиси аммония. ПХд655 во всех системах отличается термолабильностью, распадаясь при температуре $\geqslant 70°$ С на ПХд630 и ПХд638. Скорость фотоокисления у ПХд655 выше, чем у коротковолновых форм. Самосборка ПХд655, как показано по ИК-спектрам твердых пленок, происходит при образовании двух разновидностей межмолекулярных связей, в которые включаются кетогруппы циклопентаноновых колец молекул (связи кето C=O ... HN(R) ... Mg) и карбоксильные группы IV-ых пиррольных колец (связи пропил C=O ... HN(R) ... ... Mg). При самосборке коротковолновых форм карбонильные группы молекул не участвуют в межмолекулярном взаимодействии. Изучение спектров КД привело к заключению о том, что ПХд655 в отличие от ПХд630 и ПХд638 имеет упорядоченную структуру, в состав которой, вероятно, входят димеры со взаимным расположением молекул, близким к параллельному. Исследованные формы протохлорофиллида моделируют формы предшественника хлорофилла (хлорофиллида) в растениях. Обсуждены отличительные особенности межмолекулярного взаимодействия протохлорофиллида и состояния предшественника хлорофилла в растениях.

Исследование способности изолированных протохлорофилловых пигментов к агрегации необходимо для понимания молекулярной организации нативных форм предшественника хлорофилла (хлорофиллида) в растениях.

Изучению агрегации протохлорофилла методами спектроскопии посвящено много работ, круг которых охватывает разнообразные модельные системы: растворы пигмента в неполярных органических растворителях [1, 2], твердые пленки [3—9], водные коллоидные растворы [10, 11] и водные растворы в детергентах [12], содержащие агрегированные формы различного типа.

Известные данные по агрегации бесфитольного аналога протохлорофилла — протохлорофиллида — не столь обширны и ограничиваются наблюдениями образования в неполярных растворителях агрегированной формы с максимумом поглощения 650—655 нм, близкой к поглощению предшественника хлорофилла в листьях (П650), и изучением спектральных свойств этой формы в тех же системах [13—17].

В данной работе мы изучали агрегацию протохлорофиллида в твердых пленках и водных коллоидных растворах путем измерения спектров поглощения, люминесценции и кругового дихроизма, а также ИК-спектров в области характеристических частот связей карбонильных групп. Нас интересовали свойства агрегированных форм разного типа. Основное внимание было уделено агрегированной форме протохлорофиллида с максимумом поглощения при 655 нм, самосборка которой, как показано в работе, происходит в твердых пленках при обработке парами аммиака, а также в водных коллоидных растворах в присутствии гидроокиси аммония. Мы надеялись, что наша работа принесет новую информацию о

межмолекулярном взаимодействии протохлорофиллида и будет способствовать лучшему пониманию структурно-функциональной организации предшественника хлорофилла (хлорофиллида) в растениях.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Протохлорофиллид выделяли из этиолированных листьев пшеницы (сорт Юбилейная) 10—12-дневного возраста. Срезанные листья после замораживания жидким азотом измельчали и обрабатывали охлажденным 80%-ным ацетоном. Экстракт много раз промывали последовательно *н*-гексаном и гептаном (для удаления протохлорофилла и каротиноидов), затем пигмент переводили в диэтиловый эфир после доведения pH водно-ацетонового раствора до 7 насыщенным раствором однозамещенного фосфата калия. Эфирный раствор сушили над прокаленным сернокислым натрием. Наш метод позволял без хроматографической очистки [13, 14, 18] получать спектрально чистый пигмент, идентичный протохлорофиллу по спектрам поглощения и люминесценции в полярных органических растворителях.

Твердые пленки в большинстве опытов получали путем испарения эфира из эфирных растворов (10^{-5} М) в стеклянных вакуумных трубках специальной формы и последующего откачивания форвакуумным насосом в течение 30—60 мин. Для измерения спектров поглощения и флуоресценции пленки получали из 1—3 мл раствора с таким расчетом, чтобы средняя оптическая плотность одного образца не превышала 0,15 ед. Для измерения КД- и ИК-спектров получали более плотные образцы ($A_{макс}$ = =0,5—1 ед.).

При обработке пленок парами аммиака его водный раствор (25%) помещали в боковой отвод трубки Тунберга и спектры поглощения регистрировали в процессе экспозиции при 20° С [7].

Для измерения ИК-спектров использовали пленки, получаемые на пластинках из NaCl [6], с исходной оптической плотностью в максимуме поглощения (~638 нм) $\geqslant$1 ед. Обработку таких пленок парами аммиака проводили в течение 1 ч.

Измерения ИК-спектров проводили на приборе UR-20 («C. Zeiss», ГДР). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-14 (СССР); спектры флуоресценции — на флуоресцентном спектрофотометре MPF-44B («Perkin-Elmer», США; «Hitachi», Япония); спектры КД — на спектрополяриметре 40-AS («Jasco», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения и флуоресценции. Протохлорофиллид при испарении растворов в предварительно высушенном диэтиловом эфире или четыреххлористом углероде в вакууме в отсутствие контакта с водой образует твердую пленку с основными максимумами поглощения при 630—632 и 440—443 нм (рис. 1, *2*). Эти максимумы соответствуют форме протохлорофиллида (ПХд630), которая образуется в данных условиях как основная агрегированная структура. Аналогичную форму образует протохлорофилл в неполярных растворителях [1, 2].

Пленки с ПХд630 заметно люминесцируют при комнатной температуре. В спектрах люминесценции при возбуждении монохроматическим светом с длиной волны 442 нм (соответствует синей полосе поглощения) преобладает максимум ~633 нм, принадлежащий ПХд630 (рис. 2, *1*).

При испарении растворов с более высокой концентрацией пигмента (10^{-4} М) без соблюдения специальных условий обезвоживания образуются пленки, содержащие ПХд638 в качестве основной агрегированной структуры, с максимумом поглощения в синей области около 455 нм (рис. 1, *3*). Недавно [9] у протохлорофилла, выделенного из семян тыквы, в твердых пленках наблюдалось образование аналогичной (поглощение при 630 нм) агрегированной формы под действием паров воды.

ПХд638, как и ПХд630, обладает люминесценцией при комнатной температуре. В спектрах люминесценции пленок с ПХд638 (рис. 2, *2*, *3*)

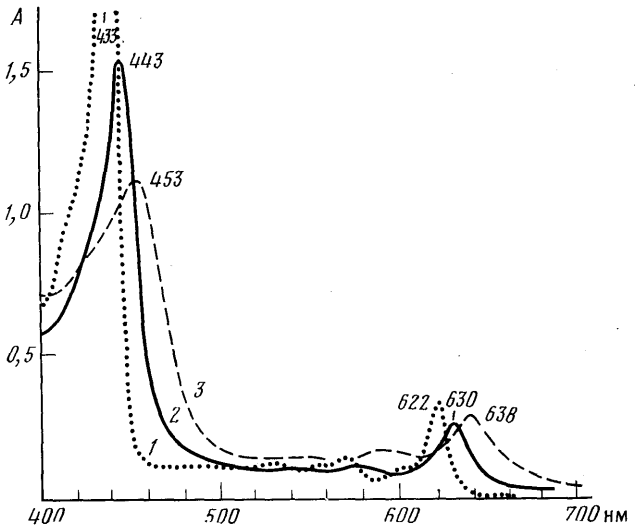


Рис. 1. Спектры поглощения протохлорофиллида: *1* — раствор в диэтиловом эфире; *2, 3* — в твердых пленках разного типа

при возбуждении светом с длиной волны 460 нм доминирует максимум 638—642 нм, принадлежащий основной агрегированной форме. В спектрах люминесценции заметно проявляется свечение в области 680—690 нм. Его спектральный состав и относительная интенсивность непостоянны у разных образцов и зависят от плотности измеряемых участков. Это свечение может принадлежать агрегированным формам с соответствующим длинноволновым поглощением, которые образуются в пленках наряду с ПХд638. Это значит, что пленки, содержащие ПХд638, как и пленки с ПХд630, отличаются структурной неоднородностью.

Кроме пленок рассмотренных типов, протохлорофиллид нередко в обычных условиях образует пленки с максимумом поглощения около 635 нм. Образование пленок такого типа у протохлорофилла ранее наблюдалось в нашей лаборатории [3, 5, 19]. Пленки протохлорофиллида с поглощением при 635 нм содержат ПХд630 и ПХд638 в более или менее соизмеримом соотношении. В их спектрах люминесценции проявляются принадлежащие этим формам полосы ~633 и ~640 нм приблизительно равной интенсивности при возбуждении светом 442 и 460 нм соответственно.

Пленки протохлорофиллида любого типа при экспозиции в парах аммиака (в течение 20—40 мин при 20° С) подвергаются структурной перестройке с конечным образованием новой агрегированной формы, имеющей максимум поглощения при 655±2 нм (ПХд655), которому соответствует максимум около 480 нм в синей области спектра

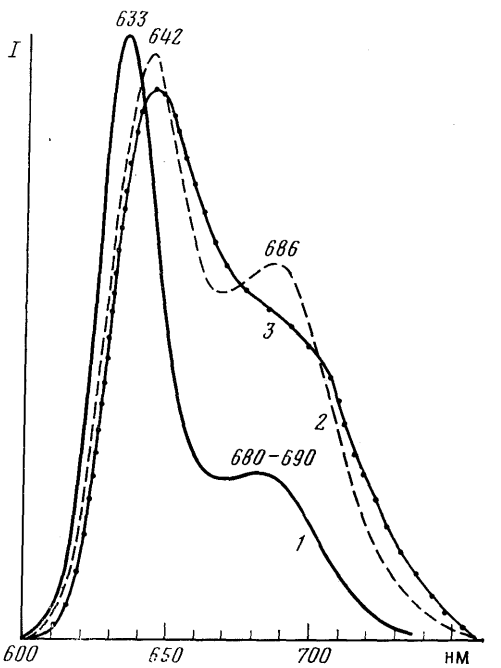


Рис. 2. Спектры флуоресценции пленок протохлорофиллида при 20° С: *1* — пленка с максимумом поглощения ~630 нм (возбуждение 440 нм); *2, 3* — пленки с максимумами поглощения при 638 нм (возбуждение 460 нм)

(см. рис. 3, *а*, *3*). Ранее [13, 14] образование аналогичной формы наблюдалось в растворах протохлорофиллида в неполярных растворителях.

В пленках под действием паров аммиака ПХд655 образуется с одинаковой эффективностью как из ПХд630, так и из ПХд638. В качестве примера на рис. 3, *а* показано образование ПХд655 из ПХд630. Можно видеть, что процесс структурной перестройки протекает через стадию образования промежуточной, по-видимому, неустойчивой в структурном отношении формы с поглощением при 650 нм.

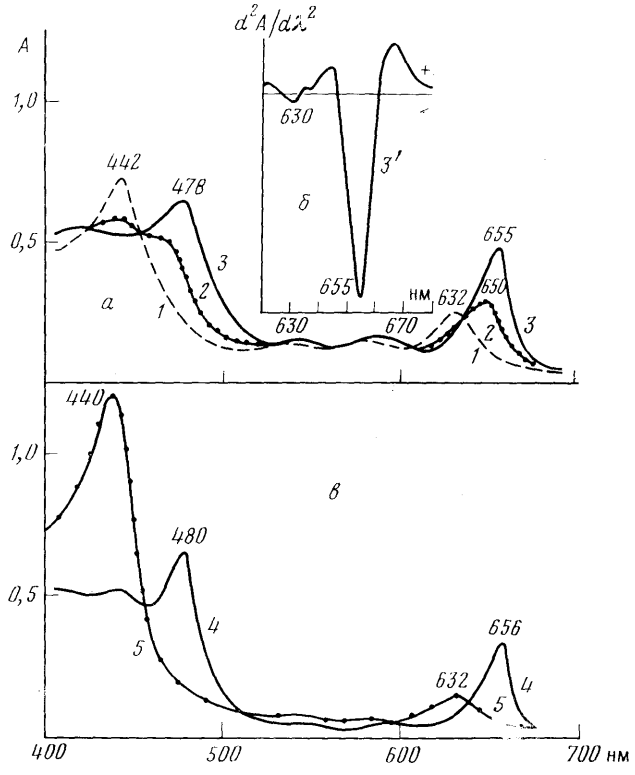


Рис. 3. Спектры поглощения (*а*, *в*) и вторая производная поглощения (*б*) протохлорофиллида: *1* — исходная твердая пленка; *2*, *3*, *3'* — после обработки парами аммиака при 20° С в течение 15 мин (*2*) и 45 мин (*3*, *3'*); *4* — водно-этаноловый раствор в присутствии гидроокиси аммония (10^{-4} М) при 20° С; *5* — то же при 70° С

Самосборка ПХд655, по нашим данным, происходит и в парах воды, однако, действие воды на пленки протохлорофиллида несравнимо менее эффективно (образование ПХд655 в более или менее измеряемом количестве требует длительной — в течение нескольких часов — обработки пленок парами воды).

Быструю самосборку ПХд655 мы смогли наблюдать и в растворах протохлорофиллида в толуоле в присутствии метиламина, а также в водно-этаноловых (5% этанола) коллоидных растворах пигмента при добавлении гидроокиси аммония ($(1{,}5 \div 5) \cdot 10^{-4}$ М) (рис. 3, *в*, *4*). Характерно, что ПХд655 во всех системах после завершения самосборки становится доминирующей формой (см. вторую производную на рис. 3, *б*), которой тем не менее всегда в том или ином соотношении сопутствуют коротковолновые формы — ПХд630 и ПХд638. Первая из них достаточно отчетливо проявляется во вторых производных поглощения (рис.3, *б*), вторая — в спектрах люминесценции (см. ниже).

Во всех системах ПХд655 отличается термолабильностью. В пленках при температуре $\geqslant$70° С при откачивании указанная форма распадается на исходные коротковолновые формы — ПХд630 и ПХд638 в более или

менее равном соотношении. В водно-этаноловых растворах при 70° С она диссоциирует с преимущественным образованием ПХд630 (рис. 3, *в*, *5*). Процесс тепловой деструкции полностью обратим при охлаждении до 20° С.

ПХд655 в пленках и коллоидных растворах при 20° С обнаруживает заметную люминесценцию, более интенсивную, чем коротковолновые формы пигмента, с основным максимумом 658—660 нм. Этот максимум имеет полуширину 18—20 нм, особенно четко проявляется при возбуждении монохроматическим светом с длиной волны 480 нм, соответствующим синей полосе поглощения ПХд655 (рис. 4, *а*, *1*). При возбуждении

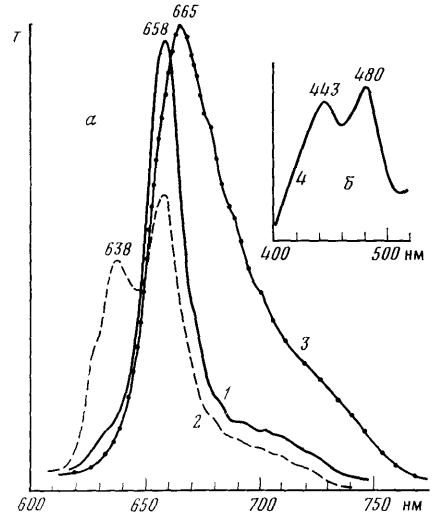


Рис. 4

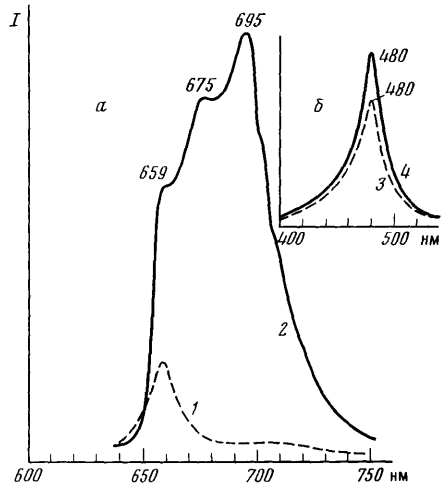


Рис. 5

Рис. 4. Спектры флуоресценции (*а*) и возбуждения флуоресценции (*б*) твердых пленок ПХд655: *1* — пленка ($A<0{,}25$), возбуждение 480 нм; *2* — то же, возбуждение 460 нм; *3* — другой образец пленки ($A>1$), возбуждение 480 нм; *4* — спектр возбуждения флуоресценции при 658 нм

Рис. 5. Спектры флуоресценции (*а*) и возбужденная флуоресценция (*б*) водно-этанолового раствора ПХд655: *1* — 20° С; *2* — —196° С, *3*, *4* — спектры возбуждения флуоресценции (—196° С) при 659 и 695 нм соответственно

светом 450—460 нм в спектрах люминесценции пленок, как и коллоидных растворов, кроме основного максимума отчетливо обнаруживается коротковолновая полоса (637—640 нм) (рис. 4, *а*, *2*), проявляющаяся, по всей вероятности, преимущественно за счет ПХд638. Интересно, что по структуре такие спектры очень похожи на спектры люминесценции интактных этиолированных листьев при — 196° С, зарегистрированные в ранние сроки выращивания [20].

У пленок, содержащих ПХд655, в спектрах возбуждения люминесценции при 658—660 нм (рис. 4, *б*) кроме основной полосы при ~480 нм обнаруживается соизмеримый с ней компонент 440—445 нм, принадлежащий ПХд630 (см. раздел о спектрах поглощения). Это свидетельствует о миграции энергии возбуждения к ПХд655 от коротковолновых форм, протекающей в пленках с достаточно высокой эффективностью.

В спектрах люминесценции пленок с ПХд655 всегда обнаруживаются более или менее заметные полосы в области 675—695 нм. Это свечение принадлежит формам с соответствующим длинноволновым поглощением, которые присутствуют в агрегированной структуре как результат «первичной» самосборки. Понятно, что относительная интенсивность указанных полос гораздо больше у образцов, получаемых использованием более высокой концентрации пигмента, имеющих поэтому более высокую оптическую плотность. На рис. 4, *а*, *3* приведен спектр пленки

с оптической плотностью $>1{,}5$ ед. (вместо обычной величины $<0{,}5$ ед.). Основной максимум имеет более длинноволновое положение и бóльшую полуширину, что обусловлено наложением соседней длинноволновой полосы (с люминсценцией около 670 нм).

Охлаждение до —196° С приводит к значительному увеличению свечения в области 675—695 нм. Этот эффект характерен для систем всех разновидностей и особенно сильно выражен у водно-этаноловых растворов протохлорофиллида, содержащих ПХд655. У таких систем при низкой температуре интенсивность длинноволновой люминесценции возрастает более чем в 20 раз (рис. 5, *а*). Отмеченное усиление свечения, по-видимому, связано не только с увеличением эффективности миграции энергии возбуждения от ПХд655 к соответствующим длинноволновым формам, имеющимся в исходной структуре, но и с новообразованием таких форм при глубоком охлаждении.

Следует отметить, что спектры возбуждения полос 695 и 659 нм (рис. 5, *б*) в низкотемпературных спектрах люминесценции пленок и растворов не отличаются друг от друга, обнаруживая максимум при 480 нм, принадлежащий ПХд655. Эти результаты соответствуют более ранним данным [14], полученным для растворов протохлорофиллида в неполярных растворителях, содержащих аналогичную форму пигмента.

Водно-этаноловые (5% этанола) коллоидные растворы, содержащиие ПХд655, по спектральным свойствам близки к пленкам пигмента; при возбуждении светом 460 нм в их спектрах люминесценции обнаруживаются две соизмеримые по интенсивности полосы ~ 659 и ~ 638 нм

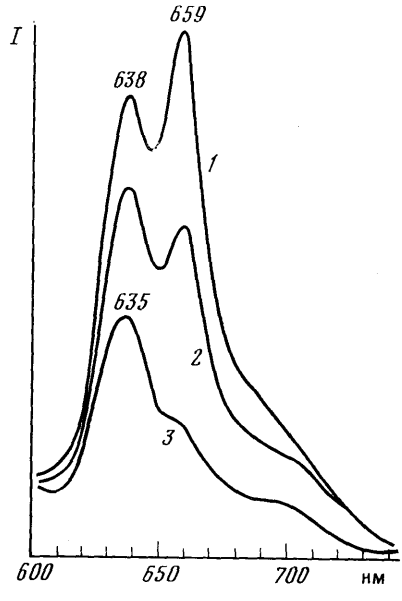


Рис. 6

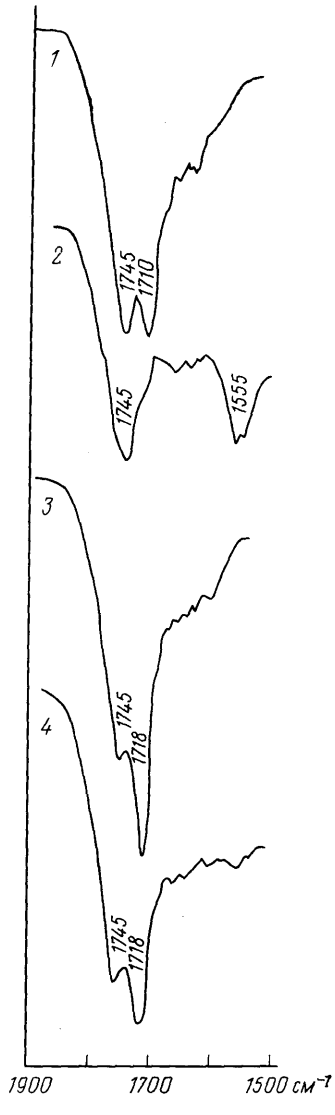


Рис. 7

Рис. 6. Спектры флуоресценции (возбуждение 460 нм) водно-этанолового раствора ПХд655: *1* — исходный; *2*, *3* — после освещения 10^{-1} Дж/см^2·с в течение 1 и 12 мин соответственно

Рис. 7. ИК-спектры пленок пигментов: *1* — исходная пленка протохлорофиллида; *2* — после обработки парами аммиака при 20° С в течение 1,5 ч; *3* — исходная пленка протофеофорбида; *4* — после обработки парами аммиака при 20° С в течение 1,5 ч

(рис. 6, *1*). Последовательное измерение таких спектров в процессе освещения на воздухе — простой способ сравнения разных форм пигмента по скорости фотоокисления. Из рис. 6 можно видеть, что интенсивность максимума 659 нм падает под действием света гораздо быстрее, чем коротковолновая люминесценция. Это показывает, что при фотохимическом окислении ПХд655 более чувствителен к свету, чем коротковолновые формы.

Аналогичное различие в способности к фотоокислению обнаруживают агрегированные формы хлорофилла *а* с основными максимумами поглощения при 712 и 675 нм, образующиеся в тех же системах [21]. Повышенная способность длинноволновых агрегированных форм хлорофилла и его предшественника к фотоокислению может быть связана с особенностями структурной организации, которые отличают эти формы от коротковолновых агрегированных форм.

На примере протохлорофиллида мы смогли подтвердить это предположение, получив доказательства различия молекулярной организации ПХд655 и коротковолновых форм пигмента с помощью измерения ИК-спектров и спектров КД.

Инфракрасные спектры. У пленок, содержащих ПХд638 в качестве основной формы, в спектре отчетливо проявляются две полосы, соизмеримые по интенсивности — $\sim$1710 $см^{-1}$ (кетогруппы циклопентаноновых колец) и $\sim$1745 $см^{-1}$ (карбонильные группы заместителей у 7-го и 10-го атомов углерода). Полоса $\sim$1710 $см^{-1}$ является доминирующей (рис. 7, *1*).

По общей структуре спектры исходных пленок протохлорофиллида весьма близки к спектрам твердых пленок протохлорофилла [6], поглощающих около 635 нм. Это свидетельствует о том, что у обоих пигментов агрегированные структуры с коротковолновым поглощением имеют сходное строение.

При самосборке ПХд655 под действием аммиака структура ИК-спектров пленок резко меняется. Полоса 1710 $см^{-1}$ практически исчезает, интенсивность полосы 1745 $см^{-1}$ заметно уменьшается, появляется новый интенсивный максимум около 1560 $см^{-1}$ (рис. 7, *2*). Ранее [17] у растворов протохлорофиллида в CCl_4 (с максимумом поглощения около 655 нм) в ИК-спектрах наблюдалась полоса $\sim$1675 $см^{-1}$, которая была приписана образованию межмолекулярных связей с участием кетогрупп и центральных атомов магния молекул пигмента.

Наблюдаемые нами в пленках протохлорофиллида изменения ИК-спектров под действием аммиака мы склонны объяснять образованием межмолекулярных связей, в которых участвуют, с одной стороны, кетогруппы циклопентаноновых колец молекул, а с другой стороны, по всей вероятности, карбонилы свободных карбоксильных групп у С7. Указанные карбонилы взаимодействуют с центральными атомами магния через посредство аминогрупп аммиака как комплексообразователя, образуя межмолекулярные связи двух разновидностей: кето C=O...HN(R)...Mg и пропил C=O...HN(R)...Mg. Можно полагать, что в образование первой разновидности межмолекулярных связей включается подавляющее большинство свободных кетогрупп, имеющихся в исходной структуре.

Появление максимумов в области 1550—1560 $см^{-1}$, коррелирующее с уменьшением интенсивности полос 1710 и 1745 $см^{-1}$, как мы полагаем, является следствием указанного взаимодействия. Вместе с тем некоторый вклад в поглощение около 1550 $см^{-1}$ вносит присоединение аммиака к кетогруппам части молекул протохлорофиллида, не связанное с пигмент-пигментным взаимодействием. Об этом свидетельствуют результаты, полученные с безмагниевым производным протохлорофиллида — протофеофорбидом. На рис. 7, *3*, *4* приведены ИК-спектры пленок протофеофорбида — исходной и после экспозиции в парах аммиака. Можно видеть, что аммиак вызывает некоторое уменьшение поглощения свободных кетогрупп (1715—1720 $см^{-1}$) и появление полосы слабой интенсивности около 1550 $см^{-1}$. Можно считать, что эти изменения вызваны коор-

динационным взаимодействием аммиака с доступной ему частью кетогрупп молекул. Следует особо подчеркнуть, что у пленок протофеофорбида при обработке аммиаком поглощение в области 1740—1750 $см^{-1}$ (карбонилы у С7 и С10) не изменяется.

Таким образом, опыты с протофеофорбидом подтверждают нашу трактовку изменений, происходящих в ИК-спектрах пленок протохлорофиллида под действием паров аммиака.

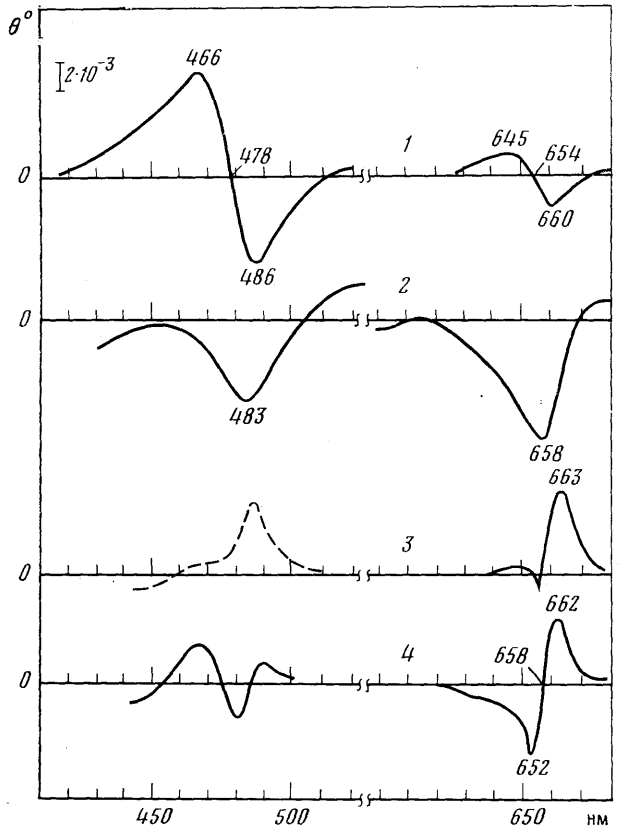


Рис. 8. Спектры КД твердых пленок и водно-этанолового раствора ПХд655: *1* — твердая пленка ($A=1$); *2* — твердая пленка ($A=2$); *3* — водно-этаноловый раствор, свежеполученный; *4* — через 1 ч после получения

Спектры кругового дихроизма. В отличие от коротковолновых агрегированных форм, практически не обладающих оптической активностью, ПХд655 во всех системах обнаруживает довольно заметную оптическую активность с характерными особенностями спектров КД. На рис. 8 приведен (кривая *1*) типичный спектр КД пленки, содержащей ПХд655 как основную форму, с оптической плотностью >1. В области красного максимума поглощения проявляются полосы 660 нм (отрицательная) и 645 нм (положительная), пересекающие нулевую линию при 654 нм; в области синего максимума — полосы 486 нм (отрицательная) и 466 нм (положительная), пересекающие нулевую линию при 478 нм. Таким образом, у ПХд655 в пленках оба главных максимума поглощения обнаруживают наличие двойных, в достаточной степени симметричных, сигналов с противоположными знаками, которые, по всей вероятности, являются основными компонентами абсорбционного расщепления. Растворы протохлорофиллида в толуоле в присутствии метиламина ($\sim 10^{-4}$ М), имеющие максимум поглощения около 655 нм, обнаруживают такие же спектры КД, как и пленки. Ранее [15] спектры КД с подобной структурой наблюдались у растворов протохлорофиллида в бензоле без примеси экзогенных аддендов.

Наличие двойных компонентов расщепления у ПХд655 в области основных максимумов поглощения позволяет предположить, что в его состав входят димеры молекул, которые могут быть и составными частями, основными строительными блоками, полимерной структуры.

В случае пленок с ПХд655 общий вид спектров КД, точные положения и соотношения амплитуд полос изменялись у разных образцов, по-видимому, из-за их оптической неоднородности. У некоторых образцов (чаще у пленок с оптической плотностью $\geqslant 1{,}5$ ед.) в области основных максимумов поглощения можно было наблюдать довольно сильные отрицательные сигналы (около 658 и 483 нм) без отчетливо выраженных сопутствующих им положительных компонентов (рис. 8, *2*). Отмеченное явление может быть связано с вероятным присутствием в плотных пленках структур, сигналы которых «тушат» друг друга. На такую возможность указано в работе Бодди и соавт. [9] при анализе КД твердых пленок хлорофилла и хлорофиллида.

Протохлорофиллид-голохром по структуре спектра КД [22, 23] в области основных максимумов поглощения (около 640 и 440 нм соответственно) в достаточной мере напоминает твердые пленки протохлорофиллида, что может свидетельствовать о близости типов молекулярной упаковки пигмента в обоих случаях. Вместе с тем следует заметить, что сходство между протохлорофиллид-голохромом и твердыми пленками протохлорофилла (с формой 647 нм) [7] по спектрам КД выражено в большей степени.

В данной работе мы смогли наблюдать, что водно-этаноловые растворы, содержащие ПХд655, по виду спектров КД (рис. 8, *3*, *4*)* отличаются от пленок с той же формой пигмента. Если у пленок наиболее длинноволновый в спектре сигнал (658—660 нм) отрицательный, то у растворов соответствующий сигнал (660—664 нм) положительный. Последний проявляется сразу после образования ПХд655 (в присутствии гидроокиси аммония) сначала как компонент, в достаточной мере индивидуальный, а затем, после «созревания» коллоидной системы (в течение 1 ч при 20° С) — вместе с сопутствующим коротковолновым (652—655 нм) отрицательным компонентом (рис. 8, *3* и *4*). Таким образом, ПХд655 в водной среде по сравнению с той же формой в твердых пленках обнаруживает противоположные по знаку сигналы КД, что свидетельствует об иной организации взаимодействующих молекул.

Ранее [11] наблюдалось обращение знаков полос КД у формы протохлорофилла с поглощением при 640 нм в водно-диоксановых растворах при хранении, что было приписано повороту молекул в структурных ячейках (димерах) друг относительно друга на 180°. Аналогичное явление наблюдалось для формы протохлорофилла с поглощением при 650 нм (ПХл650) в твердых пленках при обработке парами ацетона [8].

В данной работе мы показали, что ПХд655, как и ПХл650, может существовать в двух структурных модификациях (с противоположными по знаку сигналами КД). Можно полагать, что возможные компоненты упомянутых структур — димеры различаются по взаимной ориентации плоскостей составляющих их молекул, которая определяется условиями самосборки.

Итак, изолированный из этиолированных листьев протохлорофиллид обнаруживает способность к образованию путем самосборки агрегированных форм трех типов: ПХд630, ПХд638 и ПХд655 с соответствующими максимумами флуоресценции при 632—634, 639—642 и 657—659 нм. Эти формы можно рассматривать в качестве моделей нативных форм предшественника хлорофилла (хлорофиллида) в растениях. Особо отметим, что ПХд655 моделирует свойства основной фотохимически активной формы предшественника хлорофилла — П650. Указанные формы образуются самопроизвольно за счет межмолекулярного взаимодейст-

* В синей области спектр КД у ПХд655 в водной среде выражен слабо и нечетко, в первые моменты после самосборки претерпевает резкие изменения, поэтому спектральная кривая здесь (рис. 8, *3*) достаточно условна. Это может быть связано с наложением нескольких разнородных сигналов и их возможным взаимотушением.

вия и существуют в агрегированной структуре искусственных систем, как и нативные формы в мембранах этиопластов, не в изолированном виде, а в том или ином сочетании друг с другом. Основным формам протохлорофиллида в искусственных системах, как и в неосвещенных этиолированных листьях, сопутствует некоторое количество более длинноволновых форм с люминесценцией в области 675—710 нм. Однако если в низкотемпературных спектрах пленок и коллоидных растворов, содержащих ПХд655, длинноволновая люминесценция доминирует, то в спектрах неосвещенных этиолированных листьев доля ее относительно невелика. Вероятной причиной отмеченного различия, кроме разного содержания длинноволновых форм, может быть также различие в том и другом случае процессов миграции энергии возбуждения к этим формам от основной формы протохлорофиллида.

Самосборка коротковолновых форм в твердых пленках, как свидетельствуют ИК-спектры, в отличие от ПХд655, происходит без определяющего участия карбонильных групп в межмолекулярном взаимодействии. Поскольку у этих форм не наблюдаются отчетливые сигналы КД, можно предположить, что они не имеют упорядоченной структуры.

ПХд655 образуется в разных системах из коротковолновых форм под действием соединений, содержащих аминогруппу: аммиака, гидроокиси аммония, метиламина. Его самосборка сопровождается образованием межмолекулярных связей с участием аминогрупп, которые в качестве посредников способствуют развитию взаимодействия кетогрупп циклопентановых колец, а также карбоксильных групп IV пиррольных колец с центральными атомами магния (кето C=O...HN[R]...Mg и пропил C=O...HN[R]...Mg), как следует из изучения ИК-спектров пленок протохлорофиллида, модифицированных обработкой парами аммиака. При самосборке ПХд655 в пленках очень быстро под действием аммиака в сферу межмолекулярного взаимодействия вовлекается бóльшая часть указанных карбонильных групп, имеющихся в исходной структуре, в результате чего образуется полимерная структура с упорядоченным строением.

Особенности КД позволяют предположить, что составными частями структуры ПХд655 являются димеры, у которых взаимное расположение молекул близко к параллельному. В разных условиях самосборки (как то в твердой или жидкой среде) при постоянстве общей «архитектуры» формирующейся структуры возможна различная ориентация взаимодействующих молекул друг относительно друга в составе димеров. Это и определяет наблюдаемое противоположное направление сигналов КД у ПХд655 в твердых пленках и коллоидных растворах.

Возникает вопрос о сходстве и различии особенностей самосборки агрегированных структур у протохлорофиллида и протохлорофилла. По способности к образованию коротковолновых агрегированных форм в твердых пленках и молекулярному механизму их самосборки протохлорофиллид не отличается от своего содержащего фитол аналога, что следует из сопоставления результатов настоящей работы с имеющимися данными по агрегации протохлорофилла [3, 6—9, 24]. Однако, перестройка структуры под действием аммиака у обоих пигментов протекает по-разному. У протохлорофиллида ее конечным результатом является образование ПХд655, у протохлорофилла — более коротоволновой формы, ПХл647 [7]. Хотя обе эти формы по характеру межмолекулярных связей принципиально не отличаются друг от друга*, относительная доля карбонильных групп, занятых в межмолекулярном взаимодействии, у ПХд655 гораздо больше, чем у ПХл647, о чем свидетельствует сравнение ИК-спектров указанных форм. Бóльшая степень участия карбонилов в организации ПХд655 приводит к выводу о том, что у этой формы степень полимеризации молекул выше. Участие кетогрупп в организации структуры ПХд655 в пленках, как и карбоксильных групп,

* Повторное исследование ИК-спектров твердых пленок протохлорофилла поставило под сомнение наше первоначальное предположение о том, что в самосборке ПХл647 кетогруппы молекул не участвуют [7].

опосредовано их взаимодействием с аминогруппами аммиака как комплексообразователя. При самосборке же ПХл647 кетогруппы молекул не обнаруживают сродства к аминогруппам и включаются в образование межмолекулярных связей прежде всего путем присоединения гидроксилов воды. Можно полагать, что высокое сродство кетогрупп молекул протохлорофиллида к аминогруппам комплексообразователя является существенным фактором быстрой самосборки структуры ПХд655. Возможно, отмеченное свойство реализуется в растениях при образовании связей пигмента с аминогруппами белка в формировании нативных протохлорофиллид-белковых комплексов в мембранах этиопластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Houssier C., Sauer K.* Biochim. et biophys. acta, 1969, *172*, 476—491.
2. *Rasquian A., Houssier C., Syronval C.* Biochim. et biophys. acta, 1977, *462*, 622—641.
3. *Быстрова М. И., Красновский А. А.* Молекуляр. биология, 1967, *1*, 362—372.
4. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Ланг Ф.* Докл. АН СССР, 1971, *201*, 1485—1488.
5. *Быстрова М. И., Ланг Ф., Красновский А. А.* Молекуляр. биология, 1972, *6*, 77—86.
6. *Быстрова М. И. и соавт.* Молекуляр. биология, 1976, *10*, 193—205.
7. *Быстрова М. И. и соавт.* Молекуляр. биология, 1982, *16*, 291—301.
8. *Boddi B., Soos J., Lang F.* Biochim. et biophys. acta, 1980, *593*, 158—165.
9. *Boddi B., Rakasz E., Lang F.* Photobiochem. Photobiophys., 1983, *5*, 27—33.
10. *Зенькевич Э. И., Лосев А. П.* Молекуляр. биология, 1976, *10*, 294—303.
11. *Зенькевич Э. И. и соавт.* Молекуляр. биология, 1978, *12*, 1002—1010.
12. *Boddi B., Kovacs K., Lang F.* Biochim. et biophys. acta, 1983, *423*, 479—498.
13. *Seliskar C. J., Ke B.* Biochim. et biophys. acta, 1968, *153*, 685—691.
14. *Brouers M.* Photosynthetica, 1972, *6*, 415—423.
15. *Brouers M.* Photosynthetica, 1975, *9*, 304—310.
16. *Brouers M.* Plant Sciences Letters, 1977, *10*, 13—17.
17. *Brouers M.* Photosynthetica, 1979, *13*, 9—14.
18. *Dujardin E., Bombart P.* Fifth International Congress on Photosynthesis. Abstracts. 1980, Greece, p. 76.
19. *Красновский А. А. и соавт.* Докл. АН СССР, 1953, *92*, 1201—1204.
20. *Литвин Ф. Ф., Стадничук И. Н.* Физиол. растений, 1980, *27*, 1024—1034.
21. *Быстрова М. И., Красновский А. А.* Молекуляр. биология, 1971, *5*, 291—301.
22. *Schultz A., Sauer K.* Biochim. et biophys. acta, 1972, *267*, 320—340.
23. *Mathis P., Sauer K.* Biochim. et biophys. acta, 1972, *267*, 498—511.
24. *Krasnovsky A. A., Bystrova M. I.* Biosystems, 1980, *12*, 181—194.

Поступила в редакцию
26.XII.1983

SPECTRAL EFFECTS OF PROTOCHLOROPHYLLIDE AGGREGATION

M. I. BYSTROVA, I. A. SAFRONOVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Protochlorophyllide isolated from the etiolated leaves through the self-assembly forms in solid films aggregated structures with main absorption maxima at 630 (PChd630) and 638 nm (PChd638), and fluorescence maxima at 633 and 640 nm, respectively. In the ammonia vapours each form is rearranged into the structure absorbing at 655 nm and with the fluorescence maximum of about 658 nm. In the presence of ammonium hydroxide the self-assembly of PChd655 was also observed in the aqueous solution of the pigment. In all the systems PChd655 is characterized by thermolability. The heating up to 70° C causes its transformation into PChd630 and PChd638. The oxidation rate for PChd655 is faster in comparison to shortwave forms. PChd655 self-assembly as shown by measurements of solid films occurs through the formation of two types of the intermolecular bonds, which involve ketogroups of cyclopentanone rings (keto C=O...HN(R)...Mg) and carboxylgroups of the pyrrole ring IV (propyl C=O...HN(R)...Mg). During the self-assembly if shortwave forms carbonyl groups of the molecules are not involved in the intermolecular interaction. The study on CD-spectra leads to the conclusion that PChd655, unlike PChd 630 and PChd 638, has the regular structure, which may consist of dimers with approximately parallel mutual molecular arrangement. The protochlorophyllide forms studied model the forms of the chlorophyll (chlorophyllide) precusor in plants. Peculiarities of the protochlorophyllide intermolecular interaction and the state of the chlorophyll (chlorophyllide) precusor in plants are discussed.

БИОФИЗИКА

Том XXX, вып. 5 1985

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА ФОТОСИСТЕМЫ II

ГАНАГО И. Б., КЛИМОВ В. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Препараты реакционного центра фотосистемы II получены из хлоропластов шпината, последовательно обработанных холатом Na и дерифатом-160 и очищенных дифференциальным центрифугированием и высаливанием с помощью сульфата аммония. Препараты содержат равные количества фотохимически активного первичного донора электронов *P*680 и первичного акцептора электронов феофитина *a*, 30—40 молекул хлорофилла *a* на *P*680; примесь фотосистемы I практически отсутствует. Исследованы спектры поглощения и низкотемпературной флуоресценции, термолюминесценция и дифференциальные спектры «свет-минус-темнота». Обсуждаются механизмы переноса электронов при первичных реакциях разделения зарядов в фотосистеме II.

Фотосистема II ответственна за перенос электронов от воды и выделение кислорода при фотосинтезе зеленых растений. Первичный перенос электрона происходит в реакционном центре при поглощении кванта света. Усилия многих ученых направлены на получение чистых препаратов реакционных центров фотосистемы II и изучение их структурных и функциональных характеристик. Изучаются препараты, полученные из хлоропластов при обработке их детергентами: тритоном X-100 [1, 2], дигитонином [3], октилглюкозидом [4]. Однако упомянутые методы весьма трудоемки. В работе [5] показано преимущество цвиттерионных детергентов дерифата-160 и миранола для солюбилизации фрагментов мембран, содержащих фотосистему II. Последовательная обработка хлоропластов двумя детергентами — холатом Na и дерифатом-160 — позволила нам получить препараты, обогащенные реакционными центрами фотосистемы II, довольно простым способом. В данной работе описаны их спектральные и функциональные свойства.

Материалы и методы. Свежие листья 4-недельного шпината промывали холодной водой и выдерживали 20 мин при 4° С. Хлоропласты выделяли, согласно [6], в среде, содержащей 0,4 М сахарозы, 3 мМ $MgCl_2$, 5 мМ NaCl, 5 мМ аскорбата Na и 40 мМ трис-HCl-буфер при pH 7,5. Затем хлоропласты промывали 1 раз в той же среде и после этого инкубировали 15 мин при 0° С в среде, содержащей 0,3 М сахарозы, 3 мМ $MgCl_2$, 5 мМ NaCl, 0,4 М сульфата аммония и 2% холата Na, 30 мМ трис-HCl-буфер при pH 8,0. Концентрация хлорофилла в суспензии составляла 2 мг/мл. Обработанные таким образом хлоропласты осаждали центрифугированием при 144 тыс. *g* в течение 1 ч. Осадок ресуспендировали в среде выделения хлоропластов и обрабатывали детергентом дерифат-160 (Henkel Corp., USA) в течение 30 мин при 0° С при соотношении концентраций детергент : хлорофилл, равном 5 : 1, после чего суспензию центрифугировали 2 ч при 200 тыс. *g*. Супернатант содержал препарат, обогащенный реакционными центрами фотосистемы II с общей концентрацией хлорофилла 50—70 мкг/мл. Препарат концентрировали высаливанием с помощью сульфата аммония при концентрации 60—80% от насыщающей.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре «Спекорд М 40» (ГДР). Спектры флуоресценции регистрировали на самодельной установке с двумя монохроматорами SPM-2 (ГДР) при возбуждении 430 нм. Дифференциальные спектры поглощения «свет-минус-темнота» измеряли на однолучевом дифференциальном спектрофотометре с фосфороскопом [7]. Термолюминесценция измерена в Институте физиологии растений АН ВНР (г. Сегед) на установке, описанной ранее [8].

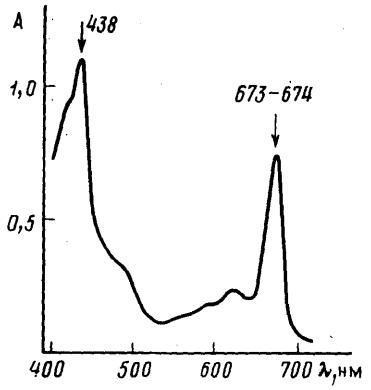


Рис. 1

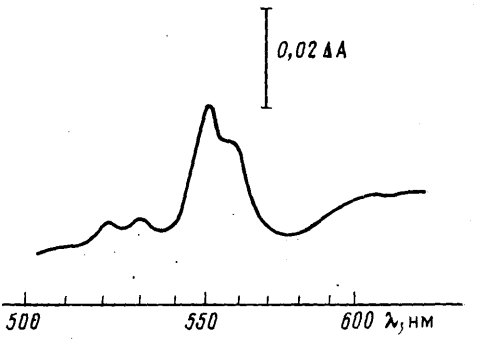


Рис. 2

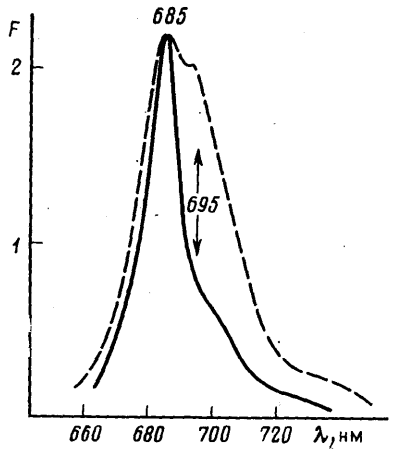


Рис. 3

Рис. 1. Спектр поглощения препаратов реакционного центра фотосистемы II при комнатной температуре

Рис. 2. Изменение спектра поглощения препаратов реакционного центра фотосистемы II при добавлении дитионита при комнатной температуре. Оптическая плотность образца показана на рис. 1

Рис. 3. Спектры флуоресценции препаратов реакционного центра фотосистемы II при 77 К: сплошная линия — исходный препарат, штриховая — после высаливания сульфатом аммония

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показан спектр поглощения полученных препаратов реакционного центра фотосистемы II при комнатной температуре (спектры, измеренные в жидком азоте, имели практически те же положения максимумов и отличались только меньшей полушириной полос поглощения). Положение полос поглощения в этих спектрах согласуется с данными работ [2, 3], что указывает на сходный пигментный состав препаратов, получаемых нами и другими исследователями. Практически отсутствует поглощение хлорофилла *b*; отношение концентраций хлорофилл *a* : хлорофилл *b*, измеренное по методу Верона [9], превышает 8,0. В синей области спектра заметный вклад в поглощение дают каротиноиды. Около 540—545 нм проявляется небольшая полоса, принадлежащая, вероятно, феофитину. В области 550—570 нм видны полосы поглощения цитохромов. При добавлении к исходным препаратам аскорбата Na в спектре поглощения появляется полоса с максимумом 555±0,5 нм; в этих же условиях удается наблюдать обратимое фотоиндуцированное уменьшение поглощения с максимумом 557—559 нм при комнатной температуре. При добавлении дитионита в спектре поглощения появляется вторая полоса поглощения (на рис. 2 — в виде плеча) с максимумом 563±0,5 нм. Вопрос о том, принадлежат эти две полосы двум разным цитохромам или двум модификациям одного и того же цитохрома, требует дополнительных исследований.

На рис. 3 показан спектр флуоресценции препаратов реакционного центра фотосистемы II, измеренный при 77 К. Спектр состоит из двух основных полос с максимумами при 685 и 695 нм (при комнатной температуре спектр флуоресценции представляет собой одну полосу с максимумом при 685 нм). Пунктирной линией на рис. 3 показан спектр

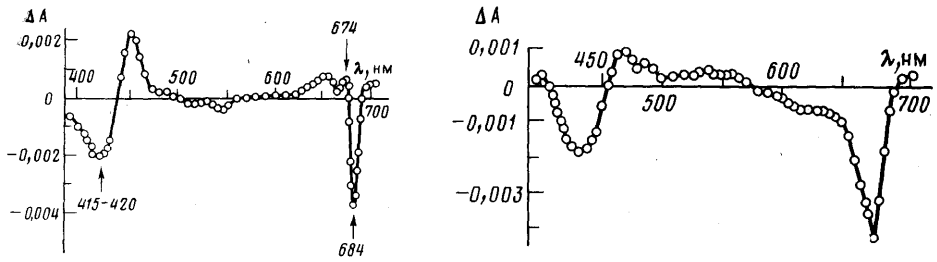


Рис. 4. Спектры обратимых фотоиндуцированных изменений поглощения препаратов реакционного центра фотосистемы II при комнатной температуре: *а* — реакция накопления восстановленного феофитина, окислительно-восстановительный потенциал —450 мВ, *б* — реакция накопления *P*680$^+$, окислительно-восстановительный потенциал +400 мВ

флуоресценции данных препаратов после высаливания с помощью сульфата аммония. Отношение интенсивностей полос с максимумами при 685 и 695 нм в препарате после высаливания близко к единице. При добавлении *о*-фенантролина соотношение интенсивностей этих полос меняется в сторону увеличения интенсивности полосы с максимумом при 695 нм. Такой же эффект при добавлении *о*-фенантролина наблюдается и в хлоропластах [10]. Возможной причиной этого является увеличение вклада рекомбинационной люминесценции в полосе 695 нм [11] за счет нарушения переноса электрона при действии *о*-фенантролина на комплекс хинона с железом [12]. Нагатани и др. [13] нашли, что препараты фотосистемы II можно разделить на пигмент-белковые субъединицы, которые различаются по спектрам флуоресценции. Так, максимум флуоресценции при 685 нм обнаруживается при 77 К в субъединице с молекулярной массой 43 000, которую авторы рассматривают как светособирающий (антенный) хлорофилл-белковый комплекс; в то же время максимум флуоресценции при 695 нм наблюдается при 77 К в субъединице с молекулярной массой 47 000, в которой, вероятно, и происходит первичное разделение зарядов. Исследования в этом направлении являются задачей дальнейшей работы.

Фотохимическую активность препаратов реакционного центра фотосистемы II оценивали по величине сигналов изменения поглощения при фотонакоплении восстановленного феофитина — промежуточного переносчика электронов в фотосистеме II [7]. Спектр таких изменений поглощения приведен на рис. 4, *а*. Условия регистрации сигналов те же, что описаны в [7]. Считая коэффициент экстинкции феофитина в реакционном центре равным $3{,}2 \cdot 10^4$ $М^{-1} \cdot см^{-1}$ [14], получаем, что на одну молекулу феофитина (т. е. на один фотохимически активный центр) в нашем препарате приходится 30—40 молекул хлорофилла. Такое обогащение препарата фотохимически активными реакционными центрами фотосистемы II соответствует данным других авторов. Так, для препаратов, описанных в [2], отношение хлорофилл : реакционный центр равно 40, а для препаратов, получаемых по методу [3], это отношение составляет 50. Полученные препараты фотосистемы II обнаруживают также характерные изменения поглощения при накоплении фотоокисленного P680$^+$, первичного донора электронов в фотосистеме II. Спектр этих изменений поглощения показан на рис. 4, *б*; он вполне аналогичен спектрам, наблюдавшимся ранее [2, 15, 16], отличие состоит лишь в том, что в прежних работах для фотонакопления *P680*$^+$ нужна была добавка феррицианида как экзогенного акцептора электронов, тогда как в описываемых препаратах требовалась добавка силикомолибдата и феррицианида. По-видимому, это различие объясняется тем, что при очистке препарата двумя детергентами по-другому нарушаются компоненты электронтранспортной цепи фотосистемы II. Сравнение данных рис. 4, *а* и *б* позволяет сопоставить количества фотовосстановленного феофитина и фотоокисленного *P680*$^+$. Наблюдавшиеся изменения оптической плотно-

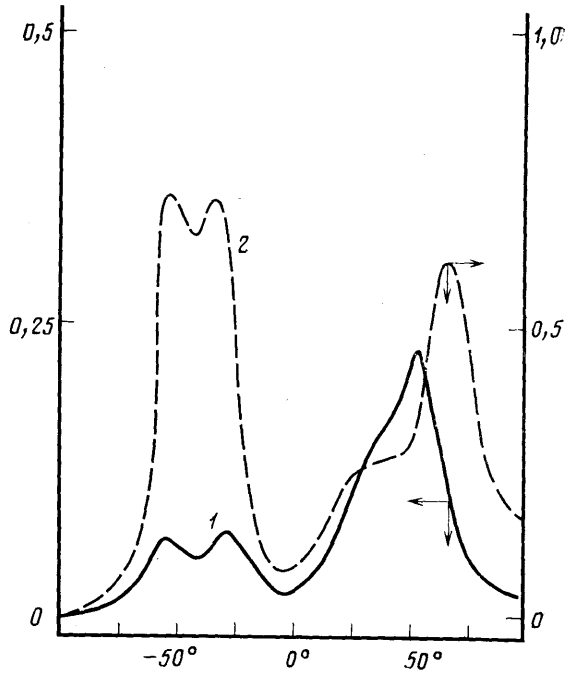


Рис. 5. Кривые термолюминесценции препарата реакционного центра фотосистемы II (левая шкала — сплошная линия) и «тяжелых» субхлоропластных частиц ДТ-20 после полного удаления марганца (правая шкала — штриховая линия). Концентрация хлорофилла для кривой *1* — 5 мкг/мл, для кривой *2* — 20 мкг/мл

сти в максимумах выцветания пигментов относятся как 1 : 2 с точностью ±10%. Учитывая двукратное различие коэффициентов экстинкции феофитина и $P680^+$, приходим к выводу о том, что измеренные количества катион-радикала $P680^+$ и анион-радикала феофитина в полученных препаратах находятся в стехиометрическом соотношении 1 : 1.

Данные препараты фотосистемы II способны восстанавливать на свету дихлорфенолиндофенол со скоростью не меньше 50 мкМ ДХФИФ на 1 мкг хлорофилла в час без добавления экзогенного донора электронов. При добавлении дифенилкарбазида скорость фотовосстановления ДХФИФ увеличивается в 2—3 раза.

На данных препаратах измерены спектры линейного дихроизма фотоиндуцированных изменений поглощения в условиях накопления фотовосстановленного феофитина, которые обнаружили близкое сходство со спектрами, измеренными для более крупных фрагментов мембран, так называемых частиц ДТ-20 [7] и подтвердили сделанные в [17] выводы относительно ориентации пигментов в фотосистеме II.

Исследуемые препараты реакционного центра фотосистемы II (см. рис. 5) обладают характерной для фотосистемы II термолюминесценцией. Если эти препараты освещать при —60° С (1 мин) и во время их охлаждения до —90° С, то при нагревании со скоростью 20° С/мин удается наблюдать высвечивание люминесценции с максимумами при —60, —30° С, плечо при +15° С и максимум при +55° С. Как было показано ранее [18], все эти полосы характерны также для «тяжелых» субхлоропластных фрагментов фотосистемы II, ДТ-20, после полного удаления из них марганца. У необработанных фрагментов ДТ-20 доминирующими являются полосы термолюминесценции в области 0° С, связанные с накоплением зарядов в системе фотосинтетического окисления воды. Было также показано [18], что полосы термолюминесценции при —30 и —60° С обусловлены разделением и рекомбинацией зарядов в реакционном центре фотосистемы II. Поскольку в условиях измерения термолюминесценции не происходит накопления $P680^+$, положительные заряды,

участвующие в этой рекомбинации, локализуются на вторичных донорах электрона, которые не содержат марганца и расположены ближе к реакционному центру, чем марганцевый комплекс в системе окисления воды. Наличие полос термолюминесценции при —60 и —30° С у препаратов реакционного центра свидетельствует о наличии в них переносчиков электрона в донорной части фотосистемы II.

Следует отметить, что при использовании детергентов для выделения частиц возможно образование пигмент-белковых комплексов, в которых липид частично замещен молекулами детергента, а также образование солюбилизированного хлорофилла. Присутствие таких форм хлорофилла может влиять на вид спектра люминесценции и давать вклад в кривые высвечивания термолюминесценции [22].

Перенос электрона в фотосистеме II можно описать следующей схемой [19]:

Вторичные доноры → *P680* → *Фео* → *Q* → *Вторичные акцепторы.*

Рассмотрим, какие компоненты этой цепи присутствуют в исследуемых препаратах, какие реакции происходят в них.

Под действием света происходит окисление первичного донора электрона *P680.* Для накопления заметного количества окисленного $P680^+$ (см. рис 4, *б*) необходимо предотвратить возврат электрона от восстановленного акцептора на $P680^+$. Это достигается добавлением феррицианида К и силикомолибдата, т. е. при потенциалах $E_h > +400$ мВ. В исследуемых препаратах содержится 1 молекула *P680* на 25—40 молекул хлорофилла.

При фотоокислении *P680* электрон переносится на феофитин. Накопление восстановленного феофитина под действием света удается наблюдать при добавлении дитионита ($E_h \leqslant -450$ мВ), т. е. когда заранее восстановлены все вторичные акцепторы электрона и железохинонный комплекс *Q* (см. рис. 4, *а*). Стехиометрическое соотношение фотохимически активного феофитина и *P680* в описываемых препаратах равно 1 : 1.

Участие железохинонного комплекса в фотоиндуцированном переносе электрона и в рекомбинации зарядов при обратном переносе электрона на *P680* можно регистрировать по изменениям выхода люминесценции под действием света [19].

Среди вторичных акцепторов электрона in vivo обнаруживается цитохром b_{564} [20], его фотовосстановление наблюдается в хлоропластах в присутствии 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины [21]. В исследуемых препаратах при комнатной температуре наблюдается фотоиндуцированное увеличение поглощения в области 550—570 нм с максимумом при $564 \pm 0{,}5$ нм при окислительно-восстановительном потенциале около 200 мВ. Эти данные можно объяснить восстановлением цитохрома b_{564}, однако вопрос о его точном расположении требует дополнительных исследований.

На наличие вторичных доноров электрона в данных препаратах указывают следующие факты: восстановление ДХФИФ без добавления экзогенных доноров электрона, протекающее со скоростью 50—100 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час; наличие полос термолюминесценции при —30 и —60° С (см. рис. 5); обратимое фотоиндуцированное уменьшение поглощения, наблюдающееся при комнатной температуре в узкой полосе 550—563 нм с максимумом при 557—559 нм. Этот факт можно объяснить окислением цитохрома b_{559}, донирующего электроны на реакционный центр фотосистемы II. Предварительная оценка дает стехиометрическое соотношение 1 молекулы цитохрома b_{559} на 1 молекулу *P680.*

В заключение хотим поблагодарить Э. В. Маевскую за помощь при выделении препаратов реакционного центра фотосистемы II и Ш. Деметера за предоставление возможности измерения термолюминесценции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vernon L. P., Shaw E. R., Ogawa T., Raveed D.* Photochem. Photobiol., 1971, v. 14, p. 343.
2. *Shutilova N. I., Faludi-Daniel A., Klimov V. V.* FEBS Lett., 1978, v. 91, p. 126.
3. *Saton K., Butter W. L.* Plant Physiol., 1978, v. 61, p. 373.
4. *Camm E. L., Green B. R.* Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 724, p. 293.
5. *Markwell I. P., Miles C. D., Boggs R. T., Thornber I. P.* FEBS Lett., v. 99, p. 11.
6. *Whatley F. K., Arnon D. I.* In: Methods in enzymology/Eds Colovick S. P. and Kaplan N. O., 1963, v. 6, p. 308.
7. *Klimov V. V., Klevanik A. V., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A.* FEBS Lett., 1977, v. 82, p. 183.
8. *Vass I., Horvath G., Herczeg T., Demeter S.* FEBS Lett., 1980, v. 116, p. 293.
9. *Vernon L. P.* Analytical Chemistry, 1960, v. 32, p. 1144.
10. *Satoh K.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 333, p. 107.
11. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Пащенко В. З.* Докл. АН СССР, 1978, т. 242, с. 1204.
12. *Климов В. В., Долан Э., Ки Б.* Биофизика, 1981, т. 26, с. 802.
13. *Nakatani H. Y.* In: Oxygen Evolving System of Photosynthesis/Eds Inoue Y. et al. Tokyo: Acad. Press, 1983, p. 49.
14. *Fujita I., Davis M. S., Fajer I.* J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 6280.
15. *Van Gorkom H. I., Tamminga I. I., Haveman I., Van der Linden I. K.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 347, p. 417.
16. *Климов В. В., Аллахвердиев С. И., Шутилова Н. И., Красновский А. А.* Физиология растений, 1980, т. 27, с. 315.
17. *Ганаго И. Б., Климов В. В., Ганаго А. О., Шувалов В. А., Ерохин Ю. Е.* Докл. АН СССР, 1982, т. 263, с. 479.
18. *Klimov V. V., Allakhverdiev S. I., Shafiev M. A., Demeter S.* Photochem. Photobiophys. in press.
19. *Климов В. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1982, т. 27, с. 179.
20. *Cramer W. A., Crofts A. R.* In: Photosynthesis/Ed Govindjee N. Y.: Acad. Press, 1982, v. 1, p. 418.
21. *Joliot P., Joliot A.* In: The Oxygen Evolving System of Photosynthesis/Eds Inoue Y. et al. Tokyo: Acad. Press., 1983, p. 363.
22. *Krasnovsky A. A. (Jr.), Litvin F. F.* Photochem. Photobiol., v. 20, p. 133.

Институт почвоведения и фотосинтеза
АН СССР, Пущино (Московская область);
Институт биохимии АН СССР им. А. Н. Баха,
Москва

Поступила в редакцию
31.I.1985

STUDY OF SPECTRAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE PHOTOSYSTEM 2 REACTION CENTRE

GANAGO I. B., KLIMOV V. V., KRASNOVSKY A. A.

Institute of Soil Science and Photosynthesis, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region); A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Preparations of the Photosystem 2 reaction centre obtained from spinach chloroplasts were successively treated with sodium cholate and derifate-160 and purified by differential centrifugation and salting out with ammonium sulfate. The preparations have equal quantities of photochemically active primary electron donor *P*680 and primary electron acceptor of electrons pheophytin *a*, 30—40 molecules of chlorophyll *a* per *P*680; the Photosystem 1 admixture was practically absent. Absorption and low-temperature fluorescence spectra, thermoluminescence and differential spectra «light-minus-darkness» were studied. Mechanisms of electron transfer during primary reactions of charge separation in the Photosystem 2 are discussed.

7. *Secher D. S., Burke D. C.* Nature, 1980, v. 285, p. 446—449.
8. *Staehelin T., Durrer B., Schmidt J., Takacs B., Stocker J., Miggiano V., Staehl C., Rubinstein M., Levey W. P., Hershberg R., Pestka S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 1848—1852.
9. *Adolf G. R., Bodo G., Swetly P.* J. Cell. Physiol., 1982, v. 2, p. 61—68.
10. *Köhler G., Milstein C.* Nature, 1975, v. 256, p. 495—497.
11. *Greenwood F. G., Hunter W. M., Glover J. S.* Biochem. J., 1963, v. 89, p. 114—123.
12. *Thorell J. J., Johansson B. G.* Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 251, p. 363—371.
13. *Кузнецов В. П., Зуева В. С., Дмитриенко О. А, Беляев Д. Л.* Антибиотики, 1982, № 7, с. 50—53.
14. *Ackerman S. K., Nedden D., Heintzelman M., Hunkapiller M., Zoon K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, p. 1045—1047.
15. *Geoffrey A.* Biochem. J., 1982, v. 207, p. 397—408.
16. *Pestka S., Kelder B., Langer J. A., Staehelin T.* Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 224, p. 111—116.
17. *Streuli M., Hall A., Boll W., Stewart W. E., Nagata S., Weissmann C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 2848—2852.
18. *Pestka S., Kelder B., Tarnowski D. K., Tarnowski S. J.* Anal. Biochem., 1983, v. 132, p. 328—333.
19. *Pestka S., Kelder B., Rehberg E., Ortaldo J. R., Herberman R. B., Kempner E. S., Moschera J. A., Tarnowski S. J.* Proc. of the Second International TNO Meeting on the Biology of the Interferon System. Rotterdam. the Netherlands, 1983, p. 535—563.
20. *Wetzel R., Johnston P. D., Czarniecki C. W.* Proc. of the Second International TNO Meeting on the Biology of the Interferon System. Rotterdam, the Netherlands, 1983, p. 101—112.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Всесоюзный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Ленинград

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Поступила в редакцию
23.IV.1985

COMPARATIVE IMMUNOCHEMICAL STUDY OF SOME HUMAN LEUCOCYTE INTERFERONS

KOSTROV S. V., IZOVOVA L. S., EREMASHVILI M. R., GALAKTIONOV K. I., YURIN V. L., KOKOBITSYN L. P., PIVOVAROV A. P., PAVLOV I. Yu., TYAGOTIN Yu. V., FRIDLYANSKAYA I. I., MARGULIS B. A., STRONGIN A. Ya.

All-Union Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow
All-Union Research Institute of Pure Biological Preparations, Leningrad
Institute of Cytology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Using radioimmunological methods based on the use of mono- and polyclonal antibodies raised against interferon αA, it was shown that polyclonal antibodies quantitatively reacted not only with this protein, but also with interferons αF and αN, whereas all the variants of monoclonal antibodies studied reacted only with interferons αA and αN. Monoclonal antibodies 5A6, 11E9, 19C10, 258 and 268 are directed against overlapping epitopes of the interferon αA molecule, which simultaneously binds not more than two molecules of antibodies with different specificity. The correlation between immunochemical and biological activities of interferon αA during temperature denaturation and proteolytic degradation and its ability to form oligomeric complexes were investigated.

БИОХИМИЯ
Т. 50, вып. 12 1985

УДК 577.355.3

ДЕЙСТВИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

ДРОЗДОВА Н. Н., ВЫЧЕГЖАНИНА И. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследована зависимость функциональной активности и спектральных свойств реакционных центров (РЦ) под действием детергентов трех типов: катионного (ЦТМБ), анионного (DS-Na) и неионного тритона X-100. Показано, что действие ПАВ на РЦ включает две последовательные стадии, связанные с активацией и инактивацией фотохимической активности РЦ в зависимости от концентрации ПАВ. На основании различий в изменении функциональной активности, в характере деструкции пигментных форм (P960 и P830) и в процессе образования окисленного продукта «680», а также в изменении белкового компонента под действием ПАВ с различно заряженными функциональными группами, высказано предположение о локализации пигментных форм на разных участках белка и о необходимости положительно заряженного микроокружения для стабилизации формы P960. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что одним из факторов, обуславливающих изменение функциональной активности и спектральных свойств РЦ, является взаимодействие ПАВ с белковым компонентом комплекса, сопряженное с дезагрегацией пигментных структур. Полученные результаты позволяют сделать вывод о решающей роли структурной организации белка для стабилизации пигментных структур и что для функциональной активности и структурной организации пигментных форм существенное значение имеют как гидрофобные, так и электростатические взаимодействия.

Реакционные центры из пурпурных фотосинтезирующих бактерий интенсивно изучаются во многих лабораториях. Полученные в последние годы данные по их составу и структуре обобщены в ряде обзоров [1, 2]. Большой интерес представляет изучение РЦ фотосинтезирующих бактерий *Rhodopseudomonas viridis*, использующих для фотосинтеза инфракрасное излучение до 1 мк и содержащих бактериохлорофилл *б* (БХ *б*) и бактериофеофитин *б* (БФ *б*), которые обладают поглощением в этой области спектра. Мономер БХ *б* в органических растворителях и в растворе детергентов быстро и необратимо окисляется кислородом до хлорофиллоподобного продукта [3], в то время как РЦ, в которых БХ *б* нековалентно связан с белком, очень устойчивы и окисление пигмента происходит только при нарушении структуры пигмент-белкового комплекса [4, 5]. При выделении пигмент-белковых комплексов из мембран фотосинтезирующих организмов широко применяются поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые иногда частично остаются в выделенных комплексах и не могут не влиять на их активность и свойства. В силу этого особое значение приобретают исследования механизма действия ПАВ на эти комплексы. Изучению взаимодействия ПАВ с белками мембран посвящено большое количество работ; наиболее всесторонне этот вопрос рассмотрен в обзоре [6]. Однако информация в отношении взаимодействия ПАВ с бактериальными и растительными пигмент-белковыми комплексами невелика и касается в основном влияния некоторых ПАВ на состояние пигмента [7—11]. Согласно имеющимся данным [6] ПАВ связываются с определенными гидрофобными участками белковой молекулы, и это взаимодействие происходит в основном при низких концентрациях ПАВ, когда детергент находится в мономерной форме. При повышении свободной концентрации ПАВ после насыщения участков с высоким сродством, происходит кооперативное связывание других участков, что сопровождается конформационным изменением белка, при котором, вероятно, многие предварительно погруженные гидрофобные груп-

пы становятся наружными [6]. Это свойство ПАВ часто применяется при изучении структуры белков [12, 13]. Представляет интерес выяснение роли белка в стабилизации пигментных структур и пределы устойчивости РЦ в связи с перспективой их применения в качестве преобразователя солнечной энергии. Настоящая работа посвящена изучению изменения функциональной активности и спектральных свойств РЦ из *Rh. viridis* под действием ПАВ разного типа. Полученные данные рассматриваются с точки зрения выяснения структурной организации пигментных форм РЦ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

РЦ были выделены из хроматофоров пурпурных фотосинтезирующих бактерий *Rh. viridis* с использованием неионного детергента лаурилдиметиламиноксида (ЛДАО) и очисткой путем хроматографии на гидроксилапатите и дробным осаждением сульфатом аммония [14]. Образцы хранились в жидком азоте в 10 мМ трис-HCl-буфере pH 8,0, содержащем 10% глицерина и 0,1% ЛДАО. Следует отметить, что в полученных препаратах РЦ часть липидов замещена молекулами ЛДАО [5]. Для получения растворов РЦ с pH 4—8 применяли трис-HCl-буферные смеси, а с pH>11 в буфер добавляли раствор NaOH.

Было исследовано действие детергентов трех типов: катионного — цетилтриметиламмоний бромистый (ЦТМБ), анионного — додецилсульфат натрия (DS-Na) и неионного — тритон X-100. В образец, содержащий РЦ, вносили раствор ПАВ до необходимой концентрации, инкубировали в течение 10 мин, после чего производили измерения. О действии ПАВ на РЦ судили по изменению величины фотоиндуцированного сигнала при 960 нм (ΔA_{960}), спектров поглощения в пигментной и белковой областях, а также по ультрафиолетовым (УФ) спектрам флуоресценции белкового компонента. Величину ΔA_{960} измеряли на однолучевом дифференциальном спектрофотометре [15] при освещении образцов светом кинолампы (750 Вт) через светофильтр КС-19. Спектры поглощения в области 500—900 нм и дифференциальные спектры поглощения в области 200—340 нм регистрировали на спектрофотометре Perkin Elmer 554, а в интервале 900—1300 нм — на спектрофотометре Hitachi EPS-3T, УФ-спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Perkin Elmer MPF-44B. Собственная флуоресценция раствора ПАВ вычиталась из спектров флуоресценции образцов. Дифференциальные УФ-спектры поглощения измеряли с помощью четырех кювет. В кюветное отделение для образца помещали кювету с реакционной смесью (РЦ+ПАВ) и кювету с буфером, контролем служили кювета с РЦ в буфере и кювета с раствором ПАВ в буфере той же концентрации, что и в реакционной смеси, для компенсации поглощения ПАВ [13, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ПАВ на величину фотоиндуцированного сигнала. Рис. 1 демонстрирует изменения величины ΔA_{960}, происходящие при постепенном увеличении концентрации ПАВ в растворе РЦ при pH 8. Концентрации ПАВ, вызывающие эти изменения, а также характер изменений зависят от типа ПАВ. При обработке РЦ ПАВ изменения ΔA_{960} носят двухступенчатый характер. Первая ступень характеризуется активацией фотохимической активности, т. е. увеличением величины ΔA_{960} (примерно до 5% от исходной), в небольшом интервале концентраций для ЦТМБ и тритона X-100 в отличие от DS-Na. В случае DS-Na величина ΔA_{960} остается постоянной до концентрации $>10^{-3}$%, после чего также наступает увеличение порядка 5%. Вторая — отражает инактивацию фотохимической активности, т. е. уменьшение ΔA_{960}, отличное по своему характеру для ЦТМБ и тритона X-100 по сравнению с DS-Na. Для первых двух ПАВ наблюдается постепенное уменьшение ΔA_{960} в большом интервале концентраций ($7\cdot10^{-5}$—$2\cdot10^{-1}$%), в то время как в случае DS-Na имеет место резкое уменьшение ΔA_{960} в узком интервале концентрации ($7\cdot10^{-3}$—$2\cdot10^{-2}$%). Первая ступень характерна для низких концентраций ПАВ, при

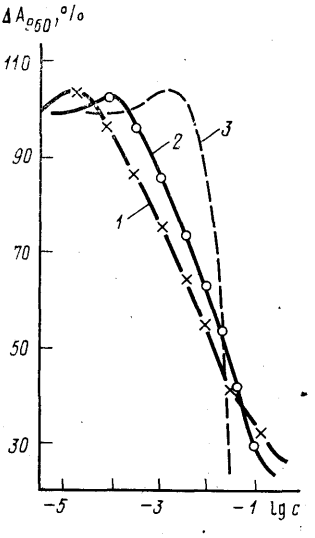


Рис. 1. Влияние разных концентраций ПАВ на величину ΔA_{960} при pH 8. ΔA_{960} без ПАВ принята за 100%; *1* — ЦТМБ, *2* — тритон X-100, *3* — DS-Na

Таблица 1

Действие ПАВ на величину ΔA_{960} при разных pH (величина ΔA_{960} без ПАВ принята за 100%)

ΔA_{960}, % от исходного значения	Концентрация ПАВ, %						
	Тритон X-100	ЦТМБ			DS-Na		
	pH 4; 8; 11	pH 4	pH 8	pH 11	pH 4	pH 8	pH 11
>100	$1\cdot10^{-4}$	$2\cdot10^{-2}$	$1\cdot10^{-5}$	$1\cdot10^{-4}$	$5\cdot10^{-3}$	$3\cdot10^{-3}$	$5\cdot10^{-3}$
90	$5\cdot10^{-4}$	$1\cdot10^{-1}$	$7\cdot10^{-5}$	$1{,}5\cdot10^{-3}$	$1{,}5\cdot10^{-2}$	$7\cdot10^{-3}$	$3\cdot10^{-2}$
60	$1{,}5\cdot10^{-2}$	1	$5\cdot10^{-3}$	$1\cdot10^{-2}$	$3{,}5\cdot10^{-2}$	$2\cdot10^{-2}$	$1\cdot10^{-1}$
30	$1\cdot10^{-1}$	—	$2\cdot10^{-1}$	$8\cdot10^{-2}$	$5\cdot10^{-2}$	$3\cdot10^{-2}$	2

которых они находятся в мономерном состоянии и происходит связывание их с гидрофобными участками белкового компонента. При этих концентрациях не затрагивается, по-видимому, связь пигмента с белком, так как не наблюдается спектральных изменений в области поглощения пигментов, что свидетельствует о сохранении пигмент-пигментного взаимодействия [17, 18].

Характер действия ПАВ на РЦ зависит также от кислотности среды. В табл. 1 приведены концентрации ПАВ, вызывающие изменение величины ΔA_{960} при разных pH. Видно, что наибольшая зависимость от pH наблюдается в случае ЦТМБ. Так, при pH 8 его действие на подавление функциональной активности начинается уже при концентрациях порядка $7\cdot10^{-5}$%, при pH 11—10^{-3}%, а при pH 4 только при концентрациях, выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Скорость уменьшения ΔA_{960} также различна: если при pH 4—8 она уменьшается постепенно, то при pH 11 — резко. DS-Na начинает действовать при концентрациях выше 10^{-3}% независимо от pH, но скорость уменьшения ΔA_{960} практически одинакова только при pH 4 и 8, при pH 11 эффективность действия Ds-Na резко снижается и для заметного подавления функциональной активности РЦ требуются концентрации порядка ККМ. Действие тритона X-100 практически не зависит от pH среды. Следует отметить, что ПАВ по-разному влияют на соотношение быстрой и медленной компонент в реакции восстановления фотоокисленного димера $P960^+$. С увеличением концентрации ЦТМБ происходит уменьшение как быстрой, так и медленной компонент, при этом быстрая исчезает быстрее. В случае DS-Na уменьшается только быстрая компонента. Тритон X-100 в одинаковой степени уменьшает обе компоненты. Добавление хинона не оказывает влияния на величину ΔA_{960} в РЦ, обработанных ЦТМБ, незначительно увеличивает в образцах с тритоном X-100 и сильно увеличивает в РЦ, обработанных DS-Na.

Влияние ПАВ на пигментные формы РЦ. Концентрации ПАВ, вызывающие увеличение величины ΔA_{960} не вызывают видимых спектральных изменений в близкой ИК области спектра РЦ, что свидетельствует об отсутствии нарушения пигмент-пигментного взаимодействия [17, 18]. Дальнейшее увеличение концентрации, ведущее к уменьшению ΔA_{960} приводит к сдвигу максимумов P830 и P960 в сторону коротких волн с одновременным изменением интенсивности полос поглощения. Характер и глубина спектральных изменений зависит от типа ПАВ (рис. 2). Так, в случае ЦТМБ увеличение концентрации до $4\cdot10^{-2}$% (ККМ) приводит к постепенному коротковолновому сдвигу полос поглощения при 830 и 960 нм на 3 и 5 нм соответственно и изменению их интенсивности; при этом в спектре поглощения увеличивается полоса в области 790—810 нм. Окисленный продукт начинает образовываться только при концентрациях, близких к ККМ. В отличие от ЦТМБ, DS-Na уже при концентрации $2\cdot10^{-2}$%, на порядок ниже ККМ, вызывает коротковолновый сдвиг до 10 нм и уменьшение интенсивности полосы 960 нм с одновременным образованием окисленного продукта «680», без изменения интенсивности полосы 830 нм; наблюдается лишь незначительный сдвиг ее в синюю

область на 1—2 нм. Увеличение концентрации DS-Na до $4 \cdot 10^{-2}$% ведет к резким спектральным изменениям обеих пигментных форм, сопровождающихся увеличением интенсивности поглощения в области 790—810 и 680 нм. При действии тритона X-100 наблюдается сдвиг максимумов пигментных форм в коротковолновую область: P830 на 1—2 нм и P960 на 5—7 нм с одновременным образованием полосы при 790—810 нм. Окисленный продукт появляется только при длительной инкубации (более 20 ч) образца при концентрации тритона выше 5%. Такое коротковолновое смещение максимумов поглощения пигментных форм и образование мономерного пигмента может являться результатом частичной

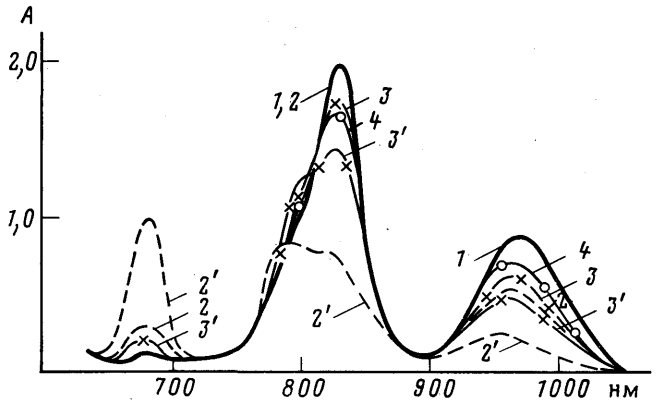


Рис. 2. Изменение спектров поглощения РЦ при действии ПАВ. *1* — исходный спектр, *2*, *2'* — DS-Na ($2 \cdot 10^{-2}$% и $4 \cdot 10^{-2}$%), *3*, *3'* — ЦТМБ ($2 \cdot 10^{-2}$% и $4 \cdot 10^{-2}$%), *4* — тритон X-100 (1%)

дезагрегации пигмента за счет изменения пигмент-белкового взаимодействия, происходящего вследствие нарушения связи пигмента с определенными функциональными группами белка [19—21], а также частичной делипидизации [5, 22]. В табл. 2 приведены данные, показывающие различную скорость разрушения P830 и P960 под действием ПАВ. О степени разрушения пигментных форм судили по изменению отношения поглощения при 830 нм к поглощению при 960 нм. Для всех исследованных ПАВ скорость разрушения формы P960 превосходит деструкцию P830, что, по-видимому, связано с различным микроокружением и локализацией P830 и P960 на разных участках белковой структуры. Неодинаковые изменения пигментных форм, а также величины ΔA_{960} под влиянием ПАВ разного типа может быть вызвано также разной степенью действия исследованных ПАВ на пигмент-белковое и белок-белковое взаимодействия, обеспечивающие нативную структуру РЦ.

Действие ПАВ на белковый компонент РЦ. На рис. 3 приведены данные по влиянию ПАВ на интенсивность и положение максимума УФ-спектра флуоресценции. Видно, что при концентрациях ПАВ, вызывающих увеличение ΔA_{960} наблюдается уменьшение интенсивности и коротковолновый сдвиг максимума УФ-спектра флуоресценции, свидетельствующие о том, что вокруг хромофоров, которые обычно находятся в контакте с растворителем, создается более гидрофобное окружение за счет молекул ПАВ [23]. При этих концентрациях не наблюдается заметных спектральных изменений в белковой области, а имеет место лишь увеличение светорассеяния [24]. Изменения такого рода обусловлены, по-видимому, связыванием мономерных молекул ПАВ с белком без изменения конформации последнего. При повышении концентрации ПАВ до концентраций, вызывающих уменьшение ΔA_{960} и спектральные изменения пигментных форм, происходит увеличение интенсивности и полуширины УФ-спектра флуоресценции, а также сдвиг максимума в более длинноволновую область по сравнению с исходным спектром. При этих

Таблица 2

Влияние концентрации ПАВ на соотношение интенсивностей поглощения при 830 и 960 нм

Концентрация ПАВ, %	A_{830}/A_{960}			Концентрация ПАВ, %	A_{830}/A_{960}		
	ЦТМБ	DS-Na	Тритон X-100		ЦТМБ	DS-Na	Тритон X-100
0	2,5	2,5	2,5	$1\cdot10^{-2}$	2,7	3,0	2,6
$5\cdot10^{-4}$	2,5	2,5	2,5	$2\cdot10^{-2}$	2,8	3,5	2,6
$1\cdot10^{-3}$	2,6	2,5	2,5	$3\cdot10^{-2}$	2,8	3,8	2,6
$5\cdot10^{-3}$	2,7	2,8	2,5	$5\cdot10^{-2}$	3,0	4,0	2,8

концентрациях в УФ-дифференциальных спектрах поглощения для всех ПАВ образуется отрицательный максимум при 235 нм, в присутствии ионных детергентов появляется также положительный максимум при 310—320 нм, а в присутствии тритона X-100 — при 276 и 284 нм. Такие изменения в УФ-спектрах флуоресценции и поглощения могут быть обусловлены более глубокими изменениями белкового компонента, вызванных изменением конформации за счет разрушения гидрофобных взаимодействий, ведущих к перемещению остатков триптофана на поверхность белка [16, 23], а также с изменением микроокружения других

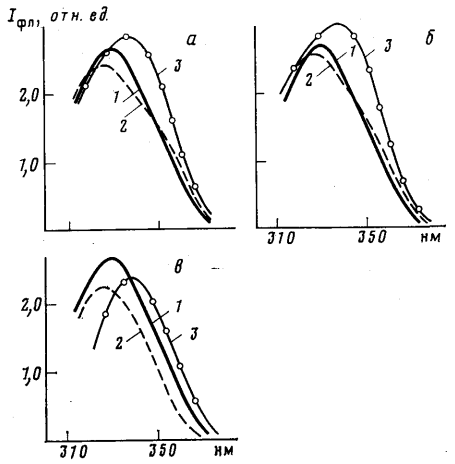


Рис. 3

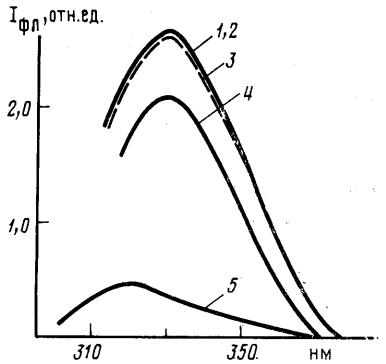


Рис. 4

Рис. 3. УФ-спектры флуоресценции РЦ при действии ЦТМБ (*а*), DS-Na (*б*) и тритона X-100 (*в*). *1* — исходный спектр, *2* — концентрация активации фотохимической активности, *3* — концентрация 10% инактивации

Рис. 4. Тушение белковой флуоресценции РЦ. *1* — исходный спектр, *2* — 0,5 М KCl, *3* — 0,5 М CsCl, *4* — 0,5 М KI, *5* — акриламид

ароматических аминокислот. Тушение белковой флуоресценции низкомолекулярными веществами показало, что KCl и CsCl не влияют на интенсивность флуоресценции, в то время как KI уменьшает ее, а неполярный акриламид полностью тушит (рис. 4), на основании чего можно заключить, что белок РЦ имеет преимущественно положительно заряженные области.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных по действию ПАВ на РЦ показывает корреляцию между структурными изменениями пигментных форм и состоянием белкового компонента. Действие ПАВ на РЦ включает две последовательные стадии. Первая реализуется при концентрациях ПАВ намного ниже ККМ; для нее характерна активация фотохимической ак-

тивности РЦ, т. е. увеличение величины ΔA_{960}, вызванное, вероятно, изменением расстояний между участниками акцепторно-донорной системы в силу увеличения гидрофобности при связывании ПАВ с белком. Подобное явление наблюдалось нами ранее при изучении влияния нагревания на функциональную активность РЦ [4]. Для этой стадии характерно также отсутствие спектральных изменений в области поглощения пигментных форм, появление светорассеяния в белковой области, уменьшение и коротковолновый сдвиг максимума УФ-флуоресценции. Для второй стадии, наступающей при концентрациях ПАВ больше, чем на порядок и выше характерны: уменьшение величины ΔA_{960}, коротковолновые сдвиги максимумов поглощения пигментных форм, частичная их деструкция, сопровождающаяся в случае DS-Na образованием хлорофиллоподобного продукта окисления. Это вызвано более глубокими изменениями белка РЦ за счет нарушения гидрофобных взаимодействий, о чем свидетельствуют появление спектральных изменений в белковой области и увеличение интенсивности и длинноволновый сдвиг максимума УФ-флуоресценции по сравнению с исходным спектром. Можно предположить, что одним из факторов, обуславливающих изменение функциональной активности и спектральных свойств РЦ под действием ПАВ, является взаимодействие ПАВ с белковым компонентом комплекса.

Из сравнения действия ЦТМБ, DS-Na и тритона Х-100 можно заключить, что комбинация заряженной головной группы и длина углеводородного хвоста определяет характер нарушения нативной структуры комплекса, а также ту критическую концентрацию ПАВ, при которой происходят конформационные изменения белка, ведущие к изменению свойств РЦ. В области нейтральных pH основная роль при действии ПАВ, а для тритона Х-100 независимо от pH, определяется взаимодействием углеводородной части молекулы ПАВ с гидрофобными участками белковой поверхности. Так, например, ЦТМБ, имеющий более длинную углеводородную цепочку по сравнению с DS-Na, и тритон Х-100, который имеет большую неподвижную, неполярную половину, начинают действовать при концентрациях примерно на 1,5 порядка ниже, чем DS-Na. При кислых и щелочных pH для ионных детергентов приобретают значение также электростатические взаимодействия. Для получения эффекта от действия ЦТМБ при pH 4 требуется концентрация порядка и выше ККМ. Это может рассматриваться как возможность того, что силы отталкивания между одноименными зарядами в ПАВ и на поверхности белка, несущей положительный заряд, превосходят взаимодействие ЦТМБ с гидрофобными участками белка [12, 24]. Удаление положительного заряда повышением pH до 11 способствует уменьшению действующей концентрации ЦТМБ примерно на два порядка. Наоборот, противоположные заряды в ПАВ и в субстрате облегчают взаимодействие, и действующая концентрация DS-Na при pH 4 намного ниже ККМ, в то время как в щелочной среде избыток анионов, нейтрализуя положительный заряд белков, препятствует взаимодействию DS-Na и действующая концентрация его повышается до ККМ. Эти данные, а также данные по тушению УФ-флуоресценции анионами подтверждают наличие положительно заряженных участков в белковом компоненте РЦ, локализованных вблизи пигментных форм.

Характер разрушения пигментных форм и образование окисленного продукта «680» сильно зависят от типа ПАВ, вероятно, в силу того, что они в разной степени затрагивают взаимодействия, обеспечивающие нативную структуру РЦ, а именно пигмент-белковое и белок-белковое взаимодействия. Другой возможностью объяснения этого может быть разная степень доступности пигментных форм для действия ПАВ, в силу их различного расположения на белке. Показано, что скорость разрушения Р960 превышает скорость деструкции Р830. В тритоне Х-100 эти скорости различаются незначительно, в присутствии ЦТМБ — в большей степени, а в случае DS-Na происходит резкий коротковолновый сдвиг до 10 нм и быстрое разрушение Р960 с образованием окисленного продукта уже при низких концентрациях DS-Na. Последнее связано, веро-

ятно, с тем, что DS-Na в большей степени способствует нарушению как белок-белкового, так и пигмент-белкового взаимодействий, что влечет за собой дезагрегацию димера и необратимое окисление мономерного пигмента. В случае тритона X-100 и ЦТМБ в меньшей мере затрагиваются связи пигмента с белком и при повышении концентрации ПАВ происходит солюбилизация мономерного пигмента вместе с белком, что препятствует образованию окисленного продукта. Более быстрая деструкция формы P960, по-видимому, связана с большей доступностью для действия ПАВ в связи с расположением ее ближе к белковой поверхности, чем P830. Коротковолновые сдвиги могут быть обусловлены частичной делипидизацией [22], а также нарушением как гидрофобных, так и электростатических [25] взаимодействий под влиянием больших концентраций ПАВ. Существенные различия, наблюдаемые в изменении функциональной активности РЦ, в характере деструкции фотоактивных форм P960 и P830 и в процессе образования окисленного продукта под действием ПАВ с различно заряженными функциональными группами, подтверждают предположения о локализации пигментных форм на разных участках белка и о необходимости положительно заряженного окружения для стабилизации формы P960.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о решающей роли молекулярной организации белка в стабилизации пигментных структур реакционных центров.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Thornber J. P., Cogdell R. J., Pierson B. K., Seftor R. E. B.* J. Cell. Biochemistry, 1983, v. 23, № 1—4, p. 159—169.
2. *Cogdell R. J.* Ann. Rev. Plant Physiol., 1983, v. 34, p. 21—45.
3. *Бокучава Е. М., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Биохимия, 1974, т. 39, № 1, с. 186—196.
4. *Дроздова Н. Н., Вычегжанина И. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1984, т. 29, № 1, с. 7—12.
5. *Дроздова Н. Н., Хотченков В. П., Красновский А. А.* Биохимия, 1985, т. 50, № 7, с. 1213—1219.
6. *Helenius A., Simons K.* Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 415, № 1, p. 29—79.
7. *Ерохин Ю. Е., Синегуб О. А.* Молекуляр. биология, 1970, т. 4, № 4, с. 541—549.
8. *Markwel J. P., Thornber J. P.* Plant Physiol., 1982, v. 70, № 3, p. 633—636.
9. *Il'ina M. D., Kotova E. A., Borisov A. Yu.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 636, № 1, p. 193—200.
10. *Абдурашитова Ф. Д., Барский Е. Л., Гусев М. В., Ильина М. Д., Котова Е. А., Самуилов В. Д.* Биохимия, 1984, т. 49, № 4, с. 644—651.
11. *Захарова Н. И., Шубин В. В., Бухов Н. Г., Карапетян Н. В.* Биофизика, 1982, т. 27, № 4, с. 572—577.
12. *Hayashi K., Kugimiya M., Imoto T., Funatsu M., Bigelow C.* Biochemistry, 1968, v. 7, № 4, p. 1461—1466.
13. *Ushiwata A., Nakaya K., Nakamura Y.* Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 393, № 1, p. 215—224.
14. *Clayton R. K., Clayton B. I.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 501, p. 478—487.
15. *Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Биофизика, 1963, т. 8, № 1, с. 191—196.
16. *Демченко А. П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев: Наукова думка, 1981.
17. *Красновский А. А., Быстрова М. И.* Докл. АН СССР, 1967, т. 174, № 2, с. 480—483.
18. *Красновский А. А.* В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М.: Наука, 1970, с. 15—38.
19. *Steffen H., Calvin M.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1970, v. 41, № 2, p. 282—286.
20. *Ерохин Ю. Е., Синегуб О. А.* Молекуляр. биология, 1971, т. 5, № 3, с. 472—479.
21. *Rafferty C. N., Bolt J., Sauer K., Clayton R. K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 9, p. 4429—4432.
22. *Хотченков В. П., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Биофизика, 1983, т. 28, № 5, с. 878—879.
23. *Бурштейн Э. А.* Итоги науки и техники. Биофизика, т. 7. Собственная люминесценция белка. М.: ВИНИТИ, 1977.
24. *Bello J., Bello H. R.* Europ. J. Biochem., 1973, v. 34, № 3, p. 535—538.
25. *Eccles J., Honig B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 16, p. 4959—4962.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
23.IV.1985

EFFECTS OF SURFACTANTS ON FUNCTIONAL AND SPECTRAL PROPERTIES OF REACTION CENTERS OF THE PHOTOSYNTHESIZING BACTERIA RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

DROZDOVA N. N., VYCHEGZHANINA I. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The functional activity and spectral properties of reaction centers (RC) of *R. viridis* in the presence of cationic (CTMB), anionic (Na-DS) and non-ionic (Triton X-100) detergents was investigated. It was shown that the effects of the surfactants on RC are realized via two consecutive steps that are coupled with the activation and inactivation of the photochemical activity of RC, depending on the surfactant concentration. Changes in the functional activity different types of pigment forms (P960 and P830) destruction, the formation of an oxidized product «680» and the detergent-induced changes in the protein component bearing differently charged functional groups of the detergent suggest that the pigment forms are localized in different parts of the protein molecule and that the positively charged microenvironment is needed for stabilization of P960. The experimental results demonstrate that one of the factors responsible for the alteration of functional and spectral properties of RC is the interaction between the surfactants and the protein component of the complex which is coupled with disaggregation of pigment structures. It is concluded that the structural organization of the protein is critical for the stabilization of pigment structures and that hydrophobic and electrostatic interactions play a role in their functional activity and structural organization.

БИОХИМИЯ
Т. 50, вып. 7 1985

УДК 577.355

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПАЗЫ И ПРОНАЗЫ

ДРОЗДОВА Н. Н., ХОТЧЕНКОВ В. П., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследованы структурные нарушения реакционных центров (РЦ) *Rps. viridis* при действии липазы, проназы, изменении ионной силы и концентрации лаурилдиметиламиноксида (ЛДАО). Показано, что частичная делипидизация РЦ с помощью липазы или больших концентраций ЛДАО вызывает сходные изменения в спектрах поглощения пигментных форм *P*-960 и *P*-830 — постепенный коротковолновый сдвиг формы *P*-960 до 30 нм на фоне уменьшения интенсивности обеих полос поглощения. При действии проназы наблюдалась постепенная деградация обеих пигментных форм, по характеру отличная от изменений, вызванных инкубацией с липазой. Встраивание РЦ, подвергнутых ограниченному липолизу, в липосомы ведет к обратному смещению максимума *P*-960; включение в липосомы РЦ, обработанных проназой, не вызывает изменений в положении длинноволнового максимума. Снятие электростатического взаимодействия путем увеличения ионной силы среды вызывает увеличение интенсивности Q_x- и Q_y-полос поглощения специальной пары *P*-960. Установлено, что при перечисленных выше воздействиях на РЦ имеет место изменение содержания доли α-спирализованной структуры, свидетельствующее о различных конформационных состояниях белкового компонента РЦ, связанных с изменением гидрофобных взаимодействий.

В процессе фотосинтеза у пурпурных бактерий первичное преобразование энергии света происходит в специальных структурах — реакционных центрах. Бактериальный реакционный центр (РЦ) является мембранным белок-пигментным комплексом, состоящим из трех белковых субъединиц, нековалентно связанных с пигментами (четыре молекулы бактериохлорофилла, две — бактериофеофитина, одна — каротиноида) и другими составными компонентами (две молекулы убихинона, один атом железа) [1]. Кроме того показано, что РЦ из *Rps. viridis* содержат цитохромы *c*-типа, функционирующие как вторичные доноры электрона [2, 3].

Высокая эффективность превращения световой энергии в РЦ требует выяснения особенностей молекулярной организации этих структур. В настоящее время имеются работы по изучению структуры, локализации и участия пигментных форм в процессе первичного разделения заряда [4, 5], конформации и ориентации белков РЦ [6], а также работы по изучению первичной структуры полипептидных субъединиц [7]. Особый интерес для понимания молекулярной организации РЦ фотосинтезирующих бактерий представляют работы последних лет по выделению и кристаллизации РЦ *Rps. viridis* [8] и по изучению свойств полученных кристаллов [9].

Однако до сих пор остается неясным вопрос о возможном участии фосфолипидов в структурной организации бактериальных РЦ. Наличие липидов и их значение для стабильности было показано на РЦ, выделенных из бактерий *Rhodopseudomonas sphaeroides* [10] и *Rhodospirillum rubrum* [11], в некоторых ферментных комплексах, выделенных из хроматофоров этих бактерий, в частности для убихинол-цитохром *c*-редуктазного комплекса ($b - c_1$) [12], а также была показана существенная роль липидов в организации нативной конформации *P*-850 у *Chromatium minutissimum* [13]. В данной работе сделана попытка опреде-

ления роли липидов в структурной организации пигментных форм в препаратах РЦ, выделенных из мембран хроматофоров *Rps. viridis* при помощи неионного детергента лаурилдиметиламиноокисда. Такие препараты РЦ в основном сохраняют нативное состояние молекулярной организации, обеспечивающей высокую фотохимическую активность [14].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки *Rps. viridis* выращивались в анаэробных условиях на свету. Реакционные центры были выделены из хроматофоров *Rps. viridis* хроматографией на колонке гидроксилаппатита с помощью ЛДАО и последующим осаждением сульфатом аммония [14]. Образцы РЦ хранили в жидком азоте в 10 мМ трис-HCl-буфере, содержащем 0,05% ЛДАО pH 8,1, и ресуспендировали в соответствующем буфере перед опытом. Концентрацию бактериохлорофилла *b* в образцах определяли по поглощению при 830 нм, используя $\varepsilon_M = 300 \pm 65$ мМ$^{-1}$ см$^{-1}$ [14].

Для проверки чистоты РЦ проводили электрофорез в полиакриламидном геле по Лэммли [15]. Относительные молекулярные массы были определены с использованием в качестве маркеров набора белков с молекулярными массами в области 14—94 кДа («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция).

Общее содержание липидов в хроматофорах и РЦ определяли после их экстракции 20 объемами смеси хлороформ — метанол (2 : 1). Денатурированные белки осаждали центрифугированием 10 мин при 7000 об/мин. Супернатанты, содержащие липиды, пигменты и часть белка, обрабатывали 0,2 объемами 0,04%-ного $MgSO_4$ для удаления следов неорганического фосфата. Объединенные хлороформные фракции упаривали в присутствии аргона, остаток растворяли в минимальном объеме смеси хлороформ — метанол (2 : 1). Качественный состав липидов определяли двумерной тонкослойной хроматографией на пластинках с силикагелем КСК, используя для разделения в первом направлении смесь хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4), а во втором — хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (50 : 20 : 10 : 10 : 5). Зоны липидов идентифицировали после окраски хроматограмм парами иода или реактивом Васьковского на фосфор [16]. Подвижность полученных зон фосфолипидов сравнивали с подвижностью фосфолипидов стандартной смеси. Количественное определение фосфора проводили после сжигания экстрактов из хроматофоров и РЦ по методу Бартлетта [17].

Для литической обработки РЦ использовали проназу Е («Serva», ФРГ) и липазу из печени свиньи, любезно предоставленную В. А. Ереминым (Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР). Инкубацию с липазой проводили в 10 мМ трис-HCl-буфере, содержащем 5 мМ $CaCl_2$, pH 8,1, при 37°. РЦ и липазу прибавляли к буферу до конечных концентраций 0,59 мкМ и 60 мкг/мл соответственно. Инкубацию с проназой проводили в 50 мМ трис-HCl, pH 7,1, при 22°; концентрации РЦ и проназы были равны 0,59 мкМ и 45 мкг/мл соответственно. Действие литических ферментов на РЦ оценивали по изменению спектров поглощения, спектров кругового дихроизма (КД), а также по обратимому фотоиндуцированному изменению поглощения при 960 нм.

Протеолипосомы с РЦ были получены по модифицированному методу Бруннера [18]. Пленку фосфатидилхолина суспендировали в растворе 0,15 М NaCl и 10 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,6, до концентрации 15 мг/мл, затем добавляли РЦ до концентрации 0,33 мкМ и холат натрия (конечная концентрация — 32 мМ). Смесь перемешивали в темноте при 5° в течение 30 мин. Полученную суспензию наносили на колонку сефадекса G-50 (1,5×30 см), уравновешенную 10 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,6, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05%-ный ЛДАО. Элюцию проводили тем же буфером при 5°. Полученные протеолипосомы были сконцентрированы до 2 мл в ячейке для ультрафильтрации с фильтром XM-100 («Amicon Ltd», США). Для включения в липосомы РЦ после частичного гидролиза фосфолипидов инкубацию с ферментом проводили прямо в ячейке для ультрафильтрации, в темноте. Через необходимый промежуток времени начинали отмывку от липазы: сначала 2 раза по 5 мл смеси 10 мМ трис-HCl-буфера, pH 8,1 и 0,02%-ного ЛДАО, а затем 3 раза по 5 мл 10 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,6, содержащего 0,15 М NaCl и 0,02%-ный ЛДАО. После промывок образец концентрировали до 1,5 мл и включали в липосомы описанным выше методом.

Спектры поглощения до и после обработки литическими ферментами записывали на спектрофотометрах Specord M-40 и Unicam SP-700A в области 240—900 и 700—1100 нм соответственно. Оба прибора были снабжены термостатируемыми кюветодержателями. Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jascko 40-AS в области 190—250 нм в 2-мм кварцевых кюветах. Концентрация образцов была равна 0,1—0,2 мг белка на 1 мл. Из спектров КД смеси РЦ и фермента вычитали спектр фермента. Обратимые фотоиндуцированные изменения поглощения при 960 нм регистрировали на однолучевом спектрофотометре [19] при освещении через светофильтр КС-19.

Концентрацию белка в препаратах РЦ определяли по методу Лоури [20]. В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации х. ч. и ч. д. а.; яичный фосфатидилхолин и кардиолипин (10%- и 5%-ный спиртовые растворы соответственно); ЛДАО (30%-ный водный раствор; «Fluka», Швейцария); холат натрия и DS-Na («Serva», ФРГ); сефадекс G-50 («Pharmacia», Швеция).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения препаратов РЦ, использованных в работе, даны на рис. 1. Критерием чистоты выделенных препаратов служат отношения поглощения при 280 нм к поглощению при 830 нм и поглощения при 830 нм к поглощению при 960 нм, которые в оптимальном случае равны 2,1 и 2,5 соответственно [14]. В наших препаратах эти отношения обычно были равны 2,3 и 2,5. По данным электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле, выделенные препараты РЦ содержат 4 белковые субъединицы с молекулярной массой 40, 33, 28 и 25 кДа. Наличие тяжелой субъединицы (40 кДа) свидетельствует о наличии в препаратах РЦ цитохрома *c*-типа [3].

Содержание фосфолипидов в хроматофорах и в изолированных РЦ дано в табл. 1. Как видно, отношение липидного фосфора к белку примерно в 4 раза больше в хроматофорах, чем в РЦ. Если исходить из того, что содержание белка в РЦ составляет 20—25% от общего белка в хроматофорах [21], то содержание фосфолипидов в РЦ составляет примерно 25% от количества фосфолипидов в мембране хроматофоров. Расчет содержания фосфора в хлороформ-метанольных экстрактах РЦ (3 мкг P_i/мг белка) и содержания бактериохлорофилла *b* (2,9 мкМ) показывает, что на 1 моль бактериохлорофилла *b* приходится 3 моль фосфолипидов. Интересно отметить, что это отношение практически совпадает с таковым для РЦ *Rps. sphaeroides* R-26 [22].

Таблица 1

Содержание белка и фосфолипидов в реакционных центрах и хроматофорах *Rps viridis*

Средние данные 4 опытов

Компонент	Хроматофоры	РЦ
Белок, мг/мл	5,9	1,7
Фосфолипиды, мг/мл	1,92	0,13
Фосфолипид/белок, мг/Г	324,9	74,7

При двумерной хроматографии липидного экстракта из хроматофоров *Prs. viridis* были выявлены следующие главные компоненты: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилглицерол (ФГ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и кардиолипин (КЛ). Определению фракции фосфолипидов после разделения липидного экстракта из РЦ сильно мешает ЛДАО, который также переходит в органический растворитель и дает на хроматограмме широкое пятно, перекрывающее области расположения КЛ и ФЭ. При окраске таких хроматограмм реактивом Васьковского обнаруживается лишь слабое пятно ФХ.

На рис. 2 приведены спектры поглощения препаратов РЦ до и после их инкубации с проназой и липазой. Для сравнения результатов выбраны условия, при которых величина поглощения при 830 нм уменьшается в 2 раза. Как видно, наибольшие изменения происходят в полосах поглощения пигментных форм *P*-830 и *P*-960. Более слабо выраженные изменения отмечаются в области 540—550 нм. Различия в действии проназы и липазы проявляются в том, что в первом случае (рис. 2, *2*) в области 960 нм происходит изменение величины поглощения без сдвига максимума, а во втором — наряду с уменьшением поглощения происходит коротковолновый сдвиг до 945—940 нм (рис. 2, *3*). В области полосы 830 нм при действии проназы наблюдается появление максимума при 790 нм на фоне постепенного уменьшения исходной полосы. Этот максимум (в исходном спектре ему соответствует слабое плечо) относится к бактериофеофитину *b* [2]. При высокой степени гидролиза белков РЦ проназой максимумы при 830 и 960 нм исчезают и остается только максимум бактериофеофитина. При действии липазы полоса 830 нм постепенно уменьшается без разделения на мак-

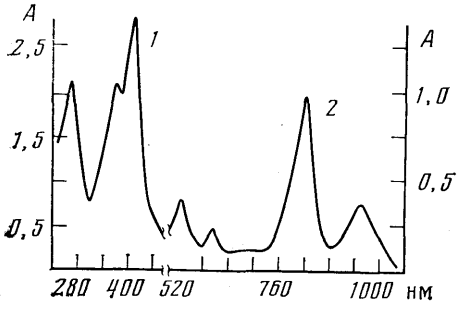


Рис. 1

Рис. 1. Спектр поглощения РЦ из *Rhodopseudomonas viridis*. *1* — $A_{280}/A_{830}=2{,}3$; *2* — $A_{830}/A_{960}=2{,}5$

Рис. 2. Спектры поглощения исходных препаратов РЦ до (*1*) и после обработки проназой (*2*) и липазой (*3*)

Рис. 3. Положение полосы *P*-960 в спектре поглощения РЦ до обработки липазой (*1*), после обработки (*2*) и после включения в лецитиновые липосомы (*3*). Время инкубации с липазой 30 мин

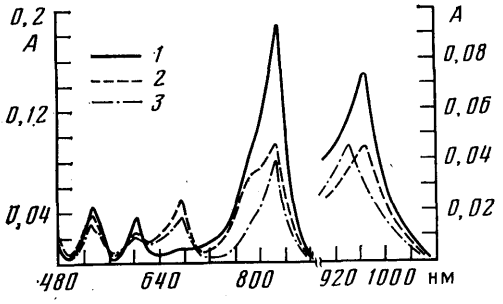


Рис. 2

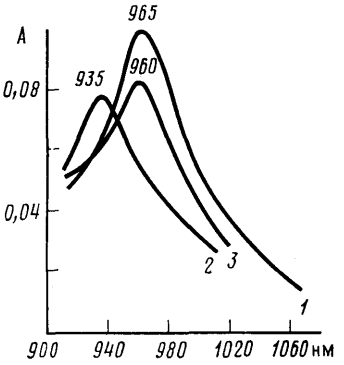


Рис. 3

симумы 790 и 830 нм. Следует отметить, что при действии липазы и проназы наблюдается увеличение поглощения при 680 нм, более медленное в случае липазы и указывающее на окисление бактериохлорофилла *b* до хлорофиллоподобного продукта [23].

В полосе 540—550 нм, которая обусловлена поглощением бактериофеофитина и цитохрома, отличие в действии проназы и липазы проявляется в том, что во втором случае наблюдается частичное восстановление цитохрома, которое обнаруживается по появлению плеча в области 550 нм (рис. 2, *3*).

Данные по круговому дихроизму препаратов РЦ, подвергнутых действию проназы и липазы, свидетельствуют об изменении вторичной структуры белка РЦ, связанном с уменьшением содержания α-спиральных участков в белковой молекуле (табл. 2).

Для выяснения роли липидного окружения было проведено встраивание РЦ, обедненных липидами, в липосомы из фосфатидилхолина. Включение нативных РЦ в липосомы сопровождалось потерей ими способности к обратимому фотоокислению *P*-960 при сохранении исходного спектра поглощения. При добавлении к таким протеолипосомам минимального количества хинона (1—2 кристалла на образец) фото-

Таблица 2

Доля α-спиральной структуры в белке РЦ при различных воздействиях

Образец	$f_н$ *	Образец	$f_н$ *
РЦ	0,38	РЦ-NaCl, 0,34 М	0,44
РЦ-проназа Е	0,22	Хроматофоры	0,6**
РЦ-липаза	0,28	РЦ в липосомах из фосфатидилхолина	0,5**

* $f_н$ — доля α-спиральной структуры. Рассчитана по формуле Чена [24]: $[\theta]_{222}=-30300\,f_н-2340$, где $[\theta]_{222}$ — молекулярная эллиптичность.

** Данные работы [6].

химическая активность полностью восстанавливалась. При попытке понизить концентрацию холата натрия, используемого для солюбилизации РЦ и фосфолипида, путем его частичной замены на ЛДАО были получены протеолипосомы, обладающие фотоответом, но имеющие большой размер (1—1,5 мкм), что мешало спектральным исследованиям из-за высокой мутности образцов. Поэтому остановились на исходном методе получения протеолипосом с РЦ. Как видно из рис. 3, при встраивании РЦ, подвергнутых ограниченному липолизу, в липосомы происходит обратное смещение максимума *P*-960. При включении в липосомы препаратов РЦ, обработанных проназой, положение длинноволнового максимума не меняется.

При действии на РЦ неионного детергента ЛДАО происходит коротковолновый сдвиг *P*-960 при увеличении концентрации детергента с 0,05% до 9%. Кроме сдвига в положении максимума наблюдается также и уменьшение интенсивности пиков 830 и 960 нм, причем изменение поглощения при 960 нм идет с большей скоростью, чем при 830 нм (табл. 3). Следует также отметить, что с ростом концентрации ЛДАО устойчивость бактериохлорофилла *b* к окислению падает, что следует из увеличения поглощения хлорофиллоподобного продукта при 680 нм, которое зависит также от времени инкубации с ЛДАО.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение липидного фосфора в хлороформ-метанольных экстрактах реакционных центров *Rps. viridis* (табл. 1) показало, что они, как и РЦ других фотосинтезирующих бактерий [10, 11, 22], содержат фосфолипиды. Количество фосфолипидов у *Rps. viridis* (74,7 мкг на 1 мг белка) занимает промежуточное положение между значениями 36,5 для *Rps. sphaeroides* [10] и 195 для *R. rubrum* [11]. Было отмечено, что при выделении РЦ из *R. rubrum* фосфолипидный состав изменялся в сторону увеличения содержания отрицательно заряженных фосфолипидов (кардиолипина и фосфатидилглицерола) [11]. Такое же обогащение кардиолипином отмечено и в детергентных фрагментах мембран хроматофоров *Rps. viridis*, которые преимущественно содержат комплекс антенны и РЦ [5]. В этом случае соотношение фосфолипидов в хроматофорах до и после обработки тритоном X-100 или холатом натрия меняется с ФЭ>ФХ>КЛ на КЛ>ФХ>ФЭ соответственно. В противоположность результатам работы [5], мы обнаружили в хроматофорах *Rps. viridis* фосфатидилглицерол, следовательно, можно предполагать, что в РЦ суммарное количество отрицательно заряженных липидов должно быть большим. Наличие в РЦ отрицательно заряженных фосфолипидов, видимо, обусловливает возможность электростатических взаимодействий между фосфолипидами и положительно заряженной поверхностью белка [25, 26].

Одна из возможных функций фосфолипидов в структурно-функциональной организации РЦ, вероятно, связана с их необходимостью для удерживания вторичного хинона в составе РЦ. Этим можно объяснить потерю фотоответа при включении РЦ в липосомы и его восстановление при добавлении к ним экзогенного хинона. Сходный результат был по-

Таблица 3

Изменение поглощения пигментных форм *P*-830 и *P*-960 при действии на РЦ разных концентраций ЛДАО

Максимум поглощения, нм	Поглощение (опт. ед.) при концентрации ЛДАО		$A_{9,375}/A_{0,05}$, % *
	0,05%	9,375%	
830	0,606	0,570	94
960	0,241	0,174**	72

* $A_{9,375}$ — поглощение при 9,375% ЛДАО, $A_{0,05}$ — при 0,05%.
** Соответствует новому максимуму поглощения при 940 нм.

лучен при выделении РЦ из *Rps. sphaeroides* R-26 на колонке целита [22]. Промывание колонки буфером, содержащим 0,3%-ный ЛДАО и сульфат аммония (0,31 г/мл), показало, что количество убихинона в РЦ зависит от количества остающегося фосфолипида.

Сравнение спектров поглощения РЦ при обработке липазой и проназой (рис. 2), а также положений длинноволновых максимумов пигментных форм *P*-830 и *P*-960 при действии неионного детергента ЛДАО (табл. 3) обнаружило различия в характере и скорости изменения этих форм, что говорит о различном механизме действия на РЦ проназы, с одной стороны, и липазы или ЛДАО, с другой. Показано, что при действии на РЦ липазы или высоких концентраций ЛДАО происходит постепенный коротковолновый сдвиг максимума поглощения формы *P*-960 до 30 нм и уменьшение доли α-спиральной структуры белка. Получение коротковолнового сдвига формы *P*-960 при действии этих агентов является, по-видимому, результатом частичного удаления фосфолипидов из комплекса РЦ. В первом случае это происходит за счет липолиза, а во втором — за счет образования двух видов смешанных мицелл: ЛДАО — РЦ — липид и ЛДАО — липид [27]. Действие липазы и проназы на РЦ реализуется двумя различными путями. Если проназа прямо влияет на связь белок — пигмент, нарушая первичную структуру белка, то липаза действует опосредованно, через изменение вторичной структуры белка при нарушении его связи с фосфолипидом. Однако остается еще не выясненным вопрос о возможности прямого нарушения связи липид — пигмент, которая может осуществляться либо при взаимодействии фитольной части молекулы бактериохлорофилла с жирнокислотными остатками молекул фосфолипидов, либо при взаимодействии координационно связанного магния с полярными группами фосфолипидов [28].

Изучение влияния ионной силы среды на спектральные свойства РЦ (табл. 2) показало, что при гашении зарядов происходит перестройка структуры РЦ, проявляющаяся в увеличении доли α-спиральной структуры белков РЦ и в увеличении поглощения в Q_x- и Q_y-полосах димера специальной пары. Известно, что увеличение содержания α-спирализованных участков в молекуле белка приводит к увеличению его гидрофобности [29]. Таким образом, рост интенсивности поглощения полос Q_x и Q_y специальной пары можно отнести на счет изменения (возрастания) гидрофобности белка в составе пигмент-белкового комплекса, а изменения в пигментной форме *P*-960 при действии липазы и неионного детергента ЛДАО отнести на счет уменьшения гидрофобности белка.

Полученные данные позволяют сделать предположение о преимущественной роли фосфолипидов в обеспечении гидрофобного окружения в области димера бактериохлорофилла *b* специальной пары (*P*-960), о чем, в частности, свидетельствует и возможность реконструкции исходного положения максимума *P*-960 при включении в липосомы частично делипидированных РЦ (рис. 3), а также повышенное содержание α-спирали при включении реакционных центров в липосомы (табл. 2) [6]. Нарушения в структурной организации пигментных форм РЦ, вызванные частичным удалением липидов при действии липазы, сопровождаются изменениями в функциональной активности, что было показано нами ранее [30, 31]. Более детальное рассмотрение этого вопроса будет приведено в следующей статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dutton P. L., Prince R. C., Tiede D. M.* Photochem. Photobiol., 1978, v. 28, p. 939—949.
2. *Thornber J. P., Cogdell R. J., Seftor R. E. B., Webster G. D.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 539, p. 60—75.
3. *Jay F., Lambillote M., Mühlethaler K.* Europ. J. Cell Biol., 1983, v. 30, p. 1—8.
4. *Schuvalov V. A., Asadov A. A.* Biochim et biophys. acta, 1979, v. 545, p. 296—308.
5. *Welte W., Kreutz W.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 692, p. 479—488.
6. *Nabedryk E., Tide D. M., Dutton P. L., Breton J.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 682, p. 273—280.

7. *Marinetti T. D., Okamura M. V., Feher G.* Biochemistry, 1979, v. 18, p. 3126—3133.
8. *Michel H.* J. Mol. Biol., 1982, v. 138, p. 567—572.
9. *Zinth W., Kaizer W., Michel H.* Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 723, p. 128—131.
10. *Jolchine G., Reiss-Hüsson F.* FEBS Letters, 1975, v. 52, p. 33—36.
11. *Snozzi M., Bachofen R.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 546, p. 236—247.
12. *Yu L., Yu C. A.* Biochem. and Biophys. Res. Communs., 1982, v. 108, p. 1258—1292.
13. *Ерохин Ю. В., Синегуб О. А.* Молек. биология, 1970, т. 4, с. 401—410.
14. *Clayton R. K., Clayton B. J.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 501, p. 478—487.
15. *Laemmli U. K.* Nature, 1970, v. 227, p. 680—685.
16. *Svetachev V. I., Vaskovsky V. E.* J. Chromatogr., 1972, v. 65, p. 451—456.
17. *Bartlett G. K.* J. Biol. Chem., 1959, v. 234, p. 466—468.
18. *Brunner H. B., Scrabal P., Hauser H.* Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 455, p. 322—331.
19. *Карапетян Н. В., Литвин Ф. Ф., Красновский А. А.* Биофизика, 1963, т. 8, с. 191—197.
20. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
21. *Clayton R. K., Haselkorn R.* J. Mol. Biol., 1972, v. 68, p. 97—101.
22. *Kendall-Tobias M. W., Seibert M.* Arch. Biochem. and Biophys., 1982, v. 216, p. 255—258.
23. *Бокучава Е. М., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Биохимия, 1974, т. 39, с. 186—201.
24. *Chen Y. H., Martinez H. B., Yang J.* Biochemistry, 1972, v. 11, p. 4120—4133.
25. *Birrel G. B., Sistrom W. K., Griffith O. H.* Biochemistry, 1978, v. 17, p. 3768—3773.
26. *Захарова Н. И., Пермяков Е. А., Фабиан М., Кононенко А. А., Чаморовский С. К., Бурштейн Э. А., Рубин А. Б.* Молек. биология, 1984, т. 18, с. 719—724.
27. *Tanford C., Reynolds J. A.* Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 457, p. 133—170.
28. *Katz J. J.* In: Adv. Biochem. Physiol. Plant Lipids. Proc. Symp., Götteborg. Aug. 28—30, 1978, Amsterdam e. a., 1979, p. 37—56.
29. *Образцов В. В., Селищева А. А., Козлов Ю. П.* Биофизика, 1983, т. 28, с. 412—417.
30. *Хотченков В. П., Дроздова Н. Н., Вычегжанина И. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1983, т. 28, с. 878—880.
31. *Дроздова Н. Н., Хотченков В. П., Вычегжанина И. В.* В кн.: 16-ая конф. ФЕБО. Тез. докл. М., 1984, с. 249.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
13.XII.1984

STRUCTURAL CHANGES IN THE REACTION CENTERS OF PHOTOSYNTHESIZING BACTERIA RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS INDUCED BY LIPASE AND PRONASE

DROZDOVA N. N., KHOTCHENKOV V. P., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Structural changes in the reaction centers (RC) of *Rsp. viridis* induced by lipase and pronase as well as changes in the ionic strength and lauryldimethylaminooxide (LDAO) concentration were investigated. It was found that partial delipidation of RC with lipase or high concentrations of LDAO induce similar changes in the absorption spectra of pigment forms P-960 and P-830. A gradual short-wave shift in form P-960 down to 30 nm concomitant with a decrease in the intensity of both absorption bands was observed. Under effects of pronase, a stepwise degradation of both pigment forms distinct from the changes caused by incubation with lipase took place. The incorporation of RC after their limited lipolysis into liposomes resulted in a reverse shift in the P-960 maximum; the incorporation of pronase-treated RC into liposomes did not cause any changes in the position of the long-wave maximum. Cessation of electrostatic interactions by increasing ionic strength led to an increase in the intensity of the Q_x and Q_y absorption bands of the special P-960 pair. Under these influences, the changes in the amount of the α-helix evidencing different conformational states of the RC protein component resulting from changes in the hydrophobic environment were observed.

УДК 581.17

БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗА, VIII СИМПОЗИУМ 16-й КОНФЕРЕНЦИИ ФЕБО

Проблемы биохимии фотосинтеза обсуждались на двух заседаниях симпозиума (организатор А. А. Красновский), на стендовой сессии и в дискуссии «круглого стола». Заседания симпозиума, на которых председательствовали Т. В. Гудвин (T. W. Goodwin, Англия) и А. А. Красновский (СССР), были посвящены обсуждению двух важнейших проблем фотосинтеза — регуляции фотосинтетического переноса электронов и молекулярной организации фотосинтетического аппарата.

Пленарная лекция Дж. Барбера (J. Barber, Англия) была посвящена проблеме регуляции фотосинтетического переноса вследствие изменения структуры мембран хлоропластов. Предложенная им концепция основана на латеральном (продольном) разобщении комплексов фотосистем в плоскости тилакоидной мембраны. Разная подвижность участков мембран, содержащих фотосистему 2 или фотосистему 1, объясняется различным содержанием в них белков и липидов. Фотофосфорилирование светособирающего пигментного комплекса вызывает латеральную диффузию вследствие изменения плотности поверхностных зарядов. Латеральная гетерогенность белков и липидов предполагает специфическое взаимодействие между ними.

В докладе Говинджи (Govindjee, США) был дан обзор данных по кислородвыделяющей системе фотосинтеза. Эта проблема еще далека от разрешения, однако в последние годы получены существенные достижения в выяснении структуры фотосистемы 2 и роли компонентов донорной части этой фотосистемы. Установлен полипептидный состав белков фотосистемы 2, включающей шесть полипептидов, и высказаны предположения о роли этих полипептидов в функционировании фотосистемы. Первичная фотореакция фотосистемы 2 представляет собой разделение зарядов между П680 и молекулой феофитина (кстати, этот важный факт был установлен в работах советских ученых). Перенос электрона от восстановленного феофитина к Q_A (первичному акцептору) происходит за 200 пс, от Q_A к Q_B (вторичному акцептору) — за 200—400 мкс. Q_B действует как «двухэлектронные ворота» и расположен на белке, связывающем гербициды и бикарбонат. Обсуждена роль четырех атомов марганца, ионов хлора и негемового железа, функционирующих в донорной части фотосистемы 2.

В докладе Я. Амеца (J. Amesz, Нидерланды) были рассмотрены пигменты и компоненты цепи переноса электрона фотосинтезирующих бактерий. Изучение свойств выделенных пигмент-белковых комплексов позволило создать модель организации бактериохлорофилла и каротина в этих комплексах. Сравнительное исследование реакционных центров пурпурных и зеленых бактерий позволило заключить, что центры зеленых бактерий сходны с центрами фотосистемы 1 зеленых растений.

Доклад А. А. Красновского (СССР) был посвящен моделям фотосинтетического переноса электрона. В системе, моделирующей фотосистему 1, хлорофилл, включенный в мицеллы детергента или в липосомы, сопряжен с бактериальной гидрогеназой для переноса электронов к метилвиологену с последующим выделением водорода. Для моделирования фотосистемы 2 были использованы различные полупроводники. Подобные работы позволяют предложить пути разработки фотобиохимических систем, способных преобразовывать световую энергию в химическую.

В пленарной лекции Дж. Акоюноглу (J. Akoyunoglou, Греция) были рассмотрены биосинтез пигмент-белковых комплексов зеленых растений и их молекулярная организация. Установлена зависимость биосинтеза комплексов от скорости синтеза хлорофилла *a*. При недостатке хлорофилла образуются лишь ядерные комплексы (содержащие реакционные центры), а при большем содержании хлорофилла — все другие комплексы: сначала ядерные, затем мономеры светособирающего комплекса и, наконец, олигомеры этих комплексов. Эти процессы находят отражение в изменении спектров и выходов флуоресценции образцов при —196°.

В докладе А. Фалуди-Даниэль (A. Faludi-Daniel, ВНР) был сообщен интересный факт — обнаружение большого фотоиндуцированного сигнала кругового дихроизма хлоропластов в красной полосе поглощения, приписываемого светособирающему комплексу фотосистемы 2. Чувствительность сигнала к ингибиторам и разобщителям указывает на то, что конформационные изменения комплекса, вызывающего сигнал, могут быть обусловлены фосфорилированием этого белка. Эта работа выполнена в сотрудничестве с Институтом биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

Большой интерес вызвал доклад П. Бёгера (P. Böger, ФРГ) о принципах действия гербицидов на фотосинтез. На примере дифениловых эфиров показано, что в зависимости от боковых заместителей гербициды могут ингибировать фотосинтетическую цепь переноса электрона, оказывать разобщающее действие, блокировать биосинтез каротина или вызывать перекисное окисление липидов хлоропластов. Следует отметить,

что выяснение механизма действия гербицидов на фотосинтетический аппарат — удобный подход для изучения структурно-функциональных аспектов фотосинтеза. Кроме того, такие исследования позволяют существенно ускорить синтез гербицидов, обладающих максимальной эффективностью.

Доклад А. А. Шлыка (СССР) был посвящен рассмотрению биосинтеза хлорофилла и ранних этапов формирования пигментных систем. Прослежена последовательность образования фотосистем и встраивания молекул хлорофилла в пигментные системы, а также пути развития миграции энергии между формами хлорофилла.

В 36 докладах стендовой сессии (председатель Н. В. Карапетян, СССР) были представлены новые данные по структурной организации и механизму функционирования фотосинтетических реакционных центров, по исследованию свойств и структуры пигмент-белковых комплексов зеленых растений и фотосинтезирующих бактерий, стабильности этих комплексов, роли липидов в организации фотосинтетических мембран, по биосинтезу хлорофилла и фотосистем, а также по ферментам углеродного цикла при фотосинтезе. Помимо советских участников в работе сессии приняли участие ученые из ПНР, ЧССР, НРБ, ГДР, ВНР, Англии, Франции, Нидерландов, Греции, Бельгии, Финляндии.

На дискуссии «круглого стола» (председатели Говинджи, США и А. А. Шлык, СССР) были обсуждены структура реакционных центров фотосистем зеленых растений, пурпурных и зеленых бактерий, последовательность переноса электрона в реакционных центрах, взаимодействие хлорофилла реакционных центров с хлорофиллами антенны. Следует отметить, что советские ученые занимают передовые позиции в этой области исследования.

В целом заседания симпозиума и стендовой сессии показали прогресс в выяснении механизма фотосинтеза. Наибольший интерес в настоящее время привлекает исследование структуры фотосинтетического аппарата, мембран хлоропластов, а также механизма функционирования фотосистемы 2, наименее изученной проблемы фотосинтеза. Конференция несомненно будет стимулировать работы по дальнейшему выяснению механизма фотосинтеза.

Карапетян Н. В.

Академик
А. А. КРАСНОВСКИЙ

ПРОБЛЕМЫ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ И ЗАПАСАНИЯ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Научное сообщение

Растения преобразуют солнечное излучение, достигающее поверхности Земли, в потенциальную химическую энергию многообразных органических соединений и молекулярного кислорода. Фотосинтез растений обеспечивает пищей и кислородом практически все виды организмов. Энергетические потребности человечества также удовлетворяются главным образом за счет ископаемых продуктов фотосинтеза: нефти, природного газа, каменного угля и различных видов биомассы. Атомные и гидроэлектрические станции пока покрывают не более 5% мирового энергопотребления.

По имеющимся данным [1], структура энергетического баланса развитых и развивающихся стран в наибольшей степени различается величиной потребления биомассы: древесины, отходов сельского хозяйства и т. п.; в развитых странах ее доля составляет лишь около 1%, тогда как в развивающихся странах почти половина всей энергии (около 40%) до сих пор извлекается из биомассы. Ожидается, что к 2000 г. в мировом энергопотреблении увеличится использование атомной энергии, уменьшится доля нефти, возрастет удельный вес угля. Вероятно, доля биомассы в энергопотреблении развивающихся стран значительно уменьшится, а в развитых странах увеличится до 5—10%, причем она будет использоваться более рационально — для микробиологического производства кормового белка, спиртов и горючих газов (метан, водород). Однако несомненно, что к началу третьего тысячелетия большая часть энергии будет по-прежнему производиться путем сжигания ископаемых продуктов фотосинтеза.

Все возрастающее потребление энергии человечеством приводит к тому, что энергия солнечного излучения, накопленная растениями в течение сотен миллионов лет, может быть израсходована для нужд всего лишь нескольких поколений. Быстрый рост объема сжигаемых органических продуктов вызывает увеличение количества углекислого газа в атмосфере,

---

[1] См., например: *Hall D. O., Bernard G. W., Moss P. A.*— Biomass for Energy in the Developing Countries. Oxford, Pergamon Press, 1982.

что приводит к постепенному повышению температуры за счет «парникового эффекта» с непредсказуемыми экологическими последствиями. (Впрочем, увеличение содержания углекислоты должно стимулировать процессы глобального фотосинтеза.)

Кислород земной атмосферы также возник в результате фотосинтетической деятельности растений. Достоверных данных об уменьшении среднего содержания кислорода в атмосфере пока нет; это, по-видимому, связано с ее большой буферной емкостью и сохранением значительных темпов генерации кислорода фотосинтезирующими организмами — наземными растениями и планктоном океанов. Однако постоянный рост масштабов сжигания органического топлива, истребления лесов, влияние загрязнения окружающей среды на фотосинтез способны нарушить пока еще существующий баланс потребления и образования кислорода, а возможно, и стабильность озонового слоя атмосферы, в поддержании которого, видимо, участвует кислород фотосинтетического происхождения.

Все сказанное убеждает в том, что изучение природы и механизмов фотосинтеза является важнейшим фундаментальным научным направлением. В этой области работают сотни лабораторий во многих странах мира. Ведущиеся здесь исследования в перспективе должны привести не только к оптимизации биологического использования энергии Солнца, но и к созданию искусственных систем, более полно использующих эту энергию. Ряд соответствующих проблем уже рассматривался нами ранее [2].

Использование солнечной энергии при фотосинтезе

В основе фотосинтетической деятельности растений лежит реакция образования кислорода и углеводов из воды и углекислоты:

$$H_2O+CO_2=1/6C_6H_{12}O_6+O_2.$$

Изменение свободной энергии в ходе этой реакции составляет +120 ккал, откуда следует, что фотосинтез осуществим лишь при подводе энергии извне. Энергия Эйнштейна для света с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения хлорофилла (680 нм), составляет около 40 ккал. Таким образом, для обеспечения энергией реакции фотосинтеза теоретически требуется минимум три кванта на молекулу выделяющегося кислорода или ассимилируемой углекислоты.

Измерения квантового выхода фотосинтеза одноклеточных водорослей в оптимальных условиях показали, что на молекулу углекислоты затрачивается, по данным разных лабораторий, от 8 до 12 квантов. Если принять среднюю величину 10 квантов, то максимально достижимый коэффициент преобразования энергии, или коэффициент полезного действия фотосинтеза, в данном случае равен 30%. Остальные 70% энергии солнечного света, поглощенного хлорофиллом, в конечном итоге преобразуются в тепло. Пути расходования этой энергии неясны. Вероятно, она тратится на преодоление потенциальных барьеров промежуточных реакций, в ходе обратных реакций активных фотопродуктов и, возможно, для метаболических нужд зеленой клетки, в том числе для воспроизведе-

---

[2] См.: *Красновский А. А.* Биологическое использование солнечной энергии.— Вестник АН СССР, 1979, № 1, с. 83.

ния самого фотосинтетического аппарата. Здесь следует отметить, что указанный выше максимальный квантовый выход измерен в кратковременных экспериментах с одноклеточными водорослями, и учет реальных затрат энергии на биосинтез фотосинтезирующих структур и размножение клеток должен привести к понижению этой величины.

Коротковолновая граница спектра солнечного излучения у поверхности Земли (около 300 нм) определяется «непрозрачностью» слоя озона для ультрафиолетовых лучей с меньшей длиной волны. Приблизительно половина суммарной энергии спектра приходится на его видимую область и используется растениями для фотосинтеза. Эта часть энергии Солнца получила название «фотосинтетически активная радиация». Оставшаяся энергия приходится главным образом на инфракрасную область и для фотосинтеза не используется.

Следует, однако, отметить, что некоторые фотосинтезирующие бактерии, содержащие бактериохлорофилл B (Rhodopseudomonas viridis), могут использовать инфракрасное излучение с длиной волны до 1 мкм. Но их распространение незначительно, и они практически не играют роли в глобальном запасании солнечной энергии, так же как и галофитные бактерии, содержащие бактериородопсин. Несомненно, что изучение фотоавтотрофов, использующих близкое инфракрасное излучение, заслуживает большого внимания.

Итак, лишь половина всей солнечной энергии, падающей на поверхность Земли, представляет собой фотосинтетически активную радиацию. Это означает, что максимальное использование солнечной энергии, достигающей поверхности, не превышает 15%. Как же в действительности используется излучение Солнца растительным покровом нашей планеты? Приближенные оценки показывают, что растения суши и планктон океана запасают при фотосинтезе энергию порядка $3 \cdot 10^{21}$ Дж в год, что составляет не более 0,1% энергии солнечной радиации у поверхности Земли. Но и эта величина на порядок превышает годовые энергетические затраты человечества [3].

Существуют громадные резервы для более эффективной утилизации солнечной энергии растениями суши и океана. Даже наиболее продуктивные культурные растения (например, сахарный тростник) в среднем за год потребляют не более 1,5—2% энергии солнечного излучения, а зерновые культуры — до 1%. По существу, именно повышение использования излучения Солнца растениями и растительными сообществами — главная проблема физиологии растений и агротехники.

Интенсивное, высокопродуктивное сельское хозяйство делается все более энергоемким (за счет затрат энергии на мелиорацию, производство химических удобрений и пестицидов, выпуск сельскохозяйственной техники, обеспечение ее топливом и т. д.). Это наглядно подтверждает, например, такой показатель, как отношение запасаемой солнечной энергии к энергозатратам в различных отраслях сельского хозяйства [4]: для интенсивного земледелия эта величина равна двум, тогда как при экстенсивном достигает 20.

Если же наряду с энергозатратами в самом сельском хозяйстве учесть энергию, необходимую для переработки его продуктов, для транспортировки, упаковки и хранения продовольственных товаров, работы системы снабжения и т. д., то, по некоторым данным, на получение од-

---

[3] См.: *Hall D. O., Bernard G. W., Moss P. A.* Op. cit.

[4] См.: *Одум Г., Одум З.* Энергетический базис человека и природы. М.: Прогресс, 1978.

ной калории пищи в развитых странах затрачивается до 5—10 кал энергии[5]. Таким образом, сейчас в этих странах продукты питания производятся за счет расточительного расходования ископаемых продуктов фотосинтеза.

В связи с большими потерями энергии в животноводстве (так как не более 10% химической энергии растительных кормов превращается в химическую энергию синтезируемых в организме животных мяса и жира) уже давно рассматриваются возможности замены животных белков в рационе полноценными растительными белками с оптимальным набором необходимых аминокислот: так, в целом ряде стран широко используются в пищу соевые бобы. Будущие успехи селекции и генной инженерии фотосинтезирующих организмов позволят существенно увеличить их непосредственное использование для пищевых нужд, вероятно, в сочетании с ферментными препаратами, облегчающими переваривание оболочек растительных клеток.

На производство азотных удобрений путем химической фиксации азота атмосферы приходится до 30% энергозатрат земледелия. Поэтому для снижения энергоемкости сельского хозяйства большое значение имеет проблема биологической фиксации азота.

Наиболее древние фотосинтезирующие организмы — прокариоты (в том числе пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии, синезеленые водоросли) способны к автотрофной фиксации молекулярного азота с использованием химической энергии продуктов своего фотосинтеза. В ходе эволюции и в результате специализации биохимических функций высшие растения утратили эту способность. Как известно, лишь бобовые растения «самостоятельно» удовлетворяют свои потребности в азоте за счет симбиоза с клубеньковыми бактериями, осуществляющими гетеротрофную фиксацию и восстановление атмосферного азота. Поэтому весьма перспективны поиски бактерий-азотфиксаторов, которые могли бы жить на корнях не только бобовых, но и злаковых растений. Обсуждается также возможность возвращения высшим растениям утраченной в ходе эволюции способности к фиксации молекулярного азота методами генной инженерии.

Чрезвычайно важно шире использовать в сельском хозяйстве автотрофные фотосинтезирующие азотфиксаторы. На рисовых полях Индии, Индонезии, Японии синезеленые водоросли дают значительную часть необходимого рису азота. Вероятно, на почвах средней полосы масштабы фотосинтетического связывания азота этими организмами можно значительно увеличить при условии правильного подбора культур. Большое внимание привлекает, например, такая эффективная симбиотическая система, как папоротник азолла в сочетании с синезелеными водорослями. По некоторым данным, в тропических странах система азолла — анабена фиксирует до 1 т азота на гектар в год.

Изучение процесса фиксации азота синезелеными водорослями и фототрофными бактериями позволит выяснить биохимические механизмы связи этого процесса с фотосинтезом. Известно что восстанавливающая молекулярный азот энзиматическая система — нитрогеназа — использует органические продукты фотосинтеза в качестве доноров водорода и источника аденозинтрифосфата. Решение проблемы оптимизации и раскрытие взаимосвязи процессов фотосинтеза и азотфиксации безусловно заслуживает больших усилий исследователей.

Молекулярный механизм фотосинтеза

Наиболее характерные устройства фотосинтезирующей клетки — это специальные органеллы (хлоропласты у растений и хроматофоры у бактерий), в которых сосредоточены хлорофилл и другие пигменты, улавливающие солнечное излучение, а также энзиматические

[5] См.: *Steinhart J. S., Steinhart C. E.*— Science, 1974, v. 184, N 4134, p. 307—316.

системы, участвующие в темновых стадиях фотосинтетических реакций. Механизм фотосинтеза в клетках, содержащих хлорофилл, можно разделить на две основные части: цепь фотосинтетического переноса электрона и углеродный цикл. В результате работы первой цепи образуются запасающие энергию соединения — никотинамидадениндинуклеотидфосфаты (НАДФН или НАДН) и аденозинтрифосфат (АТФ). Они поступают в углеродный цикл, функционирование которого не требует непосредственной активации световой энергией [6].

Преобразование световой энергии в химическую происходит в цепи фотосинтетического переноса электрона. Исходным донором водорода в этой цепи у растений служат молекулы воды, что и приводит к образованию молекулярного кислорода. Фототрофные бактерии используют здесь другие органические или неорганические доноры водорода; их метаболизм протекает в большинстве случаев в анаэробных условиях, и они не способны к фотохимическому выделению кислорода.

Усилиями многих лабораторий во всем мире выявлена последовательность фотохимических и энзиматических реакций, в ходе которых энергия квантов света используется в двух фотосистемах на различных участках цепи переноса электрона для последовательного поднятия электрона от уровня кислородного (0,8 В) до уровня водородного электрода (0,42 В). Все протекающие здесь реакции сопряжены в мембранах хлоропластов. Тонкие методы «разборки» этих биологических структур с помощью детергентов и изощренная техника разделения позволяют изолировать отдельные фотосистемы цепи переноса электрона и исследовать их функции.

В каждой из двух фотосистем основная масса хлорофилла представляет собой улавливающую свет «антенну»; гораздо меньшая часть пигмента сосредоточена в реакционных центрах, включенных в цепь переноса электрона непосредственно. Энергия света, поглощаемая хлорофиллом «антенны», мигрирует к реакционным центрам, которые и являются теми наименьшими структурными элементами, где происходит первичный фотохимический процесс. Механизм их работы определяет пути первичного преобразования световой энергии. Используя технику постепенной солюбилизации антенного хлорофилла с помощью детергентов, можно в ряде случаев выделить реакционные центры и изучить их работу. В настоящее время наиболее изучены реакционные центры фотосинтезирующих пурпурных бактерий, содержащие бактериохлорофилл, его безмагниевый аналог бактериофеофитин, а также доноры и акцепторы электрона, смонтированные на белковых структурах. Существенно то, что квантовый выход первичного переноса электрона в реакционных центрах достигает единицы.

Основными компонентами реакционных центров служат молекулы хлорофилла и феофитина, поэтому необходимо знать природу действия света на эти пигменты, иначе говоря — свойства возбужденного светом хлорофилла и его аналогов.

Фотофизика и фотохимия хлорофилла

В Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР в течение многих лет изучалась фотохимия хлорофилла и его аналогов, то есть обратимые и необратимые превращения пигментов под действием света [7]. Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в синг-

[6] См., например: *Calvin M.*— Science, 1974, v. 194, N 4, p. 375.

[7] См.: *Красновский А. А.* Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы. М.: Наука, 1974.

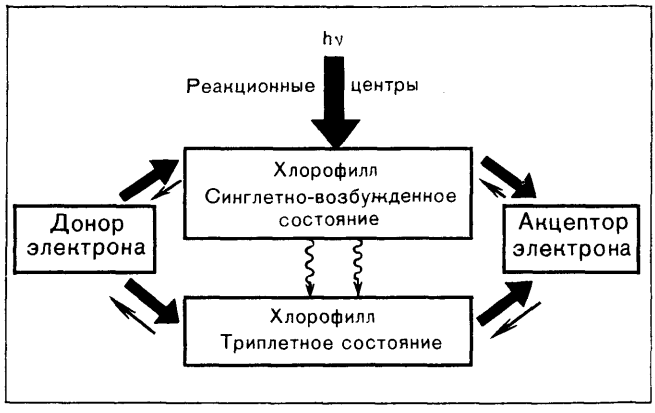
летное возбужденное состояние с длительностью жизни 10^{-9} с, а затем, после некоторой потери энергии, находится в долгоживущем триплетном возбужденном состоянии. Возбужденные синглетные и триплетные молекулы хлорофилла (ниже они обозначаются Хл*) обладают повышенной реакционной способностью. Их взаимодействие с молекулой донора (Д) или акцептора (А) электрона и является первичным фотохимическим процессом, при котором хлорофилл либо отдает свой электрон акцептору, либо воспринимает электрон от донора. В результате образуется пара ион-радикалов:

$$Хл^* + Д \rightleftarrows \cdot Хл^- + \cdot Д^+$$
$$Хл^* + А \rightleftarrows Хл^+ + \cdot А^-.$$

Существенно то, что эти реакции обратимы, и поэтому хлорофилл под действием света может переносить электрон от донора к акцептору (схема 1).

Схема 1

Фотоперенос электрона возбужденными молекулами хлорофилла



В нашей лаборатории было показано, что образующиеся промежуточные радикальные формы хлорофилла действительно участвуют в переносе электрона. Сравнительное исследование фотохимических свойств хлорофилла и его безмагниевого аналога феофитина показало, что возбужденный хлорофилл обладает большей склонностью к отдаче электрона, а возбужденная молекула феофитина — к его восприятию. Таким образом, фундаментальное свойство возбужденных молекул хлорофилла и его аналогов — способность к переносу электрона лежит в основе действия пигментов в реакционных центрах.

Важное свойство хлорофилловых пигментов в триплетном возбужденном состоянии — способность к эффективному переносу энергии к молекуле кислорода, переходящей при этом в синглетное возбужденное состояние; сенсибилизированная люминесценция кислорода обнаружена в близкой инфракрасной области спектра [8].

В состав реакционных центров у фотосинтезирующих пурпурных бактерий входят три субъединицы белка (каждая весом около 25 килодальтон), четыре молекулы бактериохлорофилла, две молекулы бактериофеофитина, один-два атома железа в комплексе с убихиноном. В работах В. А. Шувалова, В. В. Климова и других

[8] См.: *Красновский А. А. (мл.).*— В кн.: Возбужденные молекулы. Л.: Наука, 1982, с. 32.

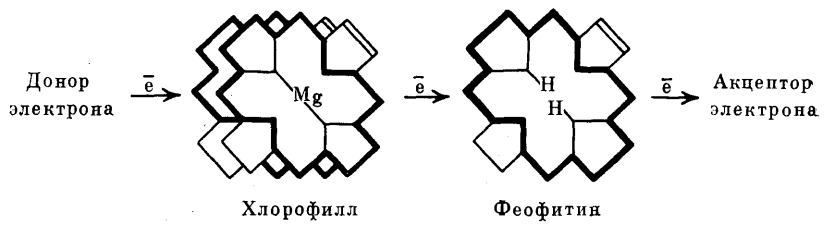
методами лазерной спектроскопии определена длительность элементарных актов переноса электрона и установлена последовательность разделения зарядов между молекулами бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона в реакционных центрах бактерий. При поглощении света происходит перенос электрона от димера бактериохлорофилла с максимумом поглощения 870 нм за время 10 пс к другой форме бактериохлорофилла с максимумом поглощения 800 нм. Далее за время около 30 пс электрон переносится к бактериофеофитину. В свою очередь от восстановленной формы бактериохлорофилла электрон воспринимается убихиноном за время около 200 пс.

Эти элементарные процессы приводят к пространственному разделению зарядов между димером бактериохлорофилла «870» и убихиноном с квантовым выходом около единицы. Состояние с разделенными зарядами характеризуется большой длительностью жизни — до 0,1 с. Вероятно, особенности пространственного расположения молекул бактериохлорофилла и бактериофеофитина в реакционных центрах благоприятствуют эффективному разделению зарядов и препятствуют обратным реакциям.

Что касается реакционных центров фотосистем клеток растений, то они пока не выделены в достаточно чистом виде, хотя недавно в препаратах, обогащенных центрами фотосистемы II, удалось наблюдать фотохимический перенос электрона от хлорофилла к феофитину с образованием восстановленной формы этого пигмента. Таким образом, можно полагать, что система хлорофилл—феофитин — это универсальный участок эстафетного переноса электрона в реакционных центрах фотосинтезирующих организмов (схема 2).

Схема 2

Сопряженный перенос электрона в реакционных центрах с участием хлорофилла и феофитина



Данные о последовательности переноса электрона в реакционных центрах можно резюмировать следующим образом:

Реакционные центры бактерий:

Бактериохлорофилл «870» $\xrightarrow{10\text{ пс}}$ Бактериохлорофилл «800» $\xrightarrow{30\text{ пс}}$ Бактериофеофитин $\xrightarrow{200\text{ пс}}$ Убихинон.

Реакционные центры фотосистемы I:

Хлорофилл «700» $\xrightarrow{40\text{ пс}}$ Хлорофилл «690» $\xrightarrow{200\text{ пс}}$ Железо-серный белок (Р 430).

Реакционные центры фотосистемы II:

Хлорофилл «680» ——→ Феофитин ——→ Пластохинон.

Наиболее достоверны данные, полученные для реакционных центров фотосинтезирующих бактерий; для фотосистемы I первичным является перенос электрона между разными формами хлорофилла; для фотосис-

темы II времена переноса электрона пока не измерены. Механизмы переноса электрона в реакционных центрах бактериальных и растительных клеток рассмотрены в недавних обзорах[9].

Эффективное преобразование световой энергии в реакционных центрах связано с особенностями структурной организации пигментно-белкового комплекса. Так, например, недавно рассмотрена гипотетическая ориентация молекул хлорофилла в реакционном центре первой фотосистемы[10].

Благодаря специфической молекулярной организации фотосистем и цепи переноса электрона, а также их особому расположению в мембранах хлоропластов и хроматофорах, образующиеся активные окислители и восстановители пространственно разобщены. В настоящее время распространена теория Митчелла, в которой постулируется анизотропное расположение цепи переноса электрона в мембранах и непроницаемость мембраны для ионов водорода.

Пути использования энергии разделенных зарядов

В реакционных центрах происходит первичное преобразование энергии квантов света в энергию разделенных зарядов с квантовым выходом, близким к единице, и с коэффициентом полезного действия, вероятно, достигающим 60—80%. Однако в самом конце метаболической цепи, где образуются конечные продукты фотосинтеза, максимальный к. п. д., по-видимому, не превышает 2—3%. Таким образом, на долгом пути от стадии разделения зарядов до накопления конечных энергозапасающих продуктов теряется весьма значительное количество энергии, первично поглощенной хлорофиллом.

До сих пор не ясны причины этих потерь, которые связаны не только с работой биохимического механизма цепи переноса электрона, но и со всем метаболизмом фотосинтезирующей клетки. Возникает вопрос, нельзя ли с большей эффективностью и с помощью более коротких метаболических путей использовать энергию разделения зарядов для восстановления углекислоты, ионов водорода или молекулярного азота, а также для окисления воды и других органических и неорганических доноров электрона. При решении этой проблемы особенно важно предотвратить обратные реакции активных промежуточных продуктов путем их разделения с помощью биологических мембран и структур, разделяющих носители электрона, а также обеспечивающих транслокацию протона и последующий синтез АТФ.

Как уже говорилось, эффективному разделению зарядов в реакционных центрах способствует специфическая молекулярная организация этих структур. В некоторых случаях разделение конечных продуктов реакции осуществляется с помощью специализированных органелл растительной клетки: так, например, у синезеленых водорослей вегетативные клетки продуцируют кислород, НАДФН и АТФ, а гетероцисты, работающие в анаэробном микроокружении, содержат нитрогеназу, которая восстанавливает молекулярный азот до аммиака.

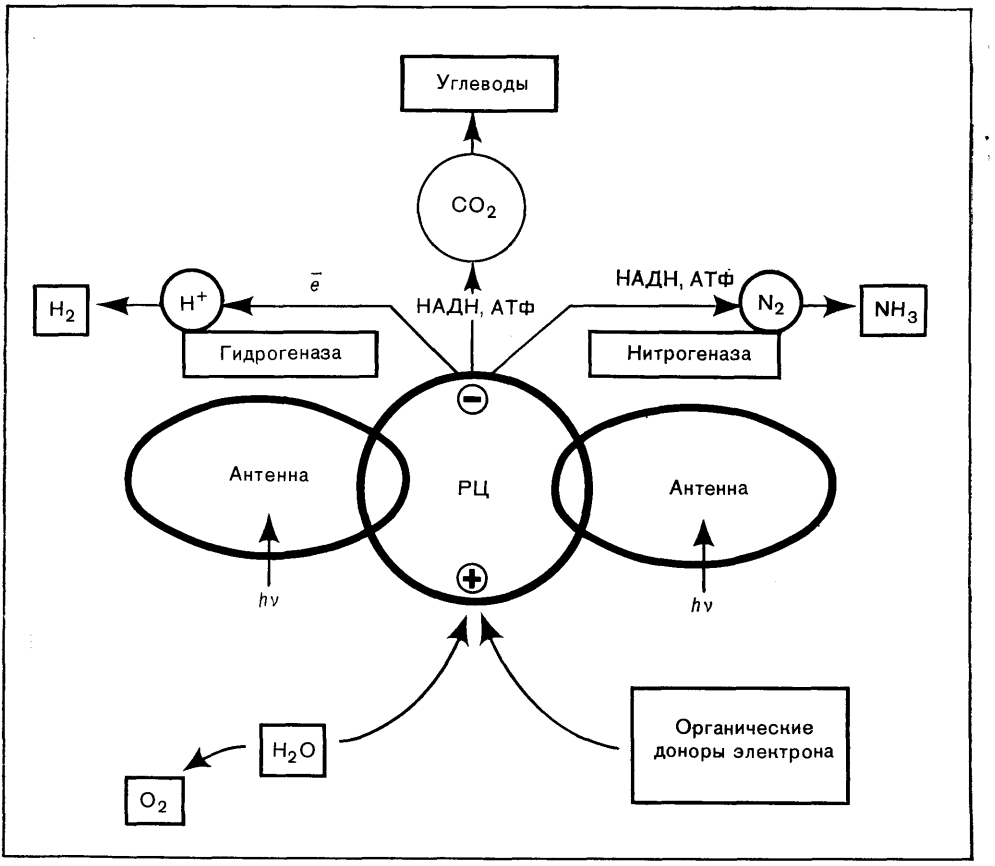
На схеме 3 крайне упрощенно изображены фотопроцессы, лежащие в основе реальных метаболических цепей, которые определяют возможности использования фотосинтезирующих клеток для реализации различ-

[9] См.: *Шувалов В. А., Красновский А. А.*— Биофизика, 1981, т. 26, № 3, с. 544—557; *Климов В. В., Красновский А. А.*— Там же, 1982, т. 27, с. 179—189.

[10] См.: *Карапетян Н. В., Шубин В. В. и др.* Тезисы 16-й конференции ФЕБО. М., 1984, с. 248.

Схема 3

Упрощенная схема переноса электрона в фотосинтезирующих организмах



ных биотехнологий. Каждое звено этой схемы является предметом исследования многих лабораторий в различных странах.

Процесс начинается с поглощения квантов солнечного излучения молекулами пигмента антенны и миграцией энергии возбуждения к реакционному центру. Здесь многое неясно. Почему так малы потери при отводе поглощенной энергии от всей массы хлорофилла антенны к небольшому числу его молекул в реакционных центрах? Какова молекулярная организация этого высокоэффективного физического трансформатора солнечной энергии?

Но вот энергия возбуждения достигла реакционного центра. Мгновенно, за пикосекунды, электрон с димера хлорофилла переносится к феофитину и далее к хинонам: здесь разделенные заряды — «дырки» на хлорофилле и электроны на убихиноне — стабилизируются на время, которое на много порядков превышает длительность первичных процессов переноса электрона.

Как устроена эта преобразующая структура? Как идет ее биосинтез и смена «запасных частей» Как она сопряжена в пространстве и во времени с работой цепи переноса электрона? Совсем недавно удалось «закристаллизовать» изолированные реакционные центры фотосинтезирующих бактерий[11], что позволяет использовать дифракционные методы

[11] См: *Michel H.*— Journ. Mol. Biol. 1982, N 158, p. 567—572.

для раскрытия молекулярного строения этого сложного пигмент-белково-липидного образования.

Далее, после эффективного разделения зарядов в реакционном центре электрон движется по цепи переносчиков, достигая в большинстве случаев ферредоксина. Это активный восстановитель с потенциалом, близким к потенциалу водородного электрода. Что касается движения электрона от донора к «дырке», здесь наиболее важны до сих пор не расшифрованные механизмы восприятия электронов от молекул воды, которое приводит в результате к образованию молекулярного кислорода. Здесь участвуют связанные с белками соединения марганца, но промежуточные стадии этого процесса пока не ясны.

В принципе существует возможность съема энергии разделенных зарядов в виде электрического тока, то есть превращения реакционного центра в фотоэлектрическое устройство; однако эволюция привела к использованию электрона и «дырки» в биохимическом метаболизме, потенциальная эффективность которого весьма велика.

Вернемся к восстановительной ветви пути переноса электрона. Её роль определяется необходимостью конечного восстановления наиболее «окисленных» соединений — углекислоты, молекулярного азота, ионов водорода с использованием восстановленных продуктов в разнообразных метаболических цепях. Возникает практический вопрос: нельзя ли «укоротить» углеродный цикл и этим уменьшить неизбежные потери, возникающие на многочисленных промежуточных стадиях процесса? Можно ли ограничиться восстановлением углекислоты (минуя углеродный цикл) до формальдегида или даже до метана?

Ассимиляты бобовых растений, спускаясь к корням, обеспечивают энергией восстановление азота у симбионтов — клубеньковых бактерий. Однако более эффективно прямое использование ферредоксина и АТФ с участием фермента нитрогеназы для восстановления молекулярного азота, что реализуется у синезеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий.

Выделение водорода одноклеточными водорослями в анаэробных условиях происходит за счет органических продуктов фотосинтеза. Более короткий путь — направить электроны через ферредоксин непосредственно к ионам водорода; в присутствии катализатора — гидрогеназы — наблюдается выделение водорода изолированными хлоропластами, наиболее эффективное в анаэробных условиях с использованием первой фотосистемы и доноров электрона, отличных от воды. Описано большое количество систем, ведущих к фотообразованию водорода [12].

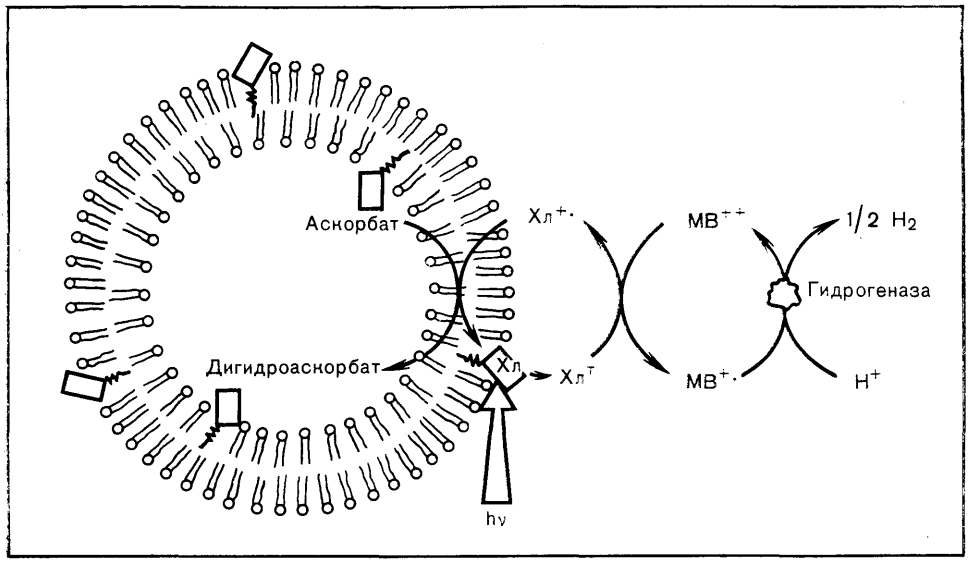
Моделирование фотосинтетических систем

Внимание исследователей привлекает применение принципов фотосинтеза для построения искусственных фотосистем. Следует отметить возможность достижения здесь значительно большего коэффициента преобразования энергии квантов солнечного света в потенциальную химическую энергию, чем максимальный к. п. д. фотосинтеза растений. Для построения искусственных фотосистем в качестве фоторецепторов используется хлорофилл и другие пигменты, изолированные клеточные структуры, содержащие пигменты, а также выделенные из клеток ферментные системы. Конструируемая энергопреобразующая си-

[12] См., например: Topics in photosynthesis. V. 3. Ed. J. Barber. Elsevier, Amsterdam, 1979.

Схема 4

Фотообразование водорода в хлорофиллсодержащих липосомах



стема должна содержать три основных блока: фотохимическую систему разделения зарядов, медиаторы, переносящие электрон к ферментам, и наконец,— ферментную систему, способную использовать мобилизованный электрон (или «дырку») для получения устойчивых фотопродуктов, запасающих энергию квантов солнечного излучения.

Для разделения фотохимически образующихся активных продуктов (активных окислителей и восстановителей) весьма перспективно создание искусственных мембран.

Так, например, в нашей лаборатории для моделирования отдельных стадий фотопереноса электрона применяются липосомы, содержащие в мембранах хлорофилл А или феофитин А (схема 4). Показано, что в суспензии таких липосом идет фотовосстановление метилвиологена, а затем фотообразование водорода при трансмембранном переносе электрона от аскорбата, находящегося во внутреннем пространстве липосом [13].

Существенно, что эти реакции не наблюдаются, если донор и акцептор электрона не разделены мембраной. Конечно, целью подобных исследований не должно быть слепое копирование фотосинтетического аппарата растений. Весьма вероятно конструирование эффективных систем, более простых, чем биологические.

Фотохимические процессы в растениях удается моделировать и с помощью неорганических полупроводников, таких как двуокись титана, окись цинка, сульфид кадмия, вольфрамовая кислота и др. В отличие от пигментов эти полупроводники могут играть двоякую роль: фотосенсибилизаторов, преобразующих энергию света с разделением зарядов, и катализаторов, на поверхности которых происходит рекомбинация первичных продуктов.

В нашей лаборатории еще в 1961 г. было показано фотовыделение кислорода в водных суспензиях окиси цинка, двуокиси титана, вольфрамовой кислоты в присутствии феррицианида калия или железоаммиачных квасцов. Двуокись титана и

[13] См.: *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.*— Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 2, с. 469—472.

окись цинка сенсибилизируют также фотовосстановление метилвиологена, обладающего электродным потенциалом — 0,44 В. При введении в суспензию названных полупроводников катализатора — бактериальной гидрогеназы — в анаэробных условиях наблюдается фотообразование молекулярного водорода. Метилвиологен и органические доноры электрона активируют этот процесс. Недавно осуществлено фотообразование водорода двуокисью титана без гидрогеназы или при использовании органических доноров электрона: трис-(оксиметил)-амина, триэтаноламина, глюкозы, глицерина, этанола и др.[14] В этом случае в суспензии генерируется восстановительный потенциал, достигающий — 0,8 В. Сульфид кадмия сенсибилизирует фотообразование водорода только в присутствии гидрогеназы и доноров электрона[15]. Элементарный механизм подобных реакций можно представить следующим образом. При возбуждении полупроводника светом происходит разделение зарядов. «Дырки» окисляют молекулы воды или присутствующие доноры электрона, электроны же можно использовать для восстановления феррицианида, метилвиологена или ионов водорода — до молекулярного водорода в присутствии гидрогеназы[16].

В настоящее время в ряде лабораторий изучаются фотоэлектрохимические процессы с участием хлорофилла и других пигментов, при которых продукты, запасающие энергию света, не накапливаются, а электроны и «дырки» взаимодействуют с инертными электродами, образуя на них разность потенциалов[17].

Направленный фотосинтез необходимых продуктов

Биосинтез белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов происходит во всех растениях за счет солнечной энергии; проблема заключается в том, чтобы направить эти процессы на получение необходимых человеку продуктов. Заманчиво добиться синтеза полноценных пищевых белков в растениях, минуя вторичную переработку последних в организме животных. Возможен также преимущественный синтез липидов или углеводородов для энергетических целей.

Все описанные процессы можно оптимизировать, используя общепринятый арсенал методов (поиск мутантов, способных осуществлять тот или иной синтез, применение техники генной инженерии для введения в растительные клетки генов, наделяющих их способностью к фиксации азота, выделению водорода, синтезу желаемых соединений и т. д.).

Среди ряда направлений в данной области внимание исследователей привлекает проблема фотовыделения водорода растительными клетками. В 1942 г. Г. Гаффрон (США) обнаружил, что одноклеточные водоросли в анаэробных условиях теряют способность выделять кислород и вместо него выделяют газообразный водород. Исследования показали, что процесс идет с участием фермента гидрогеназы и тесно связан с углеродным обменом фотосинтезирующей клетки. Данной проблеме посвящено большое число работ; сейчас продолжается поиск наиболее рациональных путей фотосинтетического образования водорода. Здесь возможно сочетание фотосинтезирующих клеток со специализированными микроорганизмами, перерабатывающими органическое вещество с выделением водорода или метана, или даже использование изолированных хлоропластов, кото-

[14] См.: *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.*— Докл. АН СССР, 1981, т. 256, № 5, с. 1249—1253.

[15] См.: *Красновский А. А., Брин Г. П., Луганская А. Н., Никандров В. В.*— Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 4, с. 896—899.

[16] См.: *Красновский А. А.* Тезисы 16-й конференции ФЕБО. М., 1984, с. 52.

[17] См.: Photochemical conversions. Symposium UNESCO. A. M. Braun (ed.). Lauzanne, Press Polytechniques Romandes, 1983.

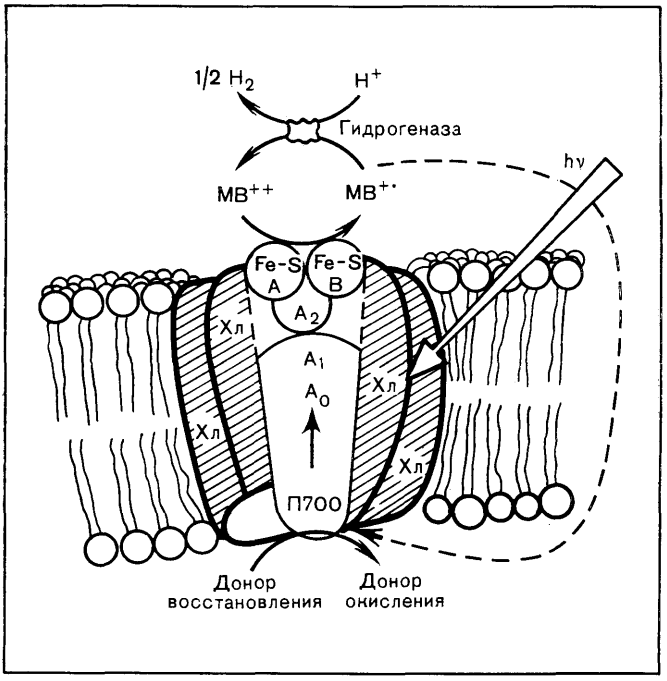
рые под действием света в присутствии бактериальной гидрогеназы также выделяют водород [18].

В нашей лаборатории исследовалось фотовыделение водорода хлоропластами и солюбилизированным хлорофиллом в присутствии препарата гидрогеназы из клостридий (схема 5). В частности, при использовании комбинации доноров электрона (дитиотреитол и аскорбат) в анаэробных условиях без повреждения хлоропластов наблюдалось фотовыделение водорода хлоропластами со скоростью до 500 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час [19].

Наряду с этим все больший интерес вызывают возможности рационального использования конечной продукции фотосинтеза — биомассы (стебли, листья и корни растений, древесина, различные отходы, содер-

Схема 5

Фотообразование водорода хлоропластами



жащие целлюлозу). Основные пути утилизации растительной биомассы связаны с ее переработкой в пищевые и технические продукты. Использование биомассы и органических отходов для этих целей, а также для получения энергии — в значительной степени микробиологическая проблема. Здесь важная стадия — химическая или энзиматическая переработка целлюлозы для получения глюкозы и последующего микробиологического синтеза белка, а также получения спиртов или горючих газов — метана и водорода. Поиск наиболее рациональных методов сбора и переработки растительного сырья и отходов органического вещества — сложнейшая технологическая и экономическая проблема. Можно предполагать, что ее

[18] См.: *Krasnovsky A. A.*— In: Topics in photosynthesis. V. 3. Ed. J. Barber. Elsevier, Amsterdam, 1979, p. 281—298; *Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981.

[19] См.: *Красновский А. А., Чан-ван-ни, Никандров В. В., Брин Г. П.*— Молек. биол., 1980, т. 14, № 2, с. 287—298.

успешное решение позволит удовлетворить часть кормовых потребностей животноводства и энергетических нужд сельского хозяйства.

Возможные пути увеличения производства самой биомассы связаны с селекцией растений, эффективно преобразующих солнечную энергию в материал листьев, стеблей и т. д. В целом же наиболее важной остается глобальная проблема всемерного повышения коэффициента использования солнечной энергии культурными растениями. Ее решение требует обширного комплекса исследований по физиологии растений и агротехнике, а также изучения механизмов регуляции фотосинтетической деятельности растительных организмов и их продуктивности [20].

На основе фундаментальных исследований фотосинтетических процессов можно надеяться на решение следующих прикладных задач:

конструирование непрерывных фотобиохимических систем, использующих весь спектр солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, с предельным практически достижимым к. п. д. (до 30%);

создание с помощью методов генной инженерии фотобиотехнических систем, способных к направленному синтезу разнообразных соединений (углеводородов, белков, липидов, различных биологически активных соединений);

реализация фотобиотехнических систем для образования водорода или восстановления молекулярного азота;

широкое развитие фотобионики, то есть создание искусственных систем, преобразующих и запасающих солнечную энергию, в том числе осуществляющих фотолиз воды на водород и кислород с использованием ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области солнечного спектра;

создание осветительных устройств с использованием принципов и механизмов биолюминесценции за счет солнечной энергии, запасаемой в продуктах фотосинтеза.

Развитие человеческого общества неизбежно потребует более полного овладения солнечной энергией, поэтому познание природы фотосинтеза растений останется одной из наиболее актуальных и практически значимых фундаментальных проблем биологии.

Выступая в ходе обсуждения научного сообщения, член-корреспондент АН СССР **А. Е. Шилов** остановился на проблеме химического моделирования процессов фотосинтеза. Пионером этого направления в СССР является коллектив, возглавляемый А. А. Красновским. В Институте химической физики (ИХФ) АН СССР также ведутся работы в данной области. За последние годы здесь удалось создать химическую модель фотосистемы I, где используются доноры электронов, более эффективные, чем вода, а продуктом является молекулярный водород с высоким квантовым выходом. Реализована и фотосистема II, с квантовым выходом выделения кислорода в десятки процентов. Создание химической модели реального процесса фотосинтеза в целом требует объединения двух фотосистем. Для этого необходимо использование тех или иных мембран, например, фосфолипидных, так как иначе происходит обратный перенос электронов, а следовательно, потеря энергии. В области применения мембран достигнуты важные результаты в ИХФ и в Институте катализа СО АН СССР (работы члена-корреспондента АН СССР К. И. Замараева). Создано несколько систем с квантовым выходом переноса электронов через мембрану 10—15%, тогда как совсем недавно этот показатель составлял лишь тысячные доли процента.

Член-корреспондент АН СССР **Р. П. Евстигнеева** обратила внимание на то, что изучение механизма действия реакционных центров хлоропластов связано с более широкой проблемой исследования всего класса порфиринов. Многие соединения этого класса могут быть использованы в качестве биологических катализаторов

[20] См.: Физиология фотосинтеза. Отв. ред. А. А. Ничипорович. М.: Наука, 1982.

целого ряда практически важных химических процессов, а также в медицине, в частности, для лечения раковых опухолей.

А. Ю. Борисов (Московский университет) отметил большие успехи, достигнутые в установлении трехмерной молекулярной структуры реакционных центров фотобактерий, причем важную роль здесь сыграли работы отечественных ученых. Реакционный центр есть не что иное, как особого рода молекулярный генератор, преобразующий солнечную энергию в химическую, а на промежуточных этапах — в электрическую. Сейчас основные принципы его действия изучены настолько, что есть все предпосылки для развертывания работ по химическому моделированию этой системы с перспективой ее практического использования для получения электрической энергии.

Успехи, достигнутые в раскрытии механизма начальных стадий фотосинтеза, во многом определяются исследованиями фототрофных микроорганизмов, имеющих более простой, чем у растений, фотосинтезирующий аппарат, сказала член-корреспондент АН СССР **Е. Н. Кондратьева.** Важно и то, что существуют микроорганизмы (галобактерии) с совершенно особым типом фотосинтеза, при котором солнечная энергия утилизуется не с помощью хлорофилла, а посредством каротиноид-белкового комплекса. В связи с этим можно предположить существование в природе и других, еще не обнаруженных фототрофных микроорганизмов с особыми формами фотосинтеза.

Дальнейшие исследования известных сейчас фототрофных микроорганизмов могут привести к таким практически значимым результатам, как создание микробиологического процесса связывания атмосферного азота до аммиака за счет солнечной энергии, процессов синтеза молекулярного водорода, глицерина, сахаров и некоторых других веществ с участием фототрофов, а также с использованием получающейся биомассы в животноводстве.

Как подчеркнул член-корреспондент АН СССР **А. А. Ничипорович,** процесс фотосинтеза является единственным первичным источником как органических ископаемых, так и всей биомассы планеты. За время своего существования фототрофные организмы перевели в состав органического вещества огромное количество водорода, воды и двуокиси углерода первичной атмосферы, насытив атмосферу кислородом, а почву гумусом. На этой основе впоследствии сложился уравновешенный круговорот с участием разнообразных гетеротрофных организмов. Таким образом, в результате жизнедеятельности растений состав атмосферы и почвы изменился весьма сильно по сравнению с начальным, который для самих же растений был оптимален. Именно этим прежде всего объясняется тот факт, что реальная продуктивность современных растений, в том числе всех культурных растений, значительно ниже потенциальной.

На повышение эффективности фотосинтетической деятельности растений и должны быть направлены основные усилия исследователей, работающих в данной области.

Проблема использования солнечной энергии, сказал академик **М. А. Марков,** это не только биологическая, и не только химическая, но и физическая проблема. Если заглядывать не в ближайшее будущее, а несколько дальше, то более перспективным путем развития, видимо, следует признать все же не ядерную, а солнечную энергетику, хотя сейчас рентабельность соответствующих устройств недостаточна. Несомненно, эта важнейшая проблема требует значительно большего внимания. В частности, было бы целесообразно заслушать на Президиуме АН СССР научное сообщение о возможностях и перспективах физических методов использования энергии Солнца. В более широком плане, возможно, следует подумать о создании комплексной программы фундаментальных и прикладных исследований в данной области, объединяющей усилия биологов, химиков и физиков.

Завершая обсуждение, вице-президент АН СССР академик **В. А. Котельников** отметил глобальное значение вопросов, поднятых в научном сообщении А. А. Красновского, и поблагодарил его за интересное и актуальное выступление.

УДК 541.144.7

ПУТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

А. А. Красновский

Вся жизнь на Земле и существование человечества основаны на способности зеленых растений к усвоению и запасанию солнечной энергии. Фотосинтез растений обеспечивает организмы пищей и кислородом. Установлено, что современная кислородная атмосфера Земли образовалась в результате фотосинтетической деятельности растений.

В настоящее время энергетические потребности человечества на 95% удовлетворяются сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза (угля, нефти, газа) и лишь около 5% — атомными и гидроэлектростанциями. По некоторым прогнозам и в 2000 г. до 80% потребности человечества в энергии будут по-прежнему удовлетворяться за счет сжигания продуктов фотосинтеза [1]. К этому надо добавить, что значительная часть промышленного сырья и строительных материалов также имеет фотосинтетическое происхождение.

Трудно прогнозировать сроки технического овладения термоядерной энергией, которая, как надеются, обеспечит грядущие энергетические потребности человеческого общества. Поэтому нет сомнений в том, что зависимость человечества от преобразования солнечной энергии растениями сохранится на долгие годы.

§ 1. ЭНЕРГЕТИКА ФОТОСИНТЕЗА

Как уже отмечалось [38], в основе использования солнечной энергии растениями лежит реакция образования кислорода и углеводов из воды и углекислоты:

$$H_2O + CO_2 = 1/6C_6H_{12}O_6 + O_2.$$

120 ккал, откуда следует, что реакцию фотосинтеза можно осуществить, лишь подводя энергию извне. Поэтому из воды и углекислоты в принципе нельзя получить кислород и углеводы путем обычных каталитических реакций, тогда как обратный, термодинамически самопроизвольный процесс — окисление сахаров кислородом — протекает в организмах при дыхании с использованием разнообразных ферментов-биокатализаторов.

Хлорофилл и другие пигменты растений служат той антенной, которая улавливает излучение солнца и преобразует его в химическую энергию продуктов фотосинтеза. При энергии Эйнштейна (мол. квантов) красного света в максимуме поглощения хлорофилла (680 нм) около 40 ккал для компенсации дефицита свободной энергии реакции фотосинтеза требуется минимум 3 кванта (120 : 40) красного света на молекулу выделяющегося кислорода или ассимилируемой углекислоты. Измерение квантового расхода фотосинтеза одноклеточных водорослей в оптимальных условиях показало, что на молекулу усваиваемой углекислоты расходуется, по данным разных лабораторий, от 8 до 12 квантов. Если принять среднюю величину 10 квантов, то максимально достижимый к. п. д. фотосинтеза, т. е. преобразования поглощенной солнечной энергии в потенциальную химическую энергию, равен 30%. Остальные 70% энергии квантов солнечного света, поглощенного хлорофиллом, в конечном итоге преобразуется в тепло. Эта избыточная энергия, вероятно, расходуется на преодоление потенциальных барьеров промежуточных реакций, на обратные реакции активных фотопродуктов и, возможно, используется для других внутренних нужд зеленой клетки.

В спектре солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, коротковолновая граница при 300 нм определяется поглощением более коротковолнового ультрафиолетового излучения слоем озона в верхних слоях атмосферы (рис. 1). Приблизительно половина энергии солнечного излучения лежит в видимой области спектра — это фотосинтетически активная радиация (ФАР). Другая половина солнечного излучения лежит в инфракрасной области спектра и не используется растениями для фотосинтеза. Следует, однако, отметить, что существуют фотосинтезирующие бактерии, содержащие бактериохлорофилл *b*, которые могут использовать инфракрасное излучение с длиной волны до 1 мкм, но их распространение незначительно. Таким образом, лишь половина всей энергии солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, представляет собой фотосинтетически активную радиацию. Отсюда следует, что макси-

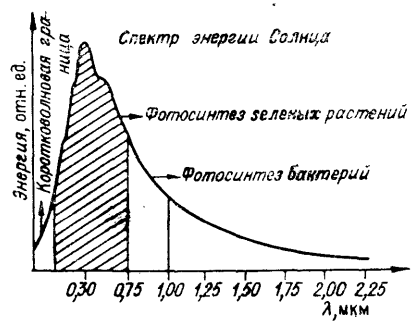


Рис. 1. Схема распределения энергии в солнечном спектре, достигающем поверхности Земли.

[illegible] составляют не более 15%.

Возникает вопрос, как в действительности используется солнечное излучение поверхностью нашей планеты? Грубые подсчеты показывают, что не более 0,1% солнечной радиации, падающей на поверхность Земли, используется для фотосинтеза растениями суши и планктоном океана. Но и эта величина в 10 раз превышает все энергетические затраты человечества (см. данные, приведенные в [38]).

Из общей продукции фотосинтеза на суше менее 1% потребляется в качестве пищи. Еще меньше полезное использование фотосинтетических продуктов океана — преимущественно это уловы рыбы, находящейся в самом конце биологической цепи, начальным звеном которой является фотосинтез фитопланктона. Использование первичной продукции фотосинтеза океанов не превышает сотых долей процента.

Основная масса органического вещества, производимого растениями,— целлюлоза. За год на Земле образуется до 10^{11} т целлюлозы, значительная часть которой расходуется в качестве топлива и строительных материалов. Однако главная масса фотосинтетически созданной целлюлозы вступает в биологический круговорот, вовлекаясь в различные процессы окисления и распада.

§ 2. ЭНЕРГОЕМКОСТЬ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Существуют громадные резервы для более интенсивного использования солнечной энергии при фотосинтезе суши и океана. Наиболее продуктивные растения (например, сахарный тростник) в среднем за год потребляют для фотосинтеза около 2% энергии попадающего на них солнечного излучения, а зерновые культуры — до 1%. По существу, повышение полезного использования солнечной энергии растениями и растительными сообществами — это главная проблема физиологии растений и агротехники.

Чтобы добиться высокой продуктивности культурных растений, необходимо полностью удовлетворить их потребности в воде и минеральных веществах, механизировать трудоемкие процессы, широко применять удобрения, гербициды и т. д. Иными словами, за высокие урожаи нужно расплачиваться быстро растущими энергетическими затратами, о чем свидетельствуют, например, следующие данные [2]:

Отрасли сельского хозяйства	Отношение запасаемой солнечной энергии к энергозатратам
Земледелие	
экстенсивное	20
интенсивное	2,0
Животноводство	0,2
Тепличное хозяйство	0,02

ты были незначительными. Современное интенсивное земледелие требует большого количества энергии для орошения, производства удобрений, работы тракторов и других сельскохозяйственных машин и механизмов и т. д. Следует также учитывать характер и степень использования возделываемых растений. Д. Холл [2] отмечает, что культура кукурузы в Англии, где почти вся биомасса растений идет на корм скоту, менее энергоемка, чем в США, где потребляется преимущественно зерно.

В тепличном хозяйстве затраты энергии намного превосходят фотосинтетическое использование солнечного излучения. Энергоемкость животноводства весьма велика, так как не более 10% химической энергии растительных кормов превращается в химическую энергию синтезируемых в организме животных мяса и жира.

Сто лет назад энергетические и пищевые нужды человечества покрывались преимущественно новообразованными продуктами фотосинтеза; отходы животноводства использовались в сельском хозяйстве, так как производство искусственных химических удобрений было ничтожным. Однако из-за недостаточной продуктивности сельское хозяйство не могло удовлетворить потребности быстро растущего населения в пище. Поэтому в развитых странах стал неизбежным переход к высокопродуктивному и крайне энергоемкому земледелию. По данным американских авторов [3], на одну калорию пищи в развитых странах затрачивается до 10 калорий энергии; сюда входят энергозатраты сельского хозяйства, энергия, необходимая для работы разнообразных механизмов, перерабатывающих его продукты, транспорта, для упаковки, хранения, работы системы снабжения и т. д.

Таким образом, пищевые продукты производятся в развитых странах путем расточительного расходования ископаемых продуктов фотосинтеза. В условиях, когда в сельском хозяйстве расходуется громадное количество горючего, необходимо внимательное технико-экономическое рассмотрение микробиологического пути получения белков из нефти, минуя традиционное ее использование в качестве топлива, характерное для современной агротехники. Недопустимо расточительно тратить топливные ресурсы Земли, созданные растениями за миллионы лет фотосинтеза для нужд лишь нескольких человеческих поколений. Нужно также считаться с опасностью увеличения концентрации углекислого газа в атмосфере при все возрастающих темпах сжигания органического топлива, что приводит к возрастанию так называемого «парникового эффекта» с непредсказуемыми экологическими последствиями.

§ 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА

Для снижения энергоемкости сельского хозяйства большое значение имеет проблема биологической фиксации азота. Ведь при выращивании высокоурожайных культурных растений только на производство азотных удобрений путем химической фиксации

Древние фотосинтезирующие организмы — прокариоты, фотосинтезирующие бактерии (в том числе цианобактерии или, как их обычно называют, синезеленые водоросли) — способны фиксировать молекулярный азот воздуха, используя химическую энергию продуктов фотосинтеза. Дальнейшая эволюция растений привела к специализации их функций, в результате чего высшие растения утратили способность к фотосинтетической фиксации азота. Поэтому культурные злаковые растения приходится снабжать химически связанным азотом, причем количество вносимых азотных удобрений достигает огромных величин; например, по имеющимся данным, в Голландии вносят под зерновые до 0,4—0,5 т азота на 1 га. Как известно, потребность в азоте у бобовых растений удовлетворяется их симбиозом с клубеньковыми бактериями, которые способны к гетеротрофной фиксации молекулярного азота. Этот процесс может быть весьма эффективным. Например, растения сои при избыточном снабжении углекислотой могут фиксировать до 0,4 т азота на 1 га. Возможный путь усвоения молекулярного азота растениями может быть достигнут при симбиозе зерновых культурных растений с бактериями-азотфиксаторами, которые были бы способны жить на корнях не только бобовых, но и злаковых растений. Исследования, которые ведутся в этом направлении, весьма перспективны. Обсуждается также возможность использовать методы генной инженерии для возвращения высшим растениям утраченной ими в процессе эволюции способности к фиксации молекулярного азота.

Чрезвычайно важная проблема — использование в сельском хозяйстве автотрофных фотосинтезирующих азотфиксаторов, таких как синезеленые водоросли, пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии. На рисовых полях Индии, Индонезии, Японии синезеленые водоросли дают значительную часть необходимого рису азота. Вероятно, на почвах средней полосы масштабы фотосинтетического связывания азота могут значительно возрасти при условии правильного подбора культур. Исследование механизма фиксации азота синезелеными водорослями и фототрофными бактериями позволит выяснить биохимические механизмы связи этого процесса с фотосинтезом. Известно, что восстанавливающая молекулярный азот энзиматическая система — нитрогеназа — использует органические продукты фотосинтеза в качестве доноров водорода и источника аденозинтрифосфата, однако проблема взаимосвязи процессов фотосинтеза и азотфиксации еще ждет своего решения.

§ 4. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ФОТОСИНТЕЗА

Не вызывает сомнения то, что познание механизмов фотосинтеза на молекулярном уровне позволит сознательно управлять их жизнедеятельностью. Каким же образом происходит процесс преобразования солнечной энергии растениями?

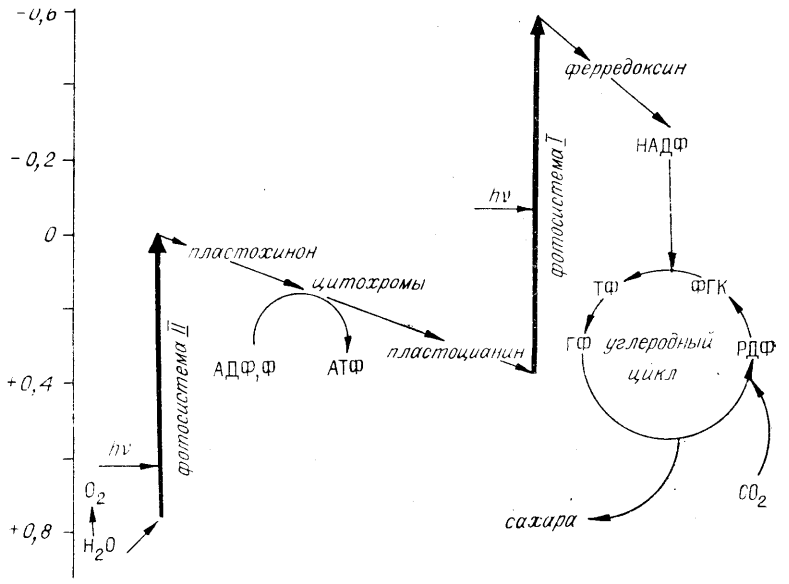
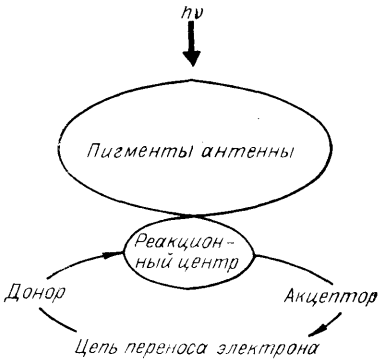


Рис. 2. Схема переноса электрона при фотосинтезе.

Наиболее характерные устройства фотосинтезирующей клетки — специальные органеллы, улавливающие солнечную энергию: хлоропласты у растений и хроматофоры у бактерий. В этих органах, обладающих мембранной структурой, сосредоточены хлорофилл и другие пигменты, улавливающие солнечное излучение, а также энзиматические системы, участвующие в темновых стадиях фотосинтетических реакций.

Процесс фотосинтеза у организмов, содержащих хлорофилл, можно разделить на две основные части: цепь фотосинтетического переноса электрона и углеродный цикл (рис. 2). В результате работы цепи фотосинтетического переноса электрона образуются восстановленные никотинамидадениндинуклеотидфосфаты (НАДФН или ЧАДН) и аденозинтрифосфат (АТФ) из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфора (Ф). НАДФН и АТФ поступают в углеродный цикл, функционирование которого не требует непосредственной световой активации. Как известно, механизм работы углеродного цикла фотосинтеза был расшифрован преимущественно путем применения углекислоты, меченной долгоживущим ^{14}C, еще в 50-х гг. нашего столетия. Согласно М. Калвину [4], поступающая в углеродный цикл углекислота связывается с акцептором — рибулезодифосфатом, затем образуется фосфоглицериновая кислота, которая, восстанавливаясь с помощью НАДФН, образует триозофосфат и далее гексозофосфат и углеводы, которые выходят из цикла. Часть промежуточных соединений путем сложных превращений возвращается в цикл и приводит к регенерации рибулезодифосфата.



Преобразование энергии света в химическую энергию происходит в цепи фотосинтетического переноса электрона, которая у фотосинтезирующих растений использует в качестве исходного донора водорода молекулы воды, что приводит к выделению молекулярного кислорода. Фототрофные бактерии используют в этом процессе органические или неорганические доноры водорода; их метаболизм протекает в большинстве случаев в анаэробных условиях, и они не способны к фотохимическому выделению кислорода воды.

Усилиями многих лабораторий во всем мире выявлена последовательность фотохимических и энзиматических реакций, при которых энергия кванта света используется дважды в различных участках цепи переноса электрона для последовательного поднятия электрона от уровня кислородного (0,8 В относительно НВЭ) до уровня водородного электрода (—0,42 В). От молекулы воды электрон за счет энергии света, поглощаемой пигментами так называемой второй фотосистемы, переносится к пластохинонам, а затем через цитохромы и пластоцианин поступает в фотосистему I, которая «поднимает» электрон до уровня ферредоксина, что обеспечивает возможность восстановления пиридиннуклеотидов (НАД и НАДФ). Все эти реакции сопряжены в мембранах хлоропластов. Тонкие методы разборки этих биологических структур, детергенты и изощренная техника разделения позволяют изолировать отдельные фотосистемы и исследовать их функции.

В каждой фотосистеме основная масса хлорофилла представляет собой улавливающую свет антенну; гораздо меньшая часть пигмента сосредоточена в реакционных центрах, непосредственно участвующих в цепи переноса электрона (рис. 3). Энергия света, поглощаемая хлорофиллами «антенны», мигрирует к реакционным центрам, где происходит первичный фотохимический процесс. Используя технику постепенной солюбилизации антенного хлорофилла с помощью детергентов, можно в ряде случаев выделить реакционные центры и изучить происходящие в них процессы. Именно реакционные центры — та структурная единица, в которой происходит первичное преобразование энергии света. В настоящее время наиболее изучены реакционные центры, впервые выделенные из фотосинтезирующих пурпурных бактерий [5]. В этих центрах содержатся бактериохлорофилл, его безмагниевый аналог бактериофеофитин, а также доноры и акцепторы электрона, смонтированные на белковых структурах. Существенно то, что квантовый выход первичного переноса электро-

Основными компонентами реакционных центров служат молекулы хлорофилла и феофитина, поэтому необходимо знать природу действия света на эти пигменты, иными словами, фотохимию хлорофилла и его аналогов.

§ 5. ФОТОХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА

В Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР в течение многих лет изучалась фотохимия хлорофилла и его аналогов: обратимые и необратимые превращения пигментов под действием света (см. обзоры [6, 7]). Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в синглетное возбужденное состояние, длительность которого составляет около 10^{-9} с. Из этого состояния с некоторой потерей энергии хлорофилл переходит в долгоживущее триплетное возбужденное состояние. Возбужденные (синглетные и триплетные) молекулы хлорофилла (Хл*) обладают повышенной реакционной способностью. Их взаимодействие с молекулой донора или акцептора электрона приводит к первичному фотохимическому процессу, при котором возбужденная молекула хлорофилла может либо отдать свой электрон акцептору (А), либо воспринять электрон от молекулы-донора (Д). В первичном процессе образуется пара ион-радикалов, катион- или анион-радикал хлорофилла и радикалы молекулы партнера:

$$\text{Хл}^* + \text{Д} \rightarrow \dot{\text{Хл}}^- + \cdot\text{Д}^+,$$

$$\text{Хл}^* + \text{А} \rightarrow \dot{\text{Хл}}^+ + \cdot\text{А}^-.$$

Эти реакции легко обратимы. Работами нашей лаборатории показано, что образующиеся промежуточные радикальные формы хлорофилла могут участвовать в процессе фотохимического переноса электрона. Сравнительное исследование фотохимических свойств хлорофилла и его безмагниевого аналога феофитина показало, что возбужденный хлорофилл обладает большей склонностью к отдаче электрона, а возбужденная молекула феофитина — к восприятию электрона (рис. 4). Таким образом, фундаментальное свойство возбужденных молекул хлорофилла и его аналогов к обратимому переносу электрона лежит в основе действия пигментов в реакционных центрах (см. обзор [8]).

Особым свойством хлорофилловых пигментов в триплетном возбужденном состоянии является эффективный перенос энергии к молекуле кислорода, которая при этом переходит в синглетное возбужденное состояние, сенсибилизированная люминесценция которого обнаружена в растворах [9].

По имеющимся данным, в состав реакционных центров у фотосинтезирующих пурпурных бактерий входят три субъединицы белка (каждая массой около 25 000), четыре молекулы бактериохлорофил-

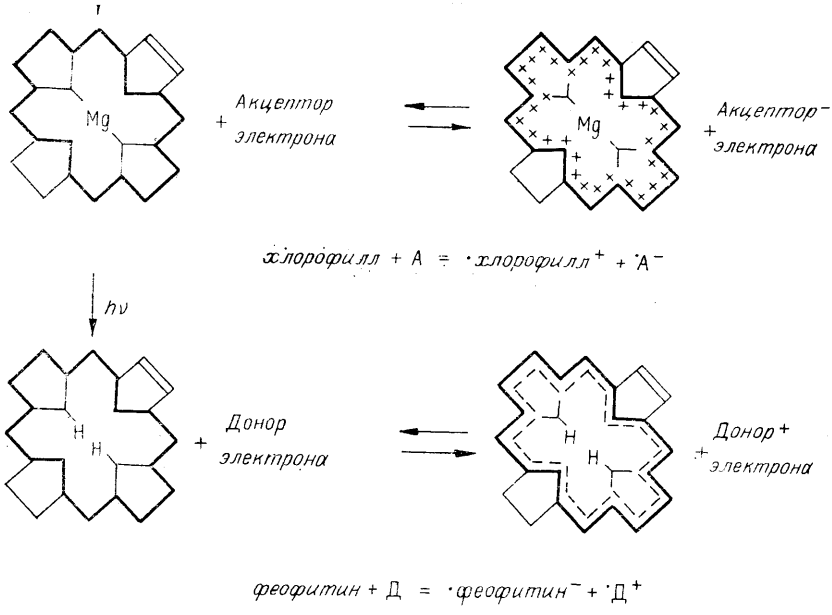


Рис. 4. Элементарные процессы фотоокисления и фотовосстановления хлорофилла и феофитина.

ла, две молекулы бактериофеофитина, один-два атома железа в комплексе с убихиноном. С помощью лазерной и импульсной спектроскопии удалось определить длительность элементарных актов переноса электрона в реакционном центре и установить последовательность разделения зарядов между молекулами бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона, входящих в состав реакционных центров бактерий [10—12]. При поглощении света происходит перенос электрона от димера бактериохлорофилла с максимумом поглощения 880 нм за время 10 пс к другой форме бактериохлорофилла с максимумом поглощения 800 нм [12]. Далее происходит перенос электрона к бактериофеофитину за время около 30 пс. В свою очередь электрон от восстановленной формы бактериохлорофилла воспринимается убихиноном за время около 200 пс. Эти элементарные процессы приводят к пространственному разделению зарядов между димером бактериохлорофилла (форма «880») и убихиноном с квантовым выходом около единицы. Состояние реакционного центра с разделенными зарядами обладает большой длительностью жизни — до 0,1 с и принимает непосредственное участие в цепи фотохимического переноса электрона. Вероятно, особенности пространственного расположения молекул бактериохлорофилла и бактериофеофитина в реакционных центрах благоприятствуют эффективному разделению зарядов.

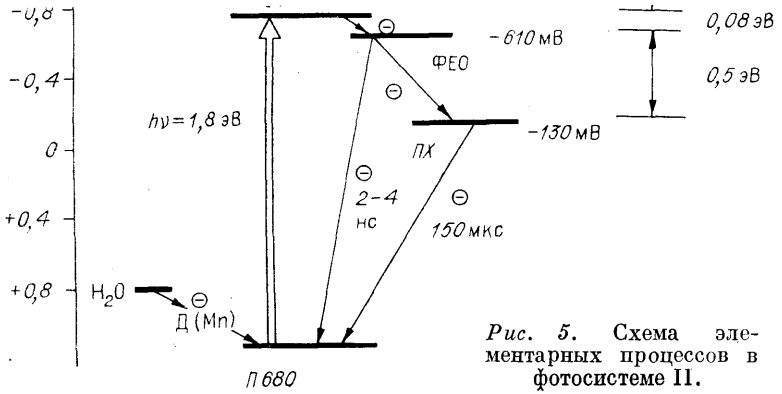


Рис. 5. Схема элементарных процессов в фотосистеме II.

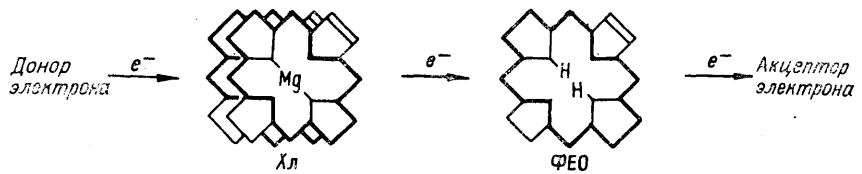


Рис. 6. Схема сопряженного действия хлорофилла и феофитина в фотосистемах.

Реакционные центры (РЦ) фотосистем I и II зеленых растений пока не выделены в достаточно чистом виде, хотя недавно в препаратах, обогащенных центрами фотосистемы II, удалось наблюдать фотохимический перенос электрона от хлорофилла к феофитину с образованием восстановленной формы этого пигмента (см. рис. 5 и [13, 14], а также обзор [15]). Таким образом, можно полагать, что система хлорофилл — феофитин является универсальным участником изображенного на рис. 6 эстафетного переноса электрона в реакционных центрах. Итак, последовательность переноса электрона в реакционных центрах, измеренная с помощью пикосекундных лазеров, можно резюмировать в виде следующей схемы [8, 15]:

Ц бактерий: Бактериохлорофилл-870 $\xrightarrow{<10\text{ пс}}$ Бактериохлорофилл-800 $\xrightarrow{30\text{ пс}}$ Бактериофеофитин $\xrightarrow{200\text{ пс}}$ Убихинон

РЦ фотосистемы I: Хлорофилл-700 $\xrightarrow{<40\text{ пс}}$ Хлорофилл-690 $\xrightarrow{200\text{ пс}}$ Р430

РЦ фотосистемы II: Хлорофилл-680 → Феофитин ⟶ Пластохинон

Наиболее достоверны данные, полученные для реакционных центров, выделенных из фотосинтезирующих бактерий; для фотосистемы I первичным является перенос электрона между разными формами хлорофилла [16]; для фотосистемы II времена переноса

Фотосистемы и цепь переноса электрона расположены в мембранах хлоропластов и хроматофорах так, что образующиеся активные окислители и восстановители пространственно разобщены. Это определяется спецификой молекулярной организации цепи переноса электрона в мембранах. В настоящее время распространена теория Митчела, которая постулирует анизотропное расположение цепи переноса электрона в мембранах и непроницаемость мембраны для ионов водорода. Вопросы, связанные с механизмом работы пигментированных мембран и путями трансформации энергии света в электрическую энергию, подробно рассмотрены В. П. Скулачевым [17].

§ 6. ПУТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ СОЛНЦА

Моделирование фотосинтеза. Внимание исследователей привлекает применение принципов фотосинтеза для построения искусственных фотосистем, использующих энергию солнечного излучения более эффективно, чем при фотосинтезе растений. При этом следует отметить отсутствие значительных термодинамических ограничений в процессе преобразования энергии квантов света в потенциальную химическую энергию с к. п. д., значительно превышающим максимальный к. п. д. фотосинтеза растений. Для построения таких искусственных систем в качестве фоторецепторов используются хлорофилл и другие пигменты, изолированные клеточные структуры, содержащие пигменты, а также выделенные из клеток ферментные системы. В нашей лаборатории, например, в 1975 г. была создана фотобиохимическая система, в которой происходит фотовыделение водорода в мицеллярных растворах детергентов, включающих хлорофилл, бактериальную гидрогеназу, доноры электрона и метилвиологен как переносчик электрона (рис. 7 и [18]). Взаимодействие возбужденного хлорофилла с метилвиологеном иллюстрируется так-

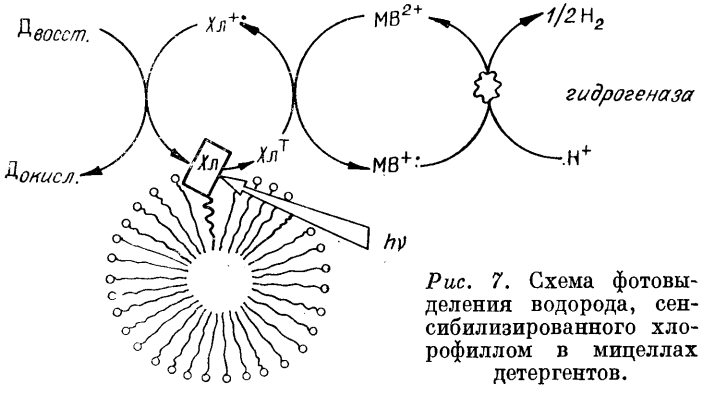


Рис. 7. Схема фотовыделения водорода, сенсибилизированного хлорофиллом в мицеллах детергентов.

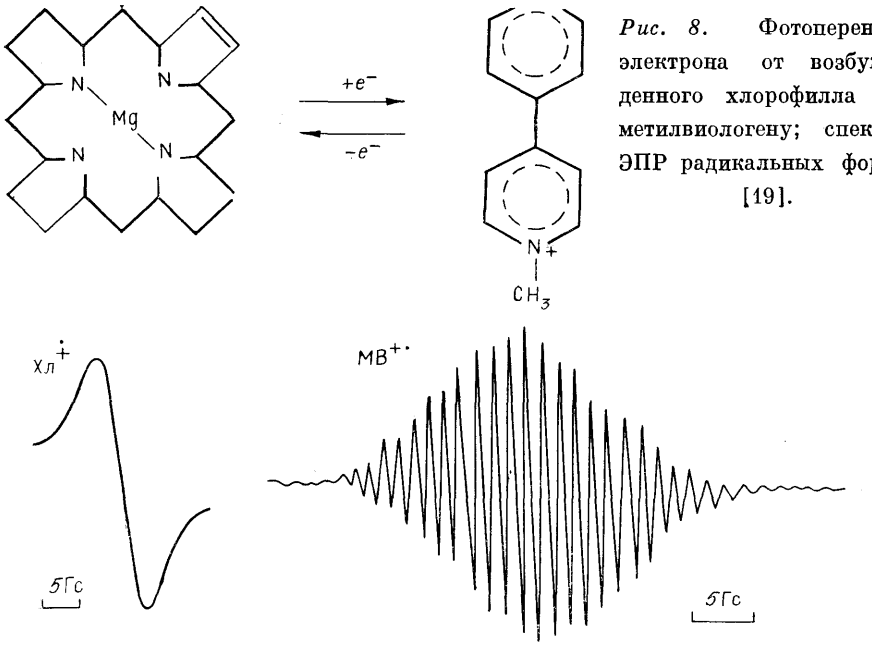


Рис. 8. Фотоперенос электрона от возбужденного хлорофилла к метилвиологену; спектр ЭПР радикальных форм [19].

же опытами с регистрацией сигналов ЭПР промежуточных радикальных форм (рис. 8 и [19]).

Фотохимические процессы, происходящие при фотосинтезе, удается моделировать с помощью неорганических полупроводников, таких как двуокись титана, окись цинка, сульфид кадмия, вольфрамовая кислота и др. В отличие от красителей неорганические полупроводники могут выполнять двоякую роль: фотосенсибилизаторов, преобразующих энергию света, и катализаторов, на поверхности которых происходит рекомбинация первичных продуктов. В нашей лаборатории еще в 1961 г. было показано фотовыделение кислорода в водных суспензиях окиси цинка, двуокиси титана, вольфрамовой кислоты в присутствии феррицианида калия или железоаммиачных квасцов [20—23]. Происхождение образующегося в этих системах кислорода из молекулы воды удалось показать в опытах с использованием $H_2{}^{18}O$ [24]. Двуокись титана и окись цинка сенсибилизируют также фотовосстановление метилвиологена, характеризующегося восстановительным потенциалом — 0,45 В относительно НВЭ [25]. При введении в суспензию двуокиси титана или окиси цинка бактериальной гидрогеназы в анаэробных условиях наблюдается фотообразование молекулярного водорода [26, 27]. Метилвиологен и органические доноры электрона активируют этот процесс.

Недавно на двуокиси титана было показано фотообразование водорода, происходящее в отсутствие гидрогеназы при использова-

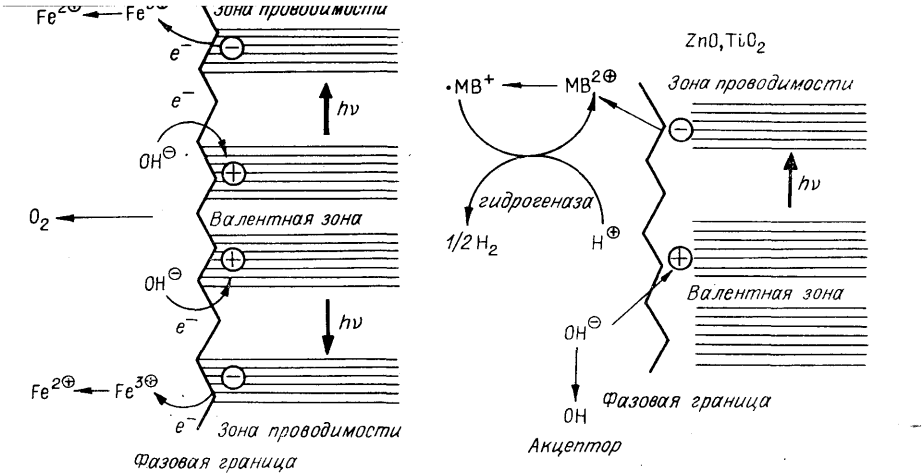


Рис. 9. Схема фотообразования кислорода и водорода на неорганических фотокатализаторах.

нии органических доноров электрона: трис-(оксиметил)-аминометана, триэтаноламина, этаноламина, глюкозы, глицерина, этанола и др. [27]. В этом случае, как установлено в опытах по сенсибилизированному фотовосстановлению метилвиологена, в суспензии двуокиси титана генерируется восстановительный потенциал, достигающий —0,8 В. Сульфид кадмия, поглощающий свет в более длинноволновом диапазоне, в отличие от двуокиси титана и окиси цинка сенсибилизирует фотообразование водорода только в присутствии гидрогеназы и доноров электрона [28].

Элементарный механизм осуществляемых неорганическими полупроводниками реакций можно представить следующим образом. При возбуждении полупроводника светом происходит разделение зарядов. Электронные вакансии (дырки) окисляют молекулы воды или присутствующие органические доноры электрона (рис. 9). Электроны используются для восстановления акцепторов электрона: феррицианида, метилвиологена или H^+ до H_2 в присутствии катализатора гидрогеназы. При использовании ряда органических доноров электрона на двуокиси титана генерируется восстановительный потенциал, достаточный для восстановления ионов решетки Ti^{4+} до Ti^{3+}, которые также, по-видимому, могут включаться в восстановление H^+ с образованием молекулярного водорода на поверхностных каталитических центрах.

В настоящее время интенсивно изучаются фотоэлектрохимические процессы с участием хлорофилла и других красителей, при которых не происходит накопления продуктов, запасающих энергию света, а электрон и «дырка» взаимодействуют с инертным электродом, приводя к образованию разности потенциалов. Японские авторы

опытов нашей лаборатории с водными суспензиями двуокиси титана и окиси цинка.

Весьма перспективное направление исследований связано с созданием искусственных мембран, способных к разделению фотохимически образующихся активных продуктов (активных окислителей и восстановителей). В нашей лаборатории для моделирования отдельных стадий фотосинтетического переноса электрона применяются липосомы (липидные везикулы — подробнее см. часть 2 сборника), содержащие в мембранах хлорофилл «*а*» или феофитин «*а*» (рис. 10). В суспензии таких липосом удалось показать фотовосстановление метилвиологена и фотообразование водорода, происходящие при трансмембранном переносе электрона от аскорбата, включенного во внутреннее пространство липосом [30]. Существенно, что эти реакции не наблюдаются в том случае, если донор электрона и акцептор электрона не разделены мембраной.

Понятно, что исследования такого рода не должны ставить своей целью слепое копирование фотосинтетического аппарата, возникшего у растений в процессе биологической эволюции. Весьма вероятно конструирование эффективных фотохимических систем, построенных более просто, чем биологические системы.

Изменение путей фотосинтетического метаболизма для направленного синтеза необходимых продуктов. Наибольшее внимание исследователей привлекают сегодня такие проблемы, как фотообразование водорода и фотоассимиляция молекулярного азота, повышение эффективности биосинтеза углеводородов (например, каучука) или липидов фотосинтезирующими организмами.

Гаффрон обнаружил в 1942 г., что одноклеточные водоросли в анаэробных условиях теряют способность выделять кислород и вместо него выделяют газообразный водород. Исследование механизма этого процесса показало, что выделение водорода происходит с участием фермента гидрогеназы и тесно связано с углеродным обменом фотосинтезирующей клетки (рис. 11). Этой проблеме посвящено большое число работ [31]. Остается неясным, в какой степени эффективность фотообразования водорода связана с использованием продуктов фотосинтеза внутри той же клетки и не будет ли более рациональным сочетание фотосинтезирующих организмов со специализированными микроорганизмами, перерабатывающими органическое вещество с выделением водорода или метана. Для фотосинтетического выделения водорода могут быть использованы не только клетки водорослей, но и изолированные хлоропласты, освещение которых в присутствии гидрогеназы, выделенной из бактерий, также ведет к выделению водорода [32]. Изолированные хлоропласты без экзогенной гидрогеназы способны к фотообразованию и фотопоглощению водорода в зависимости от степени инактивации кислородовыделяющей системы [33, 34]. В нашей лаборатории проводилось сравнительное исследование фотовыделения водорода хлоропластами и солюбилизированным хлорофиллом в присутствии препарата

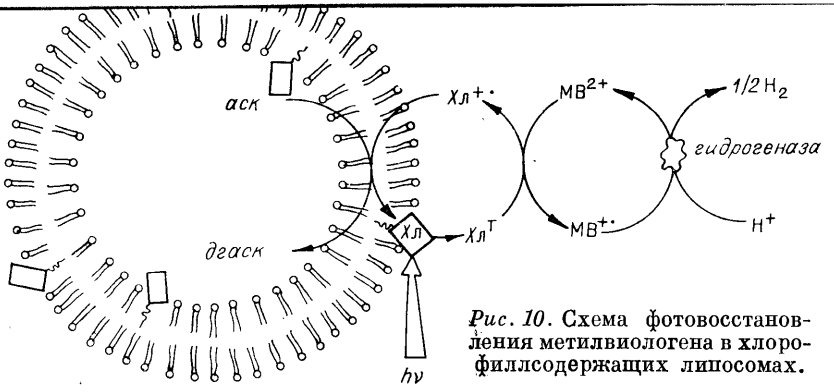
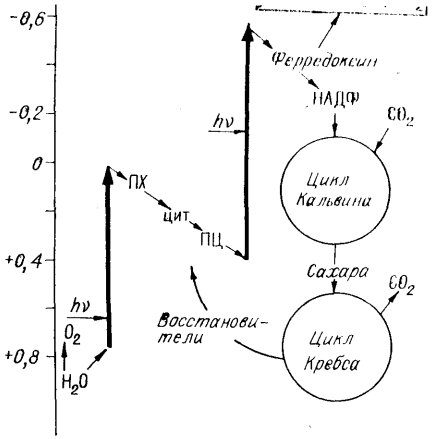


Рис. 10. Схема фотовосстановления метилвиологена в хлорофиллсодержащих липосомах.

гидрогеназы из Клостридиум бутирикум. Предполагается, что фотовыделение водорода хлоропластами в отсутствие экзогенных доноров электрона, а также при использовании необратимо окисляющихся дитиотреитола и цистеина лимитируется циклическим транспортом электронов через метилвиологен, замыкающим ветвь переноса электронов в фотосистеме I [35]. Эффективность фотовыделения водорода хлоропластами с аскорбатом и НАДФН лимитируется обратной реакцией между восстановленным на свету метилвиологеном и окисленным донором электронов. Использование комбинации доноров электронов (дитиотреитол и аскорбат) при создании анаэробных условий без повреждения хлоропластов позволяет предотвратить расходование восстановленного метилвиологена на восстановление окисленного донора электрона и исключить замыкание переноса электрона. В этих условиях наблюдалось фотовыделение водорода хлоропластами со скоростью 350—400 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час [36]. Обзор работ нашей лаборатории по фотовыделению водорода в фотосинтетических и искусственных системах недавно опубликован [37].

Использование биомассы растений. Чрезвычайно важна проблема рационального использования растительной биомассы, в том числе стеблей, листьев, корней растений и громадного количеств древесных отходов, содержащих целлюлозу. Основные пути утилизации растительной биомассы связаны с ее переработкой в пищевые и технические продукты. Переработка и утилизация биомассы растений (в основном целлюлозы), образующейся при фотосинтезе, и органических отходов для пищевых и энергетических целей — в значительной степени микробиологическая проблема. Здесь важная стадия — химическая или энзиматическая переработка целлюлозы для последующего микробиологического синтеза белка, получения спиртов или горючих газов — метана и водорода (рис. 12). Можно предполагать, что усовершенствование технологии сбора и переработки растительной биомассы позволит удовлетворить часть кормо-



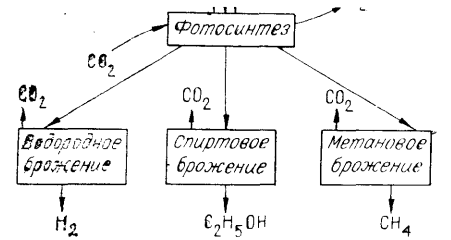


Рис. 12. Возможные пути переработки биомассы, образующейся при фотосинтезе.

Рис. 11. Гипотетическая схема фотообразования водорода одноклеточными водорослями (по Гаффрону).

вых потребностей животноводства и энергетических нужд сельского хозяйства. Возможный путь увеличения биомассы связан с селекцией растений, эффективно преобразующих солнечную энергию, с тем, чтобы суммарная биомасса — листья, стебли, корни — могла использоваться для энергетических целей. Поиски оптимальных путей использования биомассы растений тесно связаны с необходимостью решать сложнейшие технологические и экономические вопросы, с выявлением наиболее рациональных методов сбора и переработки растительного сырья и отходов органического вещества.

Наиболее важной остается глобальная проблема повышения использования солнечной энергии культурными растениями и понижения энергозатрат, связанных со сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза. Эта проблема требует обширного комплекса исследований по физиологии и агротехнике, с ней тесно связано изучение механизмов регуляции фотосинтетической деятельности растений и их продуктивности.

Развитие человеческого общества неизбежно потребует более лного овладения солнечной энергией, и трудно сомневаться в том, что биологический путь ее использования останется важнейшим на долгие годы, причем и в обозримом будущем фотосинтез растений по-прежнему будет служить единственным источником пищи и атмосферного кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Семенов Н. Н.** Об энергетике будущего.— Наука и жизнь, 1972, № 10; № 11, с. 25—32.
2. **Hall D.** Solar Energy.— London: UK-ISES, 1976.— 100 p.
3. **Steinhart J. S., Steinhart C. E.** Energy uses in the US food system.— Science, 1974, v. 184, N 4134, p. 307—316.

5. **Reed D. W., Clayton R. K.** Isolation of a reaction center fraction from Rhodopseudomonas Spheroides.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, v. 30, N 5, p. 471—475.
6. **Красновский А. А.** Преобразование энергии света при фотосинтезе; молекулярные механизмы.— М.: Наука, 1974.— 150 с.
7. **Krasnovsky A. A.** The fragments of the photosynthetic electron transfer chain in model systems.— Biophys. J., 1972, v. 12, N 7, p. 749—763.
8. **Шувалов В. А., Красновский А. А.** Фотохимический перенос электрона в реакционных центрах фотосинтеза.— Биофизика, 1981, т. 26, вып. 3, с. 544—556.
9. **Krasnovsky A. A.** Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions.— Photochem. Photobiol., 1979, v. 29, p. 29—36.
10. **Rockley M. G., Windsor W. W., Cogdell R. F., Parson W. W.** Picosecond detection of an intermediate in the photochemical reaction of bacterial photosynthesis.— Proc. Natl. Acad. Sci., 1975, v. 72, N 6, p. 2251—2255.
11. **Dutton P. L., Kauffmann K. I., Chance B., Rentzepis P. M.** Picosecond kinetics of the 1250 nm band of the Rps. Sphaeroides reaction center. The nature of the primary photochemical intermediary.— FEBS Lett., 1975, v. 60, N [illegible] p. 275—280.
12. **Шувалов В. А., Клеваник А. В., Шархов А. В. и др.** Участие бактериохлорофилла-800 в пикосекундном переносе электрона на бактериофеофитин в реакционных центрах.— Докл. АН СССР, 1978, т. 243, № 4, с. 1072—1075.
13. **Клеваник А. В., Климов В. В., Шувалов В. А., Красновский А. А.** Восстановление феофитина в световой реакции фотосистемы II высших растений.— Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 1, с. 241—245.
14. **Климов В. В., Аллахвердиев С. Н., Деметер Ш., Красновский А. А.** Фотовосстановление феофитина в фотосистеме II хлоропластов в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды.— Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 1, с. 227—230.
15. **Klimov V. V., Krasnovsky A. A.** Pheophytin as a primary electron acceptor in photosystem 2 reaction centres.— Photosynthetica, 1981, v. 15, p. 592.
16. **Shuvalov V. A., Ke B., Dolan E.** Kinetic and spectral properties of the intermediary electron acceptor A, in photosystem 1.— FEBS Lett., 1979, v. 100, N 1, p. 5—8.
17. **Скулачев В. П.** Аденозинтрифосфат и трансмембранный потенциал ионов водорода — две конвертируемые и транспортабельные формы энергии в живой клетке.— Успехи совр. биол., 1977, т. 84, вып. (25), с. 165—175.
18. **Красновский А. А., Никандров В. В., Брин Г. П. и др.** Фотообразование водорода в растворах хлорофилла, НАД-Н и хлоропластах.— Докл. АН СССР, 1975, т. 225, № 3, с. 711—715.
19. **Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Красновский А. А.** Свободные радикалы при взаимодействии фотовозбужденного хлорофилла и его аналогов с метилвиологеном.— Биофизика, 1983, т. 28, вып. 2, с. 197—203.
20. **Красновский А. А., Брин Г. П.** Фотокаталитическое действие ZnO и TiO_2 в реакциях, идущих с выделением кислорода.— Докл. АН СССР, 1961, т. 1[illegible] № 3, с. 142—145.
21. **Красновский А. А., Брин Г. П.** Неорганические модели реакций Хилла.— Докл. АН СССР, 1962, т. 147, № 3, с. 656—659.
22. **Красновский А. А., Брин Г. П.** Использование метилвиологена, как акцептора электрона при фотохимических реакциях хлорофилла и восстановленных пиридиннуклеотидов.— Докл. АН СССР, 1965, т. 163, № 3, с. 761—767.
23. **Красновский А. А., Брин Г. П.** Фотосенсибилизированное выделение кислорода в водных растворах окислителей.— В кн.: Молекулярная фотоника. Л.: Наука, 1970, с. 161—178.
24. **Фомин Г. В., Брин Г. П., Генкин Н. В. и др.** Масс-спектрометрическое исследование воды в системе неорганический сенсибилизатор — акцептор электрона.— Докл. АН СССР, 1973, т. 212, с. 424—430.
25. **Красновский А. А., Брин Г. П.** Фотовосстановление метилвиологена, сенсибилизированное неорганическими полупроводниками.— Докл. АН СССР, 1973, т. 213, № 5, с. 1431—1435.

Докл. АН СССР, 1976, т. 229, № 4, с. 990—995.
27. **Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.** Фотообразование водорода на двуокиси титана. Использование органических доноров водорода и гидрогеназы.— Докл. АН СССР, 1981, т. 256, № 5, с. 1249—1253.
28. **Красновский А. А., Брин Г. П., Луганская А. Н., Никандров В. В.** Фотосенсибилизация окислительно-восстановительных реакций сульфидом кадмия.— Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 4, с. 896—902.
29. **Fujishima A., Honda K.** Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode.— Nature, 1972, v. 238, N 5358, p. 37—38.
30. **Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.** Моделирование первой фотосистемы с помощью липосом, содержащих хлорофилл.— Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 2, с. 469—472.
31. **Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.** Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов.— М.: Наука, 1981.— 350 с.
32. **Arnon D. I., Mitsui A., Paneque A.** Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorilation.— Science, v. 134, N 3488, p. 125.
33. **Мальцев С. В., Красновский А. А.** Выделение и поглощение молекулярного водорода изолированными хлоропластами высших растений.— Физиол. раст., 1982, т. 29, вып. 5, с. 951—958.
34. **Красновский А. А., Мальцев С. В.** Фотовыделение и фотопоглощение водорода хлоропластами без экзогенной гидрогеназы.— Докл. АН СССР, 1982, т. 267, № 2, с. 506—510.
35. **Никандров В. В., Чан-ван-Ни, Брин Г. П., Красновский А. А.** Исследование условий фотовосстановления метилвиологена хлоропластами.— Молек. биол., 1978, т. 12, вып. 6, с. 1278—1287.
36. **Красновский А. А., Чан-ван-Ни, Никандров В. В., Брин Г. П.** Исследование условий эффективного фотовыделения водорода хлоропластами в присутствии бактериальной гидрогеназы.— Молек. биол., 1980, т. 14, вып. 2, с. 287—298.
37. **Krasnovsky A. A.** Photoproduction of hydrogen in photosynthetic and artificial systems.— In: Topics in photosynthesis — Amsterdam: Elsevier, 1979, v. 3, p. 281—298.
38. **Замараев К. И., Пармон В. Н.** Химические методы преобразования солнечной энергии.— См. наст. сборник.

Доклады Академии наук СССР
1985. Том 283, № 2

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

А.А. КРАСНОВСКИЙ (мл.), И.В. ВЫЧЕГЖАНИНА,
Н.Н. ДРОЗДОВА, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ГЕНЕРАЦИЯ И ТУШЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОМ И БАКТЕРИОФЕОФИТИНОМ a И b

Исследования фотосенсибилизированной люминесценции кислорода в пигментных растворах позволили установить, что триплетные молекулы бактериохлорофилла и бактериофеофитина a эффективно передают энергию растворенному кислороду с образованием возбужденных молекул кислорода в синглетном $^1\Delta q$ состоянии ($^1O_2$) [1–4]. Полученные данные указывают на возможность аналогичного процесса в клетках бактерий и, следовательно, на возможность участия $^1O_2$ в фотодеструкции бактериальных фотосинтетических мембран в аэробных условиях. Кроме того, установлено, что указанные пигменты активно тушат $^1O_2$, главным образом за счет физического процесса диссипации энергии, и поэтому способны защищать биомембраны от окисления синглетным кислородом [2–5].

Цель данной работы состояла в том, чтобы, используя измерения люминесценции $^1O_2$, исследовать генерацию и тушение синглетного кислорода наиболее длинноволновыми пигментами фотосинтезирующих бактерий – бактериохлорофиллом и бактериофеофитином b, обладающими, вероятно, наиболее низколежащими триплетными уровнями, а также уточнить некоторые параметры этих процессов в растворах бактериохлорофилла и бактериофеофитина a, измеренные ранее с недостаточной точностью.

Люминесценцию кислорода измеряли на установках с фосфороскопами [3]. В качестве растворителя использовали CCl_4 квалификации "для УФ-спектроскопии". Бактериохлорифиллы a и b выделены из клеток бактерий Rhodospirillum rubrum и Rhodopseudomonas viridis соответственно и хроматографически очищены на сахарозе [6]. Бактериофеофитины a и b получены встряхиванием эфирных растворов бактериохлорофиллов с 5% раствором HCl, последующим промыванием водой и хроматографией на сахарозе. Длинноволновые максимумы поглощения пигментов в CCl_4 указаны в табл. 1. Для определения концентраций использованы значения молярных коэффициентов экстинции в этих максимумах: $8{,}3 \cdot 10^4$ и $7{,}7 \cdot 10^4$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$ для бактериохлорофиллов a и b и $9{,}2 \cdot 10^4$ и $7{,}2 \cdot 10^4$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$ для бактериофеофитинов a и b, рассчитанных на основании молярных коэффициентов в эфире, приведенных в работах [7–9]. В связи с фотолабильностью пигментов все операции по приготовлению растворов осуществляли в темноте. Тем не менее исходные растворы пигментов в CCl_4 всегда содержали некоторую примесь хлорофиллоподобного продукта деструкции с максимумом поглощения в области 680–690 нм. Наибольшее количество этого продукта (до 30%) содержали растворы бактериохлорофилла b.

Генерация $^1O_2$ пигментами. При освещении растворов пигментов в CCl_4 мы наблюдали люминесценцию с максимумом 1272 нм, соответствующую дезактивации $^1\Delta q$-состояния молекулярного кислорода, спектры возбуждения которой совпадали со спектрами поглощения пигментов (рис. 1). Для определения квантовых выходов генерации $^1O_2$ пигментами (γ_Δ) мы использовали описанную ранее методику, в основе которой лежит сравнение спектров возбуждения

Таблица 1

Квантовые выходы генерации и константы скорости тушения синглетного кислорода пигментами в CCl_4

Пигмент и положение ИК-максимума поглощения, нм	γ_Δ	$K_q \cdot 10^{-6}$, $M^{-1} \cdot C^{-1}$	$\varphi_{max}/\gamma_\Delta$ (± 30%)	K_{ox}, $M^{-1} \cdot C^{-1}$
Бактериохлорофилл b – 808	0,65 ± 0,2	15 ± 10	10^{-1}	$(1,5 \pm 1) \cdot 10^5$
Бактериофеофитин b – 786	0,75 ± 0,07	3 ± 1	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$(3 \pm 2) \cdot 10^6$
Бактериохлорофилл a – 781	0,6 ± 0,1	9 ± 2	$3 \cdot 10^{-2}$	$(3 \pm 1) \cdot 10^7$
Бактериофеофитин a – 758	0,75 ± 0,07	0,12 ± 0,01	$2 \cdot 10^{-3}$	$(2,5 \pm 1) \cdot 10^8$
Хлорофилл a	0,55 ± 0,06*	7 ± 0,7*	$3 \cdot 10^{-3}$*	$(2 \pm 0,8) \cdot 10^6$*

*Данные работ [1–5].

кислорода в смесях из двух сенсибилизаторов со спектрами поглощения смесей [1–3]. Пигментом сравнения в этих опытах служил тетрафенилпорфин, для которого, как было показано ранее, $\gamma_\Delta = 0,7$ [4]. Полученные значения γ_Δ указаны в табл. 1, откуда следует, что квантовые выходы генерации $^1O_2$ бактериохлорофиллами a и b практически совпадают. Идентичными оказались также активности бактериофеофитинов. При этом для бактериофеофитина a получено значение, практически равное описанному ранее [1–4], а для бактериохлорофилла a втрое более высокая величина. Расхождение обусловлено тем, что ранее измерения γ_Δ осложнялись сильным выцветанием бактериохлорофилла под действием возбуждающего света. В настоящей работе удалось существенно снизить степень фотодеструкции благодаря применению более чувствительной модификации люминесцентной установки и несколько измененной методики измерений.

Обращает на себя внимание, что значения γ_Δ для бактериохлорофилла и бактериофеофитина a близки к квантовым выходам (γ_{st}) образования триплетных состояний пигментов, измеренных методом флеш-фотолиза [10–12]. Значения γ_{st} для бактериохлорофилла и бактериофеофитина b не были известны. Однако на основании полученных нами данных можно заключить, что как γ_{st}, так и время жизни и энергии триплетных состояний этих пигментов мало отличаются от аналогичных параметров бактериохлорофилла и бактериофеофитина a.

Тушение $^1O_2$ пигментами. Константы скорости тушения $^1O_2$ пигментами (K_q) измеряли путем анализа тушения сенсибилизированной тетрафенилпорфином люминесценции кислорода по методикам, описанным в работах [1–4]. Из табл. 1 видно, что значения K_q у бактериохлорофиллов близки и существенно больше, чем у бактериофеофитинов, причем бактериофеофитин b значительно активнее, чем бактериофеофитин a. Отметим также, что полученные в настоящей работе константы K_q для бактериохлорофилла и бактериофеофитина a практически совпадают с описанными ранее [1, 5].

С целью выяснения вклада деструкции пигментов в процесс тушения $^1O_2$ мы исследовали фотоокисление пигментов кислородом. О скорости фотоокисления судили по уменьшению оптической плотности в области главных максимумов поглощения пигментов. Измерения показали, что процесс идет при участии $^1O_2$. В согласии с кинетическим анализом такого механизма (см., например, [5]) β-каротин эффективно ингибировал процесс уже при концентрации 10^{-7} M, а выход

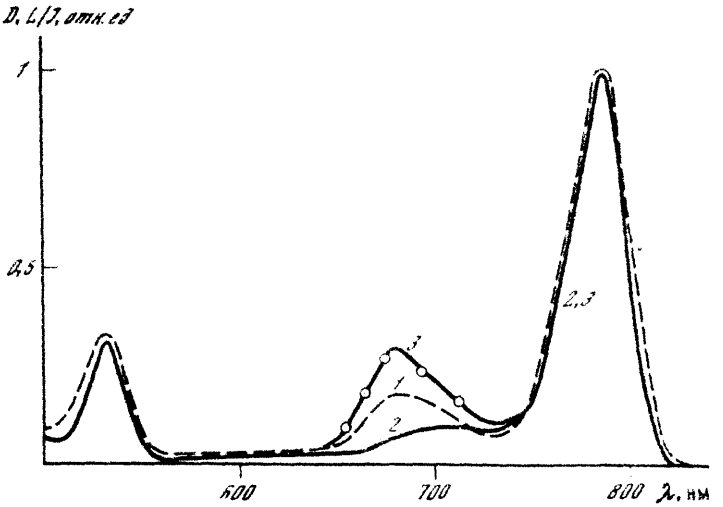


Рис. 1. Спектр возбуждения люминесценции $^1O_2$ в растворе бактериофеофитина b в CCl_4 (*1*) и спектры поглощения раствора до (*2*) и после (*3*) записи спектра возбуждения. *I* – интенсивность возбуждающего света, *L* – интенсивность люминесценции, *D* – оптическая плотность раствора. Ширина щелей монохроматора при записи спектров возбуждения 7 нм

реакции достигал предельного значения (φ_{max}) при концентрациях пигментов (C_q), удовлетворяющих соотношению: $K_q \cdot C_q \cdot \tau_\Delta \geqslant 10$, где τ_Δ – время жизни $^1O_2$ в CCl_4 без пигментов, равное 26 мкс [1, 2]. Абсолютные значения отношения измерены путем сравнения квантовых выходов фотоокисления пигментов с квантовыми выходами фотосенсибилизированного ими окисления нафтацена по методике, описанной в [5]. Поскольку, как показано ранее [1–5], $\varphi_{max}/\gamma_\Delta = K_{ox}/K_q$, где K_{ox} – константа скорости окисления пигментов синглетным кислородом, полученные значения позволили рассчитать величину K_{ox}. Из табл. 1 видно, что для всех изученных пигментов $K_{ox} \ll K_q$ и, следовательно, тушение $^1O_2$ определяется главным образом физической дезактивацией синглетного кислорода при соударениях с пигментными молекулами. Наиболее вероятно, что, как и в случае других порфиринов, тушение происходит за счет образования состояний с переносом заряда между пигментами и $^1O_2$ [4, 5]. Тем не менее, как видно из табл. 1, абсолютные значения φ_{max} и K_{ox} у бактериохлорофилла и бактериофеофитина b существенно больше, чем у других хлорофиллов и феофитинов. Этот вывод находится в согласии с наблюдениями о крайней фотолабильности указанных пигментов [6]. Данные работ [13, 14] показывают, однако, что фотолабильность бактериохлорофилла a сильно зависит от природы растворителей и характера сольватации пигментных молекул. Полученные нами предварительные результаты свидетельствуют о том, что в ацетоновых растворах бактериохлорофиллов a и b константы K_q и K_{ox}, по-видимому, близки к указанным в табл. 1, но в диэтиловом эфире и в пиридине эти константы заметно меньше.

Итак, из изложенного следует, что мономерные молекулы бактериохлорофилла и бактериофеофитина b являются эффективными фотосенсибилизаторами образования синглетного кислорода и, несмотря на повышенную фотолабильность, сохраняют характерную для многих порфиринов, способность к эффективной физической дезактивации $^1O_2$.

Институт биохимии им. А.Н. Баха
Академии наук СССР, Москва
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Поступило
29 I 1985

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А. мл.* – Биофизика, 1977, т. 22, с. 927–928. 2. *Красновский А.А. мл.* – Изв. АН СССР. Сер. физич., 1978, т. 41, с. 343–348. 3. *Krasnovsky A.A.jr.* – Photochem. Photobiol., 1979, vol. 29, p. 29–36. 4. *Красновский А.А. мл.* – ЖПС, 1980, т. 32, с. 852–856. 5. *Красновский А.А. мл., Венедиктов Е.А., Черненко О.М.* – Биофизика, 1982, т. 27, с. 966–972. 6. *Бокучава Е.М., Дроздова Н.Н., Красновский А.А.* – Биохимия, 1974, т. 39, с. 188–196. 7. *Van der Rest M., Gingras G.* – J. Biol., Chem., 1974, vol. 249, p. 6446–6450. 8. *Connolly J.S., Gorman D.S., Seely G.R.* – Ann. N.Y. Acad. Sci., 1973, vol. 206, p. 649–669. 9. *Дроздова Н.Н., Вычегжанина И.В., Шубин В.В.* – Биофизика, 1980, т. 25, с. 423–427. 10. *Гуринович Г.П., Лосев А.П., Сагун Е.И.* – ЖПС, 1977, т. 26, с. 1028–1034. 11. *Holten D., Gouterman M., Parson W.W. et al.* – Photochem. Photobiol., 1976, vol. 23, p. 415–423. 12. *Tait C.D., Holten D.* – Photobiochem. Photobiophys., 1983, vol. 6, p. 201–209. 13. *Marsh R.L., Connolly J.S.* – J. Photochem., 1984, vol. 25, p. 183–195. 14. *Smith J.R.L., Calvin M.* – J. Amer. Chem. Soc., 1966, vol. 88, p. 4500.

УДК 577.344:541.145:579.852.13

Академик А.А. КРАСНОВСКИЙ,
В.В. НИКАНДРОВ, С.А. НИКИФОРОВА

СОПРЯЖЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ФОТОКАТАЛИЗАТОРОВ-ПОЛУПРОВОДНИКОВ С КЛЕТКАМИ КЛОСТРИДИЙ; ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА

Первичным актом преобразования солнечной энергии при фотосинтезе является разделение зарядов в реакционных центрах. Существенным условием "запасания" энергии кванта света является пространственное разделение зарядов и их стабилизация на первичных акцепторах и донорах электрона. При конструировании модельных систем, преобразующих солнечную энергию, можно использовать небиологическую фоторецепторную систему (обладающую эффективным разделением зарядов), обеспечивая ее сопряжение с цепью переноса электрона изолированных клеточных структур или интактных клеток.

Для фоторазделения зарядов в таких системах мы использовали частицы неорганических фотокатализаторов-полупроводников, у которых под действием света электрон переходит из валентной зоны в зону проводимости; при этом электрон и дырка локализуются на активных центрах фазовой границы частиц фотокатализатора.

В 1962 г. в нашей лаборатории была предложена неорганическая модель реакции Хилла (характерной для хлоропластов) с использованием водной суспензии фотокатализаторов (двуокиси титана, окиси цинка или трехокиси вольфрама), соединений окисного железа или п-бензохинона в качестве акцепторов электрона и молекул воды в качестве исходных доноров электрона [1]. Квантовый выход фотообразования молекулярного кислорода в таких системах достигал 3% и стехиометрия соответствовала реакции Хилла в хлоропластах. Позже мы наблюдали фотовосстановление метилвиологена в водной суспензии полупроводников; экзогенные доноры электрона увеличивали эффективность процесса [2].

Образование синей радикальной формы "одноэлектронно" восстановленного метилвиологена было предпосылкой возможности фотообразования молекулярного водорода при введении в суспензию TiO_2 препаратов бактериальной гидрогеназы, что было осуществлено в последующих опытах [3]. Подобные опыты мы осуществили, используя также суспензию частиц сернистого кадмия [4].

Недавно мы показали [5, 6], что в системе двуокись титана – донор электрона при образовании "синего" радикала метилвиологена для образования водорода необходимо сопряжение полупроводника с гидрогеназой, тогда как при достижении двуэлектронного фотовосстановления метилвиологена выделение водорода можно наблюдать без введения экзогенной гидрогеназы. Вообще успех всех опытов определялся тем, что частицы полупроводника играют роль фоторецептора, поглощающего энергию света, и фотокатализатора, на поверхности которого происходит стабилизация первично образованных активных фотопродуктов.

В данном сообщении описана система, в которой частицы неорганических фотокализаторов-полупроводников (TiO_2, ZnO, CdS) были сопряжены с клетками бактерий Clostridium butyricum, содержащими гидрогеназу. Для сопряжения переноса электрона между частицами полупроводников и бактериальными клетками использовали метилвиологен, способный в восстановленном состоянии проникать сквозь липидные мембраны.

В опытах использовались дисперсные порошки TiO_2 (анатаз), ZnO, CdS и разнообразные доноры электрона: трис-(оксиэтил)-аминометан-(трис), N-трис-(гидроксилметил)-метилглицин-(трицин), глицин, глюкоза, карбоксиметилцеллюлоза, глицерин, этанол, метанол.

Клетки Clostridium butyricum выращивались из спор на глюкозо-пептоновой среде, которая содержала 10 г/л глюкозы, 10 г/л пептона, 2 г/л K_2HPO_4, 5 мг/л $FeSO_4 \cdot 5H_2O$ и 5 мг/л $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,01 мг/л биотина. В стерильную среду вводили споры и выдерживали 12 ч при 37 °С. Выращенные клетки отделяли от среды центрифугированием при 1600*g* 25 мин. С целью сохранения интактности клетки клостридий переводили в 0,5 *M* раствор сахарозы и хранили в атмосфере аргона при 3 °С до 10 дней без потери активности. Критерием интактности служило отсутствие гидрогеназной активности (измеряемой по выделению водорода из восстановленного гидросульфатом метилвиологена) в супернатанте после центрифугирования клеток. В другом варианте опытов клетки промывали 0,5% раствором глюкозы с последующим центрифугированием, разводили вдвое (по объему) тем же раствором и капали в сосуд Дьюара с жидким азотом, где замороженные шарики суспензии клеток хранили под слоем жидкого азота. Перед опытами замороженные клетки размораживали в струе аргона, что вызывало их разрушение. Скорость фотовыделения водорода в наших опытах была достаточна для использования манометрического

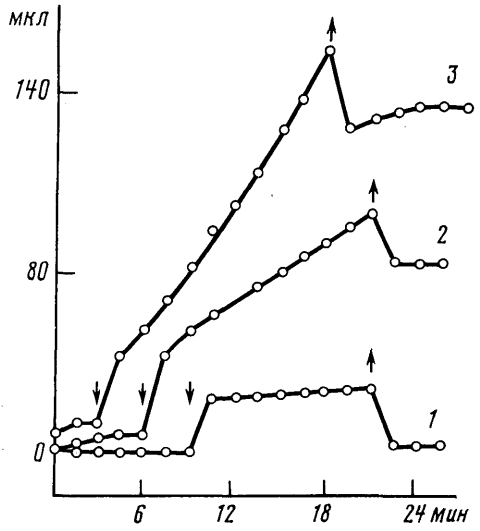


Рис. 1. Фотообразование водорода суспензиями TiO_2 (50 мг) в трис-оксиэтиламинометане (0,05 *М*, pH 7,2) – *1*; в присутствии клеток Cl. butyricum (3 мг белка) – *2*; в присутствии клеток Cl. butyricum и метилвиологена ($5 \cdot 10^{-4}$ *М*) – *3*

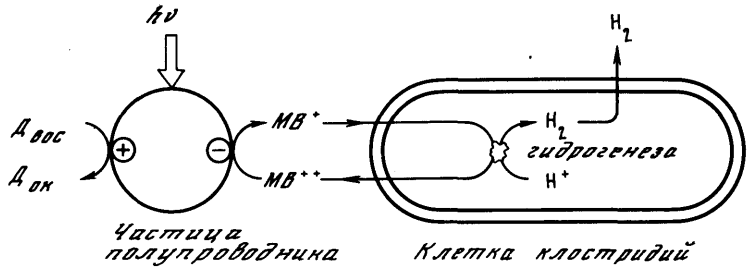


Рис. 2. Схема фотообразования водорода при сопряжении неорганического полупроводника с клетками клостридий. $МВ^{2+}$ – метилвиологен, $Д_{вос}$ и $Д_{окис}$ – восстановленный и окисленный донор электрона соответственно

прибора Варбурга со стеклянными сосудами при освещении ртутно-кварцевой лампой ПРК-4 (главным образом линиями ртути 365 нм, интенсивность 10^5 эрг/см^2 · с) в плоскости дна сосуда. Лампа была заключена в стеклянную трубку и погружена в термостатирующую ванну прибора Варбурга.

Обычно в сосуд Варбурга помещали навеску фотокатализатора (50–200 мг), 0,1 мл $3 \cdot 10^{-3}$ *М* раствора метилвиологена в воде, 0,3 мл суспензии целых или разрушенных клеток (3 мг белка) и до 6 мл 0,05 – 1,0 *М* раствора органического донора электрона. Сосуд продували аргоном. В боковой отвод сосуда помещали 40% раствор КОН, поглощающий CO_2. Опыты вели при 25 °С.

Наиболее эффективное фотообразование H_2 наблюдалось в системе: трис – TiO_2 – метилвиологен – клетки клостридий (15 мкл/мин мин), рис. 1, кривая *3*. По предварительной оценке квантовый выход образования водорода в этой системе достигал 10%. Выделение водорода на свету продолжалось с неизменной скоростью несколько часов, по-видимому, до исчерпания донора электронов, так как гидрогеназная активность клостридий (измеренная по выделению водорода из восстановленного гидросульфитом метилвиологена) сохранялась при действии ультрафиолетового света на клетки в анаэробных условиях.

То, что выделяющийся газ действительно водород, было установлено в опытах на газовом хроматографе. В отсутствие трис, TiO_2 или бактериальных клеток выделение H_2 (если оно и происходило) не превышало 0,1 мкл/мин, т.е. находилось за пределами чувствительности прибора Варбурга. При использовании клостридий с подавленной гидрогеназной активностью (что достигалось прогревом клеток при

Таблица 1

Фотообразование водорода в системе донор электрона – фотокатализатор – метилвиологен ($5 \cdot 10^{-4}$ *M*) – клетки Clostridium butyricum (3 мг белка). Длительность опыта 60 мин.

Донор электрона	TiO_2, 50 мг	ZnO, 300 мг	CdS, 200 мг
	мкл H_2 за 3 мин		
Трис, 0,05 *M*, pH 7,2	18,4	1,8	0,0
Трицин, 0,05 *M*, pH 7,0	6,1	–	–
Глицин, 0,2 *M*, pH 5,5	7,0	–	4,0
Глюкоза, 1 *M*	16,1	2,3	0,0
Карбоксиметилцеллюлоза, 60 мг	1,4	–	–
Глицерин, 1 *M*	15,6	2,0	0,0
Этанол, 10%	4,0	3,1	0,0
Метанол, 10%	5,8	4,0	1,0
Без доноров электрона	0,0	0,0	0,0

100 °C или их освещением УФ-светом на воздухе) образование водорода не происходило или было значительно подавлено. Выделение H_2 не происходило также в среде фосфатного буфера. Небольшое фотовыделение водорода (менее 0,5 мкл/мин) регистрировалось в системе трис – TiO_2 (см. рис. 1, кривая *1*), что согласуется с результатами предыдущих измерений [5, 6].

Фотообразование H_2 в суспензиях фотокатализатора существенно зависит от количества клеток клостридий. Максимальное выделение водорода наблюдалось при 2–5 мг белка в образце и достигало 5–15 мкл H_2/мин в зависимости от гидрогеназной активности клеток. При больших концентрациях клеток наблюдали подавление выделения водорода, что, по-видимому, объясняется экранирующим действием плотной суспензии клеток.

При использовании в опытах интактных клеток "удаление" метилвиологена из полной системы, содержащей трис, приводило к уменьшению скорости выделения H_2 (6–7 мкл/3 мин), рис. 1, кривая *2*. В случае использования разрушенных клеток клостридий метилвиологен практически не оказывал влияния на выделение H_2 в суспензиях TiO_2 в трис-буфере.

Однако в процессе фотохимического опыта происходило частичное разрушение клеток. На это указывало появление гидрогеназной активности в супернатанте, полученном в результате центрифугирования содержащих бактериальные клетки суспензий TiO_2 после 30 мин освещения.

Таким образом, во время опыта, по-видимому, функционировали две формы гидрогеназы: связанная с клетками и выходящая из клеток в процессе их разрушения. На возможность интимного контакта гидрогеназы с полупроводниками указывают наши предыдущие наблюдения с использованием изолированного фермента [3, 5, 6], а также опыты по иммобилизации гидрогеназ на двуокиси титана [7]. В системах, содержащих интактные клетки клостридий, сопряжения с полупроводниками возможно через посредство восстановленного метилвиологена, способного проникать через клеточную мембрану (рис. 2). Нельзя исключить также возможность экскреции низкомолекулярного переносчика электрона бактериальными клетками, что требует дополнительных исследований.

Кроме трис-буфера, в реакции фотообразования H_2 в суспензиях были эффективны также глицерин и глюкоза (табл. 1). Выделение H_2 наблюдалось также при использовании ряда других доноров электрона. Интересно, что при использовании

перечисленных в табл. 1 доноров электрона, за исключением трис, в отсутствие метилвиологена фотообразования H_2 практически не происходило. Сопряженные с клетками клостридий ZnO и CdS явились менее эффективными сенсибилизаторами фотообразования H_2 по сравнению с TiO_2 (см. табл. 1). В суспензиях CdS выделение водорода наблюдалось только при использовании глицина и метанола. Следует отметить, что, в отличие от ZnO и CdS, двуокись титана образовывала более стабильные суспензии в растворах используемых доноров электрона.

Описанные опыты представляют интерес не только для конструирования фотобиотехнических систем, но и в качестве модели возможных путей предбиологической эволюции. Мы уже неоднократно указывали на возможность использования небиологических компонентов земной коры в качестве фотокатализаторов в процессе химической эволюции (например, [8]).

Согласно гипотезе А.И. Опарина [9] первичными организмами могли быть гетеротрофы типа клостридий. Переход к фотосинтезу потребовал включения в клетки фоторецепторов. Описанные нами опыты иллюстрируют вариант использования неорганических фоторецепторов, сопряженных с метаболизмом клостридий. По-видимому, такие системы могли осуществлять преобразование солнечной энергии, но оказались тупиковой ветвью эволюции.

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

Поступило
29 VII 1985

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А., Брин Г.П.* – ДАН, 1962, т. 147, с. 656. 2. *Красновский А.А., Брин Г.П.* – ДАН, 1973, т. 213, с. 1431. 3. *Красновский А.А., Брин Г.П., Никандров В.В.* – ДАН, 1976, т. 229, с. 990. 4. *Красновский А.А., Брин Г.П., Луганская А.Н., Никандров В.В.* – ДАН, 1979, т. 249, с. 896. 5. *Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А.* – ДАН, 1981, т. 256, с. 1249. 6. *Nikandrov V.V., Brin G.P., Krasnovsky A.A.* – Photobiochem. Photobiophys. 1983, vol. 6, p. 101. 7. *Guendet P., Rao K.K., Gratzel M., Hall D.O.* – Ibid., 1984, vol. 7, p. 331. 8. *Krasnovsky A.A.* – Origins of Life, 1974, vol. 5, p. 397. 9. *Опарин А.И.* Возникновение жизни на Земле. М.: Изд-во АН СССР, 1957.

Том XXX, вып. 6 1985

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ВОДОРОДА С МЕМБРАНОЙ ХЛОРОПЛАСТОВ

ЛЕБЕДЕВ Н. Н., ПАКШИНА Е. В., ШИФФЕЛ П., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследовано влияние кратковременного воздействия высокой концентрации ионов водорода на низкотемпературные спектры поглощения и флуоресценции хлоропластов. Показано, что такое воздействие вызывает обратимый коротковолновый сдвиг полос форм хлорофилла *a* и *b*, входящих в светособирающий комплекс (максимумы поглощения 647, 660, 676 нм), а также длинноволновой широкой полосы (поглощение в районе 710 нм, флуоресценция — 735 нм). Одновременно наблюдается коротковолновый сдвиг полос поглощения каротиноидов (в области 480—520 нм) аналогичный фотоиндуцированному электрохромному сдвигу, но имеющий противоположный знак. Установлено, что взаимодействие с ионами водорода длинноволновых форм хлорофилла *a* (максимумы поглощения 682, 690, 696 нм, флуоресценции — 685 и 696 нм), специфических для фотосистем II и I, приводит к их необратимому выцветанию. Показано, что коротковолновая, возможно, мономерная, форма хлорофилла с максимумом поглощения при 666 нм не чувствительна к кратковременному воздействию ионов водорода.

Исследование влияния внешних воздействий на структуру мембран хлоропластов представляет один из подходов к вопросу регуляции процесса фотосинтеза. В последнее время появились данные о возможности непосредственного влияния ионов водорода на миграцию энергии между фотосистемами [1], перенос электрона в фотосистеме II [2, 3] и агрегацию мембран хлоропластов [4]. Возникает вопрос о механизме такого влияния. Ранее было показано, что пигментный аппарат хлоропластов представлен набором поглощающих и люминесцирующих форм [5], входящих в различные хлорофилл-белковые комплексы [6—8]. В данной работе для выяснения начальных этапов взаимодействия ионов водорода с фотосинтетической мембраной мы попытались определить, каково влияние на эти формы кратковременного (30 с) воздействия кислой среды со значением pH, заведомо меньшим соответствующего изопотенциальной точке мембран хлоропластов [9].

Материалы и методы. Хлоропласты из 10—20-дневных проростков фасоли (Phaseoles Vulgaris L.), выращенных при 24—28° С, освещенности 80 Вт·м$^{-2}$ и длительности светового периода 16 ч в сутки, выделяли в сахарозо-фосфатном буфере по методике, описанной ранее [10]. После осаждения на мембранном фильтре (Сынпор-3) хлоропласты подвергали осмотическому шоку в течение 10 мин при комнатной температуре в цитратном буфере, pH 7,0, содержащем 10 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ 2,4-дихлорфенилдиметилмочевины (ингибитор фотосистемы II на уровне пластохинона) и 5 мМ NH_2OH (ингибитор донорной части ФС-II). Кислотную обработку хлоропластов проводили в той же среде, содержащей цитратный буфер с pH 2,3.

Измерение спектров поглощения хлоропластов, их вторых производных и дифференциальных спектров проводили при низкой температуре (—170° С) на спектрофотометре «Перкин — Элмер-554» в специально разработанной криогенной приставке. Измерение низкотемпературных спектров флуоресценции — при —196° С на установке, описанной ранее [10]. При возбуждении в синий максимум поглощения хлоропластов (435 нм) для получения производных и дифференциальных спектров флуоресценции использовали микропроцессор DCSU-2 («Перкин — Элмер», США). Для предотвращения влияния светорассеяния на спектральные характеристики и получения идентичных образцов хлоропласты

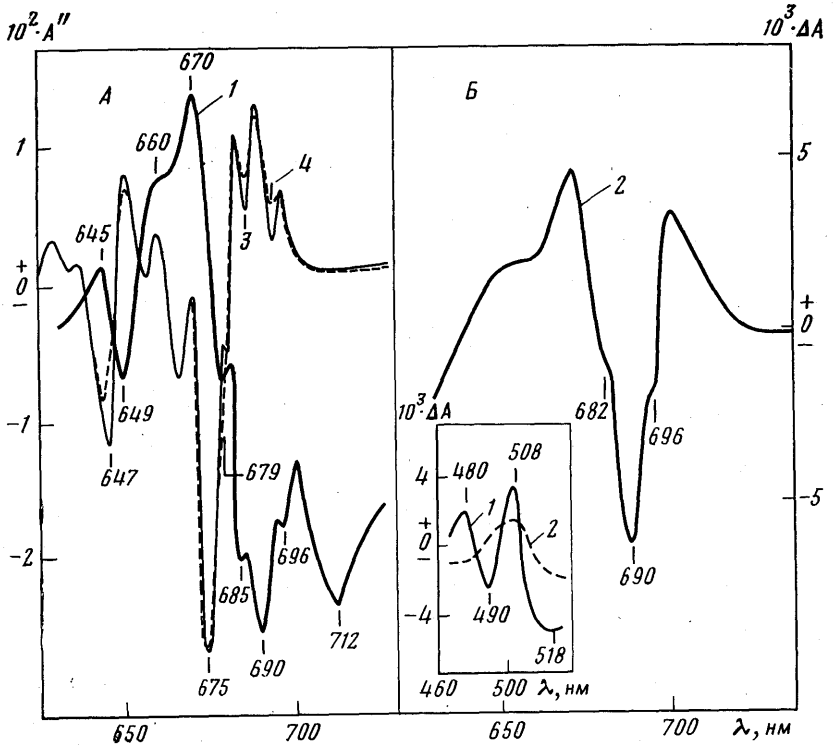


Рис. 1. Влияние выдерживания хлоропластов в кислой среде на их низкотемпературные спектры поглощения: *А* — разность спектров поглощения хлоропластов, находившихся 30 с при комнатной температуре в среде с pH 2,3, и хлоропластов, находившихся в среде с pH 7,0 (*1*), и вторые производные спектров до (*3*) и после (*4*) кислотной обработки; *Б* — разность спектров поглощения хлоропластов, обработанных кислотой и затем находившихся 5 мин при комнатной температуре в среде с pH 7,0, и исходных образцов (*2*). На вставке — участки спектров *1* и *2* в кератиноидной области (электрохромный сдвиг)

осаждали на мембранном фильтре (Сынпор-3 с диаметром пор 1,5 мкм), отдельные участки которого использовали для измерения. Оптическая ширина щелей при измерении спектров поглощения составляла 2 нм, а при измерении спектров флуоресценции 3 нм у возбуждающего и анализирующего монохроматоров. Величина шага дифференцирования при измерении производных и дифференциальных спектров 0,2 нм. Оптическая плотность образцов при измерении спектров поглощения не превышала 0,6—0,8, а при измерении спектров флуоресценции —0,05 в синем максимуме.

Результаты и обсуждение. Измерение низкотемпературных дифференциальных спектров поглощения хлоропластов, находившихся в среде с pH 2,3 в течение 30 с, показывает (рис. 1, *А*), что такая обработка приводит к коротковолновому сдвигу узких полос форм хлорофилла *a* с максимумами поглощения, расположенными, судя по второй производной низкотемпературного спектра поглощения, при 681, 675 и 659 нм, а также хлорофилла *b* с максимумом при 647 нм. Аналогичный сдвиг наблюдается для широкой длинноволновой полосы поглощения, проявляющейся в дифференциальном спектре в виде асимметричного провала в области 712 нм. Одновременно наблюдается падение интенсивности полос при 690 и 696 нм, однако смещения положения их максимумов при этом не происходит. В области коротковолновой формы хлорофилла *a*, поглощающей при 666 нм, существенных изменений спектра зарегистрировать не удается. (Небольшое изменение поглощения в области 660 нм, по-видимому, обусловлено коротковолновым сдвигом полосы при 659 нм).

Сопоставление коротковолнового сдвига полос поглощения хлорофиллов *a* и *b* с изменениями, происходящими в зеленой области (470—

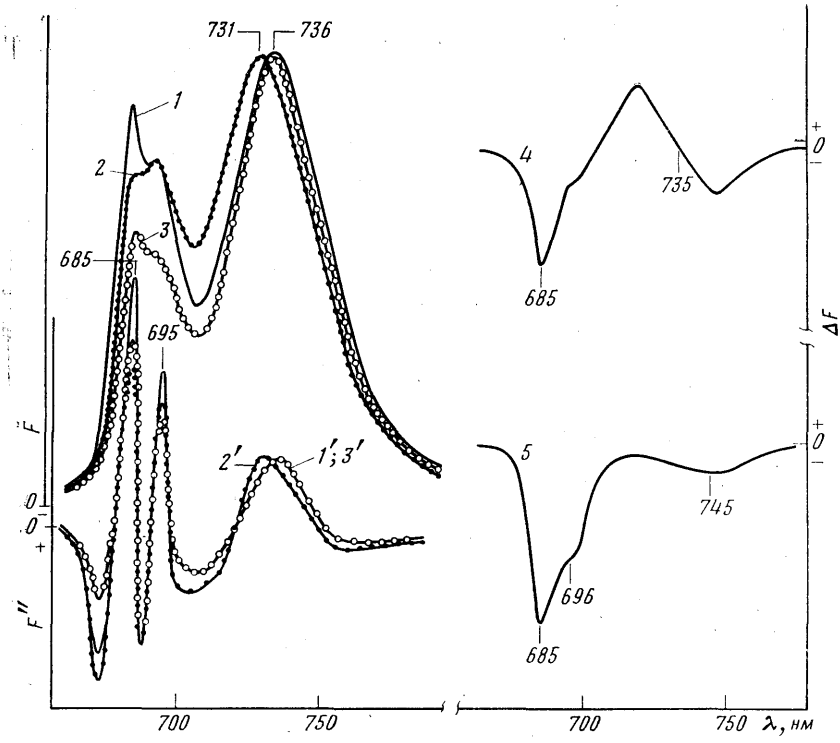


Рис. 2. Низкотемпературные спектры флуоресценции (*1—3*) и их вторые производные (*1′—3′*) исходных хлоропластов, pH 7,0 (*1*, *1′*), хлоропластов, находившихся в среде с pH 2,3 в течение 30 с при комнатной температуре (*2*, *2′*), находившихся после кислотной обработки при комнатной температуре в среде с pH 7,0 в течение 5 мин (*3*, *3′*); *4* — разность спектров *2* и *1*, *5* — разность спектров *3* и *1*

520 нм) и обусловленными, как полагают авторы [11], электрохромным сдвигом каротиноидов, позволяет интерпретировать сдвиг полос поглощения хлорофиллов как результат изменения величины поверхностного заряда мембраны тилакоидов. Интересно отметить, что в отличие от фотоиндуцированного длинноволнового электрохромного сдвига каротиноидов закисление внешней среды приводит к коротковолновому смещению их полос (рис. 1, вставка). Это согласуется с представлением о том, что при фотосинтезе происходит закисление внутритилакоидного пространства. Измерение pH-зависимости коротковолнового сдвига для широкой длинноволновой полосы поглощения хлорофилла *a* показывает, что он имеет пороговый характер и наблюдается при значении $pH \leqslant 4$, близком к изоэлектрической точке хлорофилл-белковых комплексов [9]. Поэтому возможно, что по крайней мере для широкой полосы коротковолновый сдвиг обусловлен непосредственной нейтрализацией протонами их поверхностного заряда.

Измерение низкотемпературных спектров флуоресценции показывает, что воздействие ионов водорода приводит к коротковолновому сдвигу широкой длинноволновой полосы с максимумом при 735 нм и выцветанию полос при 685 и 696 нм без существенного изменения их положения (рис. 2). Это позволяет приписать длинноволновую полосу флуоресценции длинноволновой широкой полосе поглощения и объясняет обнаруженное ранее отсутствие корреляции между интенсивностью длинноволновой флуоресценции хлоропластов и содержанием в них длинноволновых узких форм хлорофилла (690, 696 нм), а также величиной сигнала П700 [12]. С другой стороны, неизменность положения максимумов полос флуоресценции при 685 и 696 нм позволяет заключить, что эти формы не связаны с главной полосой поглощения хлоропластов при 675 нм, для которой наблюдается выраженный электрохромный сдвиг.

Выдерживание хлоропластов после кислотной обработки в нейтральной среде в течение нескольких минут приводит к исчезновению корот-

коволнового сдвига как узких, так и широких полос (рис. 1, *Б*, 2). Одновременно происходит исчезновение коротковолнового электрохромного сдвига каротиноидов. В дифференциальных спектрах таких образцов наблюдаются только выцветающие формы с максимумами поглощения 682, 690 и 696 нм (рис. 1, *Б*) и флуоресценции 685 и 696 нм (рис. 2). Судя по форме дифференциального спектра, основной причиной исчезновения длинноволновых узких форм является увеличение их полуширины, по-видимому, в результате индуцированного понижением pH изменения структуры белка. Однако нельзя исключить и непосредственного взаимодействия ионов водорода с пигментными формами [13, 14].

Таким образом, полученные результаты позволяют разделить спектральные формы хлорофилла в хлоропластах на три группы по характеру их взаимодействия с ионами водорода. К первой группе, у которой понижение pH внешней среды вызывает только обратимый электрохромный сдвиг, относятся формы, входящие преимущественно в светособирающий комплекс. К этой же группе относится длинноволновая широкополосная форма хлорофилла с максимумом поглощения в районе 710 нм и флуоресценции при 735 нм. Вторую группу составляют выцветающие под влиянием ионов водорода длинноволновые формы, входящие в фотосистемы II и I. И наконец, третью группу составляет мономерный хлорофилл *a*, спектральные характеристики которого не изменяются при кратковременном понижении pH.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Krause G. H., Briantais I. M., Vernotti C.* Biochem. Biophys. Acta, 1983, v. 723, № 2, p. 169.
2. *Bowes J. M., Crofts A. R.* Ibid., 1981, v. 637, № 3, p. 464.
3. *Wong D., Govindjee Merkelo H.* Ibid., 1980, v. 592, № 3, p. 546.
4. *Scouffaire C., Lannoge R., Barber J.* Photobiochem. Photobiophys., 1982, v. 4, № 5—6, p. 249.
5. *Литвин Ф. Ф., Синещёков В. А., Шубин В. В.* Биофизика, 1976, т. 21, № 1. с. 669.
6. *Brown J. S., Schoch S.* Biochem. Biophys. Acta, 1981, v. 636, № 2, p. 201.
7. *Шутилова Н. И., Кадочникова И. Г., Закржевский Д. А.* Биофизика, 1984, т. 29, № 3, с. 502.
8. *Larkum A. W. D., Anderson J. M.* Biochem. Biophys. Acta, 1982, v. 679, № 3, p. 410.
9. *Jamamoto Y., Ke B.* Ibid., 1981, v. 636, p. 175.
10. *Лебедев Н. Н., Шиффел П., Красновский А. А.* Биофизика, 1985, т. 30, № 1, с. 44.
11. *Farineau J., Garab G., Horvath G., Faludi-Daniel A.* FEBS Lett., 1980, v. 118, № 1, p. 119.
12. *Siffel P., Lebedev N. N., Sestak Z.* Photosynthetica, 1985, v. 19, p. 127.
13. *Пашкина Е. В., Быстрова М. И.* В кн.: Тез. докл. 3-й Всесоюз. конф. по химии и биохимии порфиринов. Самарканд, 1982, с. 236.
14. *Быстрова М. И., Пакшина Е. В., Красновский А. А.* Биохимия, т. 40, № 1, с. 137.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
9.IV.1985

SPECTRAL EFFECTS OF THE INTERACTION BETWEEN HYDROGEN IONS AND CHLOROPLAST MEMBRANE

LEBEDEV N. N., PAKSHINA E. V., SHIFFEL P., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Short-term action of high concentration of hydrogen ions of low-temperature spectra of chloroplasts absorption and fluorescence was investigated. It has been shown that in chlorophyll *a* and *b* forms being a part of the light-absorbing complex (absorption maxima 647, 660, 676 nm) as well as in the long-wave broad band (absorption in the region of 710 nm, fluorescence — 735 nm) such exposure induces a reversible short-wave shift of the spectrum. Simultaneously a short-wave shift of carotinoids absorption bands is observed (in the region of 480—520 nm) similar to the photoinduced electrochromic shift, but with an opposite sign. Interaction with hydrogen ions of long-wave forms of chlorophyll *a* (absorption maxima 682, 690, 696 nm; fluorescence maxima — 685 and 696 nm) specific for the Photosystems 2 and 1 brings about their irreversible bleaching. The short-wave, possibly, monomeric chlorophyll form with the absorption maximum at 666 nm is insensitive to a short-term effect of hydrogen ions.

Том XXX, вып. 1 1985

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.37

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА И ХЛОРОФИЛЛА *b* В ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЯХ И ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТАХ

ЛЕБЕДЕВ Н. Н., ШИФФЕЛ П., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Методом двухволновой дифференциальной низкотемпературной спектрофлуориметрии исследован коротковолновой участок (600—660 нм) флуоресценции хлоропластов и зеленых листьев. На основании анализа спектров излучения и возбуждения при селективной регистрации показано, что наблюдающееся в этой области свечение состоит из нескольких перекрывающихся полос, принадлежащих различным формам протохлорофиллида (с максимумами излучения 632 и 641 нм) и хлорофиллу *b* (максимум излучения 653 нм). Установлено, что затемнение листьев приводит к увеличению интенсивности коротковолновых и появлению длинноволновой полосы флуоресценции протохлорофиллида с максимумом 657 нм. Спектры возбуждения флуоресценции протохлорофиллида в хлоропластах смещены в длинноволновую сторону по сравнению с наблюдающимися для этого пигмента в этиолированных листьях и их гомогенатах. Каротиноиды не проявляются в спектре возбуждения флуоресценции протохлорофиллида и хлорофилла *b*. Сделан вывод, что коротковолновая флуоресценция хлоропластов и зеленых листьев обусловлена независимым излучением различных форм протохлорофиллида и хлорофилла *b*.

Коротковолновое излучение в области флуоресценции протохлорофилла было впервые обнаружено у зеленых листьев растений после их длительного затемнения [1, 2]. Оказалось, что излучение состоит из двух полос с максимумами при 635 и 655 нм и интенсивность его уменьшается после освещения [1—3]. У молодых зеленеющих листьев интенсивность коротковолновой люминесценции быстро уменьшалась по мере формирования фотосинтетического аппарата и у взрослых полностью сформировавшихся незатемненных листьев излучение в этой области удалось зарегистрировать только после их обработки дигитонином, причем в этом случае его максимум был расположен при 635 нм [4]. Измерение спектра возбуждения флуоресценции молодых зеленеющих листьев и листьев ζ-каротинового мутанта выявило максимум при 470 нм, принадлежащий хлорофиллу *b* [5—8]. В работе [9] было отмечено существование у изолированных хлоропластов излучения при ~653 нм, возбуждавшегося светом 475 нм (но не 440 и 495 нм). По мнению авторов, это излучение принадлежало хлорофиллу *b*. В данной работе поставлена задача провести детальный спектральный анализ коротковолновой флуоресценции взрослых зеленых листьев и хлоропластов и выяснить ее природу.

Методика. Для опытов использовали высечки из центральных частей первых (2—5-дневных проростков) и вторых листьев (14—20-дневных растений) фасоли (Phaseolus vulgaris L.), выращенной в оранжерее (24—28° С, освещенность 30 Вт·м$^{-2}$, длительность светового периода 16 ч/сут). Гомогенаты получали в среде, содержащей 0,4 М сахарозы, 10 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 67 мМ фосфатного буфера, pH 7,8; 4—5° С. Время приготовления гомогената 1 мин. Для выделения хлоропластов гомогенат фильтровали через вату, центрифугировали при 2500 *g* в течение 10 мин и суспендировали в среде выделения. Образцы замораживали тонким слоем на поверхности оргстекла. Оптическая плотность

образцов в области Соре составляла 0,1—0,2 ед. Общее время приготовления замороженного образца хлоропластов 12—15 мин.

Спектры флуоресценции измеряли на установке, содержащей два светосильных монохроматора (МДР-2), ксеноновую лампу (ДКсШ-200) в качестве источника возбуждающего света и фотоэлектрическую систему регистрации (ФЭУ-79 с усилителем постоянного тока У5-9 и двухкоординатным графопостроителем Н-306). Для коррекции и измерения дифференциальных и производных спектров использовали микропроцессор (DCSU-2, «Перкин — Элмер», США). При записи спектров флуоресценции в двухволновом дифференциальном режиме в качестве фонового использовали спектр, получающийся при возбуждении в области 500 нм; при записи спектров возбуждения — при регистрации в районе 607 нм. Спектральная ширина щелей возбуждающего и анализирующего монохроматоров при измерении спектров излучения составляла 4 и 3 нм, а при измерении спектров возбуждения — 2 и 5 нм соответственно. Величина шага дифференцирования при измерении производных спектров составляла 5 нм. Температура образцов во время измерения была —196° С.

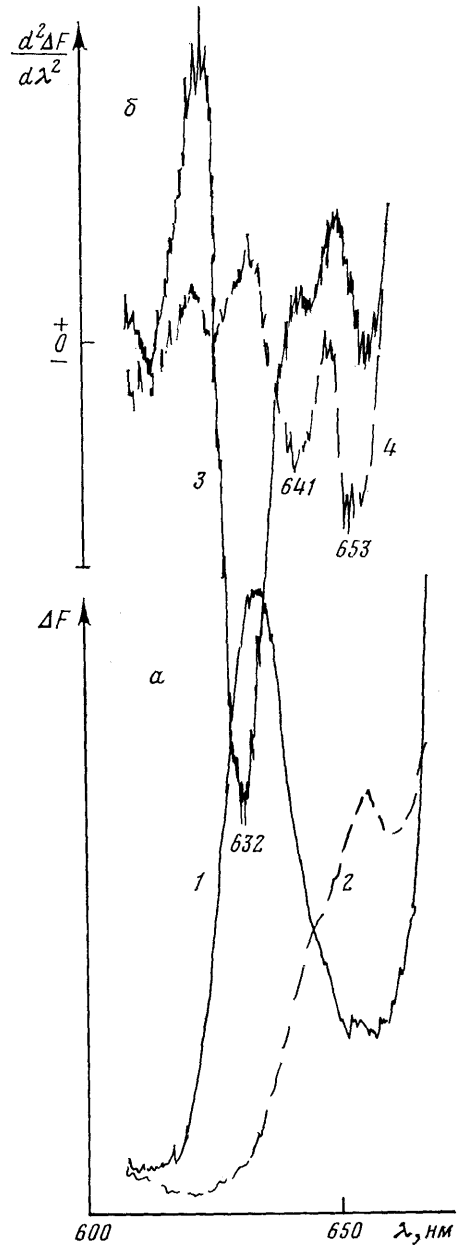


Рис. 1. Дифференциальные низкотемпературные спектры (*а*) и их вторые производные (*б*) коротковолновой флуоресценции хлоропластов фасоли: *1, 3* — возбуждение 438—500 нм, *2, 4* — возбуждение 470—500 нм; —196° С

Результаты измерений. Низкотемпературная флуоресценция хлоропластов фасоли в области 600—660 нм, измеренная в дифференциальном режиме, показана на рис. 1, *а*. Форма ее спектра и положение максимума зависят от условий возбуждения. При возбуждении светом 438 нм (область поглощения протохлорофиллида в этиолированных листьях [10]) в спектре излучения наблюдается максимум 633 нм. При возбуждении в области 470 нм (соответствующей максимуму поглощения хлорофилла *b* в зеленеющих листьях [7]) в спектре излучения наблюдается максимум при 652 нм. Из второй производной дифференциального спектра флуоресценции видно (рис. 1, *б*), что свечение обусловлено наложением трех перекрывающихся полос, максимумы которых не зависят от длины возбуждающего света и расположены при 632, 641 и 653 нм. Для первой и второй из них это положение аналогично максимумам коротковолновых форм протохлорофиллида в этиолированных и зеленеющих листьях, для третьей — полосе хлорофилла *b* в зеленеющих листьях и взрослых хлоропластах.

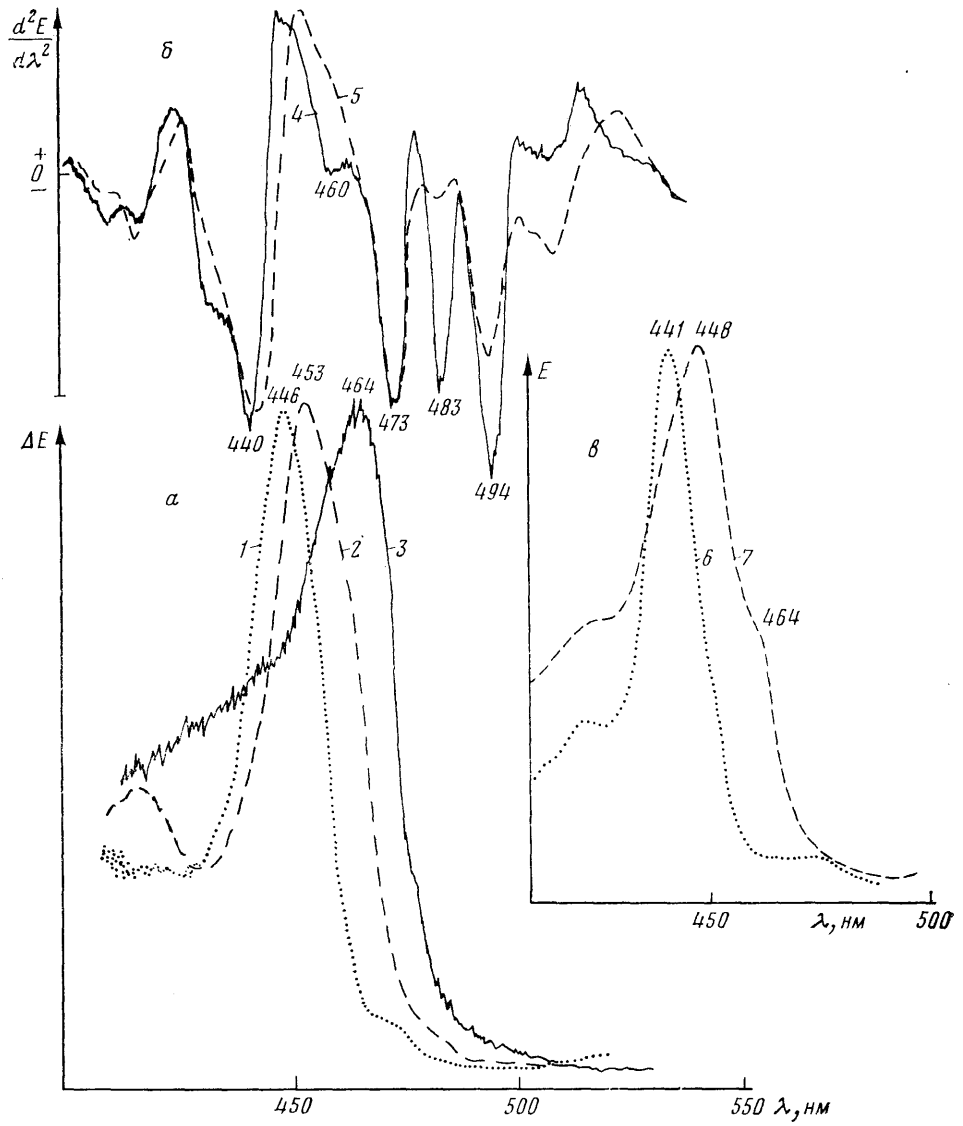


Рис. 2. Дифференциальные спектры возбуждения коротковолновой флуоресценции хлоропластов (*а*), вторые производные спектров возбуждения низкотемпературной флуоресценции фотосистем I и II в хлоропластах фасоли (*б*) и спектры возбуждения низкотемпературной флуоресценции протохлорофиллида в гомогенате этиолированного листа в присутствии суспензии хлоропластов (*в*); регистрация при 625 (*1*), 640 (*2*), 652 (*3*), 688 (*4*), 740 (*5*), 629 (*6*) и 656 нм (*7*)

Дифференциальные спектры возбуждения для каждой из полос коротковолновой флуоресценции освещенных хлоропластов заметно различаются (рис. 2, *а*). Судя по форме спектров возбуждения, миграция энергии между пигментами отсутствует (или незначительна). Положение максимумов (446 и 453 нм) и общая форма (отношение интенсивностей главной полосы и коротковолнового сателлита, полуширина полос) спектра возбуждения для двух коротковолновых полос излучения близки к наблюдающимся у протохлорофиллида в этиолированных листьях. Однако в последнем случае они смещены на 5—7 нм в коротковолновую сторону. По-видимому, это различие обусловлено не экранирующим эффектом каротиноидов или других пигментов фотосинтетического аппарата хлоропластов, поскольку наблюдается у образцов с низкой оптической плотностью, а добавление к гомогенату этиолированного листа суспензии хлоропластов не вызывает аналогичного изменения

спектров (рис. 2, *в*). Возможно, что во взрослых хлоропластах протохлорофиллид находится в ином молекулярном окружении, чем в этиолированных листьях, или что в освещенных и темновых растениях образуются различные химические модификации этого пигмента. Спектры возбуждения флуоресценции экстрактов и данные хроматографического разделения свидетельствуют о том, что протохлорофиллид in vivo может существовать в двух различных модификациях: моно- и дивинилпроизводных [11].

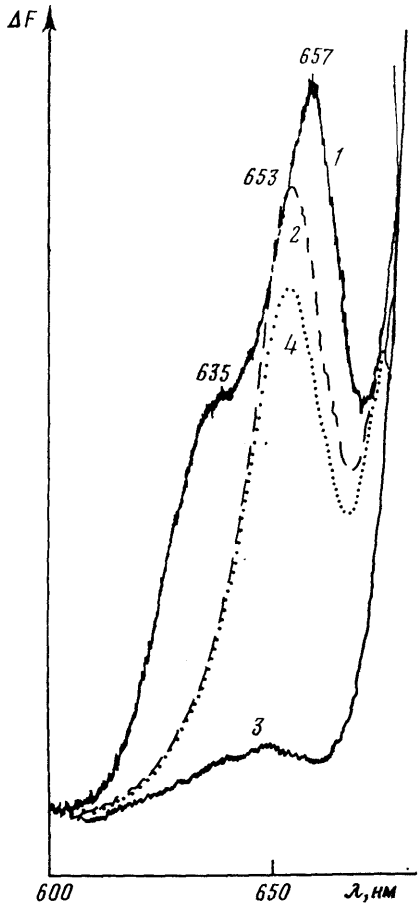


Рис. 3

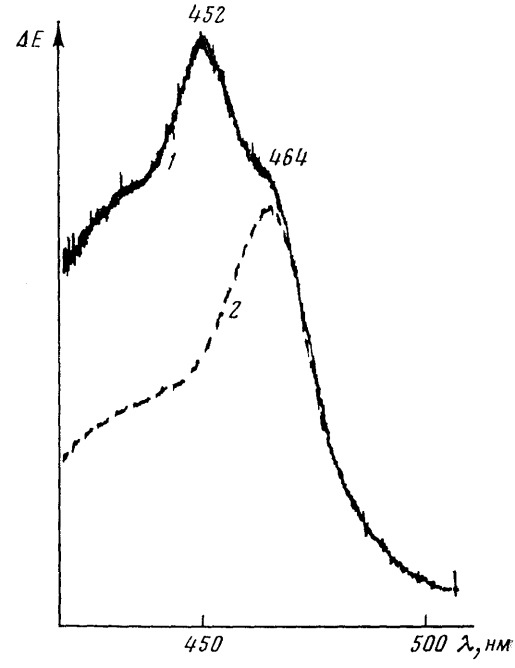


Рис. 4

Рис. 3. Дифференциальные низкотемпературные спектры гомогената зеленых листьев фасоли, помещенной на 22 ч в темноту (*1, 2*) и того же образца после дополнительного освещения при —100÷—30° С интенсивным белым светом в течение 10 мин (*3, 4*); *1, 3* — возбуждение 450—500 нм, *2, 4* — 468—500 нм

Рис. 4. Дифференциальные спектры возбуждения низкотемпературной флуоресценции гомогената зеленых затемненных листьев фасоли: *1* и *2* — до и после освещения при низкой температуре (регистрация 653 нм)

Затемнение листьев на 22—24 ч в соответствии с полученными ранее результатами [1, 2] приводит к резкому увеличению интенсивности флуоресценции в области 600—660 нм и появлению в низкотемпературном дифференциальном спектре (при возбуждении в области поглощения протохлорофиллида — 440—450 нм) преимущественно двух полос с максимумами 635 и 657 нм (рис. 3). Однако при возбуждении в области поглощения хлорофилла *b* (470 нм) в излучении проявляется только одна полоса с максимумом 653 нм. Освещение образца в замороженном состоянии (—100÷—30° С) интенсивным белым светом в условиях, аналогичных вызывающим фотопревращение протохлорофиллида [12,

13], приводит к практически полному исчезновению флуоресценции при 635 и 657 нм. Интенсивность полосы 653 нм (при соответствующем возбуждении) после такого освещения существенно не меняется. Следовательно, затемнение взрослых зеленых листьев приводит к появлению в их низкотемпературном спектре флуоресценции полосы, аналогичной длинноволновой форме протохлорофиллида этиолированных листьев.

Форма спектра возбуждения полосы 653 нм у хлоропластов из освещенных растений отличается от спектра возбуждения более коротковолновых полос (рис. 2, *а*). Судя по положению максимума (464 нм) и форме спектра возбуждения, это свечение принадлежит хлорофиллу *b*, причем, видимо, вновь синтезированной форме пигмента [7]. Отсутствие полос каротиноидов в спектре возбуждения этой флуоресценции, так же как и в спектрах возбуждения флуоресценции всех форм протохлорофиллида (рис. 2, *а*), и отсутствие аналогичной полосы в спектре возбуждения флуоресценции фотосистем (рис. 2, *б*) подтверждают такое предположение. Следует, однако, отметить, что аналогичное положение максимума имеет длинноволновая форма протохлорофиллида в этиолированных листьях (рис. 2, *в*), спектр возбуждения которой в индивидуальном виде до сих пор измерить не удалось.

Значительное перекрывание полос излучения при 657 и 653 нм у взрослых затемненных листьев не позволяет однозначно выделить спектр возбуждения появляющейся в темноте длинноволновой полосы (рис. 4). Его форма указывает, что на длинноволновую форму возможен перенос энергии с более коротковолновых форм, причем, как и в случае этиолированных листьев, наиболее активной в сенсибилизации флуоресценции является промежуточная форма протохлорофиллида.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что коротковолновая флуоресценция в области 600—660 нм хлоропластов и зеленых листьев обусловлена суперпозицией излучения трех форм протохлорофиллида и хлорофилла *b*. Коротковолновые формы протохлорофиллида во взрослых растениях отличаются от наблюдающихся в этиолированных проростках. Спектральные характеристики образующейся в темноте длинноволновой формы протохлорофиллида в этиолированных и зеленых затемненных растениях идентичны. Флуоресценция хлорофилла *b*, наблюдающаяся у взрослых листьев, принадлежит, по-видимому, новообразованной форме этого пигмента [6].

Авторы глубоко благодарны Ф. Ф. Литвину за обсуждение результатов, советы и замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Литвин Ф. Ф., Красновский А. А., Рихирева Т. Г.* Докл. АН СССР, 1959, т. 127, № 3, с. 699.
2. *Литвин Ф. Ф., Рихирева Т. Г., Красновский А. А.* Биофизика, 1962, т. 7, № 5, с. 578.
3. *Garab G. I., Sundquist C., Faludi-Daniel A.* Photochem. Photobiol., 1980, v. 31, № 5, p. 491.
4. *Фрадкин Л. И., Доманская И. Н., Шлык А. А.* Докл. АН СССР, 1981, т. 261, № 1, с. 220.
5. *Фрадкин Л. И., Шлык А. А., Коляго В. М.* Там же, 1966, т. 171, № 1, с. 222.
6. *Фрадкин Л. И., Шлык А. А.* В кн.: Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия. М.: Наука, 1967, с. 135.
7. *Фрадкин Л. И., Фалуды-Даниэль А., Шлык А. А.* Докл. АН СССР, 1968, т. 182, № 6, с. 1420.
8. *Fradkin L. I., Shlyk A. A., Kalinina L. M., Faludi-Daniel A.* Photosynthetica, 1969, v. 3, № 4, p. 326.
9. *Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Шубин В. В.* Биофизика, 1976, т. 21, № 4, с. 669.
10. *Ignatov N. V., Krasnovskii A. A. (Jr.), Litvin F. F. et al.* Photosynthetica, 1983, v. 17, № 3, p. 352.
11. *Belanger F. C., Rebeiz C. A.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1979, v. 88, p. 365.
12. *Litvin F. F., Ignatov N. V., Efimtsev E. I., Belyaeva O. B.* Ibid., 1978, v. 12, № 4, p. 375.
13. *Correnia M., Dujardin E.* Photobiochem. Photobiophys., 1983, v. 5, p. 281.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР. Москва

Поступила в редакцию
27.IV.1984

SPECTRAL CHARACTERISTICS OF FLUORESCENCE OF PROTOCHLOROPHYLLIDE AND CHLOROPHYLL b IN GREEN LEAVES AND ISOLATED CHLOROPLASTS

LEBEDEV N. N., SHIFFEL P., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

A short-wave region (600—660 nm) of fluorescence of chloroplasts and green leaves was investigated by means of double wave differential low-temperature spectrofluorimetry. An analysis of emission and excitation spectra under selective recording has shown that fluorescence observed in this region consists of several overlapping bands, pertaining to different protochlorophyllide forms/with emission maxima 632 and 641 nm/and to chlorophyll b emisson maximum 653 nm/. Dark-treatment of the leaves results in an increase of the intensity of short-wave and appearance of the long-wave fluorescence of protochlorophyllide with the maximum 657 nm. The spectra of fluorescence excitation of protochlorophyllide in chloroplasts are displaced to the longwave side as compared with those observed for this pigment in etiolated leaves and their homogenates. Carotinoids are not observed in the spectrum of fluorescence excitation of protochlorophyllide and chlorophyll b. A conclusion is made that short-wave fluorescence of chloroplasts and green leaves is due to independent radiation of different forms of protochlorophyllide and chlorophyll b.

Том 32, вып. 4 1985 г.

УДК 581.133.11

СПОСОБНОСТЬ СИНЕЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛИ К ФИКСАЦИИ АЗОТА ПРИ ПЕРЕХОДЕ ОТ ГЕТЕРОТРОФНОГО К АВТОТРОФНОМУ ТИПУ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

С. А. МАРКОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биологический факультет Московского государственного университета
Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Изучали активность нитрогеназы (по восстановлению ацетилена) цианобактерии *Chlorogloeopsis fritschii* при переходе от гетеротрофного к автотрофному типу обмена веществ. Цианобактерия, растущая гетеротрофно в темноте, фиксирует в этих условиях азот. Источником энергии для темновой азотфиксации служит дыхание, связанное с поглощением кислорода. При переносе на свет гетеротрофной культуры цианобактерии поглощение кислорода в течение 30—40 мин заменяется его выделением, в то время как активность нитрогеназы достигает максимального светового уровня только через 20—24 ч освещения и зависит от интенсивности света и добавления сахарозы. Таким образом, фотосинтез начинается сразу после освещения темновой культуры цианобактерии, тогда как включение и перестройка системы фиксации азота требует значительного времени. Предполагается, что начальное световое увеличение нитрогеназной активности связано с функционированием ФС I и зависит от присутствия запасных веществ, тогда как дальнейшее возрастание активности нитрогеназы на свету обусловленно поступлением продуктов ассимиляции углекислоты из вегетативных клеток в гетероцисты и требует участия двух фотосистем.

Синезеленые водоросли — фотосинтез — нитрогеназная активность.

Широкий набор физиологических функций сосредоточили в себе цианобактерии, что делает их уникальным материалом для исследователя. Эти организмы способны к фиксации атмосферного азота на свету в автотрофных условиях и в темноте в гетеротрофных условиях. В природных экологических системах цианобактериям постоянно приходится переключаться со светового типа фиксации азота на темновой. Это происходит во время смены дня и ночи, при заносе организмов в глубинные слои почвы и воды, а также при затенении. При этом цианобактерии для поддержания механизмов фиксации азота должны переходить с одного типа энергетического обмена на другой, с гетеротрофного на автотрофный. Однако до сих пор не выяснена общая картина перестройки энергетического обмена, снабжающего системы ассимиляции азота необходимыми соединениями при переходе от гетеротрофного к автотрофному существованию [1].

В настоящей работе исследовали изменение нитрогеназной активности, происходящее при переносе выращенной в темноте на среде с экзогенными соединениями углерода цианобактерии в фотоавтотрофные условия. Параллельно следили за изменениями в режиме энергообеспечения по выделению и поглощению кислорода. Физиологические изменения у цианобактерий при переходе из гетеротрофных условий в автотрофные, вероятно, происходили в эволюционном прошлом этих организмов; предполагается, что комплекс ферментов, ответственных за фиксацию азота, появился у гетеротрофных цианобактерий намного раньше возникновения фотосинтеза [2]. В дальнейшем нитрогеназная система стала получать необходимые соединения из реакций фотосинтеза.

Способность к фиксации азота как в темноте, так и на свету найдена лишь у немногих видов цианобактерий. Основная причина этого, по-

видимому, заключается в том, что не всегда удается подобрать условия культивирования цианобактерий в темноте.

В качестве объекта исследования мы выбрали цианобактерию *Chlorogloeopsis fritschii*, способную расти автотрофно на свету и гетеротрофно в темноте. Оптимальные условия для азотфиксации этого организма в том и другом случае изучены Фэем [3—5].

МЕТОДИКА

Культуру *C. fritschii* выращивали в колбах емкостью 250 мл в минеральной среде BG-11 без азота [6] при 35° в термостате. К среде добавляли сахарозу (10 мМ). В опытах использовали культуру в экспоненциальной фазе роста — 15-дневную, выращенную в темноте. Для сравнительных исследований использовали культуру цианобактерий, выращенную на свету 4 000 лк, 5—7-дневную в экспоненциальной фазе роста. Чистоту материала проверяли микроскопированием и методом высева на мясопептонный бульон с последующим выдерживанием при 37°.

Для измерения нитрогеназной активности культуру *C. fritschii* инкубировали на свету 20 Вт/м² при 35° 1 ч в герметически закрытых 15-мл флаконах с 1 мл ацетилена в газовой фазе. Концентрацию ацетилена и этилена определяли газохроматографически, используя лабораторный хроматограф ЛХМ-8МД с пламенно-ионизационным детектором и колонкой Porapak. В качестве газа-носителя использовали азот.

Скорость выделения и поглощения кислорода измеряли на амперометрической установке на основе полярографического анализатора РА-2 и потенциометра КСП-4 с шкалой 1 мВ. Платиновый электрод, закрытый тефлоновой пленкой, поляризовали при 750 мВ. Установку калибровали введением в ячейку открытого типа дитионита. Все измерения проводили при 25°. Культуру цианобактерии гомогенизировали путем проталкивания через иглу шприца с внутренним диаметром 0,8 мм. Интенсивность света изменяли при помощи нейтральных светофильтров. Источником света являлась лампа КГМ на 350 Вт с тепловым фильтром. Максимальная интенсивность света 100 Вт/м².

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нитрогеназная активность в условиях гетеротрофного роста в темноте. Культура *C. fritschii*, растущая в темноте, способна к восстановлению ацетилена со скоростью, составляющей 20—30% от скорости этой реакции при автотрофном росте на свету и 10—15% при гетеротрофном росте на свету (рис. 1). Источником энергии для азотфиксации (восстановления ацетилена) цианобактерий при гетеротрофном росте в темноте является дыхание. Скорость поглощения кислорода у выращенной в отсутствие света культуры *C. fritschii* составляет 3,0±0,1 мкмоль кислорода/мг сухого веса в 1 ч. Субстратом для дыхания культуры *C. fritschii* являются экзогенные углеводы. В наших опытах таким субстратом была сахароза. В отсутствие сахарозы рост культуры *C. fritschii* не поддерживается и нитрогеназная активность в течение 5—6 ч подавляется. Рост и активность нитрогеназы при добавлении к минеральной среде выращивания цианобактерии других исследуемых углеводов (глюкозы, лактозы, фруктозы) существенно не отличается от варианта с сахарозой. Удаление кислорода из газовой среды выращивания цианобактерии приводит к уменьшению скорости восстановления ацетилена. Однако эта скорость (0,5 нмолей ацетилена/мг сухого веса в 1 ч) сохраняется при длительном выращивании в специальных флаконах в бескислородных условиях и исчезает только после гибели культуры цианобактерии.

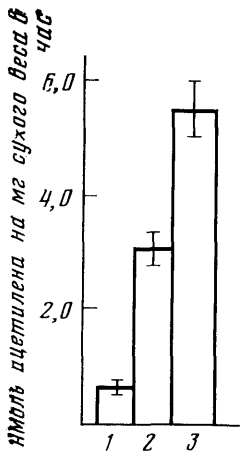


Рис. 1

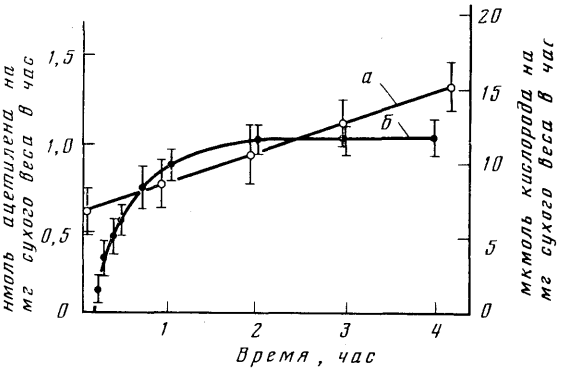


Рис. 2

Рис. 1. Нитрогеназная активность культуры *C. fritschii*. Культуру цианобактерии выращивали: в темноте в хемогетеротрофных условиях (*1*); на свету в фотоавтотрофных условиях (*2*); на свету в фотогетеротрофных условиях (*3*)

Рис. 2. Скорость восстановления ацетилена (*а*) и выделения кислорода (*б*) культурой *C. fritschii*, выращенной в темноте, при переносе на свет (20 Вт/м^2)

Нитрогеназная активность при переносе гетеротрофной культуры цианобактерии на свет. При переносе на свет культуры *C. fritschii* (культуру отмывали от сахарозы и помещали на свежую минеральную среду) нитрогеназная активность постепенно повышалась и достигала уровня, характерного для световых культур к 20—24 ч (рис. 2). Изменения в кислородном обмене происходили за более короткое время, характеризуясь быстрым нарастанием в скорости выделения кислорода в первый час переноса на свет и медленными изменениями в последующее время (рис. 2).

Для исследования механизма изменения нитрогеназной активности на свету у гетеротрофной культуры цианобактерии подбирались оптимальные условия освещения и экзогенных добавок.

Влияние сахарозы. Освещение в присутствии сахарозы (10 мМ) в среде культивирования цианобактерии, выращенной в темноте, приводило к значительному увеличению (в 5—6 раз) нитрогеназной активности по сравнению с контрольным вариантом, в котором культуру *C. fritschii* перед определением активности фермента отмывали от сахарозы. Предполагается, что этот эффект может быть связан со стимуляцией сахарозой скорости восстановления ацетилена при росте цианобактерии на свету. Для того чтобы доказать это предположение, культуру *C. fritschii*, выращенную на свету, выдерживали 24 ч при различных концент-

Зависимость скорости восстановления ацетилена и выделения кислорода выращенной на свету культурой *C. fritschii* от концентрации сахарозы

Концентрация сахарозы, мМ	Восстановление ацетилена нмоль на	Выделение кислорода мкмоль на
	мг сухого веса в час	
0	2,0±0,2	1,50±0,05
0,5	2,0±0,3	3,3±0,1
10	5,5±0,5	6,6±0,2
50	7,5±0,7	—

Рис. 3. Зависимость скорости восстановления ацетилена (*а*) и выделения кислорода (*б*) культурой *C. fritschii* от интенсивности света

Рис. 4. Изменение нитрогеназной активности культуры *C. fritschii*

Культуру цианобактерии выращивали в темноте, переносили на свежую минеральную среду и освещали: *а* — белым светом (контроль); *б* — белым светом в присутствии диурона (10 мМ), диурон добавляли за 24 ч до начала опыта; *в* — красным светом с длиной волны более 700 нм; *г* — белым светом после подавления синтеза нитрогеназы KNO_3 (10 мМ) в темноте в течение 5 ч, а перед освещением культуру отмывали от KNO_3 и помещали на свежую минеральную среду

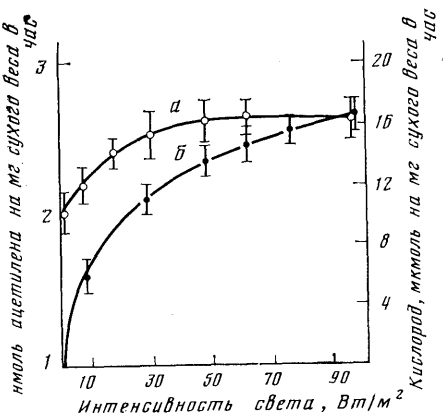


Рис. 3

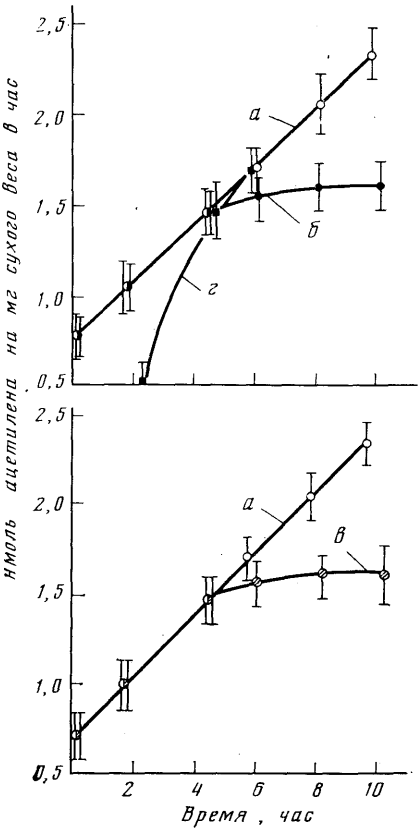


Рис. 4

рациях сахарозы (таблица). Наибольшая скорость восстановления ацетилена наблюдалась при концентрации сахарозы 50 мМ, но при этом полностью отсутствовало выделение кислорода. Очевидно, при этой концентрации сахарозы гетеротрофные возможности роста на свету культуры *C. fritschii* максимальны. Фиксация азота в этом случае не связана с функционированием ФС II и обуславливается работой ФСI, которая может участвовать в высвобождении электрона от органических веществ [7].

Влияние интенсивности света. Изменение активности нитрогеназы на свету у гетеротрофной культуры *C. fritschii* зависит от интенсивности света. Пороговой оказалась интенсивность света, равная 1 Вт/м². Свет высокой интенсивности, повышая активность нитрогеназы, неблагоприятно действовал на выделение кислорода. Так, при 100 Вт/м² выделение кислорода у культуры *C. fritschii* не наблюдалось через 1,5 ч освещения, а при 50 Вт/м² через 3 ч. Тем не менее активность нитрогеназы продолжала повышаться. Причина этого, по-видимому, в том, что продукты фотосинтеза проходят длительный путь через углеродные циклы к системе фиксации азота. Поэтому, когда фотосинтетический аппарат уже не работает, фиксация азота продолжает обеспечиваться необходимыми веществами.

Скорость восстановления ацетилена и выделения кислорода у выращенной на свету культуры *C. fritschii* зависела от интенсивности света (рис. 3). Вероятно, это является причиной повышения скорости восстановления ацетилена у культуры цианобактерии, выращенной в гетеротрофных условиях.

Влияние диурона. Добавление диурона (10 мМ), ингибитора активности ФС II, в среду роста гетеротрофной культуры *C. fritschii* (культуру выдерживали в темноте в среде, содержащей диурон, в течение суток, так как ингибитор медленно проникает в клетки цианобактерии) в первые 6 ч ее переноса на свет не отражалось на повышении нитрогеназной активности. В дальнейшем же нитрогеназная активность не увеличивалась (рис. 4, *б*). В контрольном варианте нитрогеназная активность гетеротрофной культуры цианобактерии продолжала повышаться при освещении в течение 20—24 ч.

Нитрогеназная активность при освещении гетеротрофной культуры цианобактерии красным светом. Освещение красным светом с длиной волны более 700 нм позволяет избирательно воздействовать только на фотосистему I. На рис. 4, *в* показано, как изменяется нитрогеназная активность при освещении гетеротрофной культуры *C. fritschii* красным светом (в опыте использовали красный светофильтр КС-19, интенсивность света была сравнима с контрольным вариантом). В первые часы переноса культуры *C. fritschii* на свет не наблюдалось видимой разницы в скорости восстановления ацетилена на красном и белом свету (рис. 4, *а*, *в*). Повышение нитрогеназной активности прекращалось после 6 ч освещения красным светом. Облучение белым светом в этом случае снимало «эффект» красного света и приводило к увеличению нитрогеназной активности культуры цианобактерии. Общая картина изменения нитрогеназной активности культуры *C. fritschii* в условиях освещения красным светом напоминает кривую изменения активности нитрогеназы этой же культуры в присутствии диурона.

Влияние KNO_3. Нитратную форму азота широко используют для подавления синтеза нитрогеназы [8]. Синтез фермента восстанавливается через 5—6 ч после удаления ингибитора из среды выращивания цианобактерии.

Для изучения роли синтеза нитрогеназы в механизме изменения нитрогеназной активности культуры *C. fritschii*, выращенной в темноте, при переходе от гетеротрофного типа обмена веществ к автотрофному KNO_3 (10 мМ) добавляли в минеральную среду роста данной культуры. После полного подавления синтеза фермента в течение 5 ч (о котором судили по исчезновению нитрогеназной активности) культуру цианобактерии переносили на свет на свежую минеральную среду без KNO_3 и измеряли активность нитрогеназы. Синтез фермента восстанавливался в течение 4—5 ч (рис. 4, *г*), тогда как активность нитрогеназы изменялась медленнее (см. выше).

Обратный перенос культуры цианобактерии из световых в темновые условия. Скорость восстановления ацетилена не уменьшалась в течение 5—6 ч после переноса в темноту культуры *C. fritschii*, выращенной на свету в автотрофных условиях. Значительное снижение скорости восстановления ацетилена наблюдается только через 48 ч нахождения цианобактерии в темноте, достигая стационарного уровня, характерного для адаптированной к темноте культуры. Предполагается, что в условиях кратковременной смены света и темноты нитрогеназная активность у культуры цианобактерии не снижается, так как синтезируемые на свету углеводы продолжают поступать из вегетативных клеток в гетероцисты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эволюция цианобактерий представляется как постепенное продвижение от гетеротрофного к автотрофному типу обмена веществ. Согласно гипотезе Опарина [9], первоначально организмы по своему обмену веществ были гетеротрофными и фиксация азота возникла на этой основе. Из ныне живущих организмов такими гетеротрофными азотфиксаторами являются клостридии. Можно предположить, что впоследствии в связи с истощением органических веществ в окружающей среде возник меха-

низм использования энергии Солнца при участии ФС I. Таким образом, процесс фиксации азота получает дополнительный источник энергии — свет. Дальнейшая эволюция энергоснабжения нитрогеназной системы связана с возникновением оксигенного фотосинтеза и процесса новообразования органического вещества под действием света. Те органические вещества, которые прежде поступали из окружающей среды, стали синтезироваться внутри организма. Развитие ФС II привело к повышению интенсивности фиксации азота, но пространственное разделение местанахождения нитрогеназы и фотосинтеза с выделением кислорода удлинило путь от места ассимиляции углерода к пунктам связывания азота. Современные цианобактерии, совмещая гетеротрофный обмен веществ со световым запасанием энергии, могут эффективно развиваться как в темноте, так и на свету, но не способны немедленно вовлекать механизмы фотосинтеза в фиксацию азота при переносе из темноты на свет вследствие пространственного разделения этих процессов.

Эту физиологическую особенность цианобактерий продемонстрировали наши опыты, в которых освещали культуру *C. fritschii*, выращенную в темноте в гетеротрофных условиях. Фотосинтез начинался сразу после освещения темновой культуры цианобактерии, а перестройка системы фиксации азота требовала значительного времени. Полученные данные свидетельствуют в пользу поэтапного механизма подключения фотосистем к фиксации азота на свету. В течение первых 5—6 ч переноса на свет культуры *C. fritschii* нитрогеназная активность повышалась при облучении цианобактерии только красным светом.

На этой стадии нитрогеназная активность не подавляется диуроном. Однако последующее освещение культуры *C. fritschii* красным светом не приводило к увеличению нитрогеназной активности. Мы предположили, что начальное увеличение нитрогеназной активности связано с участием ФС I и зависит от присутствия запасных веществ. Дальнейшее возрастание активности нитрогеназы, вызванное освещением белым светом, обусловлено поступлением органических веществ из вегетативных клеток в гетероцисты и требует участия двух фотосистем.

При обсуждении механизма изменения нитрогеназной активности на свету необходимо остановиться на вопросе о синтезе нитрогеназы *de novo*. Этот процесс также может вносить свой вклад в общее изменение активности нитрогеназы на свету. На основании представленных результатов можно заключить, что если синтез фермента и идет при освещении гетеротрофной культуры цианобактерии, то он играет второстепенную роль в повышении активности нитрогеназы. Отмывание культуры *C. fritschii* от ингибитора синтеза нитрогеназы приводит к быстрому восстановлению активности фермента. Изменение активности нитрогеназы при освещении гетеротрофной культуры происходит медленнее и связано с общими перестройками в обмене веществ при переходе от гетеротрофного к автотрофному существованию.

Опыты по определению активности нитрогеназы при переносе цианобактерий из темноты на свет проводились и ранее. Однако их методическая основа и результаты отличаются от описанных нами. При переносе цианобактерий *Anabaenopsis circularis* в темновые условия фиксация азота уменьшалась до нуля в течение 4 ч, но возобновлялась сразу при освещении [10]. В данном случае не было длительного выдерживания культуры цианобактерии в темноте, хотя в среде и содержались органические вещества. Отсутствие последних в минеральной среде приводит к тому, что при переходе к световому образу жизни фиксация азота не восстанавливается [11].

Приведенные в настоящей работе экспериментальные результаты указывают на возможные способы взаимосвязи между фотосинтезом и азотфиксацией культуры *C. fritschii*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гусев М. В., Никитина К. А.* Цианобактерии. М.: Наука, 1979. 228 с
2. *Маргелис Л.* Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 351 с.
3. *Fay P., Fogg G. E.* Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. III. Growth and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii* Mitra.— Arch. Mikrobiol., 1962, v. 42, № 2, p. 310.
4. *Fay P., Kumar A. P., Fogg G. E.* Cellular factors affecting nitrogen fixation in blue-green alga Chlorogloea fritschii.— J. Gen. Microbiol., 1964, v. 34, № 2, p. 351.
5. *Fay P.* Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii.*— J. Gen. Microbiol., 1965, v. 35, № 1, p. 11.
6. *Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.* Purification and properties on unicellular blue-green algae (*Order Chroococcales*).— Bacteriol. Rev., 1971, v. 35, № 2, p. 171.
7. *Ohki K., Katoh T.* Photoorganotrophic growth of blue-green alga *Anabaena variabilis.*— Plant and Cell Physiol., 1975, v. 16, № 1, p. 53.
8. *Piencos P., Bodmer S., Tabita F.* Oxygen inactivation and recovery of nitrogenaze activity in cyanobacterium.— J. Bacteriol., 1983, v. 153, № 1, p. 182.
9. *Опарин А. И.* Возникновение жизни на Земле. М.: Наука, 1957. 458 с.
10. *Fay P.* Factors influencing dark nitrogen fication in blue-green alga.— Applied. Environmental Microbiol., 1976, v. 31, № 2, p. 376.
11. *Mullineaux P., Gallon I. R., Chaplin A. E.* Nitrogen fixation in culturies of the cyanobacterium *Gloecapsa* sp. 1430/3 incubated in the dark.— J. Gen. Microbiol., 1981, v. 124, pt 1, p. 141.

Поступила в редакцию
16.X.1984

THE CAPACITY FOR NITROGEN FIXATION IN A BLUE-GREEN ALGA UPON TRANSITION FROM HETEROTROPHIC TO AUTOTROPHIC CARBON METABOLISM

S. A. MARKOV, A. A. KRASNOVSKY

M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The nitrogenase activity level (by acethylene reduction) was measured in the cyanobacterium *Chlorogloepsis fritschii* upon transition from heterotrophic to autotrophic carbon nutrition. The cyanobacterium was able to tix atmospheric nitrogen in darkness by utilizing energy produced in respiration related to oxygen uptake. On transferring heterotrophic cyanobacterium to light, the oxygen uptake was exchanged by oxygen evolution within 30—40 min, while the nitrogenase activity reached the maximum value after a 20—24 h illumination and was dependent on light intensity and sucrose additions. Thus, the dark cyanobacterium culture started photosynthesizing just on transferring to light, while activation of N_2-fixing system required much longer time. It is suggested that the initial light-induced increase in nitrogenase activity is related to photosystem-I functioning and to the presence of reserve substances, whereas further increase in nitrogenase activity in the light is determined by carbon dioxide assimilation and photosynthate inflow into heterocysts and requires an involvement of both photosystems.

УДК 547.979

ФОТОБИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕАЗАФЛАВИНОВОГО КОФЕРМЕНТА F_{420}

НИКАНДРОВ В. В., ПАНЦХАВА Е. С., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследовали влияние света на окислительно-восстановительные свойства деазафлавинового кофермента F_{420}, выделенного из метанобразующих бактерий. Установлена способность F_{420} сенсибилизировать фотовосстановление NAD^+, $NADP^+$, метилвиологена и фотообразование H_2 при использовании в качестве доноров электрона тиосоединений, органических кислот, аминокислот, сахаров. Продуктами фотовосстановления NAD^+ и $NADP^+$ являлись димеры $(NAD)_2$ и $(NADP)_2$, а также с малым выходом NADH и NADPH. Квантовые выходы фотовосстановления NAD^+, $NADP^+$ и метилвиологена достигали 60%. Сенсибилизированное коферментом F_{420} фотообразование H_2 наблюдали в присутствии бактериальной гидрогеназы. В отсутствие акцепторов электрона в анаэробных условиях наблюдалось фотовосстановление F_{420}, частично обращаемое O_2. Обсуждается фотобиологическая роль изученных реакций, а также возможность участия деазафлавиновых коферментов в эволюции фотосинтеза.

В 1972 г. из *Metanobacterium* M. o. H. было выделено низкомолекулярное флуоресцирующее соединение, названное фактором 420 (F_{420}) в связи с интенсивным поглощением света при 420 нм [1]. Позднее F_{420} был найден во всех исследованных метанобразующих бактериях в относительно больших количествах: от 100 до 400 мкг на 1 г клеток [2]. Показано, что F_{420} при участии гидрогеназы, формиатдегидрогеназы и дегидрогеназы окиси углерода восстанавливается водородом [1, 3], формиатом [4], CO [5] и, таким образом, является первичным акцептором электронов у этих бактерий. Установлено участие F_{420} в переносе электронов к $NADP^+$ [3, 5, 6] для ассимиляции CO_2, а также к метилированному коферменту M [7] на последнем этапе биосинтеза метана.

Исследование структуры F_{420} показало, что он представляет собой 7,8-дидеметил-8-окси-5-деазарибофлавин-5-фосфат, к которому через фосфодиэфирную связь присоединена N-(N-L-лактил-γ-L-глутамил)-L-глутаминовая кислота [8]. Известно, что синтетические деазафлавины обладают фотохимической активностью и способны сенсибилизировать фотовосстановление ряда низкопотенциальных акцепторов электрона [9—12], в том числе флавопротеидов, гемопротеидов и ферредоксинов [9]. Показано, что освещение активирует образование метана содержащими F_{420} интактными клетками и ферментными системами метанообразующих бактерий [13], что указывает на возможность световой активации реакций, протекающих с участием F_{420}.

Целью настоящей работы было исследование фотобиохимических свойств природного деазафлавинового соединения — кофермента F_{420}.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лиофилизированный препарат кофермента F_{420} был получен от Р. Вольфа (Иллинойский университет, США).

В работе использовали NAD, NADP, метилвиологен и дитиотреитол фирмы «Serva» (ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации х. ч. или ос. ч. В опытах по фотообразованию H_2 использовали гидрогеназу из *Thiocapsa roseopersicina*. Метод очистки гидрогеназы приведен в работе Гоготова и др. [14]. Удельная активность фермента по выделению H_2 из восстановленной формы метилвиологена составила 10 мкмоль H_2/мин на 1 мг белка при 30°.

Фотовосстановление NAD^+, $NADP^+$ и метилвиологена проводили в вакуумированных трубках Тунберга, приспособленных для спектральных измерений. За образованием восстановленного метилвиологена и продуктов восстановления NAD^+ следили по изменению оптической плотности в максимумах поглощения катион-радикала метилвиологе-

на при 605 нм ($\varepsilon = 13\,300\ M^{-1}\,см^{-1}$), димера $(NAD)_2$ при 340 нм ($\varepsilon = 6400\ M^{-1}\,см^{-1}$) и NADH при 340 нм ($\varepsilon = 6300\ M^{-1}\,см^{-1}$). Образование H_2 определяли газо-хроматографическим методом [15]. Опыты проводили при 20±1°. Пробы освещали конденсированным светом лампы накаливания (100 Вт) в области 420 нм или линиями ртути 436 нм, выделенными из спектра ламп СВД-120А или ДРШ-250. Интенсивность света определяли при помощи ферриоксалатного актинометра. Спектры поглощения снимали на спектрофотометрах Perkin-Elmer-554 и СФ-14; флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре MPF-4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фотовосстановление NAD^+ и $NADP^+$. *In vivo* деазафлавиновый кофермент F_{420} участвует в катализируемом F_{420}-NADP-оксидоредуктазой восстановлении $NADP^+$. В связи с этим представляло интерес исследовать возможность фотовосстановления NAD^+ и $NADP^+$, сенсибилизированного изолированным коферментом F_{420}. С этой целью водные вакуумированные растворы F_{420}, содержащие NAD^+ и дитиотреитол, освещали в области длинноволновой полосы поглощения F_{420} (420 нм; см. рис. 1). В результате освещения наблюдался рост оптической плотности раствора при 340 нм, указывающий на восстановление NAD^+; при этом оптическая плотность при 420 нм не изменялась, что свидетельствовало об отсутствии накопления восстановленной формы F_{420} или его расходования в ходе фотореакции (рис. 2). Квантовый выход сенсибилизированного коферментом F_{420} фотовосстановления NAD^+ дитиотреитолом составил 0,63±0,06 (в расчете на перенос одного электрона). В качестве доноров электрона были эффективны также L-цистеин и натриевая соль ЭДТА; при использовании аскорбата, оксалата или глюкозы реакция была менее эффективна (рис. 3, табл. 1).

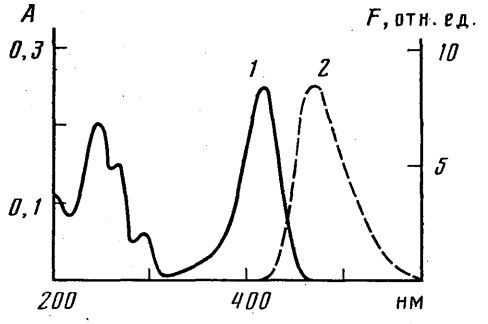


Рис. 1

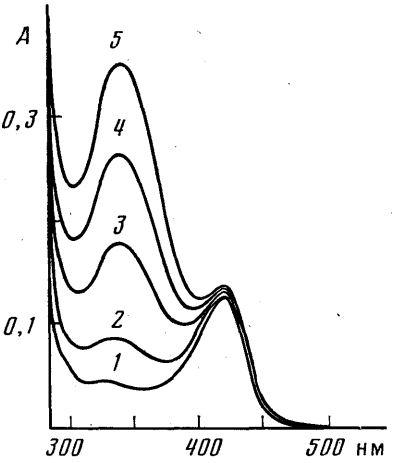


Рис. 2

Рис. 1. Спектр поглощения (*1*) и спектр флуоресценции (*2*) деазафлавина F_{420} в 50 мМ фосфатном буфере, pH 6,9

Рис. 2. Сенсибилизированное деазафлавином F_{420} фотовосстановление NAD^+. Длительность освещения, мин: *1* — 0; *2* — 0,5; *3* — 1,5; *4* — 2,5; *5* — 3,5. Условия опыта: 3,6 мкМ F_{420}, 50 мМ дитиотреитол, 1 мМ NAD^+, 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,9, $I_0 = 2{,}5 \cdot 10^4$ эрг/см² в 1 с

Освещение растворов, не содержащих донор электрона или F_{420}, в аналогичных условиях не приводило к восстановлению NAD^+. При действии света на растворы F_{420} с дитиотреитолом в отсутствие NAD^+ наблюдалось снижение оптической плотности при 420 нм, частично обращаемое при контакте с воздухом (рис. 4), а также снижение интенсивности флуоресценции F_{420}, что указывает на восстановление деазафлавина [1]. Квантовый выход фотовосстановления F_{420} дитиотреитолом составил 0,03. Сенсибилизированное деазафлавином F_{420} фотовосстановление $NADP^+$ протекало так же эффективно, как и фотовосстановление NAD^+.

Таблица 1

Квантовые выходы сенсибилизированного деазафлавином F_{420} фотовосстановления NAD^+ и метилвиологена, (электрон/квант)·100

Донор электрона, 0,05 М	Акцептор электрона		Донор электрона, 0,05 М	Акцептор электрона	
	NAD^+	Метилвиологен		NAD^+	Метилвиологен
Дитиотреитол	63	52	Оксалат	0,3	0,3
Цистеин	23	56	Формиат	—	0,4
ЭДТА·2Na	25	48	Аскорбат	1,6	0
Щавелевоуксусная кислота	—	2,5	Глюкоза	1,3	0,6
Пируват	—	2,3	Без донора электрона	0	0

Для идентификации продуктов фотовосстановления NAD^+ или $NADP^+$ была использована ферментативная система, содержащая глутаматдегидрогеназу, α-кетоглутарат и фосфат аммония, которая была способна окислять NADH и NADPH при восстановительном аминировании α-кетокислоты. Добавление этой системы к реакционной смеси, содержащей продукты фотовосстановления NAD^+ (или $NADP^+$), не приводило к снижению оптической плотности при 340 нм. В то же время используемая ферментативная система вызывала эффективное окисление внесенных в реакционную смесь NADH или NADPH.

Известно, что электрохимическим путем NAD^+ восстанавливается одноэлектронно, образуя радикалы $NAD^{\cdot}$, которые претерпевают быструю димеризацию с образованием димерного продукта $(NAD)_2$ 4,4′-тетрагидробипиридинового типа, имеющего, так же как и NADH, максимум поглощения при 340 нм [16]. В отличие от NADH, димер $(NAD)_2$ не

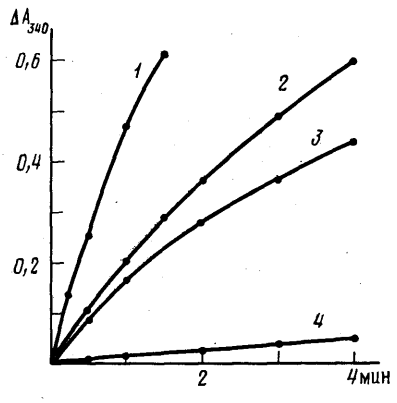


Рис. 3

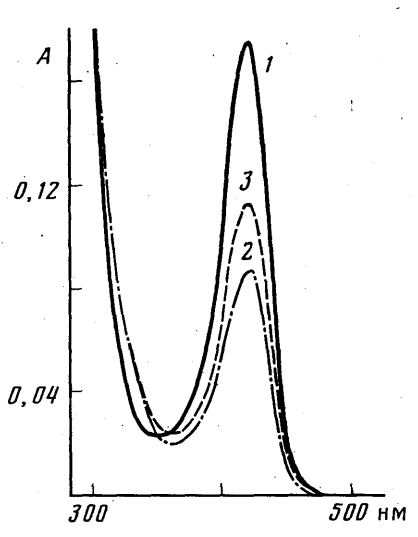


Рис. 4

Рис. 3. Временные кинетические кривые сенсибилизированного деазафлавином F_{420} фотовосстановления NAD^+. Доноры электрона: *1* — дитиотреитол, *2* — ЭДТА·2Na, *3* — L-цистеин, *4* — аскорбат. Условия опыта: 5 мкМ F_{420}, 50 мМ донор электрона, 1 мМ NAD^+, 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,9, $I_0 = 6{,}7 \cdot 10^4$ эрг/см² в 1 с

Рис. 4. Фотовосстановление деазафлавина F_{420}. Спектры поглощения: *1* — до освещения, *2* — после освещения, *3* — после впуска воздуха в трубку Тунберга. Условия опыта: 4,5 мкМ F_{420}, 50 мМ дитиотреитол, 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,5

вступает в реакции, катализируемые дегидрогеназами, слабо флуоресцирует и окисляется феррицианидом [16, 17]. Тот факт, что глутаматдегидрогеназа неспособна катализировать реакцию восстановительного аминирования α-кетоглутарата за счет окисления продукта фотовосстановления NAD^+, указывает на образование $(NAD)_2$, а не NADH в ходе фотореакции. Об этом свидетельствует также действие феррицианида:

Таблица 2

Окисление продукта сенсибилизированного деазафлавином F_{420} фотовосстановления NAD^+ феррицианидом калия

Фотовосстановление NAD^+ проводили в реакционной смеси, содержащей 50 мМ ЭДТА·2Na, 3,6 мкМ F_{420}, 1 мМ NAD и 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,9

Концентрация $K_3Fe(CN)_6$, мкМ	Изменение оптической плотности при 340 нм	Изменение концентрации $(NAD)_2$, мкМ	$[K_3Fe(CN)_6]/[(NAD)_2]$
30	0,12	17,2	1,77
60	0,20	31,2	1,85
100	0,31	48,5	2,06

добавление феррицианида к реакционной смеси, содержащей продукт фотовосстановления NAD^+, приводит к снижению оптической плотности при 340 нм (табл. 2); при этом отношение концентраций добавленного феррицианида и окисленного $(NAD)_2$ находится в согласии со стехиометрией реакции: $(NAD)_2+2Fe^{3+}\rightarrow 2NAD^+ + 2Fe^{2+}$.

Флуорометрическое определение NADH в присутствии F_{420} затруднено из-за близости максимумов флуоресценции NADH (468 нм) и деазафлавина (472 нм). Однако измерение спектров возбуждения флуоресценции реакционной смеси, содержащей F_{420} и продукт восстановления NAD^+, обнаружило максимум в области 330—340 нм, что указывает на присутствие NADH (рис. 5). Предварительная оценка показала, что в ходе сенсибилизированной реакции NADH образуется в количествах, составляющих не более 1% от количества $(NAD)_2$.

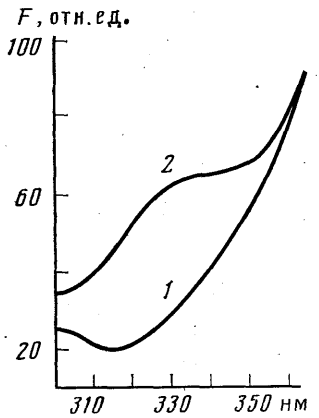


Рис. 5

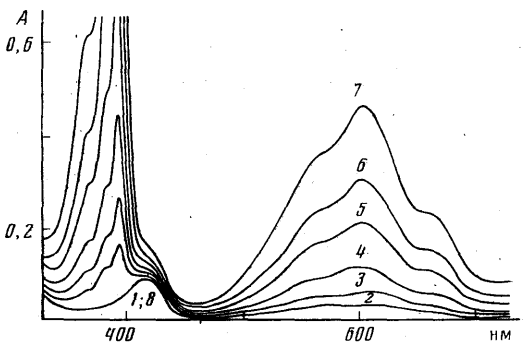


Рис. 6

Рис. 5. Спектры возбуждения флуоресценции реакционной смеси, содержащей 5 мкМ F_{420}, 50 мМ дитиотреитол и 1 мМ NAD^+, полученные до (*1*) и после (*2*) освещения

Рис. 6. Сенсибилизированное деазафлавином F_{420} фотовосстановление метилвиологена. Длительность освещения, мин: *1* — 0, *2* — 3, *3* — 6, *4* — 12, *5* — 24, *6* — 36, *7* — 60; *8* — впуск воздуха после освещения. Условия опыта: 2,7 мкМ F_{420}, 50 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ метилвиологен, $I_0=10^3$ эрг/см^2 в 1 с, 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,9

Для фотореакций, протекающих с участием синтетических деазафлавинов как сенсибилизаторов, показан восстановительный механизм переноса электрона [8, 12]. По-видимому, реакции фотовосстановления NAD^+ и $NADP^+$, сенсибилизированные природным деазафлавином F_{420}, также протекают по восстановительному механизму: на первом этапе реакции происходит окисление донора электрона находящимся в триплетном состоянии F_{420}; при этом образуется радикал $F^{\cdot}_{420}$. Радикалы синтетических деазафлавинов являются сильными восстановителями — значения их окислительно-восстановительных потенциалов достигают —0,8 В [10]. Не менее сильным восстановителем, по-видимому, является радикал $F^{\cdot}_{420}$, о чем свидетельствует его способность восстанавливать NAD^+ (потенциал одноэлектронного восстановления NAD^+ составляет

—0,94 В [18]). Восстановленный F_{420}, вероятно, не является интермедиатом сенсибилизированной реакции, поскольку его восстановительные способности недостаточны для восстановления NAD до $(NAD)_2$: окислительно-восстановительный потенциал F_{420} составляет —0,373 В [8]. На это указывает также различие квантовых выходов фотовосстановления F_{420} (0,03) и NAD^+ (0,63) дитиотреитолом.

Учитывая вышеизложенное, механизм фотовосстановления NAD^+, сенсибилизированного деазафлавином F_{420}, можно представить следующей схемой реакции:

$$F_{420} \underset{h\nu'}{\overset{h\nu}{\rightleftarrows}} {}^2F^*_{420} \rightarrow {}^3F^*_{420}, \quad (1)$$

$${}^3F^*_{420} + D_{red} \rightarrow F^{\cdot}_{420} + D^{\cdot}, \quad (2)$$

$$F^{\cdot}_{420} + D^{\cdot} \rightarrow F_{420} + D_{red}, \quad (3)$$

$${}^3F^*_{420} + D^{\cdot} \rightarrow F^{\cdot}_{420} + D_{ox}, \quad (4)$$

$$F^{\cdot}_{420} + NAD^+ \rightarrow F_{420} + NAD^{\cdot}, \quad (5)$$

$$NAD^{\cdot} + NAD^{\cdot} \rightarrow (NAD)_2, \quad (6)$$

где ${}^2F^*_{420}$ — возбужденное синглетное состояние, ${}^3F^*_{420}$ — триплетное состояние деазафлавина, D_{red}, D_{ox} — восстановленный и окисленный донор электрона соответственно.

При исследовании фотовосстановления деазарибофлавина оксалатом предполагался одновременный перенос двух электронов к триплету деазафлавина, сопровождающийся декарбоксилированием оксалата и нуклеофильным присоединением субстрата; образование радикалов деазафлавина в этой реакции объяснялось взаимодействием промежуточного соединения со второй молекулой деазарибофлавина, находящейся в триплетном состоянии [10]. Возможно, что фотовосстановление F_{420} при использовании в качестве доноров электрона оксалата, аскорбата и глюкозы происходит также по описанному механизму. Необходимость двух молекул деазафлавина, находящихся в триплетном состоянии, для образования радикалов сенсибилизатора может быть причиной низких квантовых выходов фотовосстановления NAD^+ в этом случае (см. табл. 1).

Фотовосстановление метилвиологена. В качестве акцептора электронов в фотосенсибилизированных реакциях часто используется метилвиологен (MB^{2+}) — 1,1′-диметил-γ-γ′-дипиридил, имеющий окислительно-восстановительный потенциал (E_0 = —0,45 В), близкий к потенциалу ферредоксина растений. Ранее была показана способность деазарибофлавина и 3,10-диметил-5-деазаизоаллоксазина сенсибилизировать фотовосстановление MB^{2+} при использовании в качестве доноров электрона разнообразных органических соединений [11]. Установлен восстановительный механизм переноса электрона при сенсибилизированном синтетическими деазафлавинами фотовосстановлении MB^{2+} [12].

Деазафлавиновый кофермент F_{420} в анаэробных условиях также способен сенсибилизировать фотовосстановление MB^{2+}. Освещение вакуумированных растворов F_{420}, содержащих MB^{2+} и донор электрона, приводит к появлению характерного спектра поглощения катион-радикала метилвиологена ($MB^{+\cdot}$) с максимумами поглощения при 395 нм и 605 нм (рис. 6). Наиболее эффективными донорами электрона при фотовосстановлении MB^{2+} так же, как и при фотовосстановлении NAD^+, явились дитиотреитол, L-цистеин и ЭДТА·2Na (см. табл. 1 и рис. 7). При использовании аскорбата накопление восстановленного метилвиологена не наблюдалось, что, по-видимому, объясняется прохождением «обратной» реакции — окисления $MB^{+\cdot}$ дегидроаскорбатом.

Возвращаясь к рис. 6, отметим, что спектры поглощения F_{420} до освещения (кривая *1*) и после окисления $MB^{+\cdot}$ кислородом воздуха (кривая *8*) полностью совпадают, что указывает на отсутствие расходования сенсибилизатора. Деазафлавин F_{420} не расходовался также при использовании других доноров электрона, за исключением формиата и глюкозы.

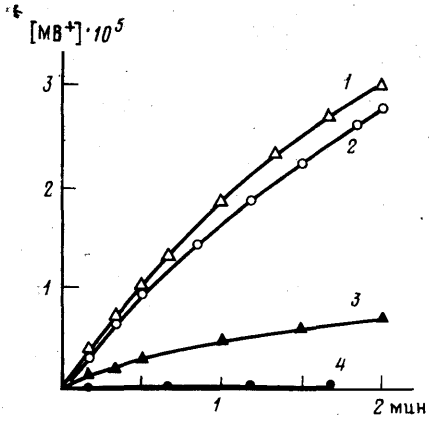


Рис. 7

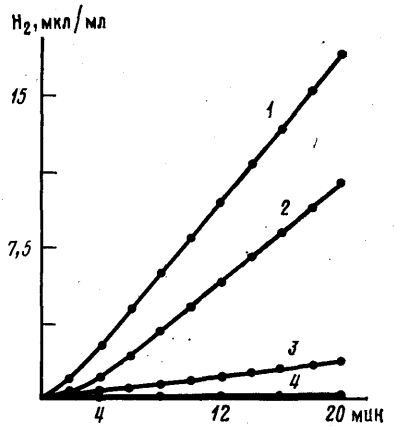


Рис. 9

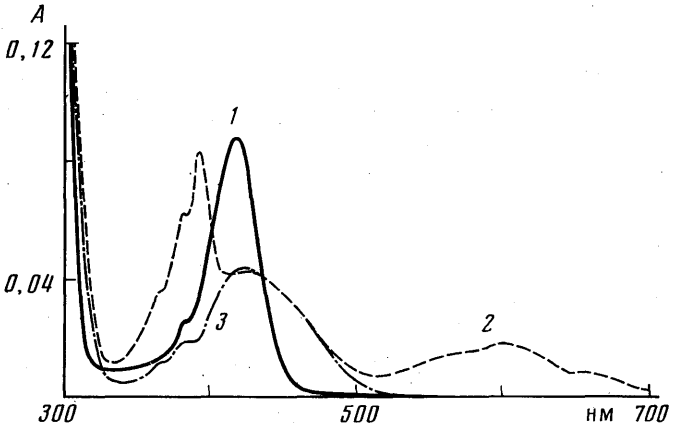


Рис. 8

Рис. 7. Временные кинетические кривые фотовосстановления метилвиологена, сенсибилизированного деазафлавином F_{420} (*1, 2*) и хлорофиллом *a* (*3, 4*). Доноры электрона: *1* и *3* — дитиотреитол, *2* и *4* — ЭДТА·2Na. Условия опыта: 6,9 мкМ F_{420}, 1,5 мкМ хлорофилл *a* в 1%-ном тритоне X-100, 50 мМ донор электрона, 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,9, $I_0 = 1{,}6 \cdot 10^3$ эрг/см² в 1 с

Рис. 8. Деструкция деазафлавина F_{420} при фотовосстановлении метилвиологена формиатом. Спектры поглощения: *1* — до освещения, *2* — после освещения, *3* — после впуска воздуха. Условия опыта: 4,8 мкМ F_{420}, 50 мМ формиат, 0,5 мМ метилвиологен, 50 мМ фосфатный буфер, pH 7,2

Рис. 9. Временные кинетические кривые фотообразования водорода, сенсибилизированного деазафлавином F_{420} (*1, 2*) и хлорофиллом *a* (*3, 4*). Доноры электрона: *1* и *3* — дитиотреитол, *2* и *4* — ЭДТА·2Na. Условия опыта: 23 мкМ F_{420}, 7 мкМ хлорофилл *a* в 1%-ном тритоне X-100, 50 мМ донор электрона, 0,5 мМ метилвиологен, 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,9, 0,1 мл гидрогеназы из *Thiocapsa roseopersicina* $I_0 = 1{,}4 \cdot 10^4$ эрг/см² в 1 с

В последнем случае в ходе фотореакции наблюдалось снижение поглощения при 420 нм и его увеличение при 430—510 нм (рис. 8). Подобные изменения в спектре поглощения F_{420} были получены ранее при освещении водных растворов F_{420} на воздухе и объяснялись деструкцией деазафлавина [1]. Сходные изменения спектра поглощения F_{420} мы наблюдали также при освещении растворов F_{420} в присутствии $МВ^{2+}$ в анаэробных условиях и в отсутствие доноров электрона.

Следует отметить, что F_{420} сенсибилизирует фотовосстановление $МВ^{2+}$ более эффективно, чем хлорофилл: квантовый выход сенсибилизированного хлорофиллом фотовосстановления $МВ^{2+}$ дитиотреитолом составляет $0{,}2 \pm 0{,}02$ по сравнению с $0{,}5 \pm 0{,}05$ для F_{420}. При использовании в качестве донора электронов 0,05 М ЭДТА·2Na сенсибилизированное хлорофиллом *a* фотовосстановление метилвиологена не наблюдается (рис. 7).

Таблица 3

Квантовые выходы фотообразования водорода, сенсибилизированного деазафлавином F_{420} или хлорофиллом *a*, (электрон/квант)·100

Донор электрона, 0,05 М	Сенсибилизатор		Донор электрона, 0,05 М	Сенсибилизатор	
	F_{420}	хлорофилл *a*		F_{420}	хлорофилл *a*
Дитиотреитол	27	2,6	ЭДТА·2Na	18	0,1
Цистеин	23	1,9	Без донора электрона	0	0

Бóльшая эффективность деазафлавина F_{420} в качестве сенсибилизатора фотовосстановления MB^{2+} может объясняться различными механизмами переноса электрона в реакциях, сенсибилизированных F_{420} и хлорофиллом. Известно, что хлорофилл сенсибилизирует восстановление MB^{2+} по окислительному механизму: реакция начинается окислением хлорофилла, находящегося в триплетном состоянии, акцептором электрона [19]. На этом этапе реакция является высокообратимой, поскольку в результате переноса электрона образуется сильный окислитель — катион-радикал хлорофилла ($E_0 = +0{,}74$ В) и сильный восстановитель — $MB^{+\cdot}$ ($E_0 = -0{,}45$ В). Высокая обратимость фотовосстановления MB^{2+} лимитирует перенос электронов, сенсибилизированный хлорофиллом. В реакции, сенсибилизированной деазафлавином F_{420}, обратный перенос электронов может быть затруднен, поскольку MB^{2+} восстанавливается радикалом $F^{\cdot}_{420}$.

Фотообразование водорода. У метанобразующих бактерий F_{420} восстанавливается H_2 при участии гидрогеназы [1, 5]. Показано также образование H_2 в присутствии восстановленного F_{420} и экстрактов *Metanobacterium ruminantium*, содержащих гидрогеназу [4].

Способность деазафлавина F_{420} сенсибилизировать фотовосстановление MB^{2+}, имеющего окислительно-восстановительный потенциал, близкий к таковому водородного электрода, указывает на возможность сенсибилизированного F_{420} фотообразования H_2 при наличии гидрогеназы, катализирующей реакцию: $2H^+ + 2\bar{e} \rightarrow H_2$. Действительно, при добавлении гидрогеназы из пурпурной серобактерии *Thiocapsa roseopersicina* в раствор, содержащий F_{420} и донор электрона, в анаэробных условиях наблюдается фотообразование водорода (рис. 9). MB^{2+}, осуществляющий перенос электронов от деазафлавина к гидрогеназе, увеличивает скорость фотообразования H_2 примерно в 30 раз.

Так же, как при фотовосстановлении MB^{2+}, при фотообразовании водорода деазафлавин F_{420} является более эффективным сенсибилизатором, чем хлорофилл *a*. Квантовые выходы сенсибилизированного F_{420} фотообразования H_2 на порядок превышают квантовые выходы реакции, сенсибилизированной хлорофиллом *a* (табл. 3).

Предполагая восстановительный механизм фотообразования H_2, сенсибилизированного деазафлавином F_{420}, перенос электрона в этой реакции можно представить в виде схемы, показанной на рис. 10.

О фотобиологической роли изученных реакций. Полученные данные показывают, что деазафлавиновый кофермент F_{420} способен с высокой эффективностью сенсибилизировать восстановление низкопотенциальных акцепторов электрона при использовании в качестве доноров электрона разнообразных органических соединений. Ранее было установлено, что синтетические деазафлавины являются более эффективными сенсибилизаторами, чем флавины [9], акридиновые красители и трис-бипиридильный комплекс рутения [11]. В настоящей работе показана бóльшая эффективность природного деазафлавина F_{420} как сенсибилизатора фотовосстановления MB^{2+} и фотообразования H_2 по сравнению с хлорофиллом *a* — сенсибилизатором переноса электрона у фотосинтезирующих организмов. По-видимому, F_{420} можно считать одним из наиболее эффективных сенсибилизаторов из природных соединений, обладающих фотохимической активностью.

При действии света на микроорганизмы, содержащие F_{420}, возможно окисление присутствующих органических соединений и восстановление эндогенных акцепторов электрона. При этом вероятно запасание энергии света в форме химической энергии восстановленных соединений.

Фотоактивация F_{420} может лежать в основе обнаруженной ранее световой активации синтеза метана культурой метанобразующей бактерии [13] и фотообразования H_2 бесклеточными экстрактами из *Methanobacillus kuzneceovii* [22].

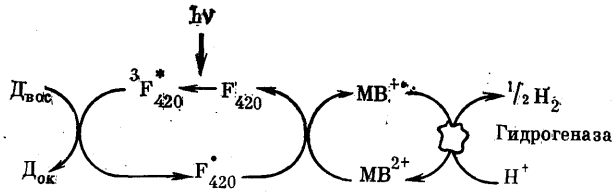


Рис. 10. Схема переноса электрона при сенсибилизированном деазафлавином F_{420} фотообразовании H_2.
$Д_{вос}$, $Д_{ок}$ — восстановленный и окисленный донор электрона соответственно, $^3F^*_{420}$ — триплетное состояние деазафлавина, MB^{2+} — метилвиологен

У метанобразующих бактерий на свету можно ожидать также образования $(NAD)_2$ и $(NADP)_2$. Димеры никотинамидных коферментов до сих пор не найдены в биологических объектах, однако способность митохондриальных экстрактов окислять $(NAD)_2$ и взаимодействие $(NAD)_2$ с рядом дегидрогеназ [17] указывают на возможное участие продуктов одноэлектронного восстановления NAD^+ и $NADP^+$ в биологических окислительно-восстановительных процессах.

Предполагается, что на эволюционном пути возникновения фотосинтеза при переходе от гетеротрофии к автотрофии была возможна стадия световой активации коферментов [20]. Ранее нами была показана световая активация восстановленных никотинамидных коферментов [21]. Исходя из полученных данных, можно предположить, что активация светом деазафлавиновых коферментов могла приводить к запасанию энергии солнечной радиации некоторыми видами архебактерий на первичных стадиях биологической эволюции.

Авторы выражают благодарность проф. Р. Вольфу, любезно предоставившему кофермент F_{420}, и Н. А. Зорину — за препарат гидрогеназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cheesman P., Toms-Wood A., Wolfe R. S.* J. Bacteriol., 1972, v. 112, p. 527—531.
2. *Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. S.* J. Bacteriol., 1979, v. 140, p. 20—27.
3. *Tzeng S. F., Wolfe R. S., Bryant M. P.* J. Bacteriol., 1975, v. 121, p. 184—191.
4. *Tzeng S. F., Bryant M. P., Wolfe R. S.* J. Bacteriol., 1975, v. 121, p. 192—196.
5. *Daniels L., Sparling R., Sprott G. D.* Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 768, p. 113—163.
6. *Zeikus J. G.* Bacteriol. Rev., 1977, v. 41, p. 514—541.
7. *Elofson W. L., Wolfe R. S.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 8388—8389.
8. *Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. S.* Biochemistry, 1978, v. 17, p. 4588—4593.
9. *Massey V., Hemmerich P.* J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 5612—5614.
10. *Goldberg M., Israel P., Kramer H. E. A., Traber R., Hemmerich P.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 673, p. 570—593.
11. *Krasna A.* Photochem. and Photobiol., 1980, v. 31, p. 75—82.
12. *Visser A. J. W. G., Fendler J. H.* J. Phys. Chem., 1982, v. 86, p. 2406—2409.
13. *Панцхава Е. С.* Биохимия, 1977, т. 42, с. 549—559.
14. *Гоготов И. Н., Зорин Н. А., Кондратьева Е. Н.* Биохимия, 1976, т. 41, с. 836—842.
15. *Ощепков В. П., Красновский А. А.* Прикл. биохимия и микробиология, 1974, т. 10, с. 760—764.
16. *Burnett R. W., Underwood A. L.* Biochemistry, 1968, v. 7, p. 3328—3333.
17. *Finazzi-Argo A., Avigliano L., Carelli V., Liberatore F., Casini A.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 661, p. 120—123.
18. *Farrington J. A., Land E. J., Swallow A. J.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 590, p. 273—276.

19. *Kalyanasundaram K., Porter G.* Proc. Roy. Soc., London, 1978, v. A364, p. 29—44.
20. *Красновский А. А.* В кн.: Возникновение жизни на Земле. М.: Изд-во АН СССР, 1957, с. 356—371.
21. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.* Биохимия, 1978, т. 43, с. 636—645.
22. *Панцхава Е. С.* Докл. АН СССР, 1976, т. 230, с. 378—482.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
26.XII.1984

PHOTOBIOCHEMICAL PROPERTIES OF DEAZAFLAVIN COENZYME F_{420}

NIKANDROV V. V., PANTSKHAVA E. S., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effect of illumination on redox properties of the deazaflavin coenzyme F_{420} isolated from methane-generating bacteria was studied. The ability of F_{420} to sensitize the photoreduction of NAD^+, $NADP^+$, methylviologen and photogeneration of H_2 was established in experiments with thiocompounds, organic acids, amino acids, and sugars as electron donors. The products of NAD^+ and $NADP^+$ photoreduction were the dimers — $(NAD)_2$ and $(NADP)_2$ as well as NADH and NADPH with low yields. The quantum yields of NAD^+, $NADPH^+$ and methylviologen photoreduction amounted to 60%. The photogeneration of H_2 sensitized by coenzyme F_{420} was observed in the presence of bacterial hydrogenase. Under anaerobic conditions in the absence of electron acceptors a photoreduction of F_{420} partly reversed by O_2 was observed. The role of reactions studied in photobiology and possible involvement of the deazaflavin coenzyme in evolution of photosynthesis are discussed.

В.В. НИКАНДРОВ, Е.С. ПАНЦХАВА,
академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

СВЕТОВАЯ АКТИВАЦИЯ ДЕАЗАФЛАВИНОВОГО КОФЕРМЕНТА F_{420}: СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ NAD^+, $NADP^+$, МЕТИЛВИОЛОГЕНА И ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА

В 1972 г. из Metanobacterium M.o.H. было выделено низкомолекулярное соединение, названное фактором 420 (F_{420}) благодаря интенсивному поглощению света при 420 нм [1]. F_{420} был найден во всех обследованных метангенерирующих бактериях в относительно больших количествах [2]. Установлено участие F_{420} в переносе электронов от субстратов метаногенов – водорода и формиата к $NADP^+$, а также в восстановлении метилированного кофермента М [3, 4]. Исследование структуры F_{420} показало, что он представляет собой 7,8-дидеметил-8-гидрокси-5-деазарибофлавин-5-фосфат, к которому через фосфодиэфирную связь присоединена N-(N-*L*-лактил-γ-*L*-глутамил)-*L*-глутаминовая кислота [5]. Известно, что синтетические деазафлавины обладают фотохимической активностью и способны сенсибилизировать фотовосстановление ряда низкопотенциальных акцепторов электрона [6–8]. Описана активация образования метана при действии света на содержащие F_{420} интактные клетки и ферментные системы метаногенной бактериальной культуры [9].

Целью настоящей работы явилось исследование фотобиохимических свойств природного деазафлавинового соединения – кофермента F_{420}.

Лиофилизированный препарат F_{420} был получен от Р. Вольфа, Иллинойский университет, США. Фотовосстановление NAD^+, $NADP^+$ и метилвиологена (MB^{2+}) проводили в вакуумированных трубках Тунберга, приспособленных для спектральных измерений. За образованием восстановленного метилвиологена и продуктов восстановления NAD^+ следили по изменению оптической плотности в максимумах поглощения катион-радикала MB^+ при 605 нм (ϵ_M = 13300), димера $(NAD)_2$ при 340 нм (ϵ_M = 6400) и NADH при 340 нм (ϵ_M = 6300). Измерение водорода осуществляли газохроматографически. Освещение проводили конденсированным светом лампы накаливания (100 Вт) в области 420 нм или линиями ртути 436 нм, выделенными из спектра лампы СВД-120А. Интенсивность света определяли с помощью ферриоксалатного актинометра. Спектры поглощения снимали на спектрофотометрах Perkin–Elmer 554 и СФ-14; флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре MPF-4.

Фотовосстановление NAD^+ и $NADP^+$. In vivo F_{420} участвует в катализируемом F_{420}–NADP-оксидоредуктазой восстановлении $NADP^+$. Представляло интерес исследовать возможность фотовосстановления NAD^+ и $NADP^+$, сенсибилизированного изолированным коферментом F_{420}. С этой целью водные вакуумированные растворы F_{420}, содержащие NAD^+ и дитиотреитол, освещались в области длинноволновой полосы поглощения F_{420} (420 нм). В результате освещения наблюдался рост оптической плотности раствора при 340 нм, указывающий на восстановление NAD^+, при этом оптическая плотность при 420 нм не изменялась, что свидетельствовало об отсутствии накопления восстановленной формы F_{420} или его расходования в ходе фотореакции (рис. 1). Освещение растворов, не содержащих донор электрона или F_{420}, не приводило к восстановлению NAD^+. При действии света на F_{420} с дитиотреитолом в отсутствие NAD^+ наблюдалось падение оптической плотности при 420 нм, указывающее на восстановление деазафлавина. Квантовый

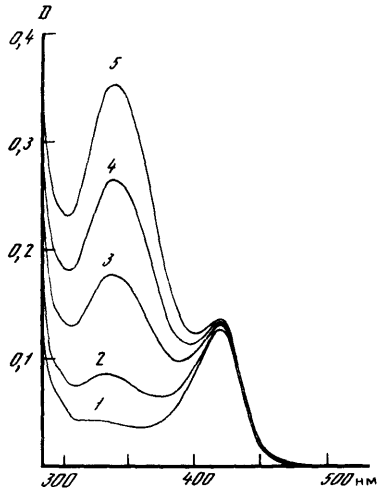


Рис. 1

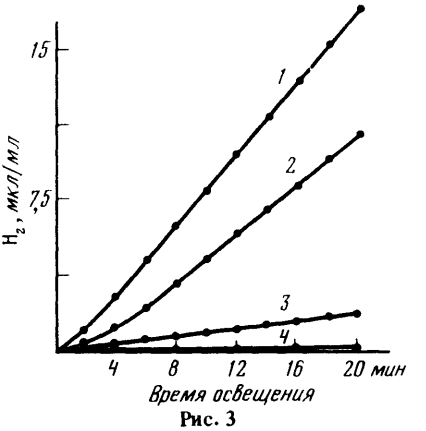


Рис. 3

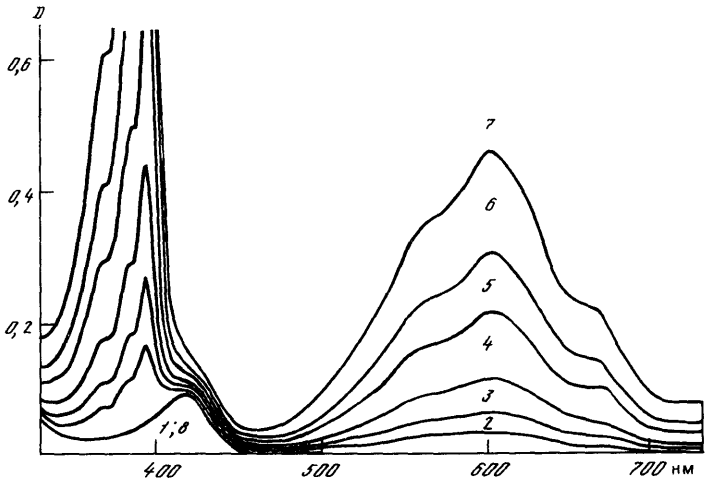


Рис. 2

Рис. 1. Сенсибилизированное деазафлавином F_{420} фотовосстановление NAD^+. Время освещения: *1* – 0 мин, *2* – 0,5 мин, *3* – 1,5 мин, *4* – 2,5 мин, *5* – 3,5 мин. Условия: 3,6 мк*M* F_{420}, 50 м*M* дитиотреитол, 1 м*M* NAD^+, 50 м*M* фосфатный буфер, pH 6,9, $I_0 = 2{,}5 \cdot 10^4$ эрг/см^2·с

Рис. 2. Сенсибилизированное деазафлавином F_{420} фотовосстановление метилвиологена. Время освещения: *1* – 0 мин, *2* – 3 мин, *3* – 6 мин, *4* – 12 мин, *5* – 24 мин, *6* – 36 мин, *7* – 60 мин, *8* – пуск воздуха после 60 мин освещения. Условия: 2,7 мк*M* F_{420}, 50 м*M* дитиотреитол, 0,5 м*M* метилвиологен, $I_0 = 10^3$ эрг/см^2·с

Рис. 3. Кинетические кривые фотообразования водорода, сенсибилизированного деазафлавином F_{420} (*1*, *2*) и хлорофиллом а (*3*, *4*). Доноры электрона: 50 м*M* дитиотреитол (*1*, *3*), 50 м*M* ЭДТА · 2Na (*2*, *4*). Условия: 23 мк*M* F_{420}, 7 мк*M* хлорофилл, в растворе 1% тритона X-100, 50 м*M* фосфатный буфер, pH 6,9, $I_0 = 1{,}4 \cdot 10^4$ эрг/см^2.с., 0,1 мл гидрогеназы Thiocapsa roseopersicina активности 10 ед., 0,5 м*M* метилвиологен

Таблица 1

Квантовые выходы сенсибилизированного деазафлавином F_{420} фотовосстановления NAD^+ и метилвиологена, (электрон/квант)·100

Донор электрона, 0,05 *M*	Акцептор электрона	
	NAD^+	Метилвиологен
Дитиотреитол	63	52
Цистеин	23	56
ЭДТА · 2Na	25	48
Щавелевоуксусная кислота	–	2,5
Пируват	–	2,3
Оксалат	0,3	0,3
Формиат	–	0,4
Глюкоза	1,3	0,6
Аскорбат	1,6	0
Без донора электрона	0	0

выход сенсибилизированного F_{420} фотовосстановления NAD^+ составил 0,63 ± 0,06 (в расчете на перенос одного электрона). В качестве доноров электрона были эффективны также цистеин и ЭДТА · 2Na (табл. 1). Сенсибилизированное F_{420} фотовосстановление $NADP^+$ протекает так же эффективно, как и фотовосстановление NAD^+. Для идентификации продуктов фотовосстановления NAD^+ и $NADP^+$ нами была использована ферментативная система, содержащая глутаматдегидрогеназу, α-кетоглутарат и фосфат аммония, которая была способна окислять NADH и NADP-H. Добавление этой системы к раствору, содержащему продукты фотовосстановления NAD^+ (или $NADP^+$), не приводило к падению оптической плотности при 340 нм; в то же время используемая ферментативная система вызывала эффективное окисление внесенных в реакционную смесь NAD-H и NADP-H.

Известно, что электрохимически NAD^+ восстанавливается одноэлектронно, давая радикалы $NAD^{\cdot}$, которые претерпевают быструю димеризацию с образованием $(NAD)_2$ имеющего, так же как и NAD-H максимум поглощения при 340 нм [10]. В отличие от NAD-H димер $(NAD)_2$ не вступает в реакции, катализируемые дегидрогеназами, не флуоресцирует и окисляется феррицианидом [11]. Тот факт, что глутаматдегидрогеназа не способна катализировать окисление продукта фотовосстановления NAD^+, указывает на образование $(NAD)_2$ в ходе фотореакции. Об этом свидетельствует также действие феррицианида: добавление 0,1 мкмоль феррицианида к 1 мл реакционной смеси, содержащей продукт фотовосстановления NAD^+, приводило к падению оптической плотности при 340 нм на 0,3, что соответствовало окислению 0,05 мкмоль $(NAD)_2$ и согласуется с реакцией $(NAD)_2 + 2Fe^{3+} \rightarrow 2NAD^+ + 2Fe^{2+}$. Измерение спектров возбуждения флуоресценции реакционной смеси, содержащей F_{420} и продукт фотовосстановления NAD^+, обнаружило максимум в области 330–340 нм, что свидетельствует о присутствии NAD-H. Предварительная оценка показала, что в ходе фотореакции NAD-H образуется в количествах, составляющих не более 1% от $(NAD)_2$.

Фотовосстановление метилвиологена. F_{420} в анаэробных условиях способен также сенсибилизировать фотовосстановление метилвиологена (MB^{2+}) – 4,4′-диметил-γ-γ-дипиридила, имеющего $E_0 = -0{,}45$ В. В ходе фотореакции образуется катион-радикал MB^+ с максимумом поглощения при 605 нм (рис. 2). Наиболее эффективными донорами электрона так же, как и при фотовосстановлении

Таблица 2

Квантовые выходы фотообразования водорода, сенсибилизированного деазафлавином F_{420} и хлорофиллом, (электрон/квант)·100

Донор электрона, 0,05 *M*	Сенсибилизатор	
	F_{420}	Хлорофилл
Дитиотреитол	27	2,6
Цистеин	23	1,9
ЭДТА · 2Na	18	0,1
Без донора электрона	0	0

NAD^+, явились дитиотреитол, цистеин и ЭДТА · 2Na (табл. 1). При использовании аскорбата накопления MB^+ не наблюдалось, что, по-видимому, объясняется прохождением обратной реакции – окисления MB^+ дегидроаскорбатом.

Как видно из рис. 2, спектры поглощения F_{420} до освещения и после окисления MB^+ кислородом воздуха полностью совпадают, что указывает на отсутствие расходования сенсибилизатора. F_{420} не расходовался также при использовании других доноров электрона, за исключением формиата и глюкозы. В последнем случае в ходе фотореакции наблюдалось падение поглощения при 420 нм и рост при 430–510 нм. Подобные изменения в спектре поглощения F_{420} были получены ранее при освещении F_{420} на воздухе и объяснялись деструкцией деазафлавина [1]. Сходные изменения спектра поглощения F_{420} мы наблюдали также при освещении растворов F_{420} с MB^{2+} в анаэробных условиях в отсутствие доноров электрона.

Следует отметить, что F_{420} сенсибилизирует фотовосстановление MB^{2+} более эффективно, чем хлорофилл. Так, в водном растворе 0,5% тритона X-100 при условиях, описанных в подписи к рис. 2, квантовый выход сенсибилизированного хлорофиллом фотовосстановления MB^{2+} составил 0,2 в сравнении с 0,5 для F_{420}.

Фотообразование водорода. Способность F_{420} сенсибилизировать фотовосстановление MB^{2+}, имеющего редокс-потенциал, близкий потенциалу водородного электрода, указывает на возможность сенсибилизированного F_{420} фотообразования H_2 при использовании катализатора, способствующего реакции: $2H^+ + 2\bar{e} \rightarrow H_2$. Действительно, при введении в раствор, содержащий F_{420} и донор электрона, гидрогеназы, выделенной из пурпурных серобактерий Thiocapsa roseopersicina, в анаэробных условиях наблюдается фотообразование H_2 (рис. 3) MB^{2+} значительно активирует эту реакцию. Квантовые выходы сенсибилизированного F_{420} фотообразования H_2 на порядок превышают квантовые выходы реакции, сенсибилизированной хлорофиллом (табл. 2).

Таким образом, деазафлавиновый кофермент F_{420} способен сенсибилизировать фотовосстановление NAD^+, $NADP^+$, MB^{2+} и фотообразование H_2. Для фотореакций, протекающих с участием синтетических деазафлавинов как сенсибилизаторов, показан восстановительный механизм переноса электрона [6, 8]. По-видимому, реакции, сенсибилизированные F_{420}, также протекают по восстановительному механизму: на первом этапе реакции происходит восстановление находящегося в триплетном состоянии F_{420}, при этом образуется радикал $F_{420}^{\cdot}$.

Радикалы синтетических деазафлавинов являются сильными восстановителями – значения их редокс потенциалов достигают – 0,8 В [7]. Не менее сильным восстановлением, по-видимому, является $F_{420}^{\cdot}$, о чем свидетельствует способность F_{420} сенсибилизировать фотовосстановление таких низкопотенциальных акцепторов

электрона, как MB^{2+} и NAD^+ (потенциал одноэлектронного восстановления NAD^+ составляет −0,94 В [12]). Восстановительный механизм реакций, сенсибилизированных F_{420}, может служить объяснением бо́льшей эффективности F_{420} как сенсибилизатора, в сравнении с хлорофиллом, который сенсибилизирует восстановление MB^{2+} по окислительному механизму [13].

Способность F_{420} с высокой эффективностью сенсибилизировать восстановление низкопотенциальных соединений указывает на возможность запасания энергии света в содержащих F_{420} микроорганизмах или искусственных системах. Фотоактивация F_{420} могла лежать в основе обнаруженной ранее световой активации синтеза метана метаногенной бактериальной культурой [9].

Предполагается, что на пути возникновения фотосинтеза при переходе от гетеротрофии к автотрофии была возможна стадия световой активации коферментов [14]. Исходя из полученных данных, можно предположить, что активация светом деазафлавиновых коферментов могла приводить к запасанию энергии света у некоторых видов археобактерий на первичных стадиях биологической эволюции.

Авторы выражают благодарность проф. Р. Вольфу, предоставившему кофермент F_{420}, и Н.А. Зорину за препарат гидрогеназы.

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

Поступило
26 XI 1984

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gheesman P., Toms-wood A., Wolf R.S.* – J. Bacteriol., 1972, vol. 112, p. 527–531. 2. *Eirich L.D., Vogels G.D., Wolf R.S.* – Ibid., 1979, vol. 140, p. 20–27. 3. *Tzeng S.F., Bryant M.P., Wolf R.S.* – Ibid., 1975, vol. 121, p. 192–196. 4. *Elofson W.L., Wolf R.S.* – J. Biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 8388–8389. 5. *Eirich L.D., Vogels G.D., Wolf R.S.* – Biochemistry, 1978, vol. 17, p. 4588–4593. 6. *Massey V., Hemmerich P.* – J. Biol. Chem., 1977, vol. 252, p. 5612–5614. 7. *Goldberg M., Israel P., Kramer H.E.A. et al.* – Biochim. et biophys. acta, 1981, vol. 673, p. 570–593. 8. *Visser A.J.W.G., Fendler J.H.* – J. Phys. Chem., 1982, vol. 86, p. 2406–2409. 9. *Панцхава Е.С.* – Биохимия, 1977, т. 42, № 3, с. 549–559. 10. *Burnett R.W., Underwood A.L.* – Biochemistry, 1968, vol. 7, p. 3328–3333. 11. *Finazzi-Agro A., Avigliano L., Carelli V. et al.* – Biochim. et biophys. acta, 1981, vol. 661, p. 120–123. 12. *Farrington J.A., Land E.J., Swallow A.J.* – Ibid., 1980, vol. 590, p. 273–276. 13. *Kalyanasundaram K., Porter G.* – Proc. Roy. Soc. London, 1978, vol. A364, p. 29–44. 14. *Красновский А.А.* В сб.: Возникновение жизни на Земле. М.: Изд-во АН СССР, 1957, с. 355–371.

Том 32, вып. 1 1985 г.

УДК 577.15.025

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ВОДОРОДА НА НИТРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ СИНЕЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *ANABAENA VARIABILIS*

О. Г. ПОЛЕССКАЯ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Исследовали влияние экзогенного водорода на нитрогеназную активность *A. variabilis*, измеренную по восстановлению ацетилена методом газовой хроматографии. В атмосфере аргона добавление к газовой фазе 50% водорода вызывало снижение скорости восстановления ацетилена на 30—70%; эффект усиливался при увеличении интенсивности света. Снижение нитрогеназной активности коррелирует и, по-видимому, обусловлено подавлением фотосинтеза: скорость светового выделения кислорода клетками *A. variabilis* ингибировалась на 40—50% после 2 ч инкубации на свету в атмосфере, содержащей водород. В тех же условиях, но при обработке клеток диуроном (10^{-5} М) или при освещении дальним красным светом, водород стимулировал восстановление ацетилена, что указывает на возможность использования водорода в качестве донора электрона для нитрогеназы в светозависимой реакции, связанной с функционированием фотосистемы I. При измерении в атмосфере воздуха внесение в газовую фазу 50% водорода способствует увеличению скорости ацетиленредукции в тем большей степени, чем ниже интенсивность света. По-видимому, этот эффект обусловлен окислением водорода кислородом воздуха в оксигидрогенной реакции, сопряженной с образованием АТФ.

Цианобактерии — водород — восстановление ацетилена — фотосинтез.

Азотфиксирующие синезеленые водоросли (цианобактерии) интенсивно изучаются благодаря их уникальной способности сочетать в метаболизме способность к фиксации молекулярного азота и фотосинтез, идущий с образованием кислорода. Эти процессы в нитях цианобактерий пространственно разделены. Фиксация азота осуществляется в специализированных клетках, гетероцистах, в которых деградирована фотосистема II (ФС II) [1]. Фотосинтез, связанный с функционированием двух фотосистем и поставляющий восстановленные соединения для процесса азотфиксации, осуществляется в вегетативных клетках цианобактерий. Особый интерес представляет образование в процессе фиксации азота молекулярного водорода (H_2); многочисленные исследования ведутся с целью оптимизации этого процесса [2, 3]. Поэтому необходимо знать влияние, которое H_2 может оказывать на метаболизм и прежде всего на нитрогеназную активность. Известно, что цианобактерии обладают гидрогеназной активностью и способны к поглощению как образованного в клетке, так и экзогенного H_2. По современным представлениям, существует два пути использования поглощенного H_2, каждый из которых оказывает стимулирующее влияние на нитрогеназную активность. Кислородзависимое поглощение H_2 (оксигидрогенная реакция) связано с его окислением в дыхательной цепи и сопряжено с образованием АТФ [2—7]. Предполагается, что оксигидрогенная реакция препятствует инактивации нитрогеназы кислородом [4, 5]. Кроме того, H_2 может поддерживать нитрогеназную активность в анаэробных условиях как донор электрона, включаясь в электронтранспортную цепь фотосинтеза через гидрогеназу [7, 8]. В одной из работ [9] сообщалось, что H_2 ингибировал фотосинтез и нитрогеназную активность в культуре *Anabaena sp.*

ТА-1. В связи с противоречивостью известных данных целью настоящей работы было исследование влияния экзогенного H_2 на нитрогеназную активность цианобактерии *Anabaena variabilis*.

МЕТОДИКА

В работе использовали бактериально чистую культуру фототрофной азотфиксирующей цианобактерии *Anabaena variabilis* Kutz, полученную из коллекции микроорганизмов кафедры генетики МГУ. Культуру выращивали на разбавленной в 4 раза безазотистой среде Аллен — Арнона [10] при непрерывном освещении 2 тыс. лк и температуре 25°. Клетки осаждали центрифугированием (1000 *g*, 5 мин) и ресуспендировали в свежей среде выращивания с начальным pH 7,5.

Нитрогеназную активность определяли по способности цианобактерий к восстановлению ацетилена (C_2H_2) до этилена (C_2H_4) [11]. Суспензию клеток помещали в герметично закрывающиеся флаконы и измерения проводили в атмосфере воздуха или аргона. В последнем случае герметично закрытые флаконы наполняли аргоном, медленно пропуская газ над суспензией клеток в течение 3—4 мин. Газообразный H_2 получали посредством электрохимического генератора водорода СГС-2 и вносили во флаконы через шприц в количестве 50% от объема газовой фазы флакона. Ацетилен добавляли в количестве 10% от газовой фазы. Флаконы инкубировали при 30° и при освещении люминесцентными лампами дневного света при интенсивности света 18 тыс. лк (60 Вт/м^2), если не указано иначе. Освещение светом интенсивности 50 тыс. лк (100 Вт/м^2) создавали лампой накаливания 500 Вт. Темновые условия создавали двойным слоем алюминиевой фольги. После 1 ч инкубации 1 мл газа из флакона отбирали шприцем и содержание образовавшегося в пробе C_2H_4 определяли на хроматографе ЛХМ-8 с детектором по ионизации в пламени. Результаты измерений представлены как среднее из четырех повторностей. Ошибка измерений составляла ±10%.

Фотосинтетическое образование O_2 определяли амперометрически с использованием платинового электрода закрытого типа. Реакцию проводили при освещении лампой накаливания при интенсивности света 7 тыс. лк.

Содержание хлорофилла в пробах (20—40 мкг) определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинции 59,9 мМ$^{-1}$·см$^{-1}$ при длине волны 680 нм [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 в зависимости от состава газовой фазы. Восстановление C_2H_2 цианобактериями наблюдали в атмосфере воздуха, т. е. в условиях роста, и в атмосфере аргона, где содержание физиологических акцепторов электрона (N_2 и CO_2) было минимальным, а незначительное содержание O_2 определялось только его образованием в ходе фотосинтеза. В последнем случае скорость фотовосстановления C_2H_2 возрастала и достигала 30—40 мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч (табл. 1). При проведении опытов в темноте добавление H_2 в воздухе несколько увеличивало восстановление C_2H_2 (табл. 1) в согласии с известными работами [4, 5]. В аргоне в темноте восстановление C_2H_2 не наблюдалось. На свету в атмосфере воздух +50% H_2 скорость ацетиленредукции была увеличена на 30—100% по сравнению с контролем. В отличие от этого в аргоне +50% H_2 фотовосстановление C_2H_2 ингибировалось на 40—50% (табл. 1). В дальнейших опытах внимание было направлено на изучение влияния, которое оказывал H_2 на световое восстановление C_2H_2.

Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 на свету и в темноте

Условия освещения	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч			
	воздух+10% C_2H_2	воздух +10% C_2H_2+50% H_2	аргон+10% C_2H_2	аргон+10% C_2H_2+ +50% H_2
Свет	14,0	20,7	25,4	12,7
Темнота	2,3	8,0	0,0	0,0

Таблица 2

Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 цианобактериями при разной интенсивности света

Интенсивность света, Вт/м²	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч			
	аргон+10% C_2H_2	аргон+10% C_2H_2+ +50% H_2	воздух+10% C_2H_2	воздух+10% C_2H_2+50% H_2
5	5,4	5,1	2,5	8,4
12	22,6	19,2	10,6	20,0
60	25,6	13,8	10,8	16,3
100	35,8	11,7	17,6	8,2

2. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 в зависимости от возраста культуры. Нитрогеназная активность уменьшается с увеличением возраста культуры цианобактерий [3, 8]. В наших условиях максимальная скорость восстановления C_2H_2 наблюдалось на 4—6-е сут роста культуры. Как выяснилось в ходе работы, действие H_2 на ацетиленредукцию (как положительное в воздухе, так и ингибирующее в аргоне) проявлялось только в молодой культуре, находящейся в экспоненциальной фазе роста (рис. 1). Именно такую культуру использовали в дальнейших опытах. В более старых культурах (10 сут роста и более) восстановление C_2H_2 не зависело от присутствия H_2 в газовой фазе. Но ранее [13] было показано, что способность к поглощению экзогенного H_2 у *A. variabilis* не изменяется значительно на протяжении длительного времени культивирования.

3. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 в зависимости от pH. Восстановление C_2H_2, измеренное в 0,07 М K-Na-фосфатном буфере и в 0,05 М трис-HCl-буфере, было заметно ниже, чем в среде выращивания. Определение ацетиленредукции в 0,02 М HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота)-фосфатном буфере показало, что ингибирующее влияние H_2 наиболее выражено в пределах pH 5,5—8,0 (рис. 2). При проведении измерений в среде выращивания наибольшее подавление восстановления C_2H_2 под действием H_2 наблюдалось при pH 7,5 (рис. 3).

4. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 при разной интенсивности света. В опытах клетки цианобактерий освещали светом интенсивности: 1 тыс. лк (5 Вт/м²), 3 тыс. лк (12 Вт/м²), 18 тыс. лк (60 Вт/м²) и 50 тыс. лк (100 Вт/м²). При увеличении интенсивности света скорость восстановления C_2H_2 возрастала, достигая практически постоянной величины при 3 тыс. лк. В атмосфере аргона ингибирующий эффект H_2 на восстановление C_2H_2 значительно возрастал при увеличении интенсивности света. В атмосфере воздуха и при интенсивности света $\leqslant$18 тыс. лк H_2 стимулировал восстановление C_2H_2 в тем большей степени, чем ниже интенсивность света (табл. 2).

5. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 в присутствии иона аммония. Известно, что ион аммония играет важную роль в регуляции нитрогеназной активности [14]. Кроме того, ион аммония оказывает разобщаю-

щее действие на фотофосфорилирование [15]. Добавление NH_4Cl (2 мМ) в наших опытах приводило к резкому падению скорости ацетиленредукции. Однако в этом случае H_2 не только не ингибировал, но даже несколько стимулировал восстановление C_2H_2 в атмосфере аргона. Особенно ясно этот эффект проявлялся в очень молодой культуре (3 сут роста, табл. 3). Причина такого действия иона аммония неясна.

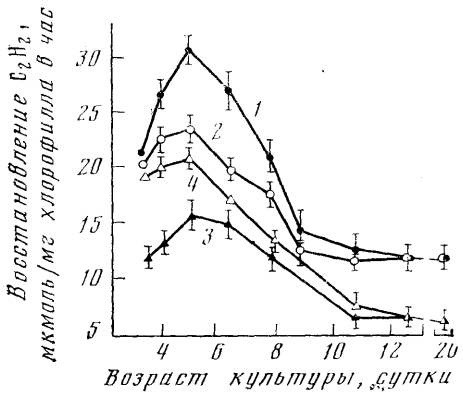


Рис. 1

Рис. 1. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2, в зависимости от возраста культуры цианобактерий

Состав газовой фазы: *1*—аргон+10% C_2H_2, *2* — аргон+10% C_2H_2+50% H_2, *3* — воздух+10% C_2H_2, *4* — воздух+10% C_2H_2+ +50% H_2

Рис. 2. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 цианобактериями в 0,02 М HEPES-фосфатном буфере в зависимости от pH *1—4* — см. рис. 1

Рис. 3. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 цианобактериями в среде выращивания в зависимости от исходного pH.

Состав газовой фазы: *1, 2* — см. рис. 1

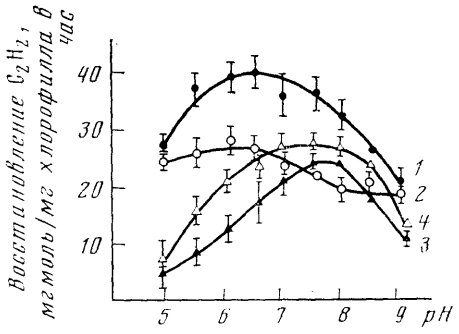


Рис. 2

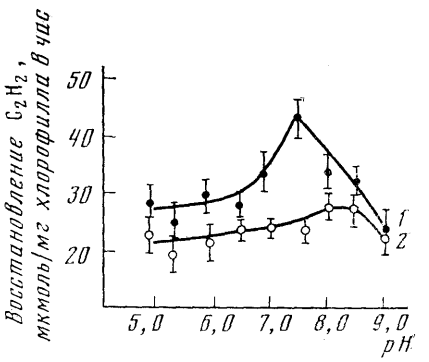


Рис. 3

6. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 в присутствии диурона и при освещении дальним красным светом. В наших опытах добавление диурона (10^{-5} М) приводило к резкому падению скорости ацетиленредукции. Существенно, что H_2 в этих условиях в несколько раз стимулировал восстановление C_2H_2 в аргоне (табл. 4). При освещении светом в области $\geqslant$685 нм (светофильтр КС-19) скорость ацетиленредукции возрастала в 2 раза по сравнению с контролем, если к газовой фазе добавляли H_2. При освещении белым светом в тех же условиях (освещенность уравнивали нейтральными светофильтрами) H_2 ингибировал восстановление C_2H_2 на 50% (табл. 4).

7. Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 и на выделение O_2. В данных экспериментах мы одновременно измеряли скорость ацетиленредукции и фотосинтетического образования O_2 после 2 ч инкубации клеток в герметично закрытых флаконах на свету в атмосфере воздуха или аргона при добавлении H_2 (табл. 5). Образование O_2 измеряли, помещая небольшой объем клеточной суспензии в 0,02 М HEPES-фосфатный буфер+5 мМ $NaHCO_3$, pH 7,5. Перед измерением клеточную суспензию выдерживали 10—20 мин в темноте на воздухе. Представляется маловероятным, что наблюдаемая скорость фотосинтеза искажалась из-за поглощения O_2 в реакции, обусловленной присутствием в суспензии раст-

Таблица 3

Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 в присутствии иона аммония

Вариант	Возраст культуры, сут	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч	
		аргон+10% C_2H_2	аргон+10% C_2H_2+50% H_2
Контроль	3	37,0	29,3
	6	42,4	24,5
NH_4Cl, 2 мМ	3	12,8	33,6
	6	14,1	16,3

Таблица 4

Влияние H_2 на восстановление C_2H_2 цианобактериями в присутствии диурона и при освещении дальним красным светом

Вариант	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч	
	аргон+10% C_2H_2	аргон+10% C_2H_2+50% H_2
Контроль	27,5	11,0
Диурон, 10 мкМ	1,3	8,7
Свет, 5 тыс. лк		
белый	11,3	5,4
красный	2,0	6,7

воренного H_2. Результаты опытов показали, что пребывание цианобактерий в атмосфере, содержащей H_2 как в воздухе, так и в аргоне, вызывает снижение начальной скорости выделения O_2 на 30—50% (время измерений 5—8 мин). Следует отметить, что выделение O_2 в этом случае имеет после включения света небольшой лаг-период (0,5—1 мин) по сравнению с клетками в контроле. В атмосфере аргон +50% H_2 наблюдалось уменьшение ацетиленредукции, которое коррелировало со снижением скорости светового выделения O_2. Напротив, восстановление C_2H_2 в атмосфере воздух +50% H_2 было значительно увеличено по сравнению с контролем, несмотря на торможение фотосинтетической реакции.

8. Влияние предварительной инкубации цианобактерий в атмосфере, содержащей H_2 и C_2H_2, на восстановление C_2H_2 и на выделение O_2. Известно, что инкубация ряда цианобактерий в атмосфере, содержащей C_2H_2, приводит к последующему увеличению способности к восстановлению C_2H_2 и образованию H_2 нитрогеназой [16, 17]. Предполагается, что увеличение нитрогеназной активности может быть вызвано конформационной перестройкой фермента под действием C_2H_2 [16]. Кроме того, C_2H_2 ингибирует гидрогеназную активность, связанную с поглощением H_2 [18]. Преинкубация *Nostoc muscorum* в аргоне +C_2H_2 способствовала увеличению нитрогеназной активности и этот эффект не наблюдался, если H_2 также был добавлен к газовой фазе [17]. Было высказано предположение, что первоначальный эффект C_2H_2 связан со снижением внутриклеточного уровня H_2, что приводит к активации нитрогеназного комплекса [17]. Мы также исследовали влияние H_2 на эффект C_2H_2. Клетки *A. variabilis* помещали в герметично закрытые флаконы и инкубировали на свету и в темноте в следующих условиях: воздух, воздух+50% H_2, воздух+20% C_2H_2, воздух+50% H_2+20% C_2H_2; аргон, аргон+50% H_2, аргон+20% C_2H_2, аргон+50% H_2+20% C_2H_2. После 3 ч инкубации газовую фазу во флаконах заменяли на воздух и ацетиленредукцию определяли на свету (18 тыс. лк) в атмосфере воздух +10% C_2H_2. Фотосинтетическую активность измеряли, как описано в предыдущем разделе. Результаты наиболее типичных опытов представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 5

Влияние предварительной инкубации цианобактерий на свету в атмосфере, содержащей H_2, на восстановление C_2H_2 и фотосинтетическое образование O_2

Состав газовой фазы при инкубации	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч	Выделение O_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/мин
Воздух	11,7	6,21
» +50% H_2	19,4	3,52
Аргон	42,0	7,34
» +50% H_2	28,3	4,58

Таблица 6

Влияние предварительной инкубации цианобактерий на свету в атмосфере, содержащей H_2 и C_2H_2, на восстановление C_2H_2 и на фотосинтетическое образование O_2

Состав газовой фазы при инкубации	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч	Выделение O_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/мин
Воздух 5	9,2	4,25
» + 0% H_2	15,5	2,84
» +20% C_2H_2	24,4	4,10
» +20% C_2H_2+ +50% H_2	43,2	4,49
Аргон	23,5	3,75
» +50% H_2	20,8	2,04
» +20% C_2H_2	42,6	3,79
» +20% C_2H_2+ +50% H_2	40,0	3,28

Таблица 7

Влияние предварительной инкубации цианобактерий в темноте в атмосфере, содержащей H_2 и C_2H_2, на восстановление C_2H_2 и фотосинтетическое образование O_2

Состав газовой фазы при инкубации	Восстановление C_2H_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/ч	Выделение O_2, мкмоль на 1 мг хлорофилла/мин
Воздух	2,7	1,90
» + 50% H_2	5,6	1,90
» + 20% C_2H_2	3,3	2,25
» + 50% H_2 + 20% C_2H_2	7,1	2,02
Аргон	5,7	2,63
» + 50% H_2	6,6	2,83
» + 20% C_2H_2	5,6	2,61
» + 50% H_2 + 20% C_2H_2	6,5	2,68

Предварительная инкубация цианобактерий с H_2 в воздухе на свету оказывает стимулирующее влияние на нитрогеназную активность: восстановление C_2H_2 остается увеличенным при смене газовой фазы. Предварительная инкубация в условиях аргон+50% H_2 не вызывала значительных изменений (хотя была заметна тенденция к снижению) в скорости ацетиленредукции при замене газовой фазы на воздух (табл. 6). Видимо, ингибирующий эффект H_2 на ацетиленредукцию не носит долговременный характер.

В соответствии с литературными данными инкубация с C_2H_2 на свету (воздух+20% C_2H_2, аргон+20% C_2H_2) приводит к тому, что способность цианобактерий к восстановлению C_2H_2 возрастает в 2—4 раза. Добавление H_2 к газовой фазе не препятствует увеличению ацетиленредук-

ты [17]. Более того, восстановление C_2H_2 возрастало еще более существенно, если клетки подвергались инкубации в аэробных условиях в атмосфере воздух+50% H_2+20% C_2H_2 (табл. 6). В ряде случаев наблюдалось увеличение скорости ацетиленредукции в 6—8 раз по сравнению с контролем (результаты не представлены). Таким образом, C_2H_2 в данной концентрации, по-видимому, не ингибирует поглощения H_2 в оксигидрогенную реакцию. Инкубацией в условиях аргон+20% C_2H_2 и аргон+50% H_2+20% C_2H_2 достигалось одинаковое возрастание скорости ацетиленредукции. Важно отметить, что ингибирующее действие H_2 на фотосинтез не проявлялось или эффект был ослаблен в том случае, если одновременно с H_2 в газовую фазу был внесен C_2H_2 (табл. 6). Возможно, это связано с тем, что C_2H_2 способен ингибировать соответствующую гидрогеназную активность. Из данных, приведенных в табл. 7, следует, что темновая инкубация с C_2H_2 не приводила к последующему возрастанию ацетиленредукции. Водород не подавлял фотосинтетическую активность, если инкубация проводилась в темноте.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе имеются данные о влиянии H_2 на фотовосстановление C_2H_2 цианобактериями: одни авторы [19, 20] наблюдали значительное увеличение ацетиленредукции под действием H_2, другие [4] отмечали незначительную стимуляцию либо отсутствие эффекта. Рост культуры *Anabaena sp.* ТА-1 в присутствии H_2 приводил к ингибированию фотосинтеза и соответственно подавлял нитрогеназную активность предположительно за счет существования в электронтранспортной цепи фотосинтеза чувствительного к H_2 переносчика электрона [9]. Результаты нашей работы соответствуют этим данным. В атмосфере аргона при освещении белым светом проявляется ингибирующее действие H_2 на восстановление C_2H_2, которое усиливается при увеличении интенсивности света (см. табл. 1 и 2). Снижение нитрогеназной активности, по-видимому, вызвано подавлением фотосинтетической активности, которое наблюдалось после инкубации клеток цианобактерий на свету в атмосфере, содержащей H_2 (см. табл. 5 и 6). В этих же условиях, но в том случае, если активность ФС II была подавлена диуроном или освещением в длинноволновой области спектра, H_2 стимулировал восстановление C_2H_2 (см. табл. 4). Способность H_2 поддерживать нитрогеназную активность, когда функционирование ФС II подавлено и нитрогеназная система испытывает недостаток в восстановителях, ранее отмечалось у цианобактерий *Anabaena cylindrica* и *Mastigocladus laminosus*, в гетероцистах *Anabaena cylindrica* и интерпретируется как способность H_2 быть донором электрона для нитрогеназы в светозависимой реакции, связанной с функционированием ФС I [6—8]. Интересно отметить, что H_2 ингибировал рост культуры *Anabaena* sp. ТА-1 не только при белом, но и при дальнем красном освещении, что привело авторов к выводу о невозможности использования H_2 данной цианобактерией в аналогичной реакции [9].

При измерении в атмосфере воздуха внесение в газовую фазу H_2 способствовало увеличению скорости ацетиленредукции при интенсивности света не выше 18 тыс. лк (см. табл. 1 и 2). По-видимому, увеличение нитрогеназной активности обусловлено тем, что в аэробных условиях возможно окисление H_2 через дыхательную цепь в оксигидрогенной реакции, что способствует обеспечению клетки дополнительной энергией [2—6]. Существенно, что в аэробных условиях H_2 стимулировал нитрогеназную активность, несмотря на подавление фотосинтетической активности (см. табл. 5). Результаты данной работы показали, что влияние H_2 на нитрогеназную активность *A. variabilis* определяется его действием в нескольких направлениях. Стимулирующее влияние H_2 проявляется

...ний функции ФС II и связано, вероятно, с его поступлением в дыхательную цепь и цепь фотосинтеза на уровне ФС I. Считается, что эти реакции локализованы главным образом или только в гетероцистах [21]. Наряду с этими возможностями H_2 оказывает как в воздухе, так и в аргоне ингибирующее действие на фотосинтез, идущий с образованием O_2, и соответственно на нитрогеназную активность в той мере, в которой она зависит от восстановителей, образующихся в ходе фотосинтеза в вегетативных клетках цианобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tel-Or E., Stewart W. D. P.* Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica.*— Proc. Roy. Soc. London, 1977, v. 198, № 1, p. 61.
2. *Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 337 с.
3. *Lambert G. R., Smith G. D.* The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green alga).— Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 1981, v. 56, № 4, p. 589.
4. *Bothe H., Tennigkeit J., Eisbrenner G.* The utilization of molecular hydrogen by the blue-green alga *Anabaena cylindrica.*— Arch. Microbiol., 1977, v. 144, № 1, p. 43.
5. *Benemann J. R., Mijamoto K., Hallenbeck P. C., Mirry M. A.* Hydrogenase activity in the thermophilic *Mastigocladus laminosus.*— Biochem. Biophys. Res. Communs, 1982, v. 106, № 4, p. 1192.
6. *Eisbrenner G., Bothe H.* Modes of electron transfer from molecular hydrogen in *Anabaena cylindrica.*— Arch. Microbiol., 1979, v. 129, № 1, p. 37.
7. *Houchins J. P., Mind G.* Puridine nucleotides and H_2 as electron donors to the respiratory and photosynthetic electron transfer chains and to nitrogenase in *Anabaena heterocysts.*— Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 682, № 1, p. 86.
8. *Benemann J. R., Weare N. M.* Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica.* III. Hydrogen — suppoted nitrogenase activity.— Arch. Microbiol., 1974, v. 101, № 2, p. 401.
9. *Antarikanoda P., Berndt H., Mayer F., Lorenzen H.* Molecular hydrogen: a new inhibitor of photosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena sp.* TA-1.— Arch. Microbiol., 1980, v. 126, № 1, p. 1.
10. *Allen U. B., Arnon D. J.* Studies on N_2-fixing blue-green alga. I. Growth and N_2 fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm.— Plant Physiol., 1955, v. 30, № 4, p. 366.
11. *Stewart D. W. P., Fitzgerald G. P., Burris R. H. In situ* studies on N_2-fixation using the acetylene reduction technique.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1967, v. 58, № 5, p. 2071.
12. *Thornber J. P.* Comparison of a chlorophyll-*a*-protein complex isolated from a blue-green algae with chlorophyll-protein complexes obtained from green bacteria and higher plants.— Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 172, № 2, p. 230.
13. *Полесская О. Г., Мальцев С. В., Красновский А. А.* Образование и поглощение водорода культурами и изолированными гетероцистами цианобактерий. Прикл. биохим. и микробиол., 1982, т. 13, вып. 3. с. 316.
14. *Murry M. A., Jensen D. B., Benemann J. R.* Role of ammonia in regulation of nitrogenase synthesis and activity on *Anabaena cylindrica.*— Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 756, № 1, p. 13.
15. *Almon H., Bohme H.* Photophosphorylation in isolated heterocysts from the blue-green alga *Nostoc muscorum.*— Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 679, № 2, p. 279.
16. *David K. A. V., Apte S. K., Thomas J.* Stimulation of nitrogenase by acetylene: fresh synthesis or conformational change? — Biochem. Biophys. Res. Communs., 1978, v. 82, № 1, p. 39.
17. *Scherer W., Kerfin W., Boger P.* Regulatory effect of hydrogen on nitrogenase activity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Nostoc muscorum.*— J. Bacteriol., 1980, v. 141, № 3, p. 1037.
18. *Miura Y., Yokoyama H., Kimura M., Iwamoto T., Miyamoto K.* Effect of acetylene and carbon monoxide on hydrogen uptake and evolution by nitrogen-starved cultures of *Mastigocladus laminosus.*— Plant and Cell Physiol., 1981, v. 22, № 8, p. 1875.
19. *Wolk C. P., Wojciuch E.* Photoreduction of acetylene by heterocysts.— Planta (Berlin), 1971, v. 97, № 1, p. 126.
20. *Scherer S., Kerfin W., Boger P.* Increase of nitrogenase activity in the blue-green alga *Nostoc muscorum.*— J. Bacteriol., 1980, v. 144, № 3, p. 1017.
21. *Houchins J. P., Burris R. H.* Occurence and localization of two distinct hydrogenase in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120.— J. Bacteriol., 1981, v. 146, № 1, p. 209.

Поступила в редакцию
28.III.1984

ACTIVITY IN THE BLUE-GREEN ALGA *ANABAENA VARIABILIS*

O. G. POLESSKAYA, A. A. KRASNOVSKY

M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Nitrogenase activity in *A. variabilis* was assayed by acethylene reduction measured by gas-chromatographic technique. When 50% of hydrogen was added to argon medium, the rate of acethylene reduction decreased by 30—70%, the effect being greater with increasing light intensity. The decrease in nitrogenase activity correlate, and is likely to be determined by a suppression of photosynthetic rate, since the rate of O_2 evolution by *A. variabilis* is inhibited by 40—50% after a 2-h exposure to the atmosphere containing hydrogen in the light. Under the same conditions, except that the cells were either treated with diuron (10^{-5} M), or exposed to far-red illumination, the hydrogen applied promoted acethylene reduction. That gave evidence for a possible utilization of H_2 as an electron donor for nitrogenase in a light-dependent reaction associated with photosystem-1 functioning. When measured in the air supplemented with 50% of H_2, the rate of acethylene reduction increased, the effect being greater with declining light intensity. Apparently, this effect is due to hydrogen oxidation by oxygen in oxyhydrogenic reaction coupled to ATP formation.

А.Н. СЕМЕНОВА, В.В. НИКАНДРОВ, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ФЕОФИТИН – СЕНСИБИЛИЗАТОР ФОТОПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ

В последнее время предпринимаются попытки создания искусственных систем, способных к эффективному преобразованию и запасанию солнечной энергии, работающих на основе использования принципов природного фотосинтеза. С этой целью широко применяются бислойные липидные везикулы (липосомы), содержащие в мембране фотосенсибилизаторы.

В качестве мембранных фотосенсибилизаторов применяли хлорофиллы [1, 2], различные порфирины [3, 4], а также поверхностно-активный аналог трисбипиридильного комплекса рутения [5]. В работах [6, 7] использовали липосомы, содержащие фотосенсибилизаторы во внутреннем водном пространстве. Однако эффективность преобразования световой энергии в описанных системах пока невелика, что приводит к необходимости создания более эффективных систем.

Ранее мы исследовали фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена и фотообразование водорода в суспензиях липосом, содержащих хлорофилл [8].

Недавно получены данные об участии феофитина в работе реакционного центра фотосистемы 2 зеленых растений [9]. Целью настоящей работы явилось исследование способности феофитина а к сенсибилизации трансмембранного фотопереноса электрона в липосомах и сравнение свойств хлорофиллсодержащих и феофитинсодержащих липосом.

Для приготовления липосом использовали яичный лецитин (фосфатидилхолин) и пигменты, выделенные и очищенные по стандартным методикам. Липосомы, содержащие в мембране хлорофилл а (Хл-липосомы) или феофитин а (Фф-липосомы) и содержащие донор электрона во внутреннем объеме получали согласно методике, описанной в предыдущей работе [9]. Фотовосстановление метилвиологена ($МВ^{2+}$) и этилвиологен-сульфата ($ЭВС^{0}$) проводили в вакуумированной трубке Тунберга, приспособленной для спектральных измерений. Все опыты вели в буферном растворе, содержащем 50 м*М* трис-HCl, 50 м*М* KCl, pH 7,5. Концентрация Na-аскорбата внутри липосом 0,5 *М*. Восстановление $МВ^{2+}$ и $ЭВС^{0}$ регистрировали по изменению оптической плотности при 605 нм ($\epsilon_{м}$ = 13 300). В качестве источника света использовали лампу накаливания 300 Вт с конденсором ($600 < \lambda < 800$ нм), интенсивность света $2{,}5 \cdot 10^{5}$ эрг/см^{2} · с. При определении квантового выхода (φ) образцы освещали монохроматическим светом (λ = 436 нм), выделенным из спектра ртутной лампы ДРШ-250 с помощью светофильтров ФС-I, ЖС-II. Интенсивность падающего света определяли актинометрически. Спектры флуоресценции липосом измеряли на флуориметре MPF-4 ("Hitachi"). Выделение водорода регистрировали с помощью газового хроматографа; суспензии липосом предварительно концентрировали с помощью фильтра XM-100A ("Amicon").

Первые опыты, проведенные с использованием Фф-липосом, содержащих аскорбат во внутреннем водном пространстве, показали увеличение скорости и глубины фотовосстановления $МВ^{2+}$ при трансмембранном переносе электрона по сравнению с Хл-липосомами (рис. 1). Для представления о способностях хлорофилла и феофитина как фотосенсибилизаторов трансмембранного переноса электронов проведено исследование зависимости квантового выхода фотовосстановления $МВ^{2+}$ от соотношения пигмент : липид. Как видно из рис. 2, зависимости φ от соотношения пигмент : липид для Хл-липосом и для Фф-липосом имеют сходный характер: φ рас-

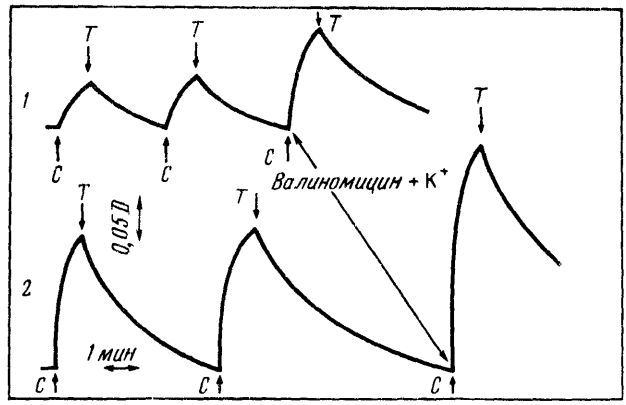


Рис. 1. Фотовосстановление метилвиологена при трансмембранном переносе электронов от аскорбата в суспензиях Хл-липосом (*1*) и Фф-липосом (*2*). Действие валиномицина. Хлорофилл $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ *M*, феофитин $1{,}2 \cdot 10^{-5}$ *M*, липид $7{,}2 \cdot 10^{-4}$ *M*, MB^{2+} $5 \cdot 10^{-4}$ *M*; валиномицин 10^{-6} *M*. *C* – свет, *T* – темнота

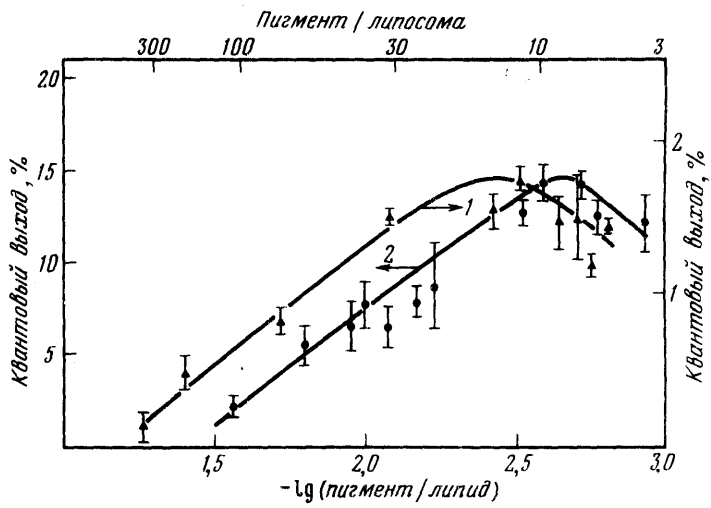


Рис. 2. Зависимость величины квантового выхода фотовосстановления метилвиологена аскорбатом в суспензиях Хл-липосом (*1*) и Фф-липосом (*2*) от соотношения пигмент : липид

тет при уменьшении соотношения пигмент : липид, достигает максимума и падает при соотношениях, приближающихся к 1 : 1000. При всех исследованных соотношениях пигмент : липид величины φ в случае Фф-липосом существенно превышают значения φ для Хл-липосом. Максимальное значение φ для Хл-липосом, равное 1,7%, достигается при соотношении Хл : липид 1 : 300, когда в одной липосоме находится примерно 20 молекул пигмента. Максимальная величина φ в случае Фф-липосом близка к 15% при соотношении Фф : липид, близком к 1 : 450. Таким образом феофитин сенсибилизирует трансмембранный фотоперенос электрона примерно в 10 раз более эффективно, чем хлорофилл. Существенно отметить, что φ реакции фотовосстановления MB^{2+} дитиотреитолом, не связанной с трансмембранным переносом электрона (донор и акцептор электрона находились во внешнем водном пространстве), примерно на порядок ниже для Фф-липосом, чем для Хл-липосом.

Таблица 1

Квантовые выходы (φ, %) фотовосстановления $МВ^{2+}$ и $ЭВС^0$

Донор и акцептор электронов	Система		
	Хл-мицеллы	Хл-липосомы	Фф-липосомы
ДТТ, $МВ^{2+}$	17,0	6,0	0,4
ДТТ, $ЭВС^0$	37,0	9,9	1,0
Аскорбат, $МВ^{2+}$	0	1,7	5,6
Аскорбат, $ЭВС^0$	0	4,4	20,6

Примечание. Соотношение пигмент : липид для Хл-липосом 1 : 300, для Фф-липосом, 1 : 200. Хлорофилл $0{,}3 \cdot 10^{-6}$ *М*, феофитин $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ *М*, липид 10^{-3} *М*; ДТТ $5 \cdot 10^{-2}$ *М*, $МВ^{2+}$ $5 \cdot 10^{-4}$ *М*, $ЭВС^0$ $5 \cdot 10^{-4}$ *М*.

Падение квантового выхода фотовосстановления $МВ^{2+}$ с увеличением содержания пигментов в липосомах (рис. 2) может быть связано с обнаруженным ранее концентрационным тушением возбужденных состояний хлорофилла [10, 11] и феофитина [12] в липосомах. Действительно, сопоставление результатов измерений фотовосстановления $МВ^{2+}$ (рис. 2) и выхода флуоресценции хлорофилла и феофитина (рис. 3) показывает, что уменьшение интенсивности флуоресценции пигментов наблюдается при тех же соотношениях пигмент: липид, при которых происходит падение φ фотовосстановления $МВ^{2+}$; максимальное значение φ достигается, когда тушение флуоресценции отсутствует. При увеличении содержания пигментов в липосомах, сопровождающемся тушением флуоресценции, мы наблюдали смещение максимумов излучения флуоресценции хлорофилла и феофитина в длинноволновую область, а также рост полосы испускания феофитина при 700–710 нм, указывающий на образование димера феофитина [13].

Сенсибилизированный пигментами трансмембранный фотоперенос электрона в липосомах, по-видимому, лимитируется возникающей на мембране разностью электрических потенциалов. На это указывает действие ионофора валиномицина, который в присутствии ионов калия в 1,5–2 раза увеличивает скорость фотовосстановления $МВ^{2+}$.

Ранее нами было показано [8], что выход фотовосстановленного $МВ^{2+}$ в суспензиях хлорофиллсодержащих липосом также лимитируется обратной реакцией, обусловленной способностью восстановленного метилвиологена проникать в липидную мембрану. Обратная реакция – окисление фотовосстановленного $МВ^{2+}$ дегидроаскорбатом протекает и в случае использования Фф-липосом (рис. 1). Применение акцептора электронов, не проникающего в липосому, вероятно, могло бы повысить эффективность разделения продуктов трансмембранной реакции. С этой целью мы использовали сульфированный этилвиологен. Как видно из рис. 4, в этом случае в суспензии Фф-липосом наблюдается повышение скорости и глубины трансмембранной реакции и уменьшение скорости окисления восстановленного акцептора электронов. В табл. 1 представлены результаты сравнительного исследования фотовосстановления $МВ^{2+}$ и $ЭВС^0$ в мицеллярных растворах тритона Х-100, содержащих хлорофилл, и в суспензиях Хл-липосом и Фф-липосом. В случаях липосом восстановление акцепторов аскорбатом происходило при трансмембранном фотопереносе электронов. В случае использования дитиотреитола, восстановление не было связано с трансмембранной реакцией (донор и акцептор электронов находились во внешнем водном пространстве липосомальной суспензии). Можно видеть, что во всех случаях φ фотовосстановления $ЭВС^0$ превышает φ фотовосстановления $МВ^{2+}$, причем применение

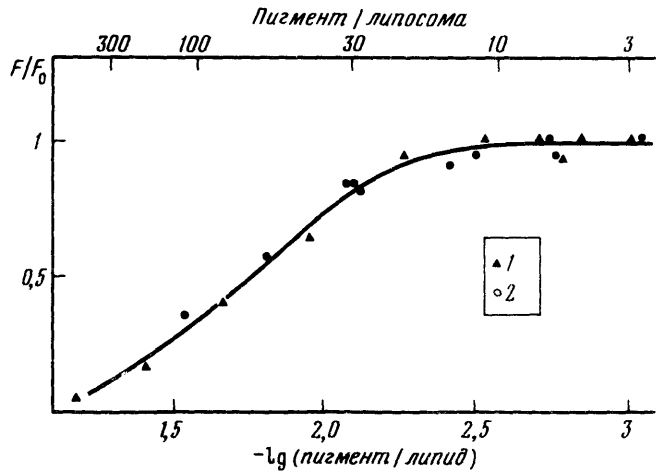


Рис. 3. Зависимость относительного выхода флуоресценции хлорофилла а (*1*) и феофитина а (*2*) в липосомах от соотношения пигмент–липид. Возбуждение при 418 нм

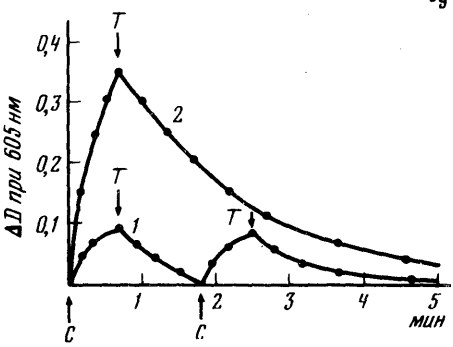


Рис. 4. Фотовосстановление метилвиологена (*1*) и этилвиологен-сульфата (*2*) при трансмембранном переносе электронов от аскорбата в Фф-липосомах. Феофитин $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ *M*, липид $7{,}2 \cdot 10^{-4}$ *M*, MB^{2+} $5 \cdot 10^{-4}$ *M*, $ЭВС^0$ $5 \cdot 10^{-4}$ *M*. *C* – свет, *T* – темнота

$ЭВС^0$ в трансмембранной реакции приводит к большему росту φ, чем в случае реакции, не связанной с трансмембранным процессом. Вероятно, повышение эффективности трансмембранной фотореакции при использовании $ЭВС^0$ определяется двумя факторами: более положительным редокс-потенциалом ЭВС ($E_0 = -0{,}36$ В) по сравнению с MB^{2+} ($E_0 = -0{,}44$ В), а также тем, что восстановленная форма ЭВС, несущая отрицательный заряд, менее способна проникать в липидную мембрану, чем катион-радикал МВ.

При введении в суспензии Фф-липосом и Хл-липосом, содержащих во внутреннем объеме аскорбат, а во внешнем водном пространстве $5 \cdot 10^{-4}$ *M* MB^{2+} и 0,1 мл гидрогеназы Thiocapsa roseopersicina (активность 10 ед/мин · мл), нам удалось показать фотообразование молекулярного водорода со скоростью 0,34 мкл H_2/10 мин и 0,12 мкл H_2/10 мин для Фф-липосом и Хл-липосом соответственно.

Таким образом феофитин является эффективным сенсибилизатором трансмембранного фотопереноса электронов. Квантовые выходы реакций фотовосстановления MB^{2+} и $ЭВС^0$ при трансмембранном переносе электронов от аскорбата ($E_0 = +0{,}08$ В) в Фф-липосомах значительно превышают φ соответствующих реакций в Хл-липосомах и приближаются к φ фотовосстановления MB^{2+} и $ЭВС^0$ необратимо окисляющимся донором электронов – ДТТ ($E_0 = -0{,}32$ В), сенсибилизируемого хлорофиллом, включенным в мицеллы детергента. Бóльшая эффективность феофитина в сравнении с хлорофиллом может быть связана с различными механизмами сенсибилизированных реакций в Фф-липосомах и Хл-липосомах. Для реакций переноса электронов в липосомах, содержащих хлорофилл, установлен окислительный

механизм сенсибилизации [14]. Феофитин, имеющий более положительный окислительный потенциала, чем хлорофилл ($E_{ФФ/ФФ^+} = 1{,}1$ В, $E_{Хл/Хл^+} = +0{,}78$ В) [15], по-видимому, сенсибилизирует реакции фотовосстановления $МВ^{2+}$ и $ЭВС^0$ по восстановительному механизму – на первом этапе переноса электрона происходит восстановление находящегося в триплетном состоянии феофитина аскорбатом. Кроме того, учитывая отсутствие атомов Mg в молекулах феофитина, можно предположить отличное от хлорофилла расположение и подвижность феофитина в мембране. Это может обеспечить бóльшую доступность молекул феофитина для доноров и акцепторов электрона, а также привести к облегчению переноса электронов между молекулами феофитина, расположенными по обе стороны липидной мембраны.

Выражаем благодарность сотруднику Института химической физики АН СССР В.Я. Шафировичу за предоставление этилвиологен-сульфата.

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

Поступило
26 XI 1984

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ti Tien H.* Topics in photosynthesis. Elsevier, Amsterdam, 1979, vol. 3, p. 115–173. 2. *Hurley J.K., Tollin G.* – Solar Energy, 1982, vol. 28, p. 187–196. 3. *Matsuo T., Itoh K., Takuma K. et al.* – Chem. Lett., 1980, № 9, p. 1009–1012. 4. *Лымарь С.В., Цветков И.М., Пармон В.Н., Замараев К.И.* – Хим. физика, 1982, т. 1, с. 405–410. 5. *Ford W.E., Otvos J.W., Calvin M.* – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, vol. 76, p. 3590–3593. 6. *Яблонская Е.Е., Шафирович В.Я.* – Кинетика и катализ, 1983, т. 24, с. 1022. 7. *Пармон В.Н., Храмов М.И., Цветков И.М. и др.* – Там же, 1983, т. 24, с. 1023. 8. *Красновский А.А., Семенова А.Н., Никандров В.В.* – ДАН, 1982, т. 262, с. 469–472. 9. *Климов В.В., Красновский А.А.* – Биофизика, 1982, т. 27, с. 179–189. 10. *Beddard G.S., Carlin S.E., Porter G.* – Chem. Phys. Lett., 1976, vol. 43, p. 27–32. 11. *Hurley J.K., Castelly F., Tollin G.* – Photochem. Photobiol., 1980, vol. 32, p. 79–86. 12. *Luisetty J., Galla H.J., Mohwald H.* – Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 1978, Bd. 82, S. 911–916. 13. *Луганская А.Н., Лебедев Н.Н.* – Мол. биол., 1984, т. 18, с. 963–971. 14. *Ford W.E., Tollin G.* – Photochem. Photobiol., 1982, vol. 35, p. 809–819. 15. *Seely G.R.* – Ibid., 1978, vol. 27, p. 639–654.

Physiol. Vég., 1985, **23** (5), 611-618

Review

The models of photosynthetic electron transfer *

Alexander A. KRASNOVSKY

Laboratory of Photobiochemistry, A. N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

(Received for publication March 19, 1985; accepted June 21, 1985)

Krasnovsky, A. A. 1985. The models of photosynthetic electron transfer. — Physiol. Vég. 23: 611-618.

A mini-review of the work of our laboratory is presented. Model photobiochemical systems have been proposed that transform light energy into chemical energy. Chlorophyll and pheophytin incorporated into detergent micelles or lipid vesicles have been used. Photosensitized transmembrane electron transfer coupled to alkyl viologen reduction and hydrogen photoevolution were observed in liposomes; similar reactions were studied in chloroplasts and isolated particles of photosystem I using a combination of several electron donors.

Additional key words — Chlorophyll, pheophytin, liposomes, hydrogen photoevolution.

A. A. Krasnovsky, Laboratory of Photobiochemistry, A. N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, *Moscow* 117071, *U.S.S.R.*

Résumé. *Dans une mini-revue des travaux de notre laboratoire sont présentés les modèles des systèmes photobiochimiques capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. La chlorophylle et la phéophytine ont été utilisées en les incorporant dans des micelles de détergent ou dans des vésicules de lipides. On a observé un transport transmembranaire d'électrons dans les liposomes, associé à la réduction de l'alkyl viologène et au photodégagement d'hydrogène. Des réactions similaires ont été étudiées dans les chloroplastes et dans les particules isolées de photosystème I, en utilisant des combinaisons de différents donneurs d'électrons.* Mots clés additionnels : chlorophylle, phéophytine, liposomes, photodégagement d'hydrogène.

Abbreviations. Ch, chlorophyll; MV, methyl viologen; SV, ethyl viologen sulfonate; D, electron donor; A, ascorbate; DHASC, dehydroascorbate; DTT, dithiothreitol; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; Tris, (hydroxymethyl) aminomethane.

Introduction

Life on our planet is based on plant photosynthesis; the study of its molecular mechanisms promises optimization of biological use of solar energy and creation of artificial systems efficiently converting the energy of light. The pioneering work of Arnon's laboratory (Arnon *et al.*, 1961) discovered hydrogen photoevolution when chloroplasts were coupled with hydrogenase extracted from bacteria. This line of research is now very attractive. Here we present a short review of the work of our laboratory in this field.

* Dedicated to Professor D. I. Arnon in honor of his 75th birthday.

Physiologie Végétale 0031-9368/85/05 611 08/$ 2.80/ © Gauthier-Villars

Reaction centers

Primary conversion of solar energy takes place in reaction centers of photosystems. They are the smallest biochemical structures capable of efficient conversion of the energy of light quanta. Up to now it has been possible to isolate preparations of reaction centers from photosynthetic bacteria which do not contain antenna pigments. But the preparations of reaction centers isolated from photosystems I and II usually contain antenna chlorophylls at 10-30 molecules per one molecule of reaction center chlorophyll.

So the most reliable information was obtained using reaction centers isolated from bacterial chromatophores (*see* Shuvalov and Krasnovsky, 1981) where an electron is transferred from the bacteriochlorophyll dimer to bacteriopheophytin and to ubiquinone. Primary electron transfer in reaction centers proceeds on a picosecond time scale but the charges separated in this mini electron transfer chain are stabilized up to the millisecond period of time. Quantum yield of electron transfer in the reaction center is close to unity and the efficiency of energy storage is up to 70-80%.

Probably the efficiency of energy conversion in reaction centers of photosystem I and II is also high. Indeed, in the photosystem II electron transfer of chlorophyll is coupled to pheophytin as in reaction centers isolated from photosynthetic bacteria (*see* Klimov and Krasnovsky, 1981). Charges separated as a result of photochemical reactions in reacti centers are used in the photosynthetic electron transfer chain located in the membranes where NADPH and ATP are finally formed in accord with Arnon's primary views (Arnon, 1984). In the course of formation of more stable compounds an inevitable loss of energy takes place. A considerable loss of primary energy stored in reaction centers is intrinsic to the long sequence of metabolic reactions required to get stable molecular systems storing solar energy.

Charge separation in model systems

The question arises whether it is possible to use energy of charges separated in reaction centers by shorter metabolic pathways having minimal energy loss. An attractive problem is to construct artificial solar energy convertors, applying our knowledge of natural photosynthetic mechanisms. One of the main problems is to prevent efficient back reactions of primary photoproducts, and this is usually achieved by the spatial translocation of these products with the aid of artificial membranes or phase boundaries of photocatalytic particles. The simplest way is to use the separated charges as an electric current through appropriate electrodes using reaction centers as construction material for biosolar batteries.

Another way is to store solar energy in the form of rather stable chemicals mimicking the redox principles of photosynthetic electron transfer. For many years we have been studying in our laboratory such a simple system composed of an electron donor, a pigment-photoreceptor and an electron acceptor. As a result of excitation of the pigment system by light quantum an electron is transferred from the donor to the acceptor molecule; thus light energy is converted and stored.

We have studied reactions of this type in solutions, colloids (micelles of detergents), liposomes, isolated cell structures and inorganic photocatalysts including semiconductors (*see* Krasnovsky, 1974). The diversity of these systems gave a choice of models to simulate the elementary reactions which take place in the photosynthetic electron transfer chain.

For many years in our laboratory reactions were studied in solutions using ascorbate, cysteine, etc. as electron donors, chlorophyll and analogs as photosensitizers, and pyridine nucleotides, methyl viologen and ferredoxin (possessing redox potentials close to the hydrogen electrode) as electron acceptors. In various systems photosensitized reduction of NADPH and methyl viologen was observed with rather high quantum yield but the degree of light energy storage was very difficult to estimate. In any case in systems listed above we could

not introduce water molecules as electron donor in a reaction coupled to oxygen evolution. Nevertheless reduced pyridine nucleotides are rather stable compounds which are not oxidized by oxygen, and thus sensitized reduction of NAD observed in our laboratory long ago (1949) produced a certain stability of photoreaction products. Early work of our laboratory in this field was reviewed comprehensively by Rabinowitch (1956) in his book.

The property of reduced methyl viologen is quite different, being a free radical extremely liable to reverse electron transfer to oxygen or to an oxidized electron donor. Hence photosensitized reduction of methyl viologen which we treat as a model of photosystem I may only be observed under anaerobic conditions as reduced methyl viologen is instantly oxidized by oxygen. A peculiar case of this type of reaction was observed in our laboratory when thiourea was used as electron donor; here efficient methyl viologen reduction could be observed without evacuation of air oxygen. The reason is that chlorophyll photosensitized oxidation of thiourea is very efficient, leading to complete exhausting of oxygen in the reaction media, and photooxidized thiourea is used in the resulting anaerobic conditions as electron donor for anaerobic photosensitized reduction of viologen. There are insufficient data on the energetics of these reactions.

'celles and liposomes

The next step towards greater complexity was the use of detergent micelles which solubilize lipophilic molecules of chlorophyll and analogs. If aqueous micelle solutions are used it is possible to employ a wide set of water soluble biologically active substances as electron donors and acceptors and various chlorophyll analogs solubilized in detergent micelles. Finally in the systems outlined it is possible to introduce enzymes active in very short artificial metabolic chains. So in our laboratory a system was constructed of an electron donor, solubilized chlorophyll, methyl viologen as mediator, and hydrogenase extracted from bacteria cells (*fig.* 1). In such a system under action of red light absorbed by chlorophyll it was possible to observe molecular hydrogen photoevolution (Krasnovsky *et al.*, 1975). Efficient photoreduction of methyl viologen and hydrogen photoproduction with quantum yield up to 60% was observed when using deazaflavin coenzyme (so called factor 420) extracted from methane-generating archaebacteria (Nikandrov *et al.*, 1985). In various laboratories using Zn-complexes of porphyrines high quantum yields of hydrogen evolution have been reported but energy storage was low as irreversible oxidized organic compounds (EDTA, DTT) usually were introduced as electron donors.

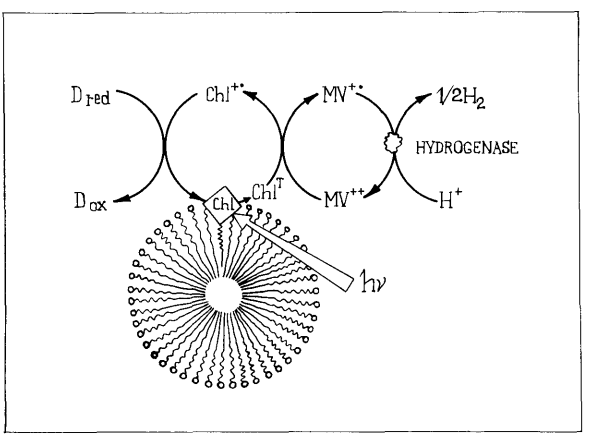


Figure 1. *Hydrogen photoproduction in a micellar solution of detergent.*

The next system studied in our laboratory were liposomes containing lipophilic chlorophyllous pigments. A charge transfer system consisting of a reversible oxidized electron donor (ascorbic acid) inside the liposome and a reversible reduced acceptor (viologens) in the outer space revealed light energy storage analogous to that taking place in real photosynthetic systems (Krasnovsky *et al.*, 1982). Instead of EDTA used in most published work we introduced into inner space reversibly oxidized ascorbate and in the outer space, methyl viologen. Chlorophyll and pheophytin were introduced into the liposome membrane. Under action of light absorbed by pigments photoreduction of methyl viologen was observed; in the case of pheophytin quantum yield was higher than with chlorophyll reaching up to 20% (*fig.* 2). The reaction was slowly reversible; probably reduced viologen slowly penetrated

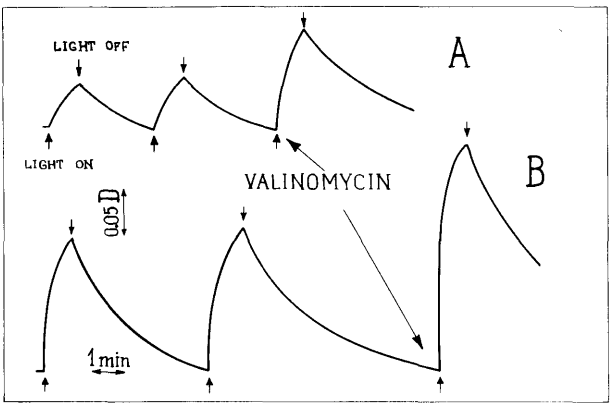


Figure 2. *Photoreduction of methyl viologen due to transmembrane electron transfer in chlorophyll-containing* **(A)** *and pheophytin-containing* **(B)** *liposomes.*

through the membrane leading to peculiar reaction kinetics, due to reversible reduction of dehydroascorbate thus formed. The reaction mechanism is not quite clear. Probably excited pheophytin may accept an electron from ascorbate, transfer this through the lipid layer to the outer interphase and here give up the electron to viologen. There is no doubt that transmembrane electron transfer actually occurs as when detergents solubilizing lipid membrane were introduced the reaction was suppressed, probably as a result of fast back reactions of primary photoproducts. When sulfonated alkyl viologen was employ (Semenova *et al.*, 1985) the reaction efficiency was enhanced (*fig.* 3). Probably the negative charged radical ion of sulfonated methyl viologen is not able to penetrate into the membrane, decreasing the speed of the back reactions. Accumulation of reduced methyl viologen (having redox potential near to that of the hydrogen electrode) is a prerequisite to create photobiochemical systems evolving molecular hydrogen. Indeed, by introducing hydrogenase (extracted from *Clostridium butyricum* cells, photosynthetic or sulfate reducing bacteria) it is possible to observe hydrogen evolution (*fig.* 4). The hydrogenase from sulfate reducing bacteria, having pronounced affinity for reduced methyl viologen, was the most active catalyst efficiently "pumping out" reduced viologen in the course of its formation. It would probably be possible to arrange such a system without hydrogenase extracted from cells by introducing bacterial cells into liposomes as reduced viologen usually penetrates easily through the cell walls.

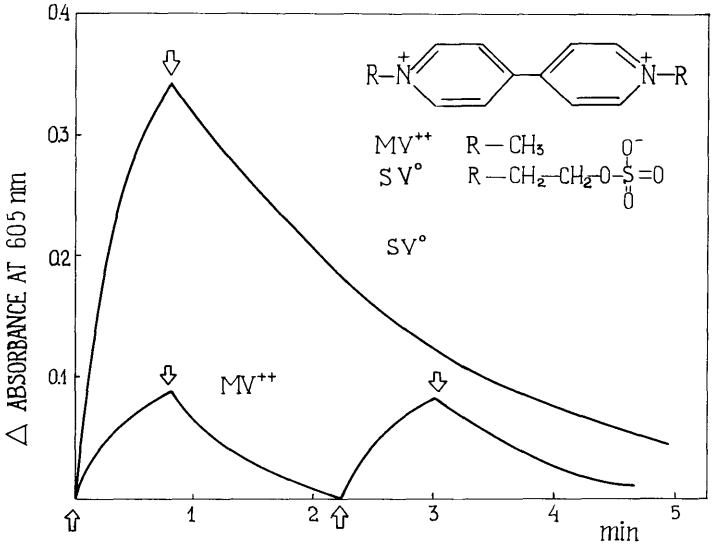


Figure 3. *The photoreduction of methyl viologen and ethyl viologen sulfonate due to transmembrane electron transfer in pheophytin-containing liposomes.*

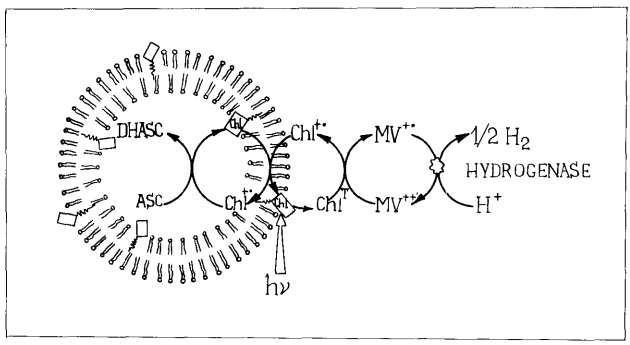


Figure 4. *Hydrogen photoproduction in liposomes.*

Chloroplasts

The next step in system complexity is to employ isolated chloroplasts or isolated photosystems for hydrogen ion photoreduction. There are many publications in this field when chloroplasts coupled to bacterial hydrogenase evolved hydrogen in the presence of exogenous electron donors (*see* Krasnovsky, 1979). It was revealed in our laboratory that a combination of DTT and ascorbate in the presence of TMPD enables expression of practically the full electron transfer capability of photosystem I in chloroplasts (*fig.* 5).

The main feature of this reaction mechanism is probably that the ascorbate donating electrons is maintained in reduced state by DTT and TMPD and is functioning as a lipophilic intermediate electron carrier to the definite site of the electron transfer chain. Viologen accepts electrons at the very end of photosystem I, having a redox potential more negative than the hydrogen electrode (Krasnovsky *et al.*, 1980).

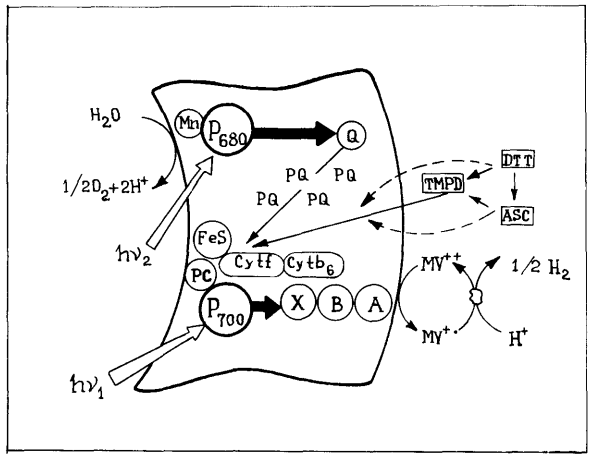


Figure 5. *Hydrogen photoproduction in chloroplasts.*

If photosystem I inside chloroplasts is efficient the question inevitably arises whether isolated photosystem I would be active too. In preparations of particles of photosystem I indeed it was possible to observe viologen photoreduction and hydrogen evolution in the presence of hydrogenase but the yield was low (Nikandrov *et al.*, 1983). It is most peculiar that in this case the phenomenon was not accompanied by amplification of the reaction by combination of two electron donors as has been revealed in experiments with chloroplasts. The reason is probably membrane disruption when particles enriched in photosystem I were prepared, this leading to significant back reactions. The activation of hydrogen evolution by combination of electron donors was observed only when photosystem I was extracted in the form of closed vesicles of thylakoid membrane. This system was more efficient when TMPD and hydrogenase extracted from *Desulfovibrio desulfuricans* were introduced, but we have not yet achieved the high efficiency of hydrogen evolution observed in chloroplast-containing systems. Using the highly sensitive amperometric method it was possible to reveal hydrogen photoevolution by chloroplasts when photosystem II was inhibited and an electron donor (hydroquinone) was introduced into the site of photosystem II (Maltzev and Krasnovsky, 1983). But hydrogen evolution by chloroplasts was some orders less than in systems containing exogenous hydrogenase.

The capability of chloroplasts to evolve hydrogen may be considered as a relict function very similar to hydrogen evolution by unicellular algae in anaerobic conditions (Maltzev and Krasnovsky, 1983).

Inorganic photocatalysts

Coming back now to creation of photobiochemical models, we have to mention that inorganic photoreceptors may also serve for primary charge separation. In our laboratory a variety of inorganic photocatalysts have been used: semiconductors—titanium dioxide, zinc oxide, tungsten trioxide and cadmium sulfide. Under action of light quantum an electron is shifted from the valence zone into the conduction zone and the charge separated may be localized on different active centers of the phase boundary of photocatalyst particles suspended in aqueous media. By introducing into solution different water soluble electron donors and acceptors it was possible to realise a variety of redox reactions modelling any fragments of the photosynthetic electron transfer chain. So, in our laboratory in 1961 an inorganic model of the Hill reaction (Krasnovsky and Brin, 1961) was constructed: as

photocatalysts were used TiO_2, ZnO, WO_3, as electrons acceptors ferrous compounds and quinones and as electron donor—the water molecule. Oxygen was evolved and oxidants were reduced in accord with the stoichiometry of the Hill reaction. Experiments when heavy ($H_2{}^{18}O$) water was used confirmed that oxygen was really originating from water molecules (Fomin *et al.*, 1973). The quantum yield of the reaction was not higher than 3% but taking into consideration redox values of components, light energy storage was no doubt taking place here. When methyl viologen was introduced into water suspensions of photocatalysts in anaerobic conditions, illumination caused viologen photoreduction without introducing exogenous electron donors—although these nevertheless enhanced the reaction (Krasnovsky and Brin, 1973). The source of electrons here was unclear as evolution of molecular oxygen (vigorously reacting with reduced MV) was impossible to observe. But if there were conditions for rapid outflow of oxygen and hydrogen formed on different sites of photocatalysts, it might be possible to observe simultaneous evolution of both gases. In any case in the presence of an exogenous electron donor photoevolution of hydrogen could be observed in suspensions of TiO_2 and of CdS as well (Krasnovsky *et al.*, 1976, 1979). Tris buffer was a rather active electron donor in this reaction (Nikandrov *et al.*, 1983) being a substance stabilizing TiO_2 suspensions as well. A suspension of TiO_2 in the presence of Tris, methyl viologen and bacterial hydrogenase actively evolved hydrogen under the action of near UV (365 nm). It was possible to simplify the system using a TiO_2 suspension in Tris buffer with *Clostridium butyricum* cells without an exogenous electron transfer mediator. It is unclear as yet what is the mode of coupling of the TiO_2 particle generating electrons to the hydrogenase located probably in the *Clostridium butyricum* cells: we cannot exclude that in the conditions of the experiment the cells were damaged and an unknown electron mediator was excreted into the medium.

Systems of the type described above attract wide attention as the photocatalyst is acting not only as a light energy convertor but also as catalyst to facilitate recombination of the primary photoproducts into final stable compounds, for instance hydrogen and oxygen gas (*see* Lehn, 1981; Grätzel, 1983).

The question arises as to the possible use of the photochemically induced electron to reduce not only hydrogen ions but also such stable molecules as molecular nitrogen and carbon dioxide.

Conclusion

Finally a question of terminology arises: what is meant by "models of photosynthetic electron transport"? May be this question should have been considered at the beginning of our paper. Photosynthetic electron transport essentially represents a multistage reaction, located in the membranes of photosynthetic cells; here light energy is converted into potential chemical energy of stable chemical products—NADPH, ATP and oxygen. We use the term "models" for realizations, in the test tube, of short fragments of electron transfer from a molecule-donor to a molecule-acceptor at the expense of light energy absorbed by pigment systems being excited. Finally here we can arrange very short fragments which do not follow the path of biological evolution but tentatively could be considered their precursors at the period of prebiological or so called chemical evolution.

Hence another aspect of the problem considered here is the creation of systems which could have functioned at a very ancient time when selfreproducing systems were not yet created. There is no doubt that high energy consuming selfreproduction required the use of solar energy. So the construction of models where photochemical electron transfer is coupled to reproduction of chemical or biological systems is amongst unsolved problems.

All organisms which exist now on the Earth employ the principle of the double helix, but there are some postulates that primary selfreproduction might be achieved with the aid of inorganic components of the earth's crust (Cairns-Smith, 1982).

The final goal of the studies presented has two main aspects: first—the creation of efficient solar energy convertors using the principles of natural photosynthesis and, second—to get information on the possible pathways of the chemical and biological evolution of solar energy conversion and storage (Krasnovsky, 1981).

References

Arnon D. I., 1984. — The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sc.*, **9**, 258-262.

Arnon D. I., Mitsui A. and Paneque A., 1961. — Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation. *Science*, **134**, 1425-1429.

Cairns-Smith A. G., 1982. — *Genetic takeover and the mineral origins of life.* Cambridge University Press, Cambridge.

Fomin G. V., Brin G. P., Genkin M. V., Liubimova A. K., Bliumenfeld L. A. and Krasnovsky A. A., 1973. — Mass-spectrometric study of water photodecomposition in the system inorganic photosensitizer-electron acceptor. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **212**, 424-427.

Grätzel M., 1983. — Artificial photosynthesis. In *Photochemical conversions*, A. M. Braun, ed., IOCD UNESCO, Lausanne, 189-211.

Klimov V. V. and Krasnovsky A. A., 1981. — Pheophytin as the primary electron acceptor photosystem II reaction centres. *Photosynthetica*, **15**, 592-609.

Krasnovsky A. A., 1974. — *Transformation of light energy in photosynthesis. Molecular mechanisms.* 29 Bakhovskoe Chtenie, Nauka, Moskva.

Krasnovsky A. A., 1979. — Photoproduction of hydrogen in photosynthetic and artificial systems. In *Topics in photosynthesis*, **3**, J. Barber, ed., Elsevier, Amsterdam, 281-298.

Krasnovsky A. A., 1981. — Evolution of uphill electron transfer. *Biosystems*, **14**, 81-87.

Krasnovsky A. A. and Brin G. P., 1961. — Photocatalytic action of ZnO and TiO_2 in reactions of oxygen evolution. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **139**, 142-145.

Krasnovsky A. A. and G. P. Brin, 1973. — Photoreduction of methyl viologen sensitized with inorganic semiconductors. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **213**, 1431-1434.

Krasnovsky A. A., Brin G. P., Luganskaya A. N. and Nikandrov V. V., 1979. — Photosensitization of redox reactions by CdS. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **249**, 896-899.

Krasnovsky A. A., Brin G. P. and Nikandrov V. V., 1976. — Photoreduction of oxygen and photoevolution of hydrogen with inorganic photocatalysts. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **229**, 990-993.

Krasnovsky A. A., Chan-van-Ni, Nikandrov V. V. and Brin G. P., 1980. — Efficiency of hydrogen photoproduction by chloroplast-bacterial hydrogenase systems. *Plant Physiol.*, **66**, 925-930.

Krasnovsky A. A., Nikandrov V. V., Brin G. P., Gogotov I. N. and Oshchepkov V. P., 1975. — Photoproduction of hydrogen in the solutions of chlorophyll, $NADH_2$ and chloroplasts. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **225**, 711-713.

Krasnovsky A. A., Semenova A. N. and Nikandrov V. V., 1982. — Chlorophyll-containing liposomes: photoreduction of methyl viologen and photoproduction of hydrogen. *Photochem. Photobiophys.*, **4**, 227-232.

Lehn J. M., 1981. — Photoinduced generation of hydrogen and oxygen from water. In *Photochemical conversion and storage of solar energy.* J. S. Connolly, ed., Academic Press, New York, 161-199

Maltzev S. V. and Krasnovsky A. A., 1983. — Photoproduction of hydrogen by chloroplasts suppression of oxygen-evolving system. *Fisiol. Rast.*, **30**, 915-924.

Nikandrov V. V., Aristarkhov A. I. and Krasnovsky A. A., 1983. — Photosensitized formation of hydrogen by the particles of photosystem I. *Biofizika*, **28**, 699-701.

Nikandrov V. V., Brin G. P. and Krasnovsky A. A., 1983. — Titanium dioxide as photocatalyst in hydrogen production. *Photobiochem. Photobiophys.*, **6**, 101-107.

Nikandrov V. V., Pantschava E. S. and Krasnovsky A. A., 1985. — Light-induced activation of deazaflavin coenzyme F_{420}: photosensitized reduction of NAD^+, $NADP^+$, methyl viologen and hydrogen ions. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **281**, 1485-1489.

Rabinowitch E. I., 1956. — *Photosynthesis*, **2**, Interscience, New York.

Semenova A. N., Nikandrov V. V. and Krasnovsky A. A., 1985. — Pheophytin—sensitizer of electron phototransfer across lipid vesicles membranes. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **282**, 189-194.

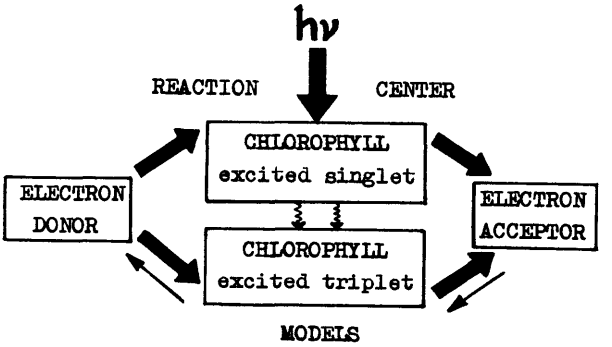
Shuvalov V. A. and Krasnovsky A. A., 1981. — Photochemical electron transfer in reaction centers of photosynthesis. *Biofizika*, **26**, 544-556.

THE MODELS OF PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER

A.A.KRASNOVSKY

A.N.Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leninsky pr. 33, Moscow, II7071, USSR

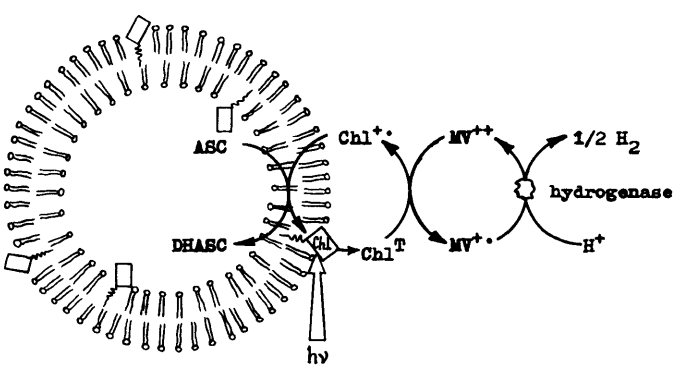
An attractive problem is the construction of artificial solar energy convertors using the knowledge of natural photosynthetic mechanisms. As a result of excitation by light quantum of pigment system electron is transferred from donor to acceptor molecules thus solar energy is converted and stored. The question arises whether it is possible to use the energy of charges separated in reaction centers of photosynthesis by short metabolic pathways with minimal energy loss (I). For many years we were studying photo-redox reactions using various pigments, chlorophylls and analogs as photosensitizers, electron donors and electron acceptors: NAD, NADP, methylviologen, ferredoxin possessing redox potential close to hydrogen electrode. Photosensitized reduction of electron acceptor coupled to oxydation of electron donor was observed (review 2).



Proceedings of the 16th FEBS Congress
Part B, pp. 29–34
© 1985 VNU Science Press

If aqueous micelle solutions were used it was possible to employ a wide set of water soluble substances as electron donors and acceptors so as various chlorophyll analogues solubilized into detergent micelles. In systems outlined it is possible to introduce enzymes involved into action of short artificial electron-transfer chains. The first work in this field was performed in our laboratory: the construction of a system which composed of electron donor, solubilized chlorophyll, methylviologen as mediator and hydrogenase extracted from bacteria cells. In such a system under action of red light absorbed by chlorophyll it was possible to observe molecular hydrogen photoevolution (3).

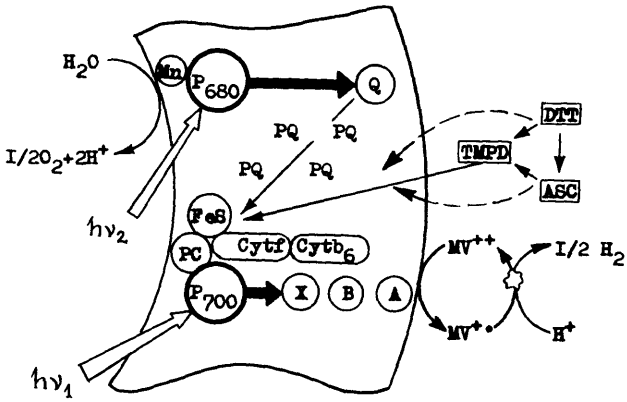
The next system studied were liposomes containing lipophylic chlorophyllous pigments. The use of oxidized electron donor (ascorbic acid) inside liposome and reversible reduced acceptor (viologens) in outer space make it possible to compose charge-transfer systems having light energy storage (4). Into liposome membrane chlorophyll or pheophytin were introduced. Under action of light absorbed by pigments photoreduction of methylviologen was observed; in the case of pheophytin quantum yield was higher then with chlorophyll reaching up to I5%.



When sulfonated methylviologen was employed (being dissolved in the form of negative ions) the reaction efficiently was enhanced. Probably negative charged radical ion of sulfonated methylviologen is not able to penetrate into membrane decreasing the speed of the back reaction. Accumulation of reduced methylviologen (having redox potential close to hydrogen electrode) is a prerequisite to create photobiochemical systems evolving molecular hydrogen. Really, when introducing the enzyme hydrogenase it was possible to observe hydrogen evolution. The hydrogenase from sulfate reducing bacteria, having pronounced affinity to methylviologen was the most active catalyst efficiently "pumping out" reduced viologen in the course of its formation. Probably it is possible to arrange such a systems avoiding hydrogenase extraction when introducing bacterial cells into liposomes as reduced viologen usually penetrates easilly through the cell walls.

The next step on the way of complication is to employ isolated chloroplasts. There is a lot of works in this field when chloroplasts coupled to bacterial hydrogenase evolved hydrogen in the presence of exogenous electron donors (see review 5). It was revealed in our laboratory that a combination of DTT and ascorbate in the presence of TMPD makes possible to use practically full electron transfer capability of photosystem I in chloroplasts.

The main feature of the reaction mechanism is probably that ascorbate donating electrones is maintained in reduced state by DTT and TMPD is functions as a lipophylic intermediate carrying electron to the definite site of electron transfer chain; viologen accepts electron at the very end of photosystem I (6).



If photosystem I inside cloroplasts is efficient a question inevitably arises whether isolated particles of photosystem I would be active as well. In such a preparation indeed it was possible to observe viologen photoreduction and hydrogen evolution in the presence of hydrogenase but the yield was low (7).

When a highly sensitive amperometric technique was used it was possible to reveal hydrogen photoevolution by chloroplasts when photosystem II was inhibited and electron donor (hydroquinone) was introduced into the site of photosystem II (8).

Coming back to creation of photobiochemical models we should mention that for primary charge separation inorganic photoreceptors may serve as well. So, in our laboratory a veriety of inorganic photocatalysts - semiconductors - titanium dioxide, zink oxide, tungsten trioxide and cadmium sulfide were used. Under the action of light quantum electron is shifted from the valence zone into conduction zone and charge separated may be localized on different active centers of phase boundary of photocatalyst particles suspended in the aqueous media. When introducing various water soluble electron donors and acceptors into solution we managed to realize a variety of redox reactions. So, in

our laboratory in 1961 an inorganic model of Hill reaction was created (9): as photocatalysts TiO_2, ZnO, WO_3 were used, as electron acceptors ferrous compounds and quinones and as electron donor - water milecules. Oxygen was evolved and oxidants were reduced in accord to stoichiometry of Hill reaction. When methylviologen was introduced into water suspensions of photocatalysts under anaerobic conditions illumination caused viologen photoreduction even without exogenous electron donors which nevertheless enhanced reaction (10). In any case in the presence of exogenous electron donor photoevolution of hydrogen gas can be observed in suspensions of TiO_2 and CdS as well (11). Tris-buffer was a rather active electron donor in this reaction (12). Suspension of TiO_2 in the presence of Tris-buffer, methylviologen and bacterial hydrogenase evolved hydrogen under action of near UV (365 nm). It was possible to simplify the system using TiO_2 suspension in Tris-buffer with Clostridia cells without exogenous electron transfer mediator.

The question arises on the possible use of photochemically induced electrons to reduce not only hydrogen ions but also such stable molecules as dinitrogen and carbon dioxide.

Hence another aspect of the problem considered here is to create model photobiochemical systems which could imitate ancient types of solar energy transformation for the action of primary selfreproducing molecular systems.

The final purpose of the studies presented was firstly - to create efficient solar energy convertors using the principles of natural photosynthesis and secondly - to get any information on possible pathways of chemical and biological evolution of solar energy conversion and storage (13).

References:

I. Photochemical conversions. IOCD UNESCO. (I983). A.M.Braun (ed.). Lauzanne.

2. Krasnovsky, A.A. (I974). Light energy conversion in photosynthesis; molecular mechanisms. Nauka. Moskva (in Russian).

3. Krasnovsky, A.A., V.V.Nikandrov et al. (I975). Dokl. Akad. Nauk SSSR. 225, 7II-7I3 (in Russian).

4. Krasnovsky, A.A., A.N.Semenova, V.V.Nikandrov. (I982). Photobiochem. Photobiophys. 4, 227-232.

5. Krasnovsky, A.A. (I979). Topics in photosynthesis. J.Barber (ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 28I-298.

6. Krasnovsky, A.A., Chan-van-Ni, V.V.Nikandrov, G.P.Brin. (I980). Plant Physiol. 66, 925-930.

7. Nikandrov,V.V., A.I.Aristarchov, A.A.Krasnovsky. (I983). Biofizika. 28, 699-70I (in Russian).

8. Maltzev, S.V., A.A.Krasnovsky. (I983). Fiziol. rast. 29, 95I-958 (in Russian).

9. Krasnovsky, A.A., G.P.Brin. (I96I). Dokl. Akad. Nauk SSSR. I39, I42-I45 (in Russian).

IO. Krasnovsky, A.A., G.P.Brin. (I973). Dokl. Akad. Nauk SSSR. 2I3, I43I-I434 (in Russian).

II. Krasnovsky, A.A., G.P.Brin, A.N.Luganskaya, V.V.Nikandrov. (I979). Dokl. Akad. Nauk SSSR. 249, 896-899 (in Russian).

I2. Nikandrov, V.V., G.P.Brin, A.A.Krasnovsky. (I983). Photobiochem. Photobiophys. 6, IOI-I07.

I3. Krasnovsky, A.A. (I98I). Biosystems. I4, 8I-87.

Obituary

Alexander A. Shlyk



Professor Alexander A. Shlyk, corresponding member of the Academy of Sciences of the U.S.S.R., died in Minsk on November 30, 1984 after a long illness.

A. Shlyk was born in Minsk on November 1, 1928, and received his education at the Byelorussian State University, Minsk, from where he graduated with Honours in Chemistry in 1950. This was followed by postgraduate training, culminating in 1954 in the degree of Doctor in Chemistry. The same year he became Deputy Director of the Institute of Biology, Minsk. In 1957 A. Shlyk organized a laboratory which later became the Institute of Photobiology. Till his last days he held the position of the Director of that Institute.

A. Shlyk's pioneering work was devoted to the systematic study of chlorophyll metabolism in green leaves using radioactive tracers. He proved the existence of chlorophyll turnover at different stages of development of the photosynthetic apparatus in higher plants, algae and photosynthetic bacteria. He studied in detail the final steps of chlorophyll formation and investigated the role of protochlorophyllide and chlorophyllide as chlorophyll precursors in green plants.

A. Shlyk and his associates discovered the metabolic heterogeneity of the photosynthetic pigments and chloroplast membranes. The essence of this important universal phenomenon is that the newly formed chlorophyll molecules and membrane fragments differ from those synthesized previously in their physical and chemical state which determines their higher lability and enhanced activity in metabolism. On this base he managed to show the formation of chlorophyll *b* from the subpool of newly formed chlorophyll *a*

molecules. As a part of his work A. Shlyk developed a unique mathematical approach to analysing the kinetics of radioactivity of substances in a heterogeneous system.

A. Shlyk examined structural and energetic interrelations between molecules of various types of chlorophylls and their precursors at different steps of biogenesis of the photosynthetic apparatus, which made it possible to elucidate the organisation of the pigment system of photosynthesis. The study of the localisation of the chlorophyll biosynthetic apparatus within the chloroplast revealed its direct coupling with the structural components of the photosynthetic apparatus and enrichment of certain highly labile zones of the membrane system in traits of chlorophyll biosynthesis. These two lines of research led to the concept of centres of chlorophyll biosynthesis. According to this concept, multienzyme complexes of chlorophyll synthesis are located in specific centres in the membrane which accomplish the formation and initial accumulation of pigment molecules and are coupled with other processes in the biogenesis of the photosynthetic apparatus.

The concept of centres of chlorophyll biosynthesis allowed him to present the changes in the overall activity of the chlorophyll-forming apparatus as determined by alterations both in the activity of a single unit and in the total number of units. According to A. Shlyk, inhibitors of protein synthesis mainly decrease the number of centres of biosynthesis, while cytokinins may increase it.

A. Shlyk was the author of more than 300 scientific papers and two monographs. He co-operated in the Editorial Boards of International and Soviet journals. He was elected as a member of the International Committee on Photosynthesis. He was selflessly devoted to science and, despite his serious illness, worked till the last days of his life.

A. Shlyk was a bright personality, a talented teacher and organiser, remarkable for his high moral standards, friendliness and self-discipline.

The name of Alexander A. Shlyk will stay forever in the hearts of all those who had the privilege to know him personally and work with him.

A.A. Krasnovsky

PHOTOSYNTHETICA 19 (2): 183—187, 1985

Detection of Protochlorophyllide Forms in Irradiated Green Leaves and Chloroplasts by Difference Fluorescence Spectroscopy at 77 K*

N. N. LEBEDEV, P. ŠIFFEL** and A. A. KRASNOVSKIĬ

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Lenin Prospect 33, SU-11701 Moscow, U.S.S.R.

Abstract

The short-wave region (600—660 nm) of the low temperature (77 K) chlorophyll (Chl) fluorescence spectra in mature leaves and chloroplasts was studied by a double wavelength differential method. The spectrum contained three distinct spectral bands, two of which belong to protochlorophyllide ·hlide, maxima at 632 and 641 nm) and the third one to Chl *b* (maximum at 653 nm). In dark- ..ess, the fluorescence band at 641 nm increased considerably and a Pchlide band with the emission maximum at 657 nm emerged. On irradiation these fluorescence bands quickly disappeared. Pchlide fluorescence excitation spectra in irradiated chloroplasts were shifted to the red as compared with those in etiolated leaves. A similar shift was observed in the excitation of the extracted pigments in solution. After prolonged darkness (about a week) the Pchlide excitation spectra in chloroplasts and etiolated leaves became identical. There were no carotenoid bands in the excitation spectra of Pchlide or Chl *b* fluorescence. Hence the fluorescence observed belongs to different spectral forms of Pchlide and probably to a newly synthesized form of Chl *b*. The pathway of Pchlide biosynthesis is altered by irradiation.

There are some indications now that the pathway of chlorophyll (Chl) biosynthesis in irradiated green plants differs from that in etiolated ones (Sautel and Apel 1981, Adamson and Packer 1984, Griffiths *et al.* 1984). The question is whether the immediate photoactive precursor of Chl — protochlorophyllide (Pchlide) — in irradiated green plants is the same as in etiolated leaves or not.

Pchlide in green leaves is present in a very low concentration, but can be detected by fluorescence measurement. Fluorescence emission in the spectral region of Pchlide was first recorded in green leaves kept in prolonged darkness (Litvin *et al.* 1959, 1962). Similarly as in etiolated leaves, this emission consisted of two bands with maxima at 635 and 655 nm, respectively. On irradiation these fluorescence bands disappeared. During greening of etiolated leaves the intensity of Pchlide fluorescence quickly dropped and in mature irradiated leaves the emission in this region could be detected only after solubilization of chloroplasts with digitonin. In this case it was located at 635 nm (Fradkin *et al.* 1981). The fluorescence excitation spectrum of Chl *a* in young greening leaves has a peak at about 470 nm, which was ascribed to Chl *b* (Fradkin *et al.* 1966). The peak of a similar position was detected in leaves of a β-carotene mutant of maize (Fradkin *et al.* 1969) and in isolated light-harvesting complexes (Larkum and Anderson 1982). The fluorescence emission in the region of 650 nm in isolated chloroplasts can be excited at 470 nm, but not at 440 or 495 nm (Litvin *et al.* 1976), and estimated to belong to Chl *b*.

* *Received* 15 August 1984.

** *Permanent address:* Institute of Experimental Botany, Czechoslovak Academy of Sciences, CS-160 00 Praha 6, Flemingovo n. 2, Czechoslovakia.

The purpose of the present work was to develop a special technique for studying the Pchlide fluorescence in green plants and to carry out a detailed spectral analysis of the short-wave region of the Chl fluorescence emission and its excitation spectra in isolated chloroplasts and green leaves.

MATERIALS AND METHODS

French beans (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Harzgruss) were grown in a greenhouse under supplementary irradiance of 80 W m^{-2} at 24—28 °C and a light period of 16 h. Samples were prepared from the central pieces of primary (2 to 5 d old) or secondary (14 to 20 d old) leaves. Homogenization was carried out for 60 s at 4—5 °C in a medium containing 0.4 M sucrose, 10 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$ and 67 mM phosphate buffer, pH 7.8. Chloroplasts were separated by centrifugation at 2500 × *g* for 10 min and resuspended in the same medium. For fluorescence measurements, the samples were frozen on the surface of plexiglass. Absorbance of samples in the Soret (blue) region was about 0.1—0.2.

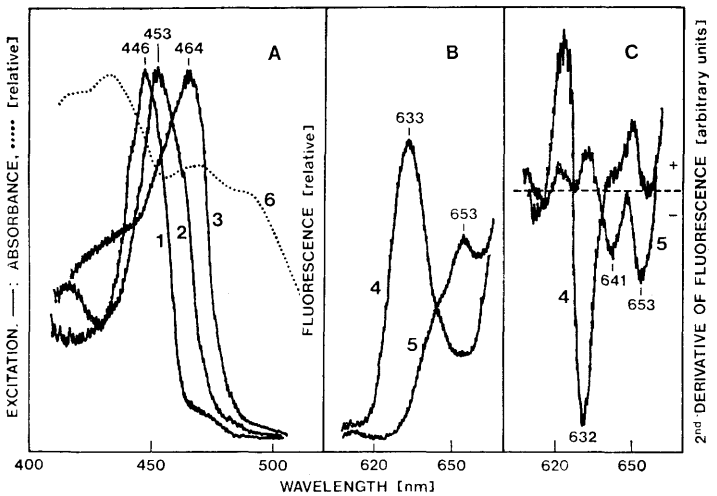
The fluorescence emission and excitation spectra were recorded with a home-made appara containing two high intensity transmission grating monochromators, a high pressure xenon lamp and a photomultiplier (*FEU-79*), direct current amplifier and x-y recorder. For correction, substraction and differentiation of the spectra a microprocessor (*DCSU-2*, *Perkin-Elmer*) was used. To obtain the background emission and excitation spectra of fluorescence, excitation at 500 nm (in the minimum of chlorophyll absorbance) and detection at 605 nm (in the minimum of chloroplasts fluorescence) was used. Excitation and emission slitwidths were 4 and 3 nm, respectively, for emission spectra measurements and 2 and 5 nm for the recording of excitation spectra. Stepwidth for the digital differentiation was 0.2 nm. All measurements were made at 77 K.

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1, *B* represents the short-wave part of the low temperature fluorescence emission spectrum of mature chloroplasts measured in the substraction mode. The position of the maximum and the shape of the spectrum depended on the wavelength of excitation. Excitation at 438 nm (the region of Pchlide absorbance) stimulated the emission with the maximum at 633 nm, but excitation at 470 nm (the region of Chl *b* absorbance) stimulated the emission with the maximum at 653 nm. The second derivative of the difference spectra showed the emission to consist of three interlapping bands with the maxima at 632, 641, and 653 nm (Fig. 1, *C*). The band intensity, but not the position of the maxima depended on the wavelength of excitation.

After 22—24 h of darkness, plants emit short-wave fluorescence with the bands at 635 and 657 nm (Litvin *et al.* 1959, 1962). This emission was observed under excitation at 440—450 nm. When we excited fluorescence at 470 nm only the band with the maximum at 653 nm remained (Fig. 2, *B*). Irradiation of frozen samples at —100 to —30 °C with intense "white light", which induced Pchlide photoconversion in etiolated leaves, lead to an almost complete disappearance of the 635 and 657 nm bands in green leaves. But the fluorescence at 653 nm (under proper excitation) did not change after such treatment (Fig. 2, *B*).

The excitation spectra for each of the short-wave fluorescence bands differed considerably (Fig. 1, *A*). Rather good resolution of the spectra indicated low (if any) energy migration among the pigments. The position of the maxima (446 and 453 nm) and the ratio of the main and satellite bands in the blue region of excitation spectra for the 635 and 641 nm bands were close to those



g. 1. Low temperature fluorescence excitation and emission spectra of protochlorophyllide and chlorophyll *b* in mature chloroplasts from an irradiated plant. (*A*) Excitation spectra for emission at: 625 nm (*1*), 640 nm (*2*), 653 nm (*3*). Curve *6* is the absorption spectrum of the sample. (*B*) Emission spectra and (*C*) their second derivative for excitation at: 438 nm (*4*) and 470 nm (*5*).

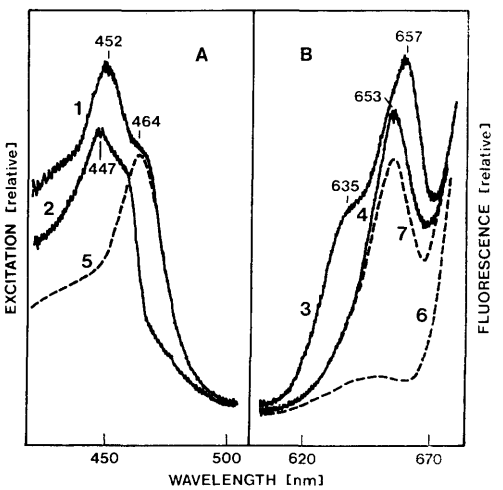


Fig. 2. Fluorescence of chlorophyll *b* and photoactive protochlorophyllide in homogenate of mature green leaves from the 22 h dark adapted plants. (*A*) Excitation spectrum of protochlorophyllide fluorescence measured at: 657 nm (*1*) or 625 nm (*2*). (*B*) Fluorescence emission of: protochlorophyllide under excitation at 450 nm (*3*), and of chlorophyll *b* under excitation at 468 nm (*4*). The same sample after irradiation with intensive "white light" at −100 to −30 °C for 10 min to convert protochlorophyllide: excitation spectrum of chlorophyll *b* emission at 653 nm (*5*), a weak emission under excitation at 450 nm (*6*), chlorophyll *b* emission under excitation at 468 nm (*7*).

of two short-wave bands of Pchlide in etiolated leaves (Ignatov *et al.* 1983), but in the latter case they shifted to the blue by 5—7 nm. The inner filter effect did not seem to be the reason for the shift, for the same spectra could be observed with the samples of very low absorbance (about 0.03). The same shift was seen in the fluorescence excitation spectra of Pchlide in extracts from both green and etiolated plants (Fig. 3), that indicated a difference in the chemical structure of Pchlide molecules. A similar difference was observed as a result of mono- and divinyl substitution in the ring II (Belanger and Rebeiz 1979). Thus green illuminated plants may synthetize divinyl-Pchlide instead of the monovinyl one of etiolated seedlings.

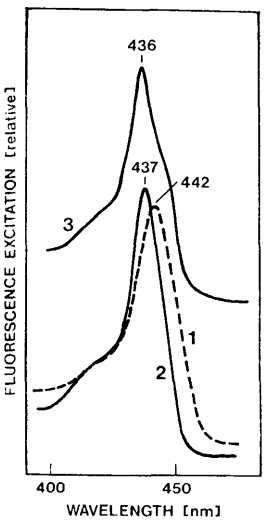


Fig. 3. Excitation spectra for low temperature fluorescence of different types of protochlorophyllides in acetone extracts: protochlorophyllide from illuminated green leaves (*1*); from etiolated leaves (*2*); from green leaves of a plant, which has been kept in darkness for 10 d (*3*). Fluorescence was detected at 627 nm.

After 4 to 20 h irradiation of etiolated leaves the maximum of Pchlide in the low temperature excitation spectrum was shifted to the position typical for green illuminated leaves. After prolonged darkness (for about a week) the low temperature fluorescence excitation spectra of etiolated and green plants become again identical. The same was true for the spectra of the pigment in extracts (Fig. 3). So the pathway of Pchlide biosynthesis was switched by a light-dependent system which differed from that which controlled Pchlide accumulation.

The excitation spectrum of the 653 nm fluorescence band in chloroplasts differed from that of the other bands (Fig. 1, *A*). The position of its maximum was similar to that of Chl *b* in irradiated and subsequently dark-treated etiolated leaves (Fradkin *et al.* 1969) or in isolated light-harvesting complexes (Larkum and Anderson 1982). These results, as well as the lack of carotenoids bands in the excitation spectrum of the 653 nm fluorescence correspond to the fluorescence properties of newly synthetized molecules of Chl *b*.

The large overlapping of the emission bands at 657 and 653 nm did not allow the determination of the excitation spectrum of the former one in the dark-treated green leaves separately. But the shape of the spectrum showed (Fig. 2, *A*) that energy could migrate between the Pchlide forms after dark treatment.

So, the fluorescence of green irradiated plants and chloroplasts in the spectral region 600 to 660 nm was due to different spectral forms of Pchlide and probably a newly synthetized form of Chl *b*. Under irradiation green plants might have synthetized a modification of Pchlide: the divinyl derivative instead of the monovinyl one, which dominates in etiolated leaves.

REFERENCES

Adamson, H., Packer, N.: Dark synthesis of chlorophyll *in vivo* and dark reduction of protochlorophyllide *in vitro* by pea chloroplasts. — In: Sironval, C., Brouers, M. (ed.): Protochlorophyllide Reduction and Greening. Pp. 353—363. M. Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague—Boston—Lancaster 1984.

Belanger, F. C., Rebeiz, C. A.: Chloroplast biogenesis XXVII. Detection of novel chlorophyll and chlorophyll precursors in higher plants. — Biochem. biophys. Res. Commun. **88**: 365—372, 1979.

Fradkin, L. I., Domanskaya, I. N., Shlyk, A. A.: Perenos énergii ot protokhlorofillida k khlorofillu v zelenom rastenii. [Energy transfer from protochlorophyllide to chlorophyll in green plant.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **261**: 220—223, 1981.

Fradkin, L. I., Shlyk, A. A., Kalinina, L. M., Faludi-Daniel, A.: Fluorescence studies on reaction centres of chlorophyll biosynthesis at the early stages of greening. — Photosynthetica **3**: 326—337, 1969.

Fradkin, L. I., Shlyk, A. A., Kolyago, V. M.: Temnovoï biosintez khlorofilla *b* u kratkovremenno osveshchennykh étiolirovannykh prorostkov. [Dark chlorophyll *b* biosynthesis in etiolated seedlings irradiated for a short time.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **171**: 222—225, 1966.

Griffiths, W. T., Oliver, R. P., Kay, S. A.: A critical appraisal of the role and regulation of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in greening plants. — In: Sironval, C., Brouers, M. (ed.): Protochlorophyllide Reduction and Greening. Pp. 19—29. M. Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague—Boston—Lancaster 1984.

Ignatov, N. V., Krasnovskiï, A. A., Jr., Litvin, F. F., Belyaeva, O. B., Walter, G.: Low-temperature (77 K) excitation spectra of fluorescence and phosphorescence of native forms of protochlorophyll(ide) in etiolated leaves of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. — Photosynthetica **17**: 352—360, 1983.

Larkum, A. W. D., Anderson, J. M.: The reconstitution of a photosystem II protein complex, *P*-700-chlorophyll *a*-protein complex and light harvesting chlorophyll *a*/*b*-protein. — Biochim. biophys. Acta **679**: 410—421, 1982.

Litvin, F. F., Krasnovskiï, A. A., Rikhireva, G. T.: Obrazovanie i prevrashchenie protokhlorofilla v zelenykh listyakh rasteniï. [Protochlorophyll synthesis and conversion in plant green leaves]. — Dokl. Akad. Nauk SSSR **127**: 699—701, 1959.

vin, F. F., Rikhireva, G. T., Krasnovskiï, A. A.: Nizkotemperaturnye spektry list'ev rasteniï i sostoyanie khlorofilla. [Low temperature spectra of higher plants leaves and the state of chlorophyll.] — Biofizika **7**: 578—591, 1962.

Litvin, F. F., Sineshchekov, V. A., Shubin, V. V.: Issledovanie migratsii énergii mezhdu nativnymi formami khlorofilla pri —196 °C metodom sensibilizirovannoï fluorestsentsii. [Energy migration between chlorophyll native forms studied at —196 °C by the method of sensitized fluorescence.] — Biofizika **21**: 669—675, 1976.

Sautel, H.-J., Apel, K.: The protochlorophyllide holochrome barley (*Hordeum vulgare* L.). The effect of light on the NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductase. — Europe. J. Biochem. **120**: 89—93, 1981.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 20 1986 Вып. 5

УДК 577.344 : 577.311.342.3

УСЛОВИЯ ФОТООБРАЗОВАНИЯ ВОДОРОДА СУБХЛОРОПЛАСТНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ФОТОСИСТЕМУ 1

А. И. АРИСТАРХОВ, В. В. НИКАНДРОВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Проведено сравнительное исследование фотохимической активности хлоропластов, их фрагментов, обогащенных фотосистемой 1, и мицеллярных растворов хлорофилла в реакциях фотовосстановления метилвиологена, метилового красного и фотоообразования водорода в присутствии экзогенной гидрогеназы. Выделенная из хлоропластов в составе тилакоидных везикул фотосистема 1 в присутствии гидрогеназы из *Desulfovibrio desulfurikans*, метилвиологена и комбинации доноров электронов — 50 мМ дитиотреита, 50 мМ аскорбата и 0,1 мМ ТМФД осуществляет фотообразование водорода более эффективно, чем изолированные хлоропласты, со скоростью, достигающей 700 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час, что соответствует предельной скорости переноса электронов через фотосистему 1, измеренной по восстановлению метилового красного. Предполагается, что необходимыми условиями достижения высоких скоростей фотообразования водорода изолированной фотосистемой 1 являются сохранение целостности тилакоидной мембраны, наличие пластоцианина и комбинации экзогенных доноров электронов, которые обеспечивают эффективное восстановление реакционного центра фотосистемы 1.

Проблема преобразования солнечной энергии в химическую привлекает пристальное внимание исследователей. Особый интерес представляют осуществляющие фотообразование молекулярного водорода системы, в которых компоненты фотосинтетического аппарата растений, водорослей или фотосинтезирующих бактерий сопряжены с бактериальной гидрогеназой. Арнон и соавт. впервые продемонстрировали фотообразование H_2 в системе хлоропласт — бактериальная гидрогеназа, используя в качестве доноров электронов цистеин или восстановленный дихлорфенолиндофенол [1]. Впоследствии была установлена возможность фотообразования H_2 в такой системе в отсутствие экзогенных доноров электронов, т. е. в результате окисления молекул воды [2, 3]. Дальнейшие работы были посвящены выяснению механизма фотообразования H_2 хлоропластами, сопряженными с бактериальной гидрогеназой, и оптимизации этого процесса (см. обзоры [4—6]). Были определены основные факторы, лимитирующие фотообразование H_2: окисление переносчиков электронов выделяющимся на свету кислородом [3, 7, 8], инактивация ФС-2 хлоропластов и гидрогеназы [9—11], циклический транспорт электронов [9, 12—14]. Эффективность фотообразования H_2 хлоропластами повышалась введением в реакционную среду систем, реагирующих с кислородом (глюкозооксидаза, глюкоза) и перекисью водорода (этанол, каталаза) [3, 10, 11], удалением кислорода в условиях, сохраняющих целостность тилакоидных мембран [14], подбором доноров [12—15] и переносчиков электронов [11, 16—18], стабилизацией мембран хлоропластов с помощью сывороточного альбумина [4, 11] и антиокислителей [4], обработкой глютаровым альдегидом [10] или иммобилизацией хлоропластов и гидрогеназ [19, 20].

Принятые сокращения: ТМФД — N,N,N′,N′ — тетраметил-*n*-фенилендиамин дигидрохлорид; МВ — метилвиологен; РЦ — реакционный центр, ФС1-В — тилакоидные везикулы, содержащие ФС-1; ФС1-Ф — фрагменты тилакоидных мембран, обогащенных ФС-1.

Максимальные скорости фотообразования H_2 хлоропластами в отсутствие экзогенных доноров электронов при использовании систем, поглощающих кислород, достигают 50—90 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час; при этом используется только часть электронтранспортной способности хлоропластов [16]. В таких условиях реакция наблюдается не более 6—8 ч [10, 21].

В нашей лаборатории обнаружено фотообразование H_2 хлоропластами со скоростью до 350 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час при использовании комбинации доноров электронов — 50 мМ дитиотреита и 50 мМ аскорбата [9]. Однако применение экзогенных доноров электронов, так же как и систем, поглощающих кислород, обусловливает низкую энергетическую эффективность процесса. Одним из возможных путей ее повышения является пространственное разделение окисляющей воду фотосистемы и сопряженной с гидрогеназой фотосистемы в большей степени, чем это происходит в хлоропластах. Предпосылкой для создания такой системы является изучение способности изолированных фотосистем 1 и 2 осуществлять соответственно фотообразование водорода и кислорода.

Ранее нами было показано, что возможно фотообразование H_2 содержащими ФС-1 субхлоропластными частицами в присутствии бактериальной гидрогеназы и дитиотреита [22]. Скорость фотообразования H_2 в такой системе не превышала 3—5 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час. Более высокие скорости этой реакции (до 40 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час) были достигнуты голландскими исследователями, которые использовали тилакоидные везикулы, содержащие ФС-1, и комбинацию доноров электронов — дитиотреит, аскорбат и ТМФД [15]. Недавно описано эффективное фотообразование H_2 (до 700 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час) везикулами, выделенными из зеленых фотосинтезирующих бактерий [24].

Для того, чтобы выяснить, каковы условия эффективного фотообразования H_2 изолированной ФС-1 хлоропластов, мы сравнили фотохимическую активность хлоропластов, тилакоидных везикул, содержащих ФС-1 (ФС1-В), фрагментов тилакоидных мембран, обогащенных ФС-1 (ФС1-Ф), и хлорофилла, включенного в мицеллы детергента в реакциях фотообразования H_2, фотовосстановления метилового красного и метилвиологена (MB^{2+}).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Хлоропласты выделяли из 10-дневных проростков гороха сорта «Победитель» по методу Уокера [25].

Выделение субхлоропластных фрагментов, обогащенных ФС-1, проводили двумя способами. Один тип фрагментов — ФС1-В получали по модифицированному методу Петерса и соавт. [23] по следующей схеме: измельчение 100 г листьев гороха в гомогенизаторе РТ-1 (5 периодов по 10 с) в 200 мл среды, содержащей 50 мМ буфер Трицин — NaOH (pH 7,5), 300 мМ маннита, 25 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$; фильтрование гомогената через два слоя полотна; центрифугирование 5 мин при 3000 *g*, надосадочную жидкость отбрасывали; суспендирование осажденных хлоропластов в течение 3 мин в 30 мл 10 мМ $MgCl_2$, приводящее к осмотическому шоку, которое прекращали добавлением 30 мл среды, содержащей 40 мМ буфер HEPES — NaOH (pH 7,5), 500 мМ маннита, 50 мМ NaCl, 50 мМ KCl; центрифугирование 5 мин при 3000 *g*, надосадочную жидкость отбрасывали; повторное суспендирование осадка в 25 мМ буфере HEPES — NaOH (pH 7,5), содержащем 250 мМ маннита, 25 мМ NaCl, 25 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$; обработка суспензии дигитонином в течение 40 мин, конечная концентрация его в среде составляла 0,2%, а отношение (дигитонин/хлорофилл) = 1 (по весу); трехкратное разведение суспензии средой инкубации без дигитонина; центрифугирование 30 мин при 10 000 *g*, осадок отбрасывали; центрифугирование 30 мин при 50 000 *g*, осадок отбрасывали; центрифугирование

60 мин при 129 000 *g*, надосадочную жидкость отбрасывали; осадок (ФС1-В) снова суспендировали в среде инкубации без дигитонина.

Таким способом получали фракцию замкнутых стромальных ламелл диаметром 500 Å [26], в которых отношение Р700/хлорофилл *a* в 3 раза, а отношение хлорофиллов *a*/*b* в 2 раза выше, чем в хлоропластах. В таких везикулах не обнаружено цитохрома c_{550}, но присутствуют цитохромы *f* и b_{559}. По содержанию пластоцианина везикулы не отличаются от хлоропластов. Фотохимическая активность, присущая ФС-2, не обнаружена.

Другой тип субхлоропластных фрагментов ФС1-Ф получали по модифицированному методу Шутиловой и соавт. [27] по следующей схеме: суспендирование хлоропластов в среде, содержащей 70 мМ фосфатный буфер (pH 7,5), 400 мМ сахарозу, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, при концентрации хлорофилла 0,25 мг/мл;

добавление в суспензию 1% дигитонина до конечной концентрации 0,4% при отношении (дигитонин/хлорофилл), равном 26 (по весу);

обработку суспензии ультразвуком с использованием УЗДН-1 при 22 кГц в течение 1—2 мин;

добавление в суспензию NaCl до конечной концентрации 2% и инкубирование в течение 40 мин;

центрифугирование 15 мин при 4000 *g*, осадок отбрасывали;

инкубирование с 0,15%-ным Тритоном Х-100 и соотношением (детергент/хлорофилл), равным 10 (по весу), в течение 10 мин;

центрифугирование 45 мин при 20 000 *g*, осадок отбрасывали;

центрифугирование 30 мин при 80 000 *g*, осадок отбрасывали;

центрифугирование 2,5 ч при 144 000 *g*, надосадочную жидкость отбрасывали;

осадок (ФС1-Ф) снова суспендировали в среде инкубации без детергентов и NaCl.

В полученных фрагментах отношение хлорофилл/Р700 составило 70. Субхлоропластные фрагменты, полученные при действии на мембрану Тритона Х-100, представляют собой нитевидные структуры толщиной 70—80 Å или их конгломераты [28] и имеют отношение хлорофиллов *a* и *b* 7—8 [27].

Все операции выделения проводили при 4° С. Субхлоропластные частицы ФС1-В и ФС1-Ф и хлоропласты хранили в жидком азоте в пластиковых пробирках с 20%-ным глицерином.

Препараты бактериальной гидрогеназы из клеток *Desulfovibrio desulfuricans* штамм 2198 получали из Казанского института биологии АН СССР. Они имели активность 200 мкл H_2 на 1 мл в минуту и были использованы в насыщающем реакцию количестве 0,2 мл.

Фотообразование H_2 регистрировали в полярографической ячейке, снабженной системой анаэробного продувания и заполнения, с встроенным электродом Кларка на полярографе LP-7E по методу Ванга и соавт. [30].

Фотовосстановление метилвиологена и метилового красного определяли при помощи спектрофотометра СФ-14 по изменению оптической плотности соответственно при 605 и 470 нм. В спектрофотометрических исследованиях анаэробные условия создавали, откачивая воздух в трубках Тунберга с дополнительным отводом; при этом концентрированная суспензия хлоропластов или фрагментов хлоропластов находилась в боковом отводе трубки отдельно от реакционной среды в 50%-ном глицерине [13]. Аскорбат добавляли к откачанной среде в сухом виде, для чего его навеску помещали в микростаканчике в трубку Тунберга и откачивали 3—4 мин. Затем при повороте трубки Тунберга порошок высыпали в реакционную смесь.

Раствор хлорофилла в детергенте готовили, добавляли хлорофилл *a* в минимальном объеме ацетона к 10%-ному раствору Тритона Х-100 с последующей откачкой оставшегося ацетона на форвакуумном насосе; конечная концентрация Тритона Х-100 в реакционной смеси составляла 1%.

Для освещения использовали лампу накаливания 300 Вт, выделяя фильтрами СЗС-24 и КС-11 область 600—800 нм с интенсивностью света $5 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$.

Измерения флуоресценции были проведены на установке, собранной в нашей лаборатории.

Дитиотреит, аскорбат натрия, метилвиологен и метиловый красный были получены от фирмы «Serva» (ФРГ), ТМФД от фирмы «BDH Chemicals» (Англия), дигитонин (был дважды перекристаллизован из спирта) и Тритон X-100 — от фирмы «Merck» (ФРГ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фотообразование водорода. В соответствии с предыдущими исследованиями [14, 15, 22] фотообразование H_2, сенсибилизированное хлоропластами, ФС1-В, ФС1-Ф или хлорофиллом, наблюдается в анаэробных условиях в присутствии MB^{2+} и бактериальной гидрогеназы при использовании в качестве донора электронов дитиотреита и не наблюдается при использовании аскорбата (табл. 1). Добавление 50 мМ аскорбата к реакционной смеси, содержащей 50 мМ дитиотреита, активирует фотообразование H_2, сенсибилизированное хлоропластами или ФС1-В, и подавляет фотообразование H_2, сенсибилизированное ФС1-Ф или хлорофиллом. При этом, как видно из рис. 1, аскорбат активирует фотообразование H_2 хлоропластами независимо от времени его добавления — до освещения или в процессе фотореакции. Такая независимость действия аскорбата от времени его введения в реакционную среду характерна для всех используемых сенсибилизаторов.

ТМФД — липофильное соединение, способное передавать электроны в фотосинтетическую цепь переноса электрона на уровне пластоцианина, действует в реакции фотообразования H_2 подобно аскорбату. В восстановленном состоянии ТМФД не способен поддерживать образование H_2 ни с одним из использованных нами сенсибилизаторов. Введение в реакционную среду пары аскорбата и ТМФД, способной, как известно, эффективно поддерживать в хлоропластах фотопоглощение O_2 или фотовосстановление $NADP^+$, также не вызывает образования H_2 (см. табл. 1). При совместном использовании с дитиотреитом ТМФД активирует образование H_2 хлоропластами и ФС1-В, но подавляет реакцию, сенсибилизированную ФС1-Ф и хлорофиллом.

Комбинация 50 мМ дитиотреита, 50 мМ аскорбата и 0,1 мМ ТМФД вызывает эффективное образование H_2, сенсибилизированное хлоропластами или ФС1-В, но не способна поддерживать образование H_2, сенсибилизированное ФС1-Ф или хлорофиллом.

Таблица 1

Фотообразование H_2

Доноры электронов	Скорость фотообразования H_2, мкэкв на 1 мл хлорофилла в час			
	хлоропласты	ФС1-В	ФС1-Ф	хлорофилл *a*
Дитиотреит	95	174	28	30
Аскорбат	0	0	0	0
Дитиотреит + аскорбат	220	200	0	0
Дитиотреит + ТМФД	950	230	0	0
Аскорбат + ТМФД	0	0	0	0
Дитиотреит + аскорбат + + ТМФД	1140	1460	0	0

Примечание. Реакционная среда содержала: 50 мМ буфер HEPES — NaOH (pH 7,0), 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ MB^{2+}, 0,2 мл гидрогеназы. В суспензии хлоропластов и ФС1-В вводили 10 мкМ дихлорметилмочевины и 0,1 мМ NH_4Cl. Концентрация хлорофилла в суспензиях хлоропластов, ФС1-В, ФС1-Ф и растворе хлорофилла составляла соответственно 10; 1,7; 6 и 10 мкг/мл. Концентрация доноров электронов была: дитиотреита – 50 мМ, аскорбата—50 мМ, ТМФД — 0,1 мМ. Чувствительность установки для регистрации водорода составляла 100 мкмоль·мл$^{-1}$.

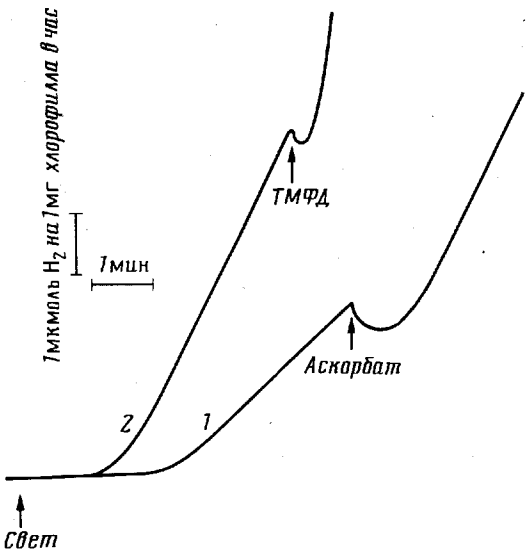


Рис. 1. Кинетика фотообразования H_2 хлоропластами в присутствии 50 мМ дитиотреита (*1*) и 50 мМ дитиотреита с 50 мМ аскорбата (*2*). Стрелками указано включение света и введение в реакционную среду аскорбата (50 мМ) и ТМФД (0,1 мМ). Состав реакционной среды представлен в табл. 1. Концентрация хлорофилла 10 мкг/мл

Таким образом, при фотообразовании H_2 ФС1-В проявляют себя аналогично хлоропластам, а ФС1-Ф подобны хлорофиллу, включенному в мицеллы детергента.

Чтобы выяснить, чем различаются ФС1-В и ФС1-Ф в качестве сенсибилизаторов фотообразования H_2, мы изучили их фотохимическую активность в реакциях фотовосстановления MB^{2+} и метилового красного. Исследование восстановления MB^{2+}, имеющего E_0'=—0,446 В, позволяет определить условия эффективной генерации восстановителя, необходимого для образования молекулярного водорода. Метиловый красный, в отличие от MB^{2+}, является необратимо восстанавливающимся акцептором электронов. Вследствие этого при сопоставлении реакций фотообразования H_2, фотовосстановления MB^{2+} и метилового красного можно определить, каков обратный перенос электрона в реакциях восстановления MB^{2+} и образования H_2.

Фотовосстановление метилвиологена. Сравнение фотовосстановления MB^{2+} (табл. 2) с фотообразованием H_2 (табл. 1) указывает на их качественное сходство. Действительно, аскорбат и ТМФД активируют как фотообразование H_2, так и фотовосстановление MB^{2+} дитиотреитом, сен-

Таблица 2

Фотовосстановление метилвиологена

Доноры электронов	Скорость восстановления метилвиологена, мкэкв на 1 мг хлорофилла в час			
	хлоропласты	ФС1-В	ФС1-Ф	хлорофилл *а*
Дитиотреит	22	66	1,5	16
Аскорбат	0	0	0	0
Дитиотреит + аскорбат	45	350	0	0
Дитиотреит + ТМФД	450	270	0	0
Аскорбат + ТМФД	0	0	0	0
Дитиотреит + аскорбат + + ТМФД	900	1000	0	0

Примечание. Состав реакционной среды указан в табл. 1. Концентрация MB^{2+} — 50 мкМ, гидрогеназу не вносили.

сибилизированное хлоропластами или ФС1-В, но подавляют аналогичные реакции, сенсибилизированные ФС1-Ф или хлорофиллом. Так же, как и при фотообразовании H_2, наибольшие скорости реакции достигаются при использовании комбинации дитиотреита с аскорбатом и ТМФД.

В реакции фотовосстановления $МВ^{2+}$ дитиотреитом, сенсибилизированной хлоропластами или ФС1-В, имеется индукционный период (рис. 2), длительность которого снижается при увеличении концентра-

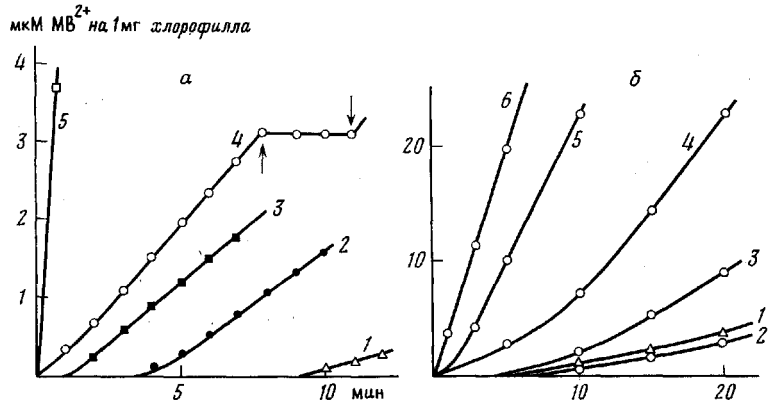


Рис. 2. Влияние аскорбата на скорость фотовосстановления метилвиологена хлоропластами (*а*) и ФС1-В (*б*) в присутствии дитиотреита. Состав реакционной среды указан в табл. 1. Концентрация метилвиологена 50 мкМ, хлорофилла 20 мкг/мл (*а*) и 1 мкг/мл (*б*), гидрогеназу не вводили. Доноры электронов для *а*: *1* — 5 мМ дитиотреит, *2* — 50 мМ дитиотреит, *3* — 5 мМ дитиотреит, 50 мМ аскорбат, *4* — 50 мМ дитиотреит, 50 мМ аскорбат, *5* — 50 мМ дитиотрейт, 50 мМ аскорбат, 0,1 мМ ТМФД; для *б*: 5 мМ дитиотреит присутствовал во всех случаях, *2*—*6* — 5, 25, 50, 100 и 200 мМ аскорбат

ции доноров электронов или увеличении pH реакционной среды (рис. 3). Добавление аскорбата в реакционную смесь, содержащую дитиотреит, приводит к уменьшению индукционного периода фотовосстановления $МВ^{2+}$ или к полному его исчезновению (рис. 2).

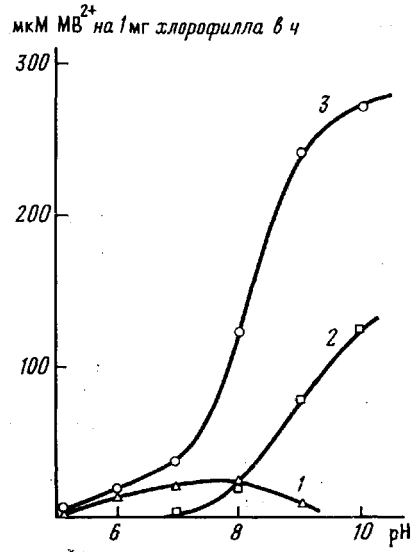


Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции фотовосстановления метилвиологена хлоропластами от pH среды. Состав реакционной среды: 70 мМ фосфатный буфер, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ дихлорметилмочевины (кроме *3*), 0,1 мМ NH_4Cl, 0,1 мМ метилвиологена, 10 мкг/мл хлорофилла, *1* — в отсутствие экзогенных доноров электронов, *2* — в присутствии 50 мМ дитиотреита, *3* — в присутствии 50 мМ дитиотреита и 50 мМ аскорбата

Активирующее действие аскорбата особенно заметно, если использовали дитиотреит в низкой концентрации. Так, в присутствии 50 мМ дитиотреита 50 мМ аскорбат вызывает увеличение скорости фотовосстановления $МВ^{2+}$, сенсибилизированного хлоропластами или ФС1-В, в 2 и 5 раз, а на фоне 5 мМ дитиотреита происходит увеличение скорости реакции в 4 и 30 раз соответственно.

Таблица 3

Фотовосстановление метилового красного

Доноры электронов	Скорость фотовосстановления, мкэкв на 1 мг хлорофилла в час			
	хлоропласты	ФС1-В	ФС1-Ф	хлорофилл *а*
Дитиотреит	110	230	30	90
Аскорбат	170	250	40	440
Дитиотреит + аскорбат	280	400	55	450
Дитиотреит + ТМФД	880	930	370	510
Аскорбат + ТМФД	1360	1480	460	870
Дитиотреит + аскорбат + + ТМФД	1710	2060	1230	1020

Примечание. Состав реакционной среды указан в табл. 1. Концентрация метилового красного—50 мкМ, гидрогеназу не вносили.

Активирующее действие аскорбата возрастает с увеличением его концентрации (рис. 4). Причем, в отличие от дитиотреита, аскорбат в концентрации до 500 мМ не приводит к насыщению фотовосстановления MB^{2+}.

Фотовосстановление метилового красного. В отличие от ситуации, наблюдаемой при фотообразовании H_2 и фотовосстановлении MB^{2+}, при

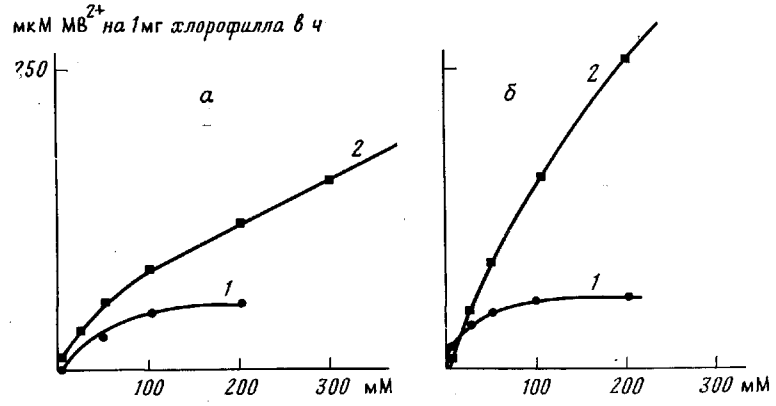


Рис. 4. Зависимость скорости фотовосстановления метилвиологена хлоропластами (*а*) и ФС1-В (*б*) от концентрации дитиотреита (*1*) и аскорбата (*2*). Состав реакционной среды указан в табл. 1. Концентрация хлорофилла в суспензии хлоропластов 5 мкг/мл, в ФС1-В — 2 мкг/мл, гидрогеназу не вводили. В случае *2* в реакционной среде присутствовал 5 мМ дитиотреит

фотовосстановлении метилового красного все исследуемые сенсибилизаторы проявляют себя сходным образом (табл. 3).

Хлоропласты, ФС1-В, ФС1-Ф и хлорофилл осуществляют фотовосстановление метилового красного как при использовании дитиотреита, так и при использовании аскорбата. Во всех случаях аскорбат и ТМФД активируют фотовосстановление метилового красного дитиотреитом. При использовании комбинации дитиотреита с аскорбатом скорость фотовосстановления метилового красного близка к сумме величин скоростей реакций, полученных с каждым донором электронов в отдельности. Фотовосстановление метилового красного, так же как и фотообразование H_2 и фотовосстановление MB^{2+}, происходит наиболее эффективно при использовании комбинации дитиотреита с аскорбатом и ТМФД.

Следует отметить, что для изучаемых сенсибилизаторов значения максимальных скоростей фотовосстановления метилового красного больше, чем соответствующие значения скоростей фотообразования H_2 и фотовосстановления MB^{2+}.

Влияние Тритона Х-100. ФС1-Ф, в процессе выделения которых при-

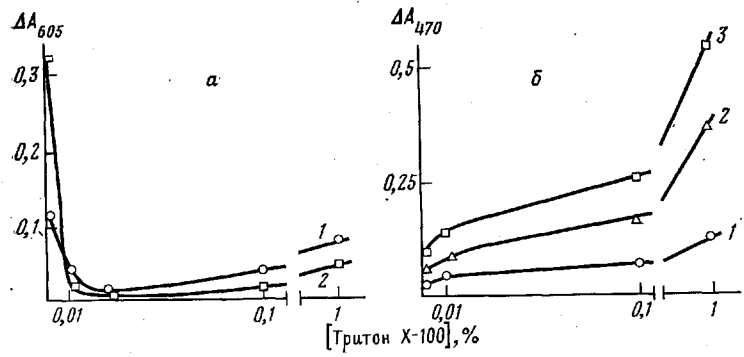


Рис. 5. Действие Тритона X-100 на фотовосстановление метилвиологена (*а*) и метилового красного (*б*) хлоропластами. Изменение оптической плотности регистрировали через 10 (*а*) и 30 с (*б*) после включения света. В реакционную среду были добавлены дитиотреит (*1*), дитиотреит и аскорбат (*2*), аскорбат (*3*) в концентрации по 50 мМ. Состав реакционной среды указан в табл. 1. Концентрация метилового красного 0,1 мМ, хлорофилла — 10 мкг/мл; при фотовосстановлении метилвиологена буфер HEPES был заменен на 70 мМ фосфатный буфер, pH 8,5, гидрогеназу не вводили

меняли Тритон X-100, в отличие от хлоропластов и ФС1-В и подобно хлорофиллу, включенному в мицеллы Тритона X-100, не способны к фотообразованию H_2 и фотовосстановлению MB^{2+} при использовании комбинации доноров электронов дитиотреита и аскорбата. В связи с этим представляло интерес исследовать, как Тритон X-100 влияет на фотохимическую активность хлоропластов.

Как видно из рис. 5, Тритон X-100 подавляет фотовосстановление MB^{2+}, но активирует фотовосстановление метилового красного хлоропластами. Существенно, что у обработанных детергентом хлоропластов при использовании комбинации дитиотреита с аскорбатом скорость восстановления MB^{2+} меньше, а скорость восстановления метилового красного больше, чем скорость соответствующей реакции при использовании дитиотреита. Подобная зависимость наблюдается у хлоропластов и ФС1-Ф (табл. 2, 3).

Из таблиц видно, что фотохимическая активность ФС1-Ф и солюбилизированного хлорофилла близки. Возможной причиной такого сходства ФС1-Ф и хлорофилла может быть участие в реакциях, сенсибилизированных ФС1-Ф, мономерного хлорофилла, образованного в результате действия Тритона X-100 при выделении субхлоропластных частиц. Действительно, в спектре излучения флуоресценции ФС1-Ф имеется максимум при 665 нм, характерный для мономерного хлорофилла. Однако оценка интенсивности флуоресценции показала, что его содержание в ФС1-Ф не превышает 0,01%. Этот факт показывает, что заметное участие мономерного хлорофилла в реакциях, осуществляемых ФС1-Ф, мало вероятно.

На это указывают также результаты опытов по изучению влияния воздействий, приводящих к денатурации белков, на фотохимическую активность ФС1-Ф и хлорофилла. Прогревание при 90° С в течение 15 мин или обработка 24 М мочевиной (30 мин) приводят к снижению скорости фотовосстановления метилового красного, сенсибилизированного ФС1-Ф, на 80—90% и практически не влияют на скорость восстановления метилового красного, сенсибилизированного хлорофиллом.

Влияние цианида калия и пластоцианина. Значения фотохимической активности ФС1-Ф и ФС1-В различаются, возможно, потому, что в препаратах ФС1-Ф нет пластоцианина. Для проверки этого предположения было исследовано влияние цианида калия — ингибитора переноса электронов через пластоцианин и экзогенного пластоцианина на фотохимическую активность ФС1-Ф, ФС1-В и хлоропластов (табл. 4).

При использовании в качестве донора электрона дитиотреита цианид калия на 85—90% подавляет фотовосстановление MB^{2+} хлоропластами

Таблица 4

Ингибирование цианидом калия фотовосстановления метилвиологена

Доноры электронов	Скорость фотовосстановления, мкэкв на 1 мг хлорофилла в час					
	Хлоропласты		ФС1-В		ФС1-Ф	
	— KCN	+ KCN	— KCN	+ KCN	— KCN	+ KCN
Дитиотреит	18	3 (85%)	40	4,5 (90%)	0,9	9,9 (0%)
Дитиотреит + аскорбат	39	0 (100%)	231	0 (100%)	0	0
Дитиотреит + ТМФД	188	1,9 (90%)	162	18 (90%)	0	0

Примечание. В скобках приведен процент ингибирования. Состав реакционной среды указан в табл. 1. Концентрация MB^{2+} — 50 мкМ, ТМФД — 50 мкМ, хлорофилла в суспензии хлоропластов, ФС1-В и ФС1-Ф 10, 1 и 2 мкг/мл соответственно, обработку KCN проводили по методу Изава и сотр. [29] в отсутствие феррицианида в реакционной среде.

Таблица 5

Влияние пластоцианина на фотовосстановление метилвиологена (MB^{2+}) и метилового красного, сенсибилизированного ФС1-Ф

Доноры электронов	Скорость фотовосстановления, %	
	MB^{2+}	метиловый красный
Дитиотреитол	260	410
Аскорбат	0	450
Дитиотреит + аскорбат	0	—
Аскорбат + ТМФД	0	500

Примечания. Скорость реакции без пластоцианина принята за 100%. Состав реакционной среды — в табл. 1. Концентрация MB^{2+} и метилового красного — 50 мкМ, пластоцианина — 7 мкМ/мл, хлорофилла — 0,18 мкг/мл, гидрогеназу не вводили.

или ФС1-В и не влияет на реакцию, сенсибилизированную ФС1-Ф. Обработанные цианидом калия хлоропласты и ФС1-В, подобно ФС1-Ф, не способны использовать комбинацию дитиотреита с аскорбатом для фотовосстановления MB^{2+}.

Экзогенный пластоцианин не влияет на фотохимическую активность хлоропластов и ФС1-В, но стимулирует фотохимическую активность ФС1-Ф. Добавление 7 мкМ пластоцианина к суспензии ФС1-Ф приводит к увеличению скорости восстановления метилового красного в 4—5 раз (табл. 5). Скорость фотовосстановления MB^{2+} дитиотреитом, сенсибилизированного ФС1-Ф, при этом увеличивается в 2—3 раза. Однако присутствие в среде экзогенного пластоцианина не приводит к появлению у ФС1-Ф способности поддерживать фотовосстановление MB^{2+} при использовании комбинации дитиотреита с аскорбатом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показывают наши исследования, фотохимическая активность изолированной ФС-1 существенно зависит от способа ее выделения из хлоропластов. Полученные с помощью 0,2%-ного дигитонина ФС1-В осуществляют фотообразование H_2 и фотовосстановление MB^{2+} более эффективно, чем ФС1-Ф, которые выделены с помощью воздействия на хлоропласты ультразвука, 0,4%-ного дигитонина и 0,1%-ного Тритона X-100. Различие в способах выделения ФС1-В и ФС1-Ф определяет их различную структуру и состав. Было показано [26], что ФС1-В представляет собой образованные ламеллами стромы везикулы, которые содержат пигмент-белковый комплекс ФС-1, комплекс цитохромов f и b_{556} и пластоцианин. Обработка хлоропластов ультразвуком и Тритоном X-100, применяемая при выделении ФС1-Ф, приводит к нарушению целостной мембранной структуры и потере пластоцианина [25].

Наличие пластоцианина в препаратах ФС-1 является необходимым, но не достаточным условием достижения высоких скоростей фотообразования H_2. Действительно, в присутствии экзогенного пластоцианина ФС1-Ф, хотя и проявляет существенное увеличение фотохимической ак-

тивности в реакциях фотовосстановления метилового красного и MB^{2+}, но не способны использовать для фотообразования H_2 комбинации доноров электронов дитиотреита с аскорбатом или дитиотреита с аскорбатом и ТМФД (в присутствии которых достигаются высокие скорости фотообразования H_2 хлоропластами или ФС1-В).

По-видимому, для эффективного образования H_2, кроме пластоцианина, необходимо наличие целостной тилакоидной мембраны. На это указывает тот факт, что хлоропласты, обработанные 0,01%-ным Тритоном Х-100, приводящим к увеличению проницаемости тилакоидной мембраны или образованию перфораций в ней, проявляют себя в реакции фотовосстановления MB^{2+} подобно ФС1-Ф и хлорофиллу (рис. 4). Такие хлоропласты осуществляют фотовосстановление метилового красного с высокой скоростью, но не способны к эффективному фотообразованию H_2.

Высокие скорости фотообразования H_2, сенсибилизированного ФС1-В, достигаются при использовании тройной комбинации доноров электронов (табл. 1). Ранее в нашей лаборатории было показано, что применение 50 мМ дитиотреита совместно с 50 мМ аскорбата позволяет достичь высоких скоростей фотообразования H_2, сенсибилизированного хлоропластами [14]. Предполагалось, что дитиотреит поддерживает в восстановленном состоянии аскорбат, а комбинация доноров электронов, эффективно восстанавливая переносчики электронов, расположенные между ФС-1 и ФС-2, подавляет циклический транспорт электронов, медиатором которых является MB^{2+}. Розен и Красна [13] показали, что дитиотреит можно заменить другими реагентами, содержащими сульфгидрильную группу, такими как цистеин, дитиоэритритол или тиогликолевая кислота. В работе Мьюлема и Холла [31] было подтверждено предположение о том, что дитиотреит поддерживает аскорбат в восстановленном состоянии. Показано, что дитиотреит, восстанавливая образующийся в ходе фотореакции дегидроаскорбат, таким образом конкурирует с MB^{2+}. Голландские исследователи предположили, что аскорбат в комбинации с дитиотреитом и ТМФД выполняет каталитические функции — связывает продукт(ы) окисления дитиотреита [15], способные окислить $MB^{+\cdot}$.

Данные, полученные в настоящей работе, не согласуются с этим предположением. Во-первых, реакция восстановления MB^{2+} дитиотреитом, сенсибилизируемая хлоропластами или ФС1-В, является необратимой (см. рис. 2). Во-вторых, на основе предположения голландских исследователей трудно объяснить тот факт, что аскорбат активирует фотообразование H_2 и фотовосстановление MB^{2+}, сенсибилизированные ФС1-В или хлоропластами, но подавляет эти реакции, сенсибилизированные ФС1-Ф или хлорофиллом.

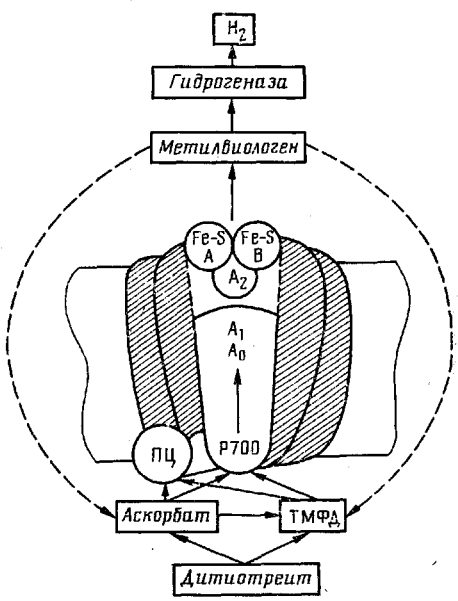


Рис. 6. Гипотетическая схема транспорта электронов при фотообразовании H_2, сенсибилизированном ФС1-Ф в присутствии бактериальной гидрогеназы. ПЦ — пластоцианин, A_0, A_1, A_2, A, B — комплекс первичных акцепторов ФС-1

По-видимому, активирующее действие аскорбата связано с тем, что он способен проникать в тилакоидную мембрану более эффективно, чем дитиотреит. На это указывает некоторое сходство действия аскорбата и липофильного переносчика электронов — ТМФД (см. табл. 1—3), а также отсутствие насыщения адсорбатом реакции фотовосстановления MB^{2+} (см. рис. 4). Известна

также способность аскорбата восстанавливать спиновую метку, включенную в гидрофобную часть лецитиновой мембраны [32].

Тот факт, что аскорбат подавляет фотовосстановление $МВ^{2+}$ и фотообразование H_2, сенсибилизированное ФС1-Ф или солюбилизированным хлорофиллом, можно объяснить наличием обратной реакции — окисления $МВ^+$ дегидроаскорбатом, в результате которой происходит замыкание транспорта электронов в цикл (рис. 6). С этим предположением согласуется тот факт, что фотовосстановление метилового красного — реакция, в которой обратный перенос электрона невозможен из-за необратимого восстановления акцептора электронов — аскорбат не подавляет.

В ФС1-В и хлоропластах места восстановления $МВ^{2+}$ и окисления аскорбатом, по-видимому, пространственно разделены тилакоидной мембраной, что уменьшает вероятность обратного транспорта электронов. Обработка хлоропластов 0,1%-ным Тритоном Х-100 приводит к подавлению фотовосстановления $МВ^{2+}$ и фотообразования H_2, по-видимому, из-за повышения проницаемости тилакоидной мембраны для $МВ^{2+}$.

Таким образом, условиями достижения высокой эффективности фотообразования H_2 изолированной ФС-1 хлоропластов являются наличие целостной тилакоидной мембраны, присутствие пластоцианина и использование доноров электронов, способных обеспечить высокие скорости переноса электронов к РЦ ФС-1 при отсутствии циклического транспорта электронов.

ФС-1, выделенная из хлоропластов в составе замкнутых тилакоидных везикул, в присутствии гидрогеназы, $МВ^{2+}$ и комбинации доноров электронов — 50 мМ дитиотреита, 50 мМ аскорбата и 0,1 мМ ТМФД — осуществляет фотообразование H_2 более эффективно, чем хлоропласты, — со скоростью, достигающей 700 мкмоль H_2 на 1 мг хлорофилла в час.

Авторы выражают благодарность М. И. Беляевой и М. Н. Давыдовой, любезно предоставившим препарат гидрогеназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arnon D. I., Mitsui A., Panegue A.* Science, 1961, v. 134, p. 1425—1429.
2. *Krampitz L. O.* In: An Inquiry into Biological Energy Conversion/Hollaender A. et al., eds. Knoxville: The University of Tenesse, 1972.
3. *Benemann J. R., Benersen J. A., Kaplan N. O.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, p. 2317—2320.
4. *Rao K. K., Hall D. O.* In: Photosynthesis in Relation to Model Systems/Barber J., ed. Amsterdam: Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1979, ch. 10, p. 299—329.
5. *Krasnovsky A. A.* Ibid., ch. 9, p. 281—298.
6. *Weaver P. F., Lien S., Seibert M.* Solar Energy, 1980, v. 24, p. 3—45.
7. *Packer L., Cullingford W.* Z. Naturforsch., 1978, 33c, S. 113—115.
8. *Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В.* Докл. АН СССР, 1976, т. 229, с. 94—97.
9. *Красновский А. А., Никандров В. В., Брин Г. П., Гоготов И. Н., Ощепков В. П.* Докл. АН СССР, 1985, т. 225, с. 711—713.
10. *Rao K. K., Rosa L., Hall D. O.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 68, p. 21—28.
11. *Fry I., Papageorgin G., Tel-Or E., Racker L.* Z. Naturforsch., 1977, 32c, S. 110—117.
12. *Hoffman D., Thauers R., Trebst A.* Z. Naturforsch., 1977, 32c. S. 257—268.
13. *Rosen M. M., Krasna A. I.* Photochem. Photobiol., 1980, v. 31, p. 259—265.
14. *Krasnovsky A. A., Chan Van Ni, Nikhandrov V. V., Brin G. P.* Plant Physiol., 1980, v. 66, p. 925—930.
15. *Peters F. A. L. J., Boog R., Krab K., Kraayenhof R.* Photosynthesis Res., 1984, v. 5, p. 335—346.
16. *Rao K. K., Gogotov I. V., Hall D. O.* Biochemistry, 1978, v. 60, p. 291—296.
17. *Cuendet P., Gratzel M.* Photobiochem. Photobiophys., 1981, v. 2, p. 93—109.
18. *Cuendet P., Gratzel M.* Photobiochem. Photobiophys., 1981, v. 2, p. 93—103.
19. *Gisby P. E., Hall D. O.* In: Photosynthesis VI/Akoyunoglou G., ed. Philadelphia: Balaban International Sci. Servis, 1981, p. 655—664.
20. *Karube L., Matsunaga T., Otsuka T., Kuano H., Suruki S.* Biochem. Biophys. Acta, 1981, v. 637, p. 490—495.
21. *Персанов В. М., Гоготов И. Н., Гинс В. К., Мухин Е. Н.* Физиология растений, 1977, т. 24, с. 699—703.

22. *Никандров В. В., Аристархов А. И., Красновский А. А.* Биофизика, 1983, т. 28, с. 699—701.
23. *Peters F. A. L. J., Wielink E. V., Sang H. W. W. F., Kraayenhof R.* Biochem. Biophys. Acta, 1983, v. 722, p. 460—470.
24. *Bernstein J. P., Olson J. M.* Photochem. Photobiol., 1981, v. 34, p. 725—731.
25. *Walker P. A.* Methods Enzymol., 1971, v. 23, p. 211—220.
26. *Peters F. A. L. J., Docter P., Kooij T., Kraayenhof R.* In: Photosynthesis I/Akounoglou G., ed. Philadelphia: Balaban International Science Services, 1981, 691—700.
27. *Шутилова Н. И., Климов В. В., Шувалов В. А., Кутюрин В. М.* Биофизика, 1975, т. 20, с. 844—847.
28. *Vernon L. P., Ke B., Mollntaues H., Shaw E. R.* Progr. Photosynthesis Res., 1969, v. 1, p. 137—148.
29. *Izawa S., Kraayenhof R., Ruuge E. K., Devault D.* Biochem. Biophys. Acta, 1973, v. 314, p. 328—339.
30. *Wang R., Healey F. P., Myers J.* Plant. Physiol., 1971, v. 48, p. 108—110.
31. *Muallem A., Hall P. O.* Plant Physiol., 1982, v. 69, p. 1116—1120.
32. *Lohmann W., Winzenburg J.* Z. Naturforsch., 1983, 38c, S. 923—925.

Поступила в редакцию
24.XII.1985

CONDITIONS OF HYDROGEN PRODUCTION BY SUBCHLOROPLAST FRAGMENTS CONTAINING PHOTOSYSTEM 1

A. I. ARISTARKHOV, V. V. NIKANDROV, A. A. KRASNOVSKY

A. A. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A comparative study of the photochemical activities of chloroplasts, their fragments, enriched with Photosystem 1, and chlorophyll micellar solutions in the reactions of photoreduction of methyl viologen, methylen red, and of H_2 photoproduction in the presence of exogenous hydrogenase was carried out. Photosystem 1 isolated from chloroplasts within the thylakoid vesicles, in the presence of hydrogenase from *Ds. desylfurikans*, methyl viologen, and a combination of electron donors — 50 mM dithiotreitol, 50 mM ascorbate and 0.1 mM N,N,N′,N′-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, performs H_2 photoproduction more effectively than the isolated chloroplasts, at the rate as high as 700 μM H_2/mg chl per hour, which corresponds to the maximal rate of electron transfer across Photosystem 1, registered by the methylene red reduction. The necessary conditions for the high rate of hydrogen photoproduction are supposed to be: the intactness of the thylakoid membrane, the presence of plastocyanine and combination of the exogenous electron donors, which provide the efficient reduction of the reaction center of Photosystem 1.

УДК 577.3

Преобразование солнечной энергии при фотосинтезе: проблемы и перспективы

Академик *А. А. КРАСНОВСКИЙ*



АЛЕКСАНДР АБРАМОВИЧ КРАСНОВСКИЙ — доктор биологических наук, заведующий лабораторией фотобиохимии Института биохимии АН СССР им. А. Н. Баха (Москва). Работы посвящены исследованию механизма первичных фотохимических превращений в фотосинтезирующих системах, моделированию фотосинтеза, утилизации солнечной энергии.

Растения преобразуют солнечное излучение, достигающее поверхности Земли, в потенциальную химическую энергию органических соединений и молекулярного кислорода. Все формы жизни на Земле основаны на способности растений к усвоению и запасанию солнечной энергии. Работа генетического аппарата и биохимических механизмов самовоспроизведения основана на использовании солнечной энергии, запасенной в продуктах фотосинтеза.

Энергетические потребности человечества ныне удовлетворяются главным образом сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза: нефти, природного газа, каменного угля, а также биомассы. Из таблицы видно, что структура энергетического баланса развитых и развивающихся стран различается величиной энергетического потребления биомассы — древесины, отходов сельского хозяйства; в развитых странах эта величина составляет лишь около 1 %, тогда как в развивающихся около половины всей энергии до сих пор извлекается из биомассы. Ожидается, что к 2000 г. возрастет использование атомной энергии (возможно до 20 %), уменьшится относительная доля нефти, увеличится доля каменного угля, а биомасса будет использоваться более рационально для микробиологического производства кормового белка, спиртов и горючих газов — метана, водорода. Вероятно, доля биомассы в энергопотреблении развивающихся стран значительно уменьшится, а в развитых странах увеличится до 5—10 %.

Распределение потребляемой энергии в мире, в % (по данным на 1978 г.)[1]

Источники энергии	Весь мир	Развитые страны	Развивающиеся страны
Нефть	39	45	24
Уголь	27	28	26
Газ	17	23	4,0
Биомасса	14	1,0	43
Атомная и гидроэнергия	2,5	3,0	1,5
Всего, Дж/год	$3 \cdot 10^{20}$	$2 \cdot 10^{20}$	$1 \cdot 10^{20}$

К началу третьего тысячелетия большая часть энергии будет по-прежнему производиться путем сжигания ископаемых продуктов фотосинтеза, так как пока трудно прогнозировать сроки технического осуществления термоядерного синтеза, который, как считают, полностью обеспечит энергетические потребности нашей планеты. Растущие потребности в энергии приводят к тому, что запасенная растениями в течение миллионов лет энергия Солнца может быть израсходована всего несколькими поколениями человечества. Сжигание органических продуктов фотосинтеза ведет к возрастанию количества CO_2 в земной атмосфере, что приводит к «парниковому эффекту» и постепенному повышению температуры в среде обитания с непредсказуемыми экологическими последствиями. С другой стороны, увеличение содержания углекислоты приведет к некоторому росту интенсивности глобального фотосинтеза.

Пока достоверно не установлено уменьшение содержания кислорода в атмосфере, хотя возможны временные локальные изменения в районах наиболее интенсивного промышленного развития. Причина относительной стабильности кислородной атмосферы, по-видимому, связана с ее большой буферной емкостью и пока еще значительными темпами генерации кислорода земными растениями и планктоном океанов. Однако рост потребления ископаемого топлива, истребление лесов, влияние загрязнения среды на фотосинтез растений способны нарушить пока еще существующий баланс потребления и образования кислорода, а, возможно, и стабильность озонового слоя в атмосфере, который защищает все формы жизни на поверхности земли от губительного жесткого ультрафиолетового излучения Солнца.

Изучение природы и механизмов фотосинтеза растений — фундаментальная научная проблема, решением которой занимаются сотни лабораторий во всем мире. Эти исследования в перспективе должны привести к оптимизации биологического использования солнечной энергии и к созданию искусственных систем, использующих энергию Солнца. Эти проблемы неоднократно рассматривались ранее (см. например,[2]).

Использование солнечной энергии при фотосинтезе. В основе использования солнечной энергии растениями находится реакция образования кислорода и углеводов из воды и углекислоты:

$$H_2O + CO_2 = 1/6\ C_6H_{12}O_6 + O_2$$

Возрастание свободной энергии в этой реакции составляет около 500 кДж, откуда следует, что фото-

синтез возможен лишь при подведении энергии извне.

Хлорофилл и другие пигменты растений служат той антенной, которая улавливает свет Солнца и преобразует его в химическую энергию продуктов фотосинтеза. При энергии моля квантов красного света в максимуме поглощения хлорофилла (680 нм) около 160 кДж для компенсации дефицита свободной энергии фотосинтеза требуется минимум 3 кванта света (500 : 160) на молекулу выделяющегося кислорода или ассимилируемой углекислоты. Измерение квантового расхода фотосинтеза одноклеточных водорослей в оптимальных условиях в ряде лабораторий показало, что на молекулу усваеваемой углекислоты расходуется от 8 до 12 квантов света. Если принять среднюю величину равной 10 квантам, то максимальное преобразование поглощенной солнечной энергии в потенциальную химическую составляет 30 %: таков к. п. д. фотосинтеза. Надо отметить, что максимальный квантовый выход измерен в кратковременных экспериментах с одноклеточными водорослями и реальные затраты энергии на биосинтез фотосинтезирующих структур и размножение клеток приведут к понижению этой величины.

В спектре солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, коротковолновая граница при 300 нм определяется поглощением более коротковолнового излучения слоем озона. Примерно половина энергии солнечного излучения лежит в видимой области и используется для фотосинтеза. Это так называемая фотосинтетическая активная радиация. Другая половина энергии солнечного излучения приходится на инфракрасную область спектра и не используется для фотосинтеза. Существуют, однако, фотосинтезирующие бактерии, содержащие бактериохлорофилл *b* (*Rhodopseudomonas viridis*), которые могут использовать ИК-излучение с длиной волны до 1 мкм, но их распространение незначительно и они не играют роли в глобальном запасании солнечной энергии, так же как и галофиты, содержащие бактериородопсин, способный к фотосинтезу АТФ.

Итак, лишь половина энергии солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, представляет собой фотосинтетически активную радиацию. Поэтому максимально возможная утилизация при фотосинтезе солнечной энергии, достигающей поверхности Земли, составляет не более 15 %.

Как же в действительности использует солнечное излучение поверхность нашей планеты? По грубым оценкам, не более 0,1 % этой радиации используется для фотосинтеза растениями суши и планктоном океана. Но и это в 10 раз превышает все энергетические затраты человечества. Из общей продукции фотосинтеза на суше менее 1 % потребляется в качестве пищи. Еще меньше полезное использование фотосинтетических продуктов океана; преимущественно это уловы рыбы, находящейся в самом конце биологической цепи, начальное звено которой — фотосинтез фитопланктона. Потребление первичной продукции фотосинтеза океанов не превышает сотых долей процента, и перспективы рационального использования продукции океанов привлекают все возрастающее внимание.

Основная масса органического вещества, производимого растениями, — целлюлоза. За год на Земле образуется до 10^{11} т целлюлозы, значительная часть которой расходуется в качестве топлива и строительных материалов. Однако главная масса целлюлозы вступает в биологический круговорот, вовлекаясь в различные процессы окисления и распада, и уходит в отходы сельского и лесного хозяйства.

Резервы для более интенсивного использования солнечной энергии фотосинтезом суши и океана громадны. Наиболее продуктивные растения (например, сахарный тростник) в среднем за год потребляют около 2 % энергии падающего солнечного излучения, а зерновые — до 1 %. По существу, повышение полезного использования солнечной энергии растениями и растительными сообществами — главная проблема физиологии растений и агротехники.

Сто лет назад энергетические и пищевые нужды человечества преимущественно удовлетворялись за счет новообразованных продуктов фотосинтеза; отходы животноводства использовали в сельском хозяйстве. Но из-за недостаточной продуктивности сельское хозяйство не могло обеспечить потребности растущего населения в пище. Поэтому в развитых странах стал неизбежен переход к высокопродуктивному и крайне энергоемкому земледелию. Иными словами, за высокие урожаи нужно платить растущими энергетическими затратами[3]. Отношение запасаемой энергии света к энергозатратам составляет: 20 — для экстенсивного и 2,0 — для интенсивного земледелия; 0,2 — в животноводстве; 0,02 — в тепличном хозяйстве[2].

Современное интенсивное земледелие требует громадного количества энергии для орошения, производства удобрений, работы машин и т. д. Следует также учитывать характер и степень использования возделываемых растений. Например, культура кукурузы менее энергоемка, если вся биомасса растений идет на корм скоту, чем при потреблении в качестве корма преимущественно зерна.

Энергоемкость животноводства весьма велика, так как не более 10 % химической энергии растительных кормов превращается в энергию синтезируемых в организме животных мяса и жира. В связи с большими потерями биомассы в животноводстве рассматривается возможность более широкого потребления растительного белка как полноценного продукта питания человека с оптимальным набором необходимых аминокислот; известно применение соевых бобов в странах Азии для питания. Следует надеяться, что будущие успехи селекции и генной инженерии приведут к более широкому непосредственному использованию растений для пищевых нужд, вероятно, в сочетании с ферментными препаратами, облегчающими переваривание клеточных оболочек.

По некоторым данным[4], на одну калорию пищи в развитых странах затрачивается от 5 до 10 ккал энергии; сюда входят энергозатраты сельского хозяйства, перерабатывающей промышленности, транспорта, упаковки, хранения, работы системы снабжения и т. д. Таким образом, пищевые продукты производятся в развитых странах путем расточительного расходования ископаемых продуктов фотосинтеза; в сельском хозяйстве расходуется масса горючего, поэтому необходимо внимательное технико-экономическое рассмотрение микробиологического пути получения белков из нефти, минуя традиционное ее использование в качестве топлива.

Фиксация молекулярного азота. При выращивании высокоурожайных культурных растений только на производство азотных удобрений путем химической фиксации азота атмосферы приходится до 30 % энергозатрат сельского хозяйства. Поэтому для снижения

энергоемкости сельского хозяйства важна проблема биологической фиксации азота.

Наиболее древние фотосинтезирующие организмы — прокариоты, фотосинтезирующие бактерии и сине-зеленые водоросли — способны связывать N_2 воздуха, используя химическую энергию продуктов фотосинтеза. Дальнейшая эволюция растений привела к специализации их биохимических функций, и высшие растения утратили способность к фотосинтетической фиксации азота. Поэтому культурные злаковые растения приходится снабжать связанным азотом, причем количество вносимых азотных удобрений достигает огромных величин; например, по данным ФАО (Food and Agriculture Organisation) в Голландии вносят под зерновые до 0,4—0,5 т азота на 1 га.

Потребность в азоте у бобовых удовлетворяется их симбиозом с клубеньковыми бактериями, гетеротрофно фиксирующими молекулярный азот. Этот процесс может быть весьма эффективным: соя при избыточном снабжении углекислотой фиксирует до 0,4 т азота 1 га. Конечно, для этого также используется энергия Солнца, запасенная в продуктах фотосинтеза, которые образуются в листьях растений, что сказывается на конечной продуктивности этих культур. Возможный универсальный путь усвоения молекулярного азота растениями состоит в симбиозе высших растений с бактериями-азотофиксаторами, которые были бы способны жить на корнях не только бобовых, но и злаковых. В этом направлении ведутся исследования. Обсуждаются перспективы генно-инженерных методов возвращения высшим растениям утраченной ими в процессе эволюции способности к фиксации молекулярного азота.

Чрезвычайно важная проблема — использование в сельском хозяйстве автотрофных фотосинтезирующих азотофиксаторов, таких, как сине-зеленые водоросли, пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии. На рисовых полях Индии, Индонезии, Японии сине-зеленые водоросли дают значительную часть необходимого рису азота. Вероятно, на почвах средней полосы масштабы фотосинтетического связывания азота могут значительно возрасти при условии правильного подбора культур. Большое внимание привлекают симбиотические системы, например, — папоротник азолла с сине-зелеными водорослями: эта система эффективно фиксирует атмосферный азот.

Исследование механизма фиксации азота сине-зелеными водорослями и фототрофными бактериями позволит выяснить биохимические механизмы связи этого процесса с фотосинтезом. Известно, что нитрогеназа— восстанавливающая N_2 ферментная система — использует органические продукты фотосинтеза в качестве доноров водорода и источника АТФ, однако решение проблемы оптимизации и взаимосвязи процессов фотосинтеза и фиксации азота заслуживает больших усилий.

Молекулярный механизм фотосинтеза. Каким же образом происходит преобразование солнечной энергии растениями?

Наиболее характерные устройства фотосинтезирующей клетки — специальные органеллы, улавливающие солнечную энергию: хлоропласты и хроматоры. В этих мембранных структурах сосредоточены хлорофилл и другие пигменты, улавливающие солнечное излучение, а также ферментные системы, участвующие в темновых стадиях фотосинтетических реакций. Процесс фотосинтеза у организмов, содержащих хлорофилл, можно разделить на две части: электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) и углеродный цикл. В результате работы ЭТЦ образуются запасающие энергию соединения — восстановленные никотинамидадениндинуклеотид фосфаты (НАДФН или НАДН) и АТФ. Они поступают в углеродный цикл, который не требует активации светом. Механизм углеродного цикла фотосинтеза расшифрован преимущественно путем применения $^{14}CO_2$ еще в 1950-х г. в лаборатории М. Кальвина[5].

Преобразование энергии света в химическую происходит в ЭТЦ, которая у фотосинтезирующих растений потребляет в качестве исходного донора водорода молекулы воды, что приводит к выделению молекулярного кислорода. Фототрофные бактерии используют органические или неорганические доноры водорода; их метаболизм протекает в большинстве случаев в анаэробных условиях, и они не способны выделять кислород из воды.

Усилиями многих лабораторий выявлена последовательность фотохимических и ферментативных реакций, при которых энергия квантов света используется в два «такта» в различных участках ЭТЦ для последовательного поднятия электрона от уровня кислородного (0,8 В) до уровня водородного электрода (0,42 В). От молекулы воды электрон за счет энергии света, поглощаемой пигментами так называемой фотосистемы 2, переносится к пластохинонам, а затем через цитохромы и пластоцианин поступает в фотосистему 1, которая «поднимает» электрон до уровня ферредоксина, что обеспечивает возможность восстановления НАДФ. Векторный перенос электрона в мембране ведет к транслокации протона и синтезу АТФ. Все эти реакции сопряжены в мембранах хлоропластов. Тонкие методы разборки этих биологических структур позволяют изолировать отдельные фотосистемы и исследовать их функции.

В каждой фотосистеме основная масса хлорофилла образует улавливающую свет антенну; гораздо меньшая часть пигмента сосредоточена в реакционных центрах, непосредственно участвующих в фотопереносе электрона. Энергия света, поглощаемая хлорофиллами антенны, мигрирует к реакционным центрам (РЦ), где происходит первичный фотохимический процесс. Используя технику постепенной солюбилизации антенного хлорофилла детергентами, можно в ряде случаев выделить реакционные центры и изучить происходящие в них процессы. Именно РЦ — та наименьшая структурная единица, в которой происходит первичное преобразование энергии света. В настоящее время наиболее изучены РЦ, выделенные из фотосинтезирующих пурпурных бактерий. В этих центрах содержатся бактериохлорофилл, его безмагниевый аналог бактериофеофитин, а также доноры и акцепторы электрона, смонтированные на белковых структурах. Квантовый выход первичного переноса электрона в РЦ достигает единицы, и механизм их работы определяет пути первичного преобразования энергии света.

Фотофизика и фотохимия хлорофилла. Многие годы изучалась[6] фотохимия хлорофилла и его аналогов: обратимые и необратимые превращения пигментов под действием света. Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в синглетно возбужденное состояние (время жизни 10^{-9} с). Из этого состояния с некоторой потерей энергии хлорофилл переходит в долгоживущее триплетное возбужденное состояние. Воз-

бужденный хлорофилл обладает повышенной реакционной способностью. Его взаимодействие с донором или акцептором электрона приводит к первичному фотохимическому процессу, при котором возбужденная молекула хлорофилла может отдать свой электрон акцептору (А) или принять электрон от донора (Д). В первичном процессе образуется пара ион-радикалов:

$$Хл^* + Д \rightleftarrows {\cdot}Хл^- + {\cdot}Д; \quad Хл^* + А \rightleftarrows {\cdot}Хл^+ + {\cdot}А^-$$

Эти реакции обратимы, поэтому хлорофилл под действием света может переносить электрон от донора к акцептору. Возбужденный хлорофилл больше склонен отдавать, а феофитин — принимать электрон. Фундаментальное свойство возбужденных молекул хлорофилла и его аналогов переносить электрон лежит в основе действия этих пигментов в РЦ.

Важное свойство триплетно возбужденных хлорофиллов — эффективный перенос энергии к молекуле O_2, которая при этом переходит в синглетное возбужденное состояние, во многом определяющее процессы фотодеструкции организмов[7].

В состав РЦ пурпурных бактерий входят три субъединицы белка (каждая массой около 25 кДа), четыре молекулы бактериохлорофилла, две молекулы бактериофеофитина, один — два атома железа в комплексе с убихиноном[8]. Методами лазерной и импульсной спектроскопии удалось оценить длительность элементарных актов переноса электрона в РЦ (30—200 пс) и установить последовательность разделения зарядов между молекулами бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона (см. обзоры[9,10]). Эти элементарные процессы приводят к пространственному разделению зарядов между димером бактериохлорофилла и убихиноном с квантовым выходом около единицы. Состояние РЦ с разделенными зарядами имеет время жизни $\approx$0,1 с, и принимает непосредственное участие в дальнейшем переносе электрона. Особенности молекулярной организации компонентов благоприятствуют разделению зарядов и препятствуют обратным реакциям.

РЦ фотосистем 1 и 2 зеленых растений пока не выделены в достаточно чистом виде, хотя недавно в препаратах, обогащенных центрами фотосистемы 2, удалось наблюдать фотохимический перенос электрона от хлорофилла к феофитину с образованием восстановленной формы этого пигмента[9] (рис. 1). Для фотосистемы 1 первичным является перенос электрона между разными формами хлорофилла; для фотосистемы 2 времена переноса электрона пока не измерены.

Фотосистемы и ЭТЦ расположены в мембранах хлоропластов и хроматофорах таким образом, что образующиеся активные окислители и восстановители пространственно разобщены. Это определяется спецификой молекулярной организации мембран. Разделение продуктов реакций осуществляется также с помощью специализированных органелл растительной клетки: например, у сине-зеленых водорослей вегетативные клетки продуцируют кислород, НАДФН и АТФ, а гетероцисты, работающие в анаэробном микроокружении, содержат нитрогеназу, которая восстанавливает молекулярный азот до аммиака.

Пути использования энергии разделенных зарядов. В реакционных центрах происходит первичное преобразование энергии кванта света в энергию разделенных зарядов с квантовым выходом $\approx$1 и с к. п. д., вероятно, достигающим 60—80 %. В самом конце цепи, когда образуются конечные продукты фотосинтеза, к. п. д., по-видимому, не превышает 2—3 %. Таким образом, на пути от разделения зарядов до накопления конечных продуктов значительная часть энергии, поглощенной хлорофиллом, теряется. Причины этих потерь неясны. Они связаны не только с работой биохимического механизма ЭТЦ, но и со всем метаболизмом фотосинтезирующего организма.

Возникает вопрос: нельзя ли более эффективно и с помощью более коротких метаболических путей использовать энергию разделения зарядов для восстановления CO_2, H^+ или N_2, а также для окисления воды и других органических и неорганических доноров электрона? При этом особое значение имеет предотвращение обратных реакций активных промежуточных продуктов путем их компартментации с помощью биологических мембран и структур, разделяющих носители электрона.

Рассмотрим упрощенную схему фотопроцессов, лежащих в основе реальных метаболических путей, которые определяют применение живых клеток для реализации различных биотехнологических процессов (рис. 2). Каждое звено схемы — предмет исследований многих лабораторий. Процесс начинается поглощением квантов пигментами антенны и миграцией энергии возбуждения к малой доле пигментов реакционного центра. Здесь многое неясно. Как достигается столь эффективный сток поглощенной энергии от массы хлорофилла к малому числу его молекул в реакционных центрах? Какова молекулярная организация этого высокоэффективного физического трансформатора солнечной энергии?

Итак, энергия возбуждения достигла РЦ. Мгновенно, за пикосекунды, электрон с димера хлорофилла переносится к феофитину и далее к хинонам; здесь разделенные заряды — положительная дырка на хлорофилле и электроны на убихиноне — стабилизируются на время, которое на много порядков дольше первичных процессов переноса электрона. Как устроена эта преобразующая свет структура? Как происходит ее биосинтез и смена «запасных» частей? Как она сопряжена в пространстве и во времени с работой ЭТЦ? Совсем недавно удалось получить кристаллы изолированных РЦ фотосинтезирующих бактерий[11], что открывает путь к использованию дифракционных методов для установления молекулярной структуры этого сложного образования.

После того как в РЦ разделились заряды, электрон движется по цепи переносчиков, достигая в большинстве случаев ферредоксина, который является актив-

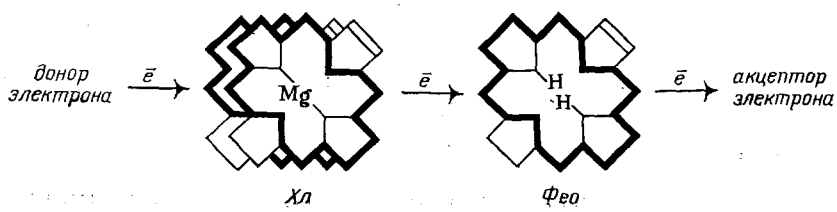


Рис. 1. Схема сопряженного действия хлорофилла (Хл) и феофитина (Фео) в фотосистемах.

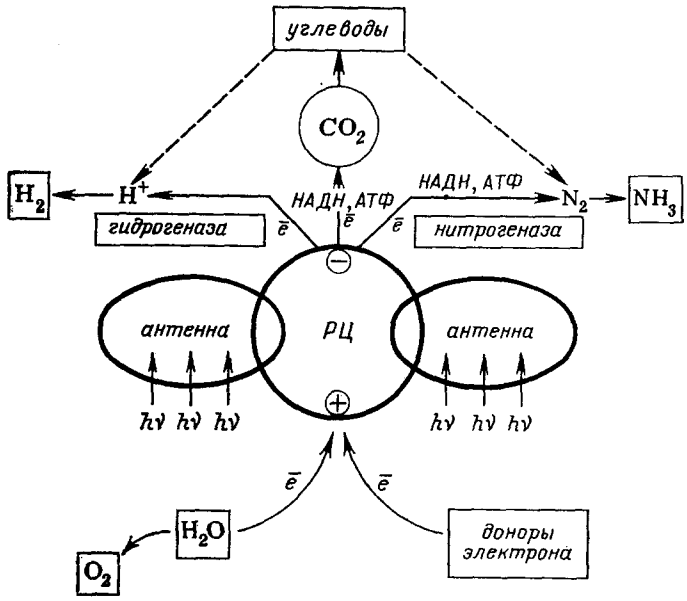


Рис. 2. Упрощенная схема переноса электрона при фотосинтезе.

ным восстановителем с потенциалом, близким к потенциалу водородного электрода. С другой стороны электрон от молекул-доноров движется к «дырке», и здесь наиболее важны до сих пор не расшифрованные пути отрыва электронов от молекул воды, ведущие к конечному образованию O_2. В этом процессе участвуют связанные с белками соединения марганца, но до сих пор не ясно, как и через какие промежуточные стадии идет образование O_2.

Вернемся к восстановительной ветви пути переноса электрона. Ее значение в метаболизме определяется необходимостью конечного восстановления наиболее «окисленных» соединений биосферы — CO_2, N_2, H^+ с использованием восстановленных продуктов в разнообразных метаболических цепях. Возникает практический вопрос: нельзя ли «укоротить» углеродный цикл и этим уменьшить неизбежные потери, возникающие на многочисленных промежуточных стадиях процесса? Можно ли ограничиться восстановлением CO_2 (минуя углеродный цикл) до формальдегида или даже до метана?

У бобовых растений ассимиляты, спускаясь к корням, обеспечивают энергией восстановление азота у симбионтов — клубеньковых бактерий. Однако более эффективно прямое использование ферредоксина и АТФ с участием нитрогеназы для восстановления N_2, как у сине-зеленых водорослей.

Выделение водорода одноклеточными водорослями в анаэробных условиях происходит путем использования органических продуктов фотосинтеза. Более короткий путь — направить электроны через ферредоксин непосредственно к ионам водорода; в присутствии гидрогеназы наблюдается выделение водорода изолированными хлоропластами, наиболее эффективное в анаэробных условиях с использованием первой фотосистемы и доноров электрона, отличных от воды. Описано большое количество систем, ведущих к фотообразованию H_2. Все перечисленные пути входят в круг проблем биотехнологии.

Моделирование. Внимание исследователей привлекает применение принципов фотосинтеза для построения искусственных систем, использующих энергию света. При этом следует отметить отсутствие значительных термодинамических ограничений при конверсии энергии квантов в потенциальную химическую энергию с к. п. д., значительно превышающим максимальный к. п. д. фотосинтеза растений. Для построения таких искусственных систем в качестве фоторецепторов используется хлорофилл и другие пигменты, изолированные клеточные структуры, содержащие пигменты, а также выделенные из клеток ферментные системы. Эти устройства включают фотохимическую систему разделения зарядов; медиаторы, переносящие электрон к ферментам; ферментную систему бактериальной клетки, использующую мобилизованный электрон (или дырку) для получения устойчивых продуктов.

Перспективное направление исследований связано с созданием искусственных мембран, способных к разделению фотохимически образующихся активных продуктов (активных окислителей и восстановителей). С этой целью широко используют бислойные липидные везикулы (липосомы), в мембраны которых включены пигменты, например хлорофилл *a* или феофитин *a* (см. [12,13]). В суспензии таких липосом удалось наблюдать фотовосстановление метилвиологена и фотообразование H_2 при трансмембранном переносе электрона от аскорбата во внутреннем пространстве липосом (рис. 3). Квантовый выход фотообразования восстановителя в этой системе достигал 15 %. Существенно, что эти реакции не наблюдаются, если донор и акцептор электрона не разделены мембраной.

Другой тип моделей основан на использовании фотокатализаторов — полупроводников TiO_2, ZnO, CdS, WO_3 и др. В отличие от красителей, частицы полупроводников могут выполнять двоякую роль: фотосенсибилизатора, преобразующего энергию света в разделенные заряды, и катализатора, на поверхности которого стабилизируются первичные продукты. При возбуждении светом возникающие электронные вакансии (дырки) окисляют воду или другой донор электрона. Электроны расходуются на восстановление акцепторов электрона.

Еще в 1961 г. было обнаружено[14] фотовыделение O_2 в водных суспензиях ZnO, WO_3, TiO_2 в присутствии Fe^{III} и показано (с помощью $H_2{}^{18}O$), что кислород в них образуется из воды. TiO_2 и ZnO сенсибилизируют также фотовосстановление метилвиологена (E_0=—0,44 В). При введении в суспензию TiO_2 или ZnO бактериальной гидрогеназы в анаэробных условиях на свету образуется H_2. Метилвиологен и органические доноры электрона активизируют этот про-

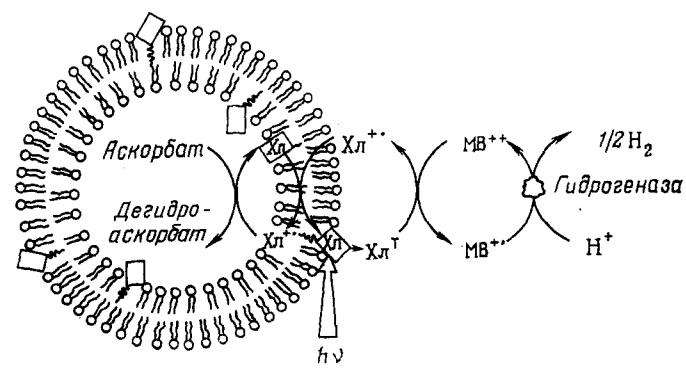


Рис. 3. Схема фотообразования водорода в хлорофиллосодержащих липосомах.

цесс. Впоследствии аналогичные опыты были выполнены с гидрогеназой, иммобилизованной на TiO_2 (см.[15]). Недавно с помощью TiO_2 и без гидрогеназы в присутствии органических доноров электрона трис(оксиметил)аминометана, триэтаноламина, глюкозы, глицерина, этанола и др. наблюдалась фотогенерация водорода[16]. При этом в суспензии TiO_2 генерируется восстановительный потенциал (до —0,8 В). CdS, поглощающий свет в более длинноволновом диапазоне, сенсибилизирует фотообразование водорода только в присутствии гидрогеназы и доноров электрона, в отличие от TiO_2 и ZnO (см.[17]).

В ряде лабораторий изучаются фотоэлектрохимические процессы с участием хлорофилла и других красителей, в которых не происходит накопления продуктов, запасающих энергию света, а электрон и дырка взаимодействуют с инертным электродом, приводя к образованию разности потенциалов[18].

Изменение фотосинтетического метаболизма для направленного синтеза необходимых продуктов. Перспективно фотохимическое обеспечение разнообразных биосинтезов, идущих в растительной клетке. Биосинтез белков, нуклеиновых кислот, липидов и углеводов идет во всех растениях за счет использования солнечной энергии; проблема в том, чтобы направить эти биосинтезы для получения желаемых продуктов. Привлекательно такое видоизменение метаболизма, которое обеспечило бы полноценный синтез пищевых белков, минуя вторичную переработку растений в организме животных. Известны микроорганизмы, накапливающие углеводороды. Все эти процессы можно оптимизировать, используя мутагенез и генную инженерию для введения в клетки зеленых водорослей или высших растений генов, определяющих их способность к фиксации азота, выделению водорода, синтезу желаемых соединений и т. д.

Еще в 1942 г. было обнаружено, что одноклеточные водоросли в анаэробных условиях теряют способность выделять кислород и вместо него выделяют газообразный водород. Исследование механизма этого процесса показало, что выделение водорода происходит с участием фермента гидрогеназы и тесно связано с углеродным обменом фотосинтезирующей клетки. Этой проблеме посвящено большое число работ (см. обзоры[19,20]). Остается неясным, в какой степени эффективность фотообразования H_2 связана с использованием продуктов фотосинтеза внутри той же клетки. Не будет ли более рациональным сочетание фотосинтезирующих организмов со специализированными микроорганизмами, перерабатывающими органическое вещество с выделением горючих газов? Для фотосинтетического выделения водорода могут быть использованы не только водоросли, но и изолированные хлоропласты, освещение которых в присутствии гидрогеназы из бактерий также ведет к выделению H_2. Изолированные хлоропласты без экзогенной гидрогеназы способны к фотообразованию и фотопоглощению водорода в зависимости от степени инактивации кислородвыделяющей системы[21].

Проведено сравнительное исследование фотовыделения водорода хлоропластами и солюбилизированным хлорофиллом в присутствии препарата гидрогеназы из клостридий[22]. Предполагается, что фотовыделение водорода хлоропластами без экзогенных доноров электрона и в присутствии дитиотреита и цистеина ограничено циклическим транспортом электронов через метилвиологен, замыкающим ветвь переноса электронов в фотосистеме 1. Использование комбинации доноров электрона (дитиотреит и аскорбат) в анаэробных условиях без повреждения хлоропластов позволяет предотвратить расходование восстановленного метилвиологена на восстановление окисленного донора электронов и исключить обратный перенос электрона. При этом H_2 выделялся со скоростью 350—400 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час. При использовании фотосистемы 1, выделенной из хлоропластов в составе тилакоидной мембраны, образующей замкнутые везикулы, скорость фотообразования H_2 достигала 1000 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час (рис. 4). Недавно описана[23] система, в которой неорганические полупроводники сопряжены с клетками клостридий, содержащими гидрогеназу (рис. 5).

Использование биомассы. Чрезвычайно важно рационально использовать биомассу, преимущественно целлюлозу. Это в значительной степени микробиологическая проблема. Здесь важная стадия — ферментативная переработка целлюлозы для получения глюкозы и последующего микробиологического синтеза белка, получения спиртов или горючих газов. Усовершенствование технологии сбора отходов и переработки растительной биомассы позволит удовлетворить часть кормовых потребностей животноводства и энергетических нужд сельского хозяйства. Поиски оптимальных путей использования биомассы растений тесно связаны с решением сложных технологических и экономических вопросов.

Наиболее важной остается глобальная проблема более эффективного использования солнечной энергии культурными растениями и понижения энергозатрат, связанных со сжиганием ископаемых продуктов фотосинтеза. Эта проблема требует обширного комплекса исследований по физиологии растений и агротехнике, с ней тесно связано изучение механизмов регуляции фотосинтетической деятельности растений и их продуктивности.

Перспективы. В заключение сравним фотосинтез растений с другими способами утилизации солнечной энергии. Предельный к. п. д. фотосинтеза растений достигает 30 %.

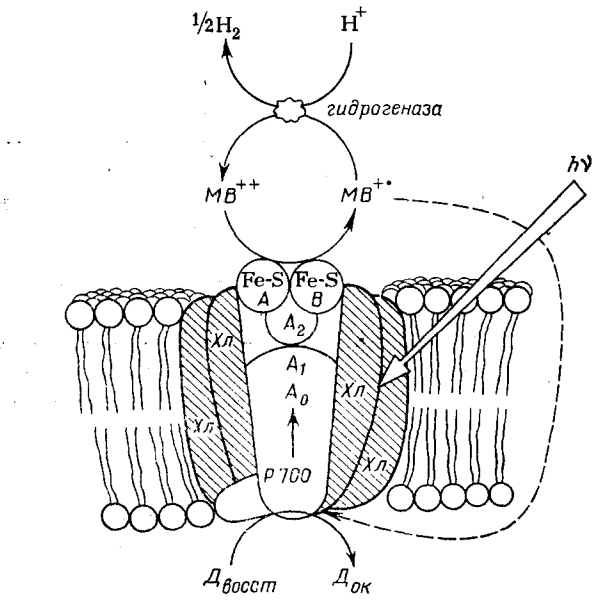


Рис. 4. Фотообразование водорода при сопряжении неорганического полупроводника с клетками бактерий.
MB — метилвиологен; A, A_0, A_1, A_2 — акцепторы электрона; Fe-S — железо-серные центры.

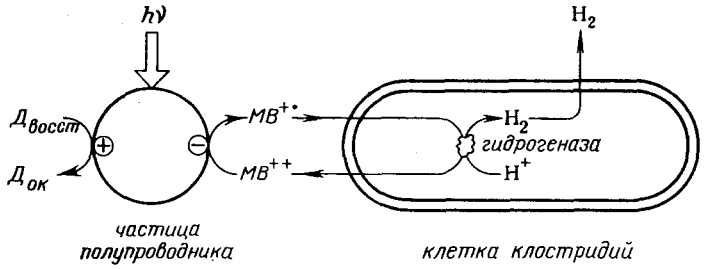


Рис. 5. Схема переноса электрона при фотообразовании водорода фотосистемой 1.

Кремниевые солнечные батареи, применяемые для энергообеспечения космических аппаратов, используют до 20 % солнечного излучения. В перспективе к.п.д. фотополупроводниковых устройств может быть еще выше, тем более что в этих устройствах можно частично использовать ИК-область излучения Солнца, которая непригодна для фотосинтеза. Что же касается тепловых машин, то при высокой температуре теплоносителя их к. п. д., по-видимому, может приближаться к к. п. д. фотосинтеза растений. Препятствием к широкому применению энергии Солнца при существующей технологии остаются экономические соображения: стоимость киловатта солнечных электростанций пока в сотни раз выше, чем у тепловых и атомных. Однако технология солнечной энергетики развивается быстро, и уже в ближайшем будущем, вероятно, будут найдены экономически целесообразные решения. Быстрее всего развивается область солнечной энергетики для отопления домов при помощи автономных устройств, которые уже разработаны. Совершенствование полупроводниковой технологии позволяет надеяться, что в будущем солнечные батареи станут основными преобразователями энергии Солнца в электроэнергию, тогда как источником пищи и кислорода по-прежнему будет служить фотосинтез растений.

Следует ожидать, что фундаментальные исследования фотосинтеза помогут решить следующие прикладные задачи:

— создание непрерывных фотобиохимических систем, использующих солнечную энергию с предельно достижимым к. п. д. (до 30 %);

— на основе установления молекулярного механизма фотосинтеза и применения методов генной инженерии создание фотобиотехнических систем, способных к направленному синтезу разнообразных соединений — углеводородов, белков, липидов, а также биологически активных соединений;

— создание фотобиотехнических систем, потребляющих солнечную энергию для образования водорода или восстановления молекулярного азота;

— развитие фотобионики на принципах фотосинтеза: создание искусственных систем, преобразующих и запасающих солнечную энергию, в том числе фотолиз воды на H_2 и O_2, с использованием для этого ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области солнечного спектра;

— создание биолюминисцентных осветительных устройств на основе длительного запасания солнечной энергии в продуктах фотосинтеза.

Развитие человеческого общества неизбежно потребует более полного овладения солнечной энергией, и можно не сомневаться в том, что познание природы фотосинтеза растений останется одной из наиболее важных фундаментальных проблем биологии, тесно связанной с насущными нуждами человечества в пище и энергии.

* *
*

В материалах данного номера журнала представлены различные направления исследований фотосинтеза растений и его моделирования, дающие представление о ситуации, сложившейся в этой области науки. Среди авторов — исследователи разных специальностей, что соответствует междисциплинарному характеру возникающих здесь проблем и разнообразию подходов к их решению. Проблемы фотосинтеза представляют собой благородное поле деятельности для химиков самого широкого профиля, и можно надеяться, что материалы номера будут способствовать привлечению новых научных сил в эту увлекательную область науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hall D. O., Barnard G. W., Moss P. A.* Biomass for Energy in the Developing Countries. Oxford : Pergamon Press, 1982.
2. *Красновский А. А.* Вестн. АН СССР, 1979, № 1, с. 83; 1985, № 3, с. 3.
3. *Одум Г., Одум З.* Энергетический базис человека и природы. М.: Прогресс, 1978.
4. *Steinhart Y. S., Steinhart C. E.* Science, 1974, v. 184, N 4134, p. 307.
5. *Calvin M.* Ibid., 1974, v. 184, N 4, p. 375.
6. *Красновский А. А.* Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы. М.: Наука, 1974.
7. *Красновский А. А. (мл.).* В кн.: Возбуждение молекулы. М.: Наука, 1982, с. 32.
8. *Клейтон Р.* Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984.
9. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* Биофизика, 1981, т. 26, № 3, с. 544.
10. *Климов В. В., Красновский А. А.* Там же, 1982, т. 27, с. 179.
11. *Michel H.* J. Mol. Biol., 1982, v. 158, p. 567.
12. *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.* Докл. АН СССР, 1982, т. 263, с. 469.
13. *Семенова А. Н., Никандров В. В., Красновский А. А.* Там же, 1985, т. 282, с. 189.
14. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Там же, 1961, т. 139, с. 142.
15. *P. Cundet e. a.* Photobiochem. and Photobiophys., 1984, v. 7, p. 331.
16. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.* Докл. АН СССР 1981, т. 256, с. 1249.
17. *Красновский А. А. и др.* Там же, 1979, т. 249, № 4, с. 895.
18. Photochemical Conversions. JOCD UNESCO, Lausanne, 1983.
19. *Krasnovsky A. A.* In: Topics in Photosynthesis. Vol. 3. Amsterdam: Elsevier, 1979, p. 281.
20. *Кондратьева Е. Н., Гоготов И. П.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981.
21. *Мальцев С. В., Красновский А. А.* Физиол. растений, 1982, т. 29, с. 951.
22. *Красновский А. А. и др.* Молекуляр. биология, 1980, т. 14, с. 287.
23. *Красновский А. А., Никандров В. В., Никифорова С. А.* Докл. АН СССР, 1985, т. 285, с. 1467.

БИОХИМИЯ
Т. 51, вып. 1 1986

УДК 577.355.2

ОБРАЗОВАНИЕ В ХЛОРОПЛАСТАХ РАЗЛИЧНЫХ СПЕКТРАЛЬНЫХ ФОРМ ФЕОФИТИНА В КИСЛЫХ СРЕДАХ

ЛЕБЕДЕВ Н. Н., ПАКШИНА Е. В., ШИФФЕЛ П., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Методами дифференциальной и производной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии при комнатной и низкой (—196°) температурах исследовано образование феофитина в хлоропластах фасоли в кислых средах. Показано, что под влиянием высоких концентраций ионов водорода происходит превращение длинноволновых «узких»* спектральных форм хлорофилла *a* в мономерную, но связанную с белком форму этого пигмента. Затем следует образование мономерного феофитина *a*. Увеличение поглощения при 698 нм сопровождается падением интенсивности длинноволновой «широкой» полосы низкотемпературной флуоресценции хлоропластов. При длительном воздействии на хлоропласты кислой среды образуется агрегат феофитина с длинноволновым максимумом поглощения при 691 нм. Кинетика образования мономера и агрегата феофитина зависит от температуры, pH, но не от целостности мембран хлоропластов. Параллельно с образованием мономерного хлорофилла *a* на начальных этапах феофитинизации происходит селективное выцветание каротиноидов с главным максимумом поглощения при 490 нм. В дальнейшем происходит постепенное выцветание других каротиноидов и хлорофилла *b*.

Работами последних лет показана важная роль ближайшего аналога хлорофилла феофитина в реакциях переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах [2, 3]. В то же время известно, что феофитин относительно легко образуется при старении фотосинтетического аппарата, при выделении хлорофилл-белковых комплексов, различных типах повреждений [4, 5]. Исследование трансмембранного градиента протонов в фотосинтетически активных хлоропластах показывает, что величина pH внутритилакоидного пространства может достигать довольно низких значений [6], что значительно облегчает образование феофитина. В работах [7—10] было показано образование феофитина при действии кислот на целые клетки водорослей, хлоропласты и хлорофилл-белковые комплексы. В данной работе была поставлена задача выяснить спектральные характеристики пигментных форм, образующиеся при действии кислот на хлоропласты, и разработать на их основе методы идентификации феофитина непосредственно в фотосинтетических структурах. Основой для такого исследования послужило проведенное нами ранее изучение спектральных характеристик мономера и агрегатов феофитина в водных растворах детергентов [11].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали хлоропласты 10—20-дневных проростков фасоли *Phaseolus vulgaris*, выделенные в сахарозо-фосфатном буфере [12]. Кислотную обработку хлоропластов проводили в цитратном буфере, pH 2,3, содержащем 10 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$. В качестве контроля использовалась та же среда с pH 7,0. Измерение спектров поглощения и флуоресценции, а также кислотную обработку проводили после осаждения хлоропластов на мембранном фильтре (Synpor-3, диаметр пор 1,5 мкм). Измерение спектров поглощения, их вторых производных и дифференциальных спектров проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer 554. Измерение низкотемпературных спектров флуоресценции проводили на установке, описанной ранее [12]. Для получения производных и дифференциальных спектров использовали микропроцессор DCSU-2 («Perkin-Elmer», США). Оптическая плотность образцов при измерении спектров поглощения составляла 0,6—0,8, а спектров флуоресценции — около 0,05.

* Под «узкими», в соответствии с работой [1], мы понимаем полосы с полушириной 8—10 нм, а под «широкими» — полосы с полушириной 30—35 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как известно, оптические характеристики хлоропластов могут претерпевать существенные изменения в результате изменения светорассеяния образца [13, 14]. Для предотвращения этого эффекта, а также для получения образцов с идентичной оптической плотностью, мы наносили хлоропласты тонким слоем на поверхность мембранного фильтра, обладающего интенсивным собственным светорассеянием, значительно превышающим светорассеяние хлоропластов.

Оказалось, что первичным результатом воздействия высокой концентрации ионов водорода на хлоропласты является уменьшение поглощения в области 680 и 440 нм, сопровождающееся ростом полос при 666 и 432 нм (рис. 1). Затем следует падение относительной интенсивности этих полос и появление новых максимумов при 515 и 535 нм. Судя по дифференциальным спектрам, падение интенсивности длинноволновых и возрастание коротковолновых полос происходит при комнатной температуре за 1—2 мин, а последующее падение их интенсивности развивается примерно за 30 мин. После 10 мин выдерживания в кислой среде в спектре поглощения хлоропластов, в соответствии с полученными ранее результатами [9], растет полоса с максимумом в районе 700 нм.

Спектральные изменения на стадиях, предшествующих феофитинизации пигмента. Низкотемпературная фиксация образца позволяет заключить, что наблюдающиеся на начальном этапе кислотной обработки превращения связаны с выцветанием форм хлорофилла *a* с максимумами при 688 и 695 нм, входящих, как известно [15—18], в фотосистему 1, а также формы 681 (рис. 2). Судя по второй производной низкотемпературного спектра поглощения, изменения положения максимумов этих полос в процессе выцветания не происходит. Одновременно в спектре низкотемпературной флуоресценции наблюдается уменьшение интенсивности полос при 685 и 696 нм (рис. 3), принадлежащих фотосистеме 2. Параллельно с уменьшением амплитуды длинноволновых полос, проявляющихся по производным спектрам и по спектрам флуоресценции, происходит возрастание полос при 666, 432 нм (см. рис. 1). Это позволяет предположить, что происходит превращение длинноволновых агрегированных форм (688, 695, 681) в мономерный хлорофилл с полосами при 666 и 432 нм. Изменение спектра второй производной в длинноволновой области отчасти, возможно, связано с уширением полос длинноволнового хлорофилла.

Наблюдающиеся в течение первой минуты спектральные превращения не зависят от присутствия ингибиторов фотосинтетического переноса электрона (10 мкМ 2,4-дихлорфенилдиметилмочевина или 5 мМ NH_2OH), а также от нарушения целостности мембран в результате осмотического шока (2 мин в дистиллированной воде) или добавления ионофоров (5 мкМ карбонилцианид-3-хлорофенилгидразон или 2 мМ NH_4Cl). Понижение температуры образца заметно тормозит эти превращения, а измерение зависимости от pH показывает, что они начинаются при величинах pH около 4, что близко к изоэлектрической точке хлорофилл-белковых комплексов и мембран хлоропластов [19]. Параллельно с образованием мономерного хлорофилла наблюдается выцветание полосы 490 нм, принадлежащей β-каротину, возможно, включенному в реакционный центр [20].

Образование мономерного феофитина. Появление в дифференциальных спектрах поглощения максимумов при 515 и 535 нм (см. рис. 1) после двух и более минут кислотной обработки указывает на возможное появление в этих условиях мономерного феофитина *a*. В спектрах низкотемпературной флуоресценции таких образцов на коротковолновом склоне наблюдается «плечо» в районе 665—670 нм (рис. 3). Его интенсивность увеличивается параллельно с ростом полос поглощения мономерного феофитина. На принадлежность свечения мономерному феофитину указывает наличие в его спектре возбуждения максимумов при 416, 510 и 538 нм.

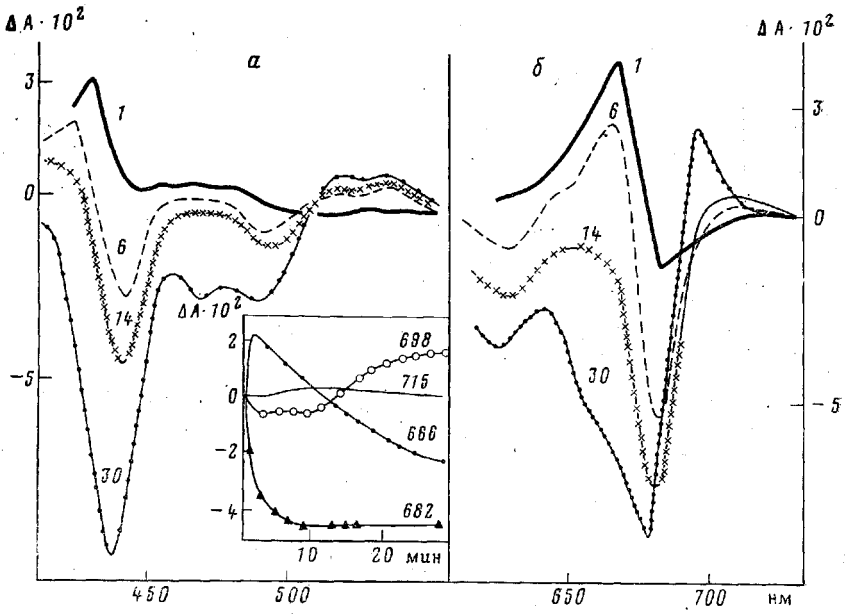


Рис. 1

Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения (pH 2,3 минус pH 7,0) хлоропластов при 22° в полосе Соре (*а*) и в красной области (*б*). Цифры около кривых соответствуют времени инкубации в мин. На вставке — кинетика изменения поглощения при различных длинах волн после нормировки на поглощение при 640 нм

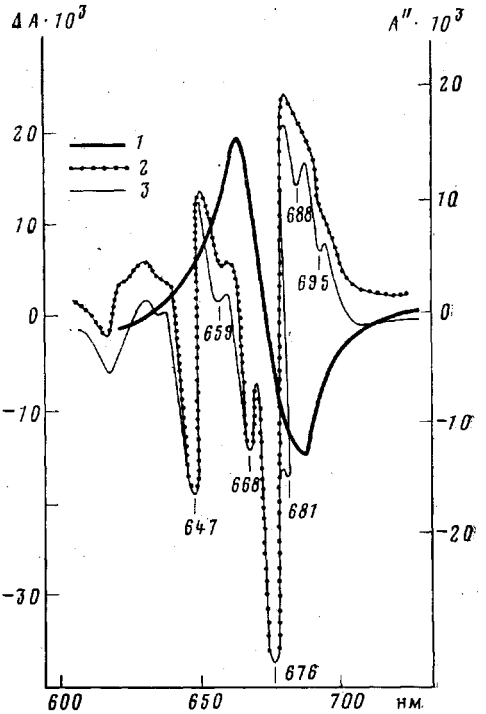


Рис. 2

Рис. 2. Изменение низкотемпературного спектра поглощения хлоропластов после инкубации в кислой среде (pH 2,3) в течение 2 мин. *1* — дифференциальный спектр поглощения (pH 2,3 минус pH 7,0), *2* — вторая производная спектра поглощения обработанных хлоропластов, *3* — то же для исходных хлоропластов

По мере падения интенсивности низкотемпературной флуоресценции хлоропластов в спектре излучения появляется и становится главной полоса с максимумом 681 нм (рис. 4). Однако, в отличие от описанной выше люминесценции феофитина, эта полоса имеет в спектре возбуждения главный максимум при 436 нм и интенсивные полосы в области поглощения каротиноидов (460 и 474 нм), что соответствует спектру возбуждения изолированного светособирающего комплекса [20]. После выдерживания хлоропластов в кислоте в течение нескольких часов полоса 681 нм становится практически единственной в низкотемпературном спектре флуоресценции, который имеет время жизни около 2 нс.

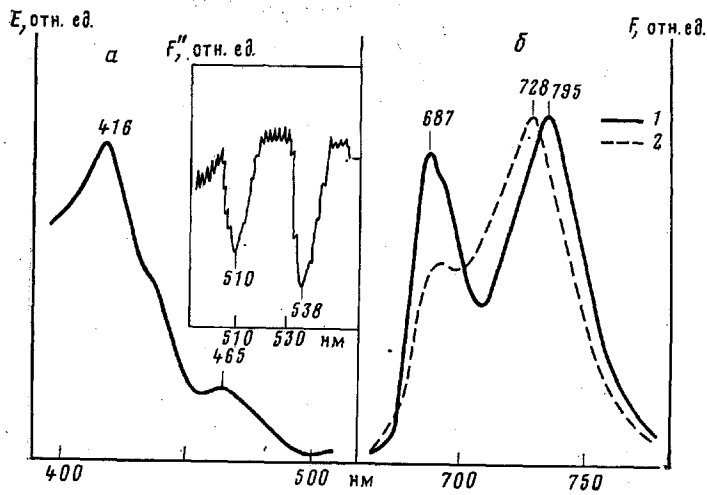


Рис. 3. Изменение низкотемпературной флуоресценции хлоропластов при обработке кислотой (pH 2,3) в течение 8 мин. *а* — спектр возбуждения флуоресценции в районе 670 нм (на вставке — вторая производная этого спектра в зеленой области); *б* — спектры флуоресценции до (*1*) и после (*2*) обработки

В спектре поглощения такого образца от исходного остаются только полосы с максимумами 646, 659 и 676 нм, характерные для светособирающего комплекса и антенных форм фотосистем [17—19].

Образование агрегированных форм феофитина при продолжительной обработке хлоропластов кислотой. Появление в низкотемпературном спектре поглощения хлоропластов полосы в районе 700 нм (рис. 5) сопровождается выцветанием длинноволновой «широкой» полосы поглощения в районе 710 нм и падением интенсивности длинноволновой «широкой» полосы в низкотемпературном спектре флуоресценции (рис. 4). При возбуждении в области 700 нм в спектре низкотемпературной флуоресценции наблюдается излучение с максимумом 728 нм, соответствующее длинноволновой полосе флуоресценции хлорофилла при кратковременной обработке хлоропластов кислотой (рис. 3). Во второй производной низкотемпературного спектра поглощения полоса в районе 700 нм расщепляется на две с максимумами при 698 и 691 нм (рис. 5). По мере феофитинизации хлоропластов наблюдается преимущественный рост полосы 691 нм, максимум которой соответствует поглощению агрегатов феофитина в модельных системах [11].

Длительная кислотная обработка хлоропластов (в течение нескольких часов) приводит к постепенному уменьшению интенсивности всех полос поглощения хлорофилла. Однако в окружающей хлоропласты среде зарегистрировать порфириноподобные молекулы нам не удалось. Вероятно, образующийся феофитин локализован в мембране хлоропластов и не выходит в окружающий раствор.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Совокупность полученных данных по спектрам поглощения и флуоресценции показывает, что при действии высокой концентрации ионов водорода на хлоропласты происходит несколько различных процессов. Вначале происходят превращения, связанные с исчезновением «узких» длинноволновых форм хлорофилла *а* (дезагрегация). Затем происходит образование мономерного феофитина. И, наконец, при продолжительном воздействии кислоты образуются агрегаты феофитина *а*.

Судя по спектральным характеристикам, исчезновение длинноволновых «узких» форм хлорофилла *а* сопровождается образованием мономера этого пигмента. Нечувствительность наблюдающихся спектральных изменений к нарушению проницаемости мембраны и действию ин-

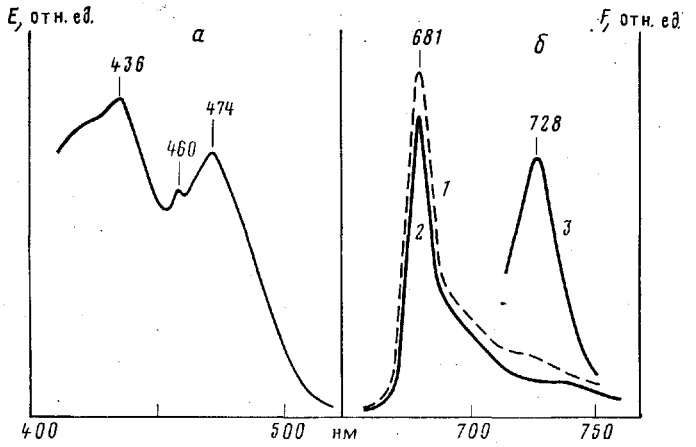


Рис. 4

Рис. 4. Низкотемпературная флуоресценция хлоропластов после инкубации в кислой среде (pH 2,3) в течение 5 ч. *а* — спектр возбуждения флуоресценции (регистрация 681 нм); *б* — спектры флуоресценции при возбуждении: *1* — 436 нм, *2* — 475 нм, *3* — 700 нм

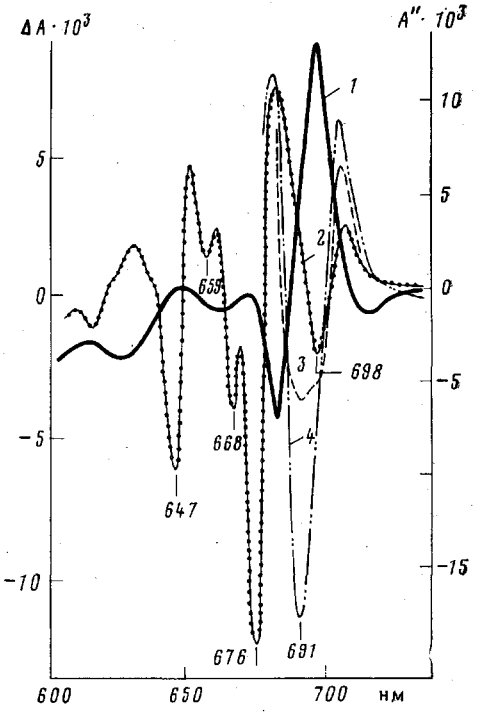


Рис. 5

Рис. 5. Изменение низкотемпературного спектра поглощения хлоропластов после длительной инкубации в кислой среде (pH 2,3). *1* — дифференциальный спектр поглощения (pH 2,3 минус pH 7,0) после инкубации хлоропластов в течение 15 ч; *2* — вторая производная спектра поглощения хлоропластов после кислотной обработки в течение 0,5 ч; *3* — то же, после 2 ч; *4* — то же после 10 ч (производные спектры нормированы при 676 нм)

гибиторов переноса электрона, их необратимый характер и замедление при понижении температуры указывают, что образование мономерного хлорофилла обусловлено структурными перестройками белка-носителя, видимо, его денатурацией, происходящей после нейтрализации протонами поверхностного заряда. Поскольку наблюдающиеся изменения не затрагивают коротковолновых форм хлорофилла *a*, а также хлорофилла *b*, входящего, как полагают [20, 21], в светособирающий комплекс, можно заключить, что денатурации в первую очередь подвергаются участки белка, близкие к реакционным центрам.

Сопоставление кинетики образования мономерного феофитина (рис. 1) с исчезновением различных спектральных форм хлорофилла *a* показывает, что вначале феофитинизируется образовавшийся в результате денатурации мономерный хлорофилл. Судя по спектрам возбуждения флуоресценции, мономерный феофитин имеет максимумы поглощения при 416, 510 и 538 нм. Наличие в его спектре возбуждения других пигментов, по-видимому, связано с наложением его излучения

на флуоресценцию светособирающего комплекса и мономерного хлорофилла *a*.

Анализ низкотемпературного поглощения и флуоресценции показывает, что появление полосы поглощения в районе 700 нм (рис. 5) лишь частично связано с образованием агрегатов феофитина. По-видимому, вначале, так же как и при образовании мономерного феофитина, происходят структурные перестройки в белковой части комплекса и лишь затем начинается феофитинизация пигмента. Критерием образования агрегированного феофитина следует считать появление практически не флуоресцирующей полосы 691 нм в спектре поглощения хлоропластов.

Таким образом, наименее устойчивыми к кислотной обработке являются длинноволновые «узкие» формы хлорофилла *a*, наиболее устойчивыми — коротковолновые формы, входящие в светособирающий комплекс. Образованию феофитина в хлоропластах, по-видимому, предшествует частичная денатурация белка хлорофилл-белковых комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А., Шубин В. В.* Биофизика, 1976, т. 21, № 1, с. 669.
2. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* Биофизика, 1981, т. 26, № 3, с. 544—556.
3. *Климов В. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1982, т. 27, № 1, с. 179—189.
4. *Brody S. S.* Photochem. Photobiol., 1983, v. 37, № 5, p. 585—586.
5. *Schoch S., Vielwerth F. X.* Planzenphysiol., 1983, v. 110, p. 309—317.
6. *Yagendorf A. T.* Photophosphorylation in: Encyclopedia of Plant Physiology, 1977, v. 5, p. 318—334.
7. *Пакшина Е. В.* Изучение феофитинизации хлорофилла и его аналогов в связи со структурой и фотохимическими свойствами молекул пигмента/Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук, 1964. М.: Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.
8. *Красновский А. А. и др.* Докл. АН СССР, 1966, т. 167, № 3, с. 691—694.
9. *Brody S. S., Gregory R. P. F. Z.* Naturforsch., 1981, v. 36, p. 638—644.
10. *Siefermann-Harms D., Ninnemann H.* Photochem. Photobiol., 1982, v. 35, p. 719—731.
11. *Луганская А. Н., Лебедев Н. Н., Красновский А. А.* Молекуляр. биология, 1984, т. 18, № 4, с. 963—971.
12. *Лебедев Н. Н., Шиффел П., Красновский А. А.* Биофизика, 1985, т. 30, № 1, с. 44—49.
13. *Biggins J.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 635, № 2, p. 259—266.
14. *Albertsson P. A.* FEBS Letters, 1982, v. 149, № 2, p. 186—190.
15. *Karapetian N. V., Shubin V. V., Rakhimbesdieva M. G., Vashchenko R. G., Bolychevtseva Ju. V.* FEBS Letters, 1984, v. 173, № 1, p. 209—212.
16. *Шутилова Н. И., Кадошникова И. Г., Закржевский Д. А.* Биофизика, 1984, т. 29, № 3, с. 502.
17. *Brown J. S., Schoch S.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 639, № 2, p. 201—209.
18. *Ладыгин В. Г.*, Физиол. растений, 1984, т. 31, № 1, с. 104—113.
19. *Yamamoto Y., Ke B.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 636, p. 175—184.
20. *Larkum A. W. D., Anderson J. M.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 679, № 3, p. 410—421.
21. *Гуляев Б. А., Тетенькин В. Л.* Биофизика, 1981, т. 26, № 2, с. 288—294.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
27.II.1985

FORMATION OF VARIOUS SPECTRAL FORMS OF PHEOPHYTIN IN CHLOROPLASTS IN ACID MEDIA

LEBEDEV N. N., PAKSHINA E. V., ŠIFFEL P., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Pheophytin formation in isolated bean chloroplasts in acid media have been measured by differential and derivative absorption and fluorescence spectroscopy at room and low (—196° C) temperatures. High concentration of H^+ was shown to cause the conversion of the longwave «narrow» spectral forms of chlorophyll into a monomeric, but protein connected one, followed by the formation of a monomeric pheophytin *a*. The diminishing in intensity of the longwave «broad» band in chloroplast low temperature absorption and fluorescence spectra was accompanied by an increase in absorption at 698 nm. Long-term exposure of chloroplasts to acid media resulted in the formation of aggregated pheophytin with the absorption maximum at 691 nm. The kinetics of formation of the monomeric and aggregated pheophytin depended on temperature and pH, but not on the integrity of chloroplast membranes. Monomeric pheophytin formation at early steps of pheophytinization went in parallel with the selective bleaching of carotenoids having an absorption maximum at 490 nm, with subsequent bleaching of other carotenoids and chlorophyll *b*.

БИОФИЗИКА

Том XXXI, вып. 6 1986

ОБРАЗОВАНИЕ КАТИОН-РАДИКАЛОВ МЕТИЛВИОЛОГЕНА ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ХЛОРОФИЛЛОМ И ИХ ЛОКАЛИЗАЦИЯ В МИЦЕЛЛЕ ДЕТЕРГЕНТА

УМРИХИНА А. В., ЛУГАНСКАЯ А. Н., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Методом ЭПР исследовано фотохимическое взаимодействие метилвиологена с хлорофиллом *a* в водном мицеллярном растворе тритона X-100. Обнаружено образование катион-радикалов метилвиологена при его восстановлении пигментом. На основании полученных результатов по агрегации катион-радикалов метилвиологена сделан вывод о высокой локальной концентрации метилвиологена, которая достигается при его солюбилизации в мицеллах детергента. Показано, что мицеллярная среда благоприятствует накоплению и стабилизации катион-радикалов метилвиологена.

Метилвиологен широко используется в качестве акцептора электрона при исследовании сенсибилизированных пигментами реакций в системах различной сложности [1—5]. Это обусловлено его низким окислительно-восстановительным потенциалом, близким к потенциалу ферредоксина — самого низкопотенциального акцептора в цепи фотосинтетического переноса электрона.

Фотосенсибилизированное пигментами образование восстановленной катион-радикальной формы метилвиологена обычно наблюдают в присутствии доноров электрона. Обнаружение фотовосстановления метилвиологена при его взаимодействии только с пигментом сопряжено с определенными трудностями, связанными с необходимостью создания специальных условий для накопления первичных свободнорадикальных продуктов. Так, фотореакцию метилвиологена с пигментом, т. е. в двойной системе, изучали методом импульсной спектроскопии [6], по тушению флуоресценции хлорофилла метилвиологеном [7] и др. [8].

В нашей предыдущей работе [9] с помощью метода ЭПР и применения низкотемпературного термостатирования установлено образование катион-радикалов различных фотосинтетических пигментов и катион-радикала метилвиологена в органических растворителях при фотоокислении этих пигментов метилвиологеном, показавшее наличие прямого фотохимического взаимодействия компонентов реакции, приводящее к образованию пары ион-радикалов, которое моделирует фотоакт в фотосистеме I.

В настоящей работе исследовали методом ЭПР фотовосстановление метилвиологена хлорофиллом *a* в мицеллярном растворе поверхностно-активного вещества — неионогенного детергента — тритона X-100. Эта система моделирует первичные фотохимические реакции, протекающие в хлоропластах на границе раздела фаз.

Экспериментальная часть. Хлорофилл *a* выделяли из растительного материала принятыми в лаборатории методами. Солюбилизацию пигмента в водном растворе детергента достигали введением концентрированных растворов хлорофилла в этиловом спирте в 1%-ный водный раствор тритона X-100. Конечная концентрация пигмента обычно составляла 10^{-4} М. Концентрация метилвиологена была 10^{-3} М. Спектры ЭПР измеряли на реконструированном радиоспектрометре типа РЭ-1301. Реакцию проводили в тонких стеклянных ампулах диаметром 4 мм. Образцы освещали непосредственно в резонаторе радиоспектрометра фокусированным светом лампы ДКСШ-200 через водный и стеклянный светофильтры. Опыты проводили в интервале $-20 \div -150°$ С. Кислород из



Рис. 1

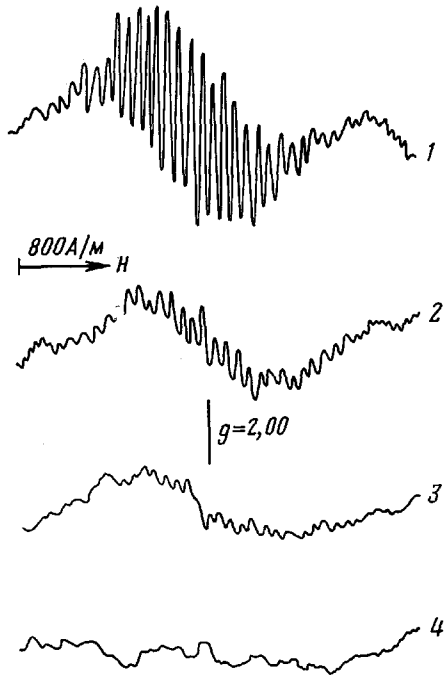


Рис. 2

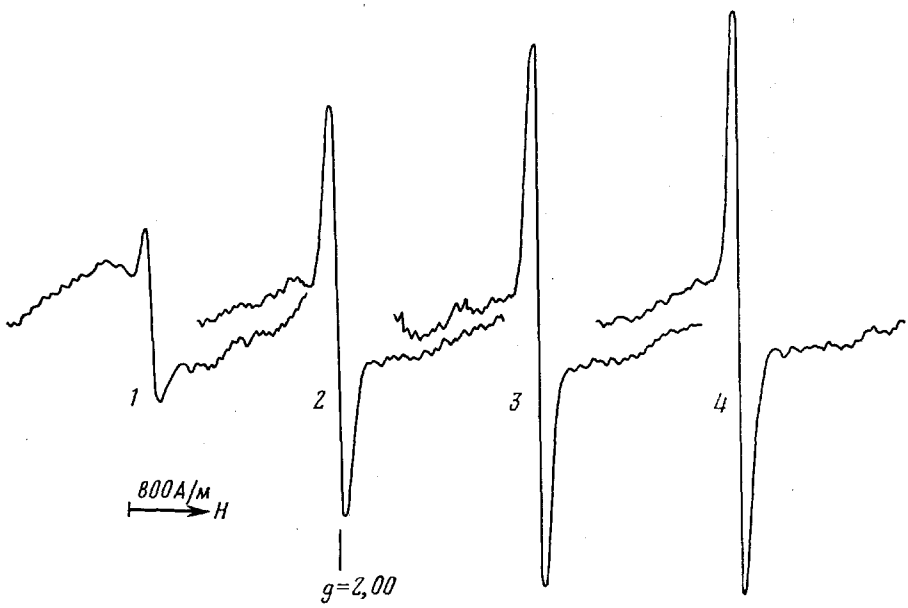


Рис. 3

Рис. 1. Спектр ЭПР, наблюдаемый при действии света на растворы хлорофилла *а* (10^{-4} М) и метилвиологена (10^{-3} М) в мицеллярном (1%-ном) водном растворе тритона Х-100 при —60° С и амплитуде ВЧ-модуляции, равной 50 (*1*) и 0,1 мкА (*2*); вакуум, 30 мин освещения лампой ДКСШ-200 через светофильтр КС-10

Рис. 2. Изменение спектра ЭПР, фотоиндуцированного при —60° С (см. рис. 1), в зависимости от температуры, °С: *1* — —20, *2* — —40, *3* — —60, *4* — —110; вакуум, темнота

Рис. 3. Изменение спектра ЭПР, фотоиндуцированного при —60° С (см. рис. 1), в процессе стояния в темноте при —110° С в течение 5 (*1*), 30 (*2*), 45 (*3*) и 60 мин (*4*)

реакционной среды удаляли с помощью форвакуумного насоса.

Обсуждение результатов. Освещение хлорофилла *а* и метилвиологена в мицеллярном растворе тритона Х-100 в отсутствие кислорода при −60° С приводит к возникновению сигнала ЭПР со сверхтонкой структурой, характерной для метилвиологена (рис. 1). При этой температуре реакция идет медленно (десятки минут) и не достигает насыщения. Повышение температуры до −40° С увеличивало скорость накопления катион-радикалов метилвиологена, тогда как понижение температуры ниже −60° С практически останавливало реакцию. Кроме катион-радикалов метилвиологена не обнаружили других свободнорадикальных продуктов, в том числе и катион-радикалов хлорофилла *а*. Хотя в данных условиях проведения опыта не было зарегистрировано сигнала ЭПР катион-радикалов хлорофилла *а*, считаем, что катион-радикалы метилвиологена возникают в данной системе за счет прямого фотохимического взаимодействия хлорофилла с метилвиологеном. Мицеллярная система, вероятно, способствует накоплению катион-радикалов метилвиологена в отличие от системы в органическом растворителе [9], где преимущественно накапливаются радикалы пигмента.

Предпринята попытка выяснить причину предпочтительного накопления катион-радикалов метилвиологена в мицеллярной среде. С этой целью исследовали свойства катион-радикалов метилвиологена — длительность его жизни и характер сигнала ЭПР $Mb^{+\cdot}$ в зависимости от температуры.

Было показано, что светоиндуцированный сигнал ЭПР метилвиологена чрезвычайно устойчив в темноте в вакуумных условиях (полностью исчезал при стоянии образцов в темноте при комнатной температуре только через несколько суток). Такая высокая стабильность катион-радикала метилвиологена дала нам возможность исследовать действие температуры на характер спектра ЭПР катион-радикала метилвиологена, генерированного в результате его фотохимического взаимодействия с хлорофиллом.

Оказалось, что спектр ЭПР катион-радикала метилвиологена, фотоиндуцированный при −60, при −20° С (рис. 2) в темноте имеет большую интенсивность и лучше разрешен[1]. При постепенном понижении температуры от −20° С интенсивность сигнала ЭПР катион-радикала метилвиологена, как и следовало ожидать, уменьшалась параллельно с ухудшением разрешения сверхтонкой структуры спектра. Однако ниже −60° С в центре широкой структурированной линии отмечалась новая небольшая узкая линия, шириной 160–200 А/м, $g=2{,}00$, интенсивность которой увеличивалась при понижении температуры до −110° С. При этом структурированный сигнал катион-радикала метилвиологена полностью исчезал. При стоянии ампулы в темноте при −110° С интенсивность узкой синглетной линии достигала максимума (см. рис. 3). Дальнейшее понижение температуры до −130° С приводило к постепенному уменьшению интенсивности узкого синглетного сигнала ЭПР вследствие его насыщения по мощности СВЧ. Постепенное повышение температуры от −130 до −20° С сопровождалось исчезновением узкого сигнала ЭПР и появлением сигнала со сверхтонкой структурой, т. е. спектр ЭПР, имеющий вид структурированной линии, переходил в узкую синглетную линию обратимо.

Согласно нашим предыдущим данным, переход спектра ЭПР катион-радикала метилвиологена, имеющего вид широкой структурированной линии, к узкой синглетной линии связан с агрегацией катион-радикала метилвиологена при низких температурах [9]. Как было показано, такая агрегация катион-радикалов метилвиологена наблюдалась только при его высокой концентрации в растворе (10^{-2} М). При меньшей концентрации метилвиологена понижение температуры не вызывало агрегации катион-радикала дипиридила и наблюдалось лишь уменьшение

[1] Измерять спектры ЭПР при более высоких температурах не могли вследствие поглощения мощности СВЧ водной средой.

интенсивности сигнала ЭПР и исчезновение сверхтонкой структуры. В этом случае при температуре ниже −100° С сигнал ЭПР катион-радикала метилвиологена не регистрировался [9].

В нашей работе концентрация метилвиологена в растворе составляла 10^{-3} М, доля же прореагировавших молекул — несколько процентов (на это указывает интенсивность сигнала ЭПР катион-радикала метилвиологена, записанного при −20° С). Тем не менее наблюдали переход мономерной формы $Mb^{+\cdot}$ в агрегированную. Этот эффект может быть достигнут при условии высокой локальной концентрации метилвиологена. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что он локально концентрируется в мицелле детергента. Такое концентрирование, по-видимому, достигается в результе взаимодействия положительно заряженных молекул метилвиологена с отрицательно заряженными атомами кислорода полиоксиэтилированных цепей молекул детергента (каждая мицелла состоит из большого числа молекул детергента и может, следовательно, присоединить значительное количество молекул метилвиологена).

Связывание метилвиологена с мицеллой детергента не только увеличивает его локальную концентрацию, но и облегчает его фотовзаимодействие с солюбилизированной в мицелле молекулой хлорофилла. Последняя расположена в мицелле таким образом, что ее гидрофобная часть находится в углеводородной части мицелл, тогда как гидрофильное порфириновое кольцо — снаружи мицелл в водной фазе, при этом возможно образование водородных и координационных связей между функциональными группами порфиринового цикла пигмента и гидрофильной частью мицеллы. В результате такого взаиморасположения компоненты системы оказываются в непосредственной близости друг к другу, что облегчает как образование предреакционного комплекса, так и саму возможность фотохимической реакции с образованием свободных радикалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А., Брин Г. П.* Докл. АН СССР, 1965, т. 163, № 3, с. 761.
2. *Красновский А. А., Брин Г. П., Никандров В. В.* Докл. АН СССР, 1975, т. 200, № 5, с. 1214.
3. *Darwent J. R., Kalyanasundaram K.* Proc. Roy. Soc., L., 1980, v. 379, № 1753, p. 179.
4. *Брин Г. П., Луганская А. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1967, т. 174, № 1, с. 221.
5. *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.* Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 2, с. 469.
6. *Чибисов А. К., Карякин А. В., Евстигнеев В. Б.* Биофизика, 1966, т. 11, с. 963.
7. *Красновский А. А., Дроздова Н. Н.* Докл. АН СССР, 1966, т. 167, № 4, с. 928.
8. *Holten D., Windsor M. W., Parson W. W., Gouterman M.* Photochem. Photobiol., 1978, v. 28, № 6, p. 951.
9. *Умрихина А. В., Бубличенко Н. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1983, т. 28, № 2, с. 197.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
16.I.1986

FORMATION OF CATION-RADICALS OF METHYLVIOLOGEN DURING PHOTOCHEMICAL INTERACTION WITH CHLOROPHYLL AND THEIR LOCALIZATION IN DETERGENT MICELLE

UMRIKHINA A. V., LUGANSKAYA A. N., KRASNOVSKY A. A.
A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Photochemical interaction between methylviologen and chlorophyll *a* in aqueous micellar solution of triton X-100 was studied by ESR technique. Formation of methylviologen cation-radicals when it is reduced by the pigment was discovered. The obtained results on the aggregation of methylviologen cation-radicals point to a high local concentration of methylviologen, when it is solubilized in detergent micellae. The micellar medium is shown to provide accumulation and stabilization of methylviologen cation-radicals. It is concluded that the micellar systems are promising models for ESR studies of photoact of Photosystem I — photointeraction between the pigment and primary acceptors of the electron.

PHOTOSYNTHETICA 20 (2): 124—130, 1986

The Effect of Acidification on Absorption and Fluorescence Spectra of French Bean Chloroplasts and the Kinetics of Pheophytin Formation*

N. N. LEBEDEV**, P. ŠIFFEL***, Elena V PAKSHINA** and A. A. KRASNOVSKIĬ**

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Lenin Prospect 33, SU-1170 71 Moscow, U.S.S.R.***
*Institute of Experimental Botany, Czechoslovak Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, CS-160 00 Praha 6, Czechoslovakia****

Abstract

The low-temperature absorption and fluorescence spectra, their second derivative and difference spectra, and the kinetics of their changes were measured after acid action (pH 2.3) on chloroplasts isolated from primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. During the first minutes of action the chlorophyll-proteins (CP), closely connected to reaction centres of photosystems (PS) 1 and 2, were reorganized. The structure of the light-harvesting chlorophyll-protein complex (LH), as well as the antenna of PS 1 did not change during this time, but an electrochromic shift for the spectra of their pigments occurred. The reorganization of the reaction centre chlorophyll-protein complexes (RC) led to the formation of a monomeric chlorophyll (Chl) *a*, which in turn transformed into monomeric pheophytin (Ph). Prolonged acidification of chloroplasts led to the formation of two types of aggregated pigment. One of them, which appeared after ten minutes seemed to originate from the antenna CP of PS 1, and the other one which appeared after one hour came from LH.

Recently Ph was shown to play an important role in the primary charge separation in photosynthesis (Klimov and Krasnovskiĭ 1981, Shuvalov and Krasnovskiĭ 1982). However, Ph is rather easily produced as the result of Chl degradation during isolation of CP (Dienstbier *et al.* 1984) or in the course of ageing of whole chloroplasts both *in vitro* and *in vivo* (Kufner 1981, Maunders *et al.* 1983, Schoch and Vielwerth 1983). The proton concentration inside illuminated thylakoids is high enough to allow Ph to be formed (for references see Jagendorf 1977) and is always present in pigment extracts of chloroplasts (Pakshina and Krasnovskiĭ 1964). Ph is artificially formed in chloroplasts and isolated CPs as a result of acid action (Krasnovskiĭ *et al.* 1966, Brody and Gregory 1981, Siefermann-Harms and Ninnemann 1982, 1983).

In the present study we determined the low-temperature absorption and fluorescence spectra and the kinetics of their transformation at room temperature for isolated chloroplasts during acidification in order to identify the artificially formed Ph and the mechanism of its formation. We were able to identify both the monomeric and aggregated states of Ph and to show that the formation of the monomeric Chl precedes the formation of monomeric Ph. We also confirmed the unique acid stability of the LH (Siefermann-Harms and Ninnemann 1983) and showed the diminishing of the speed of Ph formation in the order: RC → antenna of PS 1 → LH.

* *Received* 19 August 1985.

** *Abbreviations*: Chl — chlorophyll, CP — chlorophyll-protein complex, LH — light-harvesting chlorophyll-protein complex, Ph — pheophytin, PS — photosystem, RC — reaction centre chlorophyll-protein complex.

MATERIALS AND METHODS

Chloroplasts from primary leaves of 10—15 d old *Phaseolus vulgaris* L. cv. Harzgruss were isolated in sucrose-phosphate buffer as described by Šiffel *et al.* (1985), and spread on a membrane filter (*Synpor-3* — pore diameter 1.5 μm) with concentrations 10 and 0.5 μg Chl cm^{-2}, respectively, for absorption and fluorescence measurements. One part of the membrane filter with chloroplasts was inserted in an acid medium containing 0.33 M sucrose, 10 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, and citrate buffer, pH 2.3; and the other, the reference, in the same medium but with pH 7.0. In some experiments sucrose was absent.

Absorbance, its second derivative and difference spectra were recorded with a *Perkin-Elmer 554* spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded with a home-made apparatus having a high-transmitting optical system (Lebedev *et al.* 1985). The kinetics of the room temperature absorption changes were measured with the samples directly installed into the spectrophotometer. The low-temperature measurements were performed at −196 °C (fluorescence) and at about −170 °C (absorbance).

RESULTS AND DISCUSSION

In aqueous solution Ph exists in two spectrally different states, one monomeric and one aggregated. The monomeric state has its characteristic absorption bands at 412, 506, 535 and 667 nm, and a fluorescence maximum at 680 nm. The aggregated state of Ph exhibits two bands at 370 and 440 nm of similar intensity, a broad absorption band in the green region and a red peak at 690 nm. It also fluoresces weakly with maxima at 706 and 770 nm (Luganskaya *et al.* 1984). As the red and Soret bands of these states are close to the bands of the native Chl (Litvin *et al.* 1976), we tried to use the green spectral region for the analysis of Ph formation.

Structural Alterations of CPs at the Beginning of Acid Action

At the beginning of the acid treatment we were not able to detect any absorption of the monomeric or aggregated Ph. The first effect of the interaction of hydrogen ions with chloroplasts were rapid drops of absorbances at 682 and 440 nm and absorbance increases at 664 and 412 nm (Figs. 1*A* and 2*A*). These changes looked like electrochromic shifts of Chl *a* absorption bands. An osmotic shock of the chloroplasts (2 min in distilled water) or ionophore addition (5 μM of carbonyl cyanide-*m*-chlorophenyl hydrazone, or 2 mM NH_4Cl for about 10 min) or the presence of photosynthetic electron transfer inhibitors (10 μM dichlorophenyl dimethyl urea or 5 mM NH_2OH) did not influence this spectral transformation, but the absorption changes slowed down considerably with the lowering of temperature. The pH dependence of the changes began at pH 4.0 (Fig. 1*B*), *i.e.* it was close to the isoelectric point of CPs (Yamamoto and Ke 1981). Thus, the changes might be due to a CPs reorganization as the result of surface charges neutralization.

The low-temperature difference absorption spectrum measured after a 30 s acid action indicated the reaction to be more complex. There was a small "blue" shift of the bands which are thought to belong to the LH (Satoh and Butler 1978, Gulyaev *et al.* 1979, Ladygin 1979), *i.e.* at 647, 660, and 676 nm (Fig. 2*B*). A similar shift was seen for the band at 682 nm, the origin of which was not fully understood, and for the long-wavelength broad band at 708 nm, usually ascribed to the antenna of PS 1 (Mullet *et al.* 1980, Gulyaev *et al.* 1981). In the fluorescence spectrum a pronounced "blue" shift was seen for the long-wavelength broad emission at 735 nm (Fig. 4*B*). The shift of all these bands was fully reversible at neutral pH, and it was not seen in the presence of ionophores (this showed its probable electrochromic nature). On the other hand the Chl *a* absorption bands at

688 and 696 nm, which belong to RC of PS 1 (Ladygin 1979, Mullet *et al.* 1980, Brown and Schoch 1981, Shubin *et al.* 1981) disappeared without changes in the position of their maxima (see the second derivatives in Fig. 3*A*, *B*). The absorption band at 682 nm showed both a shift and a disappearance (see differential spectra in Fig. 2*B*, 3*A*). These changes were more pronounced after one minute of acid action and were accompanied by an increase in absorbance at 664—668 nm, *i.e.*

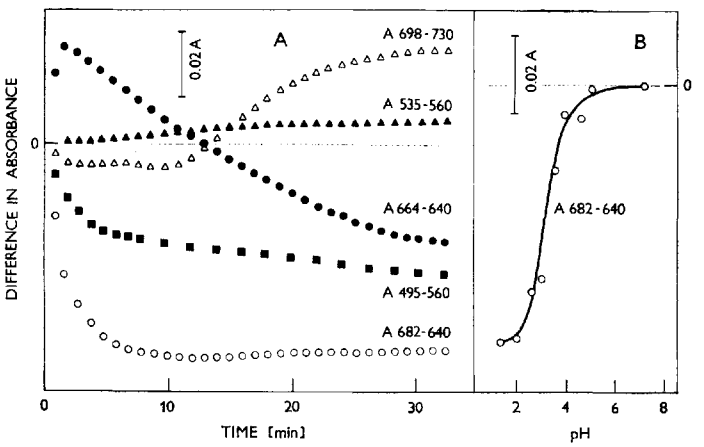


Fig. 1. Kinetics of room temperature absorption changes at different wavelengths of chloroplasts incubated at pH 2.3 (*A*), and the pH dependence of the absorption change at 682 nm after 5 min of acid action (*B*). The numbers at the curves indicate measure and reference wavelength.

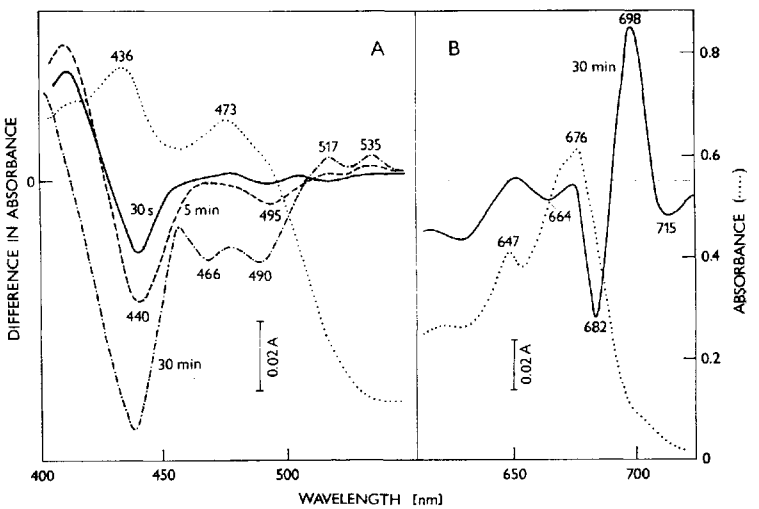


Fig. 2. Changes in low-temperature absorption spectrum after incubation of chloroplasts at room temperature at pH 2.3 for different times (indicated at the curves). The dashed curve represents the spectrum of the original chloroplasts.

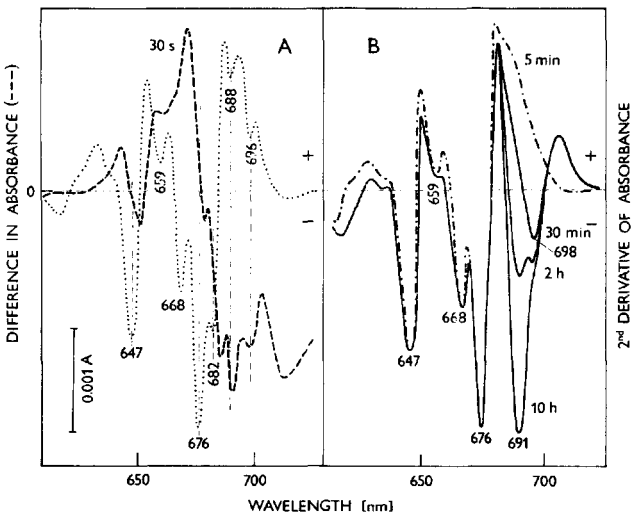


Fig. 3. Changes in the second derivative of low-temperature absorption spectrum after incubation of chloroplasts at room temperature at pH 2.3 for different times (indicated at the curves), and difference in absorbance after 30 s of incubation. The dashed curve represents the spectrum of the original chloroplasts.

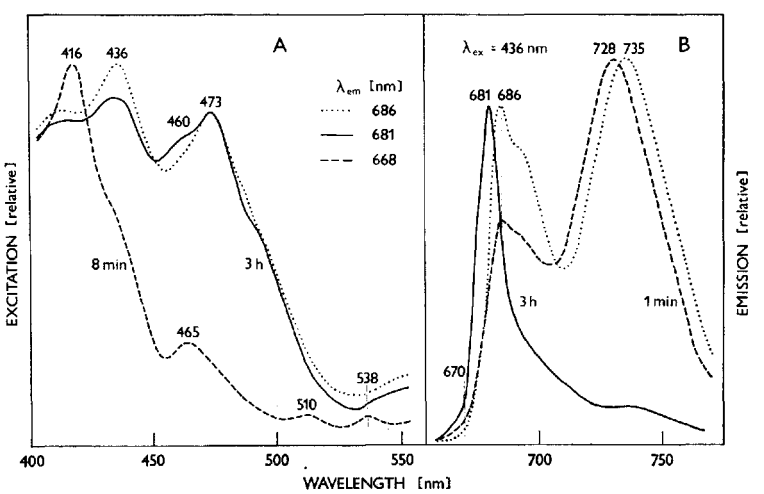


Fig. 4. Low-temperature fluorescence spectra of chloroplasts incubated at pH 2.3 at room temperature for different times (*B*), and excitation spectrum for the emission at 686 nm of the original chloroplasts (...), for the emission at 681 nm of chloroplasts incubated in the acid medium for 3 h (——) and for the emission at 668 nm of chloroplasts incubated in the acid medium for 8 min (- - -) (*A*).

in the region of monomeric Chl *a*. The fluorescence emission bands with maxima at 686 and 696 nm belonging probably to the core antenna of PS 2 reaction centres (Nakatani *et al.* 1984), irreversibly diminished (Fig. 4*B*).

Formation of Monomeric Ph in the RC of PS 1 and 2

Within a few minutes of acid action the kinetic of the changes in the green region of the difference absorption spectrum showed (Figs. 1*A* and 2*A*) the formation of the bands at 517 and 535 nm which could be attributed to monomeric Ph. The development of these bands was accompanied by the diminishing of the absorption at 664 nm and thus the Ph probably originated from the monomeric Chl *a*.

In the low-temperature fluorescence spectrum the formation of monomeric Ph was observed through the development of an emission at 670 nm. This emission corresponded to excitation maxima at 416, 510 and 538 nm (Fig. 4*A*). A shoulder of Chl *a* at 435 nm and a monomeric Chl *b* band at 465 nm (Lebedev *et al.* 1985) seemed to result from the interlapping of Ph emission with the emission of the other pigments and did not indicate the participation of the monomeric Ph in an energy migration.

The diminishing of the absorption band of the reaction centre β-carotene at 495 nm (Larkum and Anderson 1982) in parallel with the formation of monomeric Ph and the absence of changes at 473 nm of the Chl *b* incorporated into LH (Fig. 2*A*) confirmed that the monomeric Ph originates from the RC.

Formation of Aggregated Ph after Prolonged Acidificat on of Chloroplasts

After about 10 min of acid action a new band appeared at 698 nm in the absorption spectrum of chloroplasts (Fig. 1*A*). The development of this band was accompanied by a diminishing of the long-wavelength broad fluorescence band of the antenna of PS 1 (Fig. 4*B*). The newly formed absorption band had no pronounced fluorescence as would be expected for aggregated Ph, but it might belong to a Chl *a* in an altered antenna of PS 1.

After about 30 min all absorption changes were completed. The set of bands which remained of the original ones of the untreated chloroplasts (maxima at 647, 659, 668 and 676 nm) was in accordance with the spectrum of LH (Fig. 3*B*). In the low-temperature fluorescence spectrum the band at 681 nm of the LH (Satoh and Butler 1978, Ladygin 1979) became the main one (Fig. 4*B*). Nevertheless, a continued acidification of the sample led to a very slow dropping of these bands and the development of a new absorption band at 691 nm (Fig. 3*B*) which was analogous to the band of aggregated Ph in aqueous solutions (Luganskaya *et al.* 1984). This band had its own very weak fluorescence at about 710 nm, as should be expected for aggregated Ph. It is not clear yet whether the formation of this band goes through the state of monomeric Ph or not, but this form of Ph may originate from LH which is the only pigment-protein containing Chl in this time range.

Thus the artificial acidification of chloroplasts lead to the formation of different spectral forms of Ph, which originated from different CPs. Monomeric Ph originated from the RC of both PS 2 and PS 1 and its formation went through the state of monomeric Chl *a*. The aggregated states of Ph originated from antenna of PS 1 and LH. The speed of Ph formation diminished in the order: RC → antenna of PS 1 → LH.

REFERENCES

Brody, S. S., Gregory, R. P. F.: Effect of hydrogen ion concentration on the absorption spectrum and fluorescence life-time of chloroplasts. — Z. Naturforsch. **36c**: 638—644, 1981.

Brown, J. S., Schoch, S.: Spectral analysis of chlorophyll-protein complexes from higher plant chloroplasts. — Biochim. biophys. Acta **636**: 201—209, 1981.

Dienstbier, M., Il'ina, M. D., Borisov, A. Yu., Ambrož, M., Vacek, K.: Radiative and non-radiative losses of radiant energy in chloroplasts and pigment-protein complexes studied by fluorescence and photoacoustic techniques. — Photosynthetica **18**: 512—521, 1984.

Gulyaev, B. A., Teten'kin, V. L., Pomerantseva, O. M.: Svetosobirayushchiĭ pigment-belkovyĭ kompleks vysshikh rasteniĭ. [Light-harvesting pigment-protein complex of higher plants.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **248**: 752—755, 1979.

Gulyaev, B. A., Teten'kin, V. L., Rubin, A. B.: Strukturno-funktsional'nye svoĭstva pigment-belkovykh kompleksov i migratsiya énergii vozbuzhdeniya v fotosinteticheskoĭ membrane khloroplastov. [Structural and functional properties of pigment-protein complexes and migration of excitation energy in the photosynthetic membrane of chloroplasts.] — Biol. Nauki **1981** (4): 10—24, 1981.

Jagendorf, A. T.: Photophosphorylation. — In: Trebst, A., Avron, M. (ed.): Photosynthesis I. (Encycl. Plant Physiol. N. S. Vol. 5.) Pp. 307—337. Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York 1977.

Klimov, V. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Pheophytin as the primary electron acceptor in photosystem 2 reaction centres. — Photosynthetics **15**: 592—609, 1981.

Krasnovskiĭ, A. A., Bystrova, M. I., Pakshina, E. V.: Vliyanie atoma magniya v molekule pigmenta na spektral'nye svoĭstva agregirovannykh form analogov khlorofilla. [Effect of magnesium atom in the pigment molecule on spectral properties of aggregated forms of chlorophyll analogues.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **167**: 691—694, 1966.

Kufner, R. B.: The biological degradation of chlorophyll in senescent tissues. — In: Czygan, F.—C. (ed.): Pigments in Plants. Pp. 308—313. Akademie-Verlag, Berlin 1981.

Ladygin, V. G.: Spektral'nye formy khlorofilla mutantov *Chlamydomonas* s neaktivnymi fotosistemami. [Spectral forms of chlorophyll in *Chlamydomonas* mutants with inactive photosystems.] — Biofizika **24**: 254—259, 1979.

Larkum, A. W. D., Anderson, J. M.: The reconstitution of a photosystem II protein complex, *P*-700-chlorophyll *a*-protein complex and light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-protein. — Biochim. biophys. Acta **679**: 410—421, 1982.

Lebedev, N. N., Šiffel, P., Krasnovskiĭ, A. A.: Detection of protochlorophyllide forms in irradiated green leaves and chloroplasts by difference fluorescence spectroscopy at 77 K. — Photosynthetica **19**: 183—187, 1985.

Litvin, F. F., Sineshchekov, V. A., Shubin, V. V.: Issledovanie migratsii énergii mezhdu nativnymi formami khlorofilla pri —196 °C metodom sensibilizirovannoĭ fluorestsentsii. [Energy migration between native chlorophyll forms studied at —196 °C by the method of sensitized fluorescence.] — Biofizika **21**: 669—675, 1976.

Luganskaya, A. N., Lebedev, N. N., Krasnovskiĭ, A. A.: Molekulyarnaya organizatsiya feofitina *a* v vodnykh rastvorakh detergentov. [Pheophytin *a* states in aqueous detergent solutions.] — Mol. Biol. (Moskva) **18**: 963—971, 1984.

Maunders, M. J., Brown, S. B., Woolhouse, H. W.: The appearance of chlorophyll derivatives in senescing tissue. — Phytochemistry **22**: 2443—2446, 1983.

Mullet, J. E., Burke, J. J., Arntzen, C. J.: Chlorophyll proteins of photosystem I. — Plant Physiol. **65**: 814—822, 1980.

Nakatani, H. Y., Arntzen, C. J., Inoue, Y.: Characterization of photosystem II reaction center

polypeptide (CP 47). — In: Sybesma, C. (ed.): Advances in Photosynthesis Research. Vol. 2. Pp. 99—102. M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hague—Boston—Lancaster 1984.

Pakshina, E. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Issledovanie feofitinizatsii khlorofilla, bakteriokhlorofilla, bakterioviridina, protokhlorofilla i deĭstvie sveta na ėtu reaktsiyu. [Study of chlorophyll, bacteriochlorophyll, bacterioviridin, protochlorophyll pheophitinization and effect of light on this reaction.] — Biokhimiya **29**: 1132—1142, 1964.

Satoh, K., Butler, W. L.: Low temperature spectral properties of subchloroplast fractions purified from spinach. — Plant Physiol. **61**: 373—379, 1978.

Schoch, S., Vielwerth, F. X.: Chlorophyll degradation in senescent tobacco cell culture (*Nicotiana tabacum* var. "Samson"). — Z. Pflanzenphysiol. **110**: 309—317, 1983.

Seely, G. R., Jensen, R. G.: Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll. — Spectrochim. Acta **21**: 1835—1845, 1965.

Shubin, V. V., Efimovskaya, T. V., Karapetyan, N. V.: Struktura fotoindutsirovannykh spektrov pogloshcheniya i krugovogo dikhroizma *P*700. [Structure of photoinduced absorption and circular dichroic spectra of *P*700.] — Zh. fiz. Khim. **11**: 2916—2921, 1981.

Shuvalov, V. A., Krasnovsky, A. A.: Photochemical electron transfer in reaction centers of photosynthesis. — Sov. sci. Rev., Sect. D (Biol. Rev.) **3**: 1—24, 1982.

Siefermann-Harms, D., Ninnemann, H.: Pigment organization in the light-harvesting chlorophyll-*a*/*b*-protein complex of lettuce chloroplasts. Evidence obtained from protection by the chlorophyll against proton attack and from excitation energy transfer. — Photochem. Photobiol. **35**: 719—731, 1982.

Siefermann-Harms, D., Ninnemann, H.: Differences in acid stability of the chlorophyll-protein complexes in intact thylakoids. — Photobiochem. Photobiophys. **6**: 85—91, 1983.

Šiffel, P., Lebedev, N. N., Šesták, Z.: Changes in chloroplast absorption and fluorescence spectra during ontogeny of primary bean leaves. — Photosynthetica **19**: 127—137, 1985.

Yamamoto, Y., Ke, B.: Membrane-surface electric properties of *Triton*-fractionated spinach subchloroplast fragments. — Biochim. biophys. Acta **636**: 175—184, 1981.

Photobiochemistry and Photobiophysics, 13 (1986) 105–114
Elsevier

PHO 00461

Photobiochemical properties of deazaflavin coenzyme F_{420}: sensitization of NAD^+ photoreduction and hydrogen photoevolution

V.V. Nikandrov, E.S. Pantskhava and A.A. Krasnovsky

A.N. Bach Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leninsky Prospect 33, Moscow 117071, U.S.S.R.

(Received 29 January 1986)
(Revised 21 July 1986)
(Accepted 20 August 1986)

Summary

Influence of light on redox properties of deazaflavin compound coenzyme F_{420}, obtained from methanogenic bacteria was investigated. F_{420} has been found to sensitize photoreduction of NAD^+, $NADP^+$, methyl viologen, and photoproduction of hydrogen when thiol compounds, organic acids, amino acids, etc. were used as electron donors. Products of NAD^+ and $NADP^+$ photoreduction were mainly dimers $(NAD)_2$ and $(NADP)_2$. Quantum yields of NAD^+, $NADP^+$, and methyl viologen photoreduction reached 60%. In the absence of electron acceptor under anaerobic conditions, photoreduction of F_{420} was observed, partially reversible by oxygen. The photobiological role of the reactions studied and the possibility of deazaflavin coenzymes involvement in the evolution of solar energy conversion are discussed.

Photochemistry of deazaflavin coenzyme F_{420}; NAD^+ photoreduction; Hydrogen photoevolution

Introduction

In 1972 a low-molecular fluorescent compound was purified from *Methanobacterium* strain M.o.H., called factor 420 (F_{420}) for the intensive light absorption at

Address for correspondence: V.V. Nikandrov, A.N. Bach Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leninsky Prospect 33, Moscow 117071, U.S.S.R.

0165-8646/86/$03.50 © 1986 Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

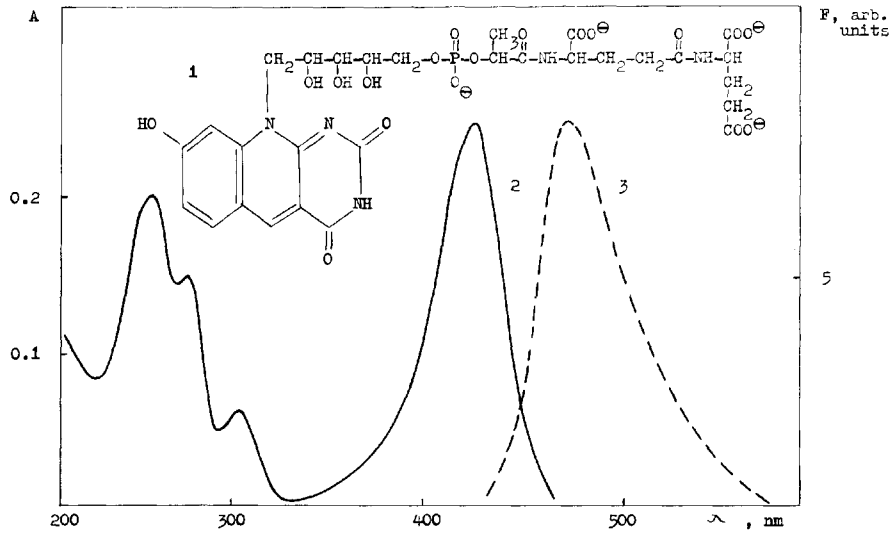


Fig. 1. Proposed structure for deazaflavin F_{420} (1) [8], and its absorption (2) and fluorescence (3) spectra in 50 mM phosphate buffer, pH 6.9.

420 nm [1]. Later, in all the methanogenic bacteria tested relatively high levels of F_{420} were found: 100 to 400 mg/kg cells [2]. It has been shown that F_{420}, with the participation of hydrogenase, formate dehydrogenase, carboxyhydrogenase, is reduced by hydrogen [1,3], formate [4], carbon oxide [5], thus being the primary electron acceptor of the methanogens. F_{420} has been proved to be involved in electron transfer to $NADP^+$ [3,5,6] for CO_2 assimilation and to the methylated coenzyme M [7] at the final stage of methane biosynthesis.

F_{420} was determined as *N*-(*N*-L-lactosyl-γ-L-glutamyl)-L-glutamic acid phosphodiester of 7,8-dimethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin-5-phosphate (Fig. 1) [8]. Synthetic deazaflavins are known to be photochemically active and to sensitize the photoreduction of some low-potential electron acceptors [9–12], including flavoproteins, heme proteins, and ferredoxins [9]. At the same time, activation of methane and hydrogen production under the action of light on the F_{420}-containing intact cells and enzymic systems of methanogenic bacterial culture have been reported [13,14]. This suggests light activation of the reactions involving F_{420}.

The purpose of the present paper was to investigate the photochemical properties of F_{420}, a natural deazaflavin compound. F_{420} was shown to possess the abilities to be reduced in the light and to sensitize photoreduction of NAD^+, $NADP^+$, methyl viologen (MV^{2+}) and hydrogen photoevolution.

Materials and Methods

Lyophilized preparation of coenzyme F_{420} was kindly supplied by R. Wolfe (University of Illinois, USA). Absorption and fluorescence spectra of the prepara-

tion are demonstrated in Fig. 1. NAD^+, $NADP^+$, methyl viologen, dithiothreitol were of "Serva" production (FRG). The other reagents were of the highest purity available. In the experiments on hydrogen photoproduction hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* was employed, the procedure for hydrogenase purification being described elsewhere [15].

The activity of hydrogenase assayed by measuring hydrogen liberation from the reduced form of methyl viologen was 10 μM H_2/min · mg protein at 30°C.

NAD^+, $NADP^+$, and MV^{2+} were photoreduced in the Thunberg quartz vacuum tubes adjusted for spectral measurements. Formation of the reduced form of methyl viologen and of NAD^+ reduction products were registered by the absorbance changes in the absorption maxima of methyl viologen cation radical at 605 nm ($\epsilon_M = 13\,300$), of the dimeric $(NAD)_2$ at 340 nm ($\epsilon_M = 6\,400$), and of NADH at 340 nm ($\epsilon_M = 6\,300$). Hydrogen evolution was measured with a gas chromatograph by the method described in [16]. Experiments were carried out at 20° ± 1°C. the samples were illuminated with the condensed light of a tungsten lamp (100 W) in the region of 420 nm, and with high pressure mercury lamps (Hg lines 436 nm). Light intensity was estimated with a ferrioxalate actinometer. Absorption spectra were measured in a Perkin-Elmer 554 or SF-14 spectrophotometer. Fluorescence was registered with a MPF-3 spectrophotometer.

Results and Discussion

Photoreduction of NAD^+ and $NADP^+$

Deazaflavin coenzyme F_{420} in vivo participates in the F_{420}-NADP-oxidoreductase catalysed reduction of $NADP^+$. For this reason, it seemed interesting to elucidate the possibility of NAD^+ and $NADP^+$ photoreduction sensitized by the isolated F_{420}. To do this, evacuated water solutions of F_{420}, containing NAD^+ and dithiothreitol, were illuminated in the region of the longwave absorption band of F_{420} (420 nm). As a result, an increase in the absorbance of the solution at 340 nm indicating NAD^+ reduction was observed (Fig. 2). Absorbance at 420 nm remained unchanged, which showed that neither accumulation of the reduced F_{420} nor F_{420} consumption took place in the course of the photoreaction. The quantum yield of F_{420}-sensitized photoreduction of NAD^+ by dithiothreitol reached 0.63 ± 0.06 (per one electron transfer). Cysteine and EDTA potassium salt were also efficient electron donors; the reaction was less effective when ascorbate, oxalate, or glucose were used (Table I).

Illumination of the solutions without electron donor or F_{420}, under the same conditions, caused no NAD^+ reduction. With F_{420} solution containing dithiothreitol only in the light, a decrease in the absorbance at 420 nm was observed, partially reversible after the admission of air, as well as a decrease in F_{420} fluorescence intensity, which is indicative of deazaflavin reduction [1]. The quantum yield of F_{420} photoreduction by dithiothreitol was 0.03. Photoreduction of $NADP^+$ sensitized by deazaflavin F_{420} proceeded equally efficiently as that of NAD^+.

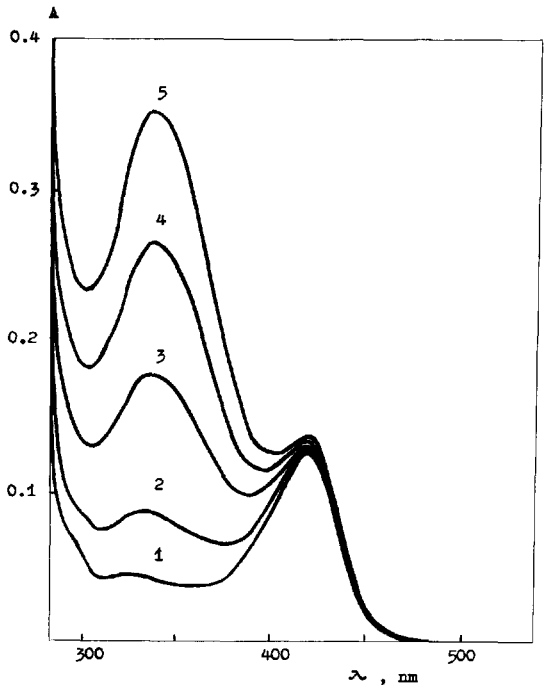


Fig. 2. Photoreduction of NAD^+ sensitized by F_{420}. Illumination time: 0 min (1), 0.5 min (2), 1.5 min (3), 2.5 min (4), 3.5 min (5). Conditions: 3.5 μM F_{420}, 50 mM dithiothreitol, 1 mM NAD^+, 50 mM phosphate buffer, pH 6.9, $I_0 = 2.5 \cdot 10^4$ erg·cm^{-2}·s^{-1}.

For identification of the NAD^+ and $NADP^+$ photoreduction products, an enzymic system (glutamate-dehydrogenase, α-ketoglutarate, ammonium phosphate) capable to oxidize NADH and NADPH was employed [23]. Addition of such

TABLE I

QUANTUM YIELDS OF THE SENSITIZED BY DEAZAFLAVIN F_{420} PHOTOREDUCTION OF NAD^+ AND METHYL VIOLOGEN (e/quantum)×100

Electron donor, 0.05 M	Electron acceptor	
	NAD^+	Methyl viologen
Dithiothreitol	63	52
Cysteine	23	56
EDTA·2Na	25	48
Oxalacetic acid	–	2.5
Pyruvate	–	2.3
Oxalate	0.3	0.3
Formate	–	0.4
Ascorbate	1.6	0
Glucose	1.3	0.6
— (control)	0	0

system to the reaction mixture, containing the products of NAD^+ (or $NADP^+$) photoreduction did not decrease the absorbance at 340 nm. However, NADH and NADPH, introduced in the reaction mixture, were oxidized by this enzymic system.

The electrochemical reduction of NAD^+ is known to proceed through two one-electron stages, $NAD^\cdot$ radicals being produced in the process [17,24]. The subsequent fast dimerization leads to the formation of the dimeric product $(NAD)_2$ of 4,4-tetrahydrobipyridine type, with an absorption maximum at 340 nm, like NADH. In contrast to NADH, the dimer $(NAD)_2$ is not involved in the dehydrogenases-catalyzed reactions, it is oxidized by ferricyanide [17,18]. Fluorescence intensity of $(NAD)_2$ makes 10% of that of NADH [19]. The fact that glutamate-dehydrogenase is not capable to be the catalyst of the oxidation of NAD^+ photoreduction product suggests formation of $(NAD)_2$ and not of NADH in the course of the reaction. This is also confirmed by the action of ferricyanide: 0.1 μM, when added to 1 ml of the reaction mixture containing NAD^+ photoreduction products results in a 0.3 decay of absorbance at 340 nm, which corresponds to the oxidation of 0.05 μM $(NAD)_2$ and is in good agreement with the reaction stoichiometry: $(NAD)_2 + 2\ Fe^{3+} \rightarrow 2\ NAD^+ + 2\ Fe^{2+}$.

The fluorometric determination of $(NAD)_2$ in the presence of F_{420} is impeded by the close fluorescence maxima of $(NAD)_2$ (468 nm), and of the deazaflavin (472 nm). However, the analysis of fluorescence excitation spectra for the reaction mixture containing F_{420} and NAD^+ photoreduction product has shown a maximum at 330–340 nm, which implies the presence of $(NAD)_2$ or trace amounts of NADH.

For the reaction using synthetic deazaflavins as sensitizers, the reductive mechanism of the electron transfer has been established. Apparently, F_{420}-sensitized reactions of NAD^+ and $NADP^+$ photoreduction have the same mechanism: at the initial stage the electron donor is oxidized by the triplet state of F_{420}, and an $F_{420}^\cdot$ radical is produced. Radicals of synthetic deazaflavins are strong reductants: their redox potentials reach -0.8 V [10]. F_{420} is, apparently, a not less efficient reductant, which is evidenced by its ability to reduce NAD^+ (the potential of one-electron reduction of NAD^+ is -0.94 V [20]). The reduced F_{420} does not seem to be the intermediate of the sensitized reaction, since its reductive activity is not high enough for the reduction of NAD^+ to $(NAD)_2$, the redox potential of F_{420} is -0.37 V [8]. This is also confirmed by the difference of the quantum yields of the non-sensitized photoreduction of F_{420} (0.03) and NAD^+ photoreduction sensitized by F_{420} (0.63). Based on the facts listed, the mechanism of NAD^+ photoreduction sensitized by deazaflavin F_{420} may be presented as follows:

$$F_{420} \xrightarrow{h\nu} {}^2F_{420} \rightarrow {}^3F_{420} \tag{1}$$

$${}^3F_{420} + D_{red} \rightarrow F_{420}^\cdot + D^\cdot \tag{2}$$

$$F_{420}^\cdot + D^\cdot \rightarrow F_{420} + D_{red} \tag{3}$$

$${}^3F_{420} + D^\cdot \rightarrow F_{420}^\cdot + D_{ox} \tag{4}$$

$$F_{420}^\cdot + NAD^+ \rightarrow F_{420} + NAD^\cdot \tag{5}$$

$$NAD^\cdot + NAD^\cdot \rightarrow (NAD)_2 \tag{6}$$

where $^2F_{420}$ is the excited singlet state, $^3F_{420}$ is the triplet state of the deazaflavin, D_{red}, D_{ox} are reduced and oxidized electron donors.

In the investigation of deazariboflavin photoreduction by oxalate, simultaneous transfer of two electrons to the deazaflavin triplet state was proposed, accompanied by the oxalate decarboxylation and nucleophilic substrate addition. Formation of the deazaflavin radicals in this reaction was accounted for by interaction of the intermediate with the second deazariboflavin molecule in the triplet state [10]. The photoreduction of F_{420}, when oxalate, ascorbate, or glucose are used as electron donors, also may proceed by the mechanism described. The necessity of two deazaflavin molecules in the triplet state for the formation of the sensitizer radicals may account for the low quantum yields of NAD^+ photoreduction in this case (Table I).

Photoreduction of methyl viologen

Methyl viologen (MV^{2+}), 1,1'-dimethyl-γ,γ'-dipyridyl, whose redox potential is $E_0 = -0.45$ V, close to that of ferredoxin, is often used as electron acceptor in the photosensitized reactions. The abilities of deazariboflavin and 3,10-dimethyl-5-deazaisoalloxacine to sensitize MV^{2+} photoreduction with various organic compounds used as electron donors have been shown [11]. The reductive mechanism of the electron transfer in the MV^{2+} photoreduction sensitized by the synthetic deazaflavins has been also described [12]. Deazaflavin coenzyme F_{420} under anaerobic

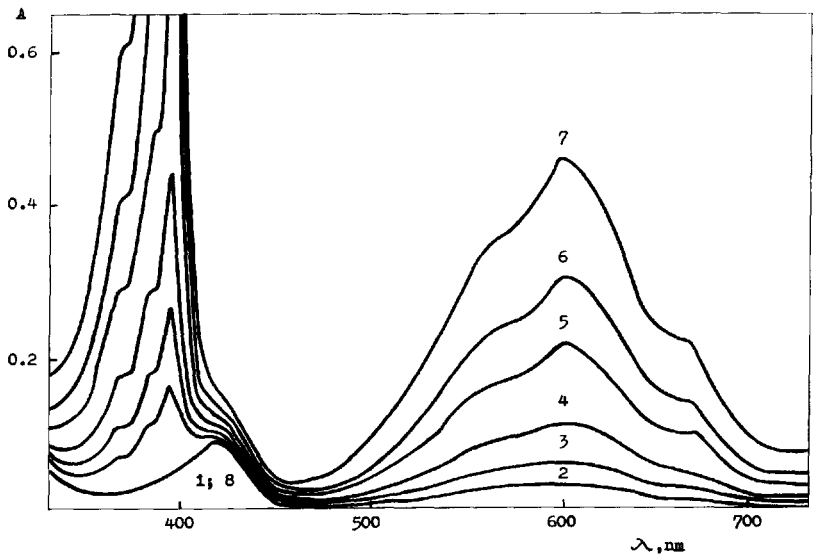


Fig. 3. Photoreduction of MV^{2+} sensitized by deazaflavin F_{420}. Illumination time: 0 min (1), 3 min (2), 6 min (3), 12 min (4), 24 min (5), 36 min (6), 60 min (7), (8) admission of air after illumination. Conditions: 2.7 μM F_{420}, 50 mM dithiothreitol, 0.5 mM MV^{2+}, $I_0 = 10^3$ erg·cm^{-2}·s^{-1}, 50 mM phosphate buffer, pH 6.9.

conditions can also sensitize MV^{2+} photoreduction. Illumination of F_{420} evacuated solutions, containing MV^{2+} and an electron donor, causes an appearance of the typical absorption spectrum of methyl viologen cation radical ($MV^{+\cdot}$) with maxima at 395 nm and 605 nm (Fig. 3). Dithiothreitol, cysteine and EDTA · 2Na appeared to be the most efficient electron donors for the photoreduction of both MV^{2+} and NAD^+ (Table I). When ascorbate was employed no accumulation of the reduced methyl viologen was observed, which, apparently, may be related to the reverse reaction of $MV^{+\cdot}$ oxidation by dehydroascorbate.

As it is seen from Fig. 3, the absorption spectra of F_{420} before illumination (curve 1) and after $MV^{+\cdot}$ oxidation by air oxygen (curve 8) fully coincide, which implies the absence of sensitizer consumption. Nor was F_{420} consumed when other electron donors, except of formate and glucose, were used. With the latter, a decay of absorption at 420 nm and an increase at 430–510 nm were observed in the course of photoreaction. Such changes in F_{420} absorption spectrum were earlier obtained by the illumination of F_{420} aqueous solutions under anaerobic conditions, and were explained by the deazaflavin destruction [1]. Similar changes were also obtained if solutions of F_{420} with MV^{2+} were illuminated under anaerobic conditions in the absence of electron donor

It should be noted, that F_{420} sensitizes MV^{2+} photoreduction more efficiently than chlorophyll. For instance, in the aqueous solution of 0.5% Triton X-100, under conditions given in legend to Fig. 2, the quantum yield of the chlorophyll-sensitized MV^{2+} photoreduction with dithiothreitol is 0.2 ± 0.02, while that of F_{420}-sensitized photoreduction was as high as 0.5 ± 0.05.

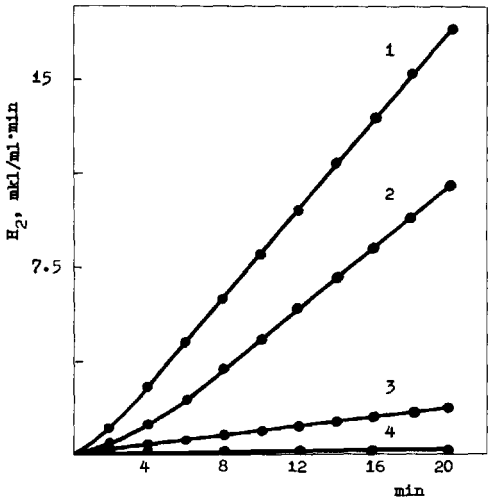


Fig. 4. Kinetic curves of hydrogen photoproduction sensitized by deazaflavin F_{420} (1,2), and chlorophyll *a* (3,4). Electron donors: dithiothreitol (1,3), EDTA·2Na (2,4). Conditions: 23 μM F_{420}, 7 μM chlorophyll in 1% Triton X-100, 50 mM electron donor, 0.5 mM MV^{2+}, 50 mM phosphate buffer, pH 6.9, 0.1 ml hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina*, $I_0 = 1.4 \times 10^4$ erg·cm^{-2}·s^{-1}.

TABLE II

QUANTUM YIELDS OF HYDROGEN PHOTOPRODUCTION SENSITIZED BY DEAZAFLAVIN COENZYME F_{420} AND CHLOROPHYLL (e/quantum)×100

Electron donor, 0.05 M	Sensitizer	
	F_{420}	Chlorophyll
Dithiothreitol	27	2.6
Cysteine	23	1.9
EDTA·2Na	18	0.1
— (control)	0	0

Hydrogen photoproduction

In methanogenic bacteria F_{420} is reduced with hydrogenase being involved [1,5]. Hydrogen production in the presence of the reduced F_{420} and *Methanobacterium* extracts containing hydrogenase has been also shown [4].

The fact that deazaflavin F_{420} can sensitize photoreduction of MV^{2+} having the redox potential close to the potential of the hydrogen electrode, demonstrates the possibility of F_{420}-sensitized hydrogen photoproduction in the presence of hydrogenase, promoting the reaction: $2H^+ + 2\bar{e} \rightarrow H_2$. Indeed, introduction of hydrogenase isolated from cells of *Thiocapsa roseopersicina* in the solution containing F_{420} and an electron donor, under anaerobic conditions, results in hydrogen photoproduction (Fig. 4). MV^{2+} providing the electron transfer from deazaflavin to hydrogenase, enhances the rate of hydrogen production approximately by a factor of 30.

As well as in MV^{2+} photoreduction, in the case of hydrogen photoevolution, deazaflavin F_{420} appears to be a more efficient sensitizer than chlorophyll. The quantum yields of H_2 photoproduction sensitized by F_{420} are higher by an order of magnitude than those of the reaction sensitized by chlorophyll (Table II).

Assuming the hydrogen photoproduction sensitized by deazaflavin F_{420} to proceed by the reduction mechanism, the electron transfer in the reaction may be presented in a scheme of Fig. 5.

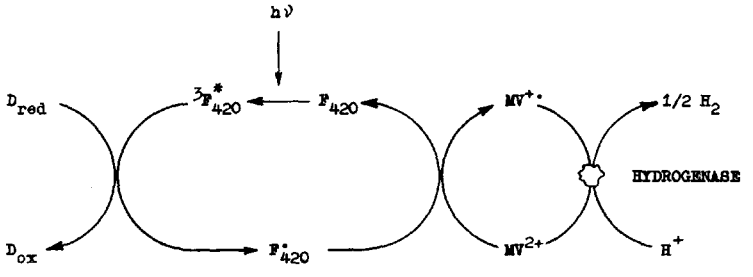


Fig. 5. Scheme of electron transfer in the hydrogen photoproduction sensitized by deazaflavin F_{420}. D_{red} and D_{ox} are reduced and oxidized electron donors, $^3F_{420}$ is the triplet state of the deazaflavin F_{420}, MV^{2+} is methyl viologen.

Photobiological aspects of the reactions studied

It has been earlier shown that synthetic deazaflavins are more efficient sensitizers than flavins [9], acridine dyes, and the ruthenium tris-bipyridyl complex [11]. In the present paper the higher efficiency of natural deazaflavin F_{420} as sensitizer of MV^{2+} photoreduction and H_2 photoevolution, as compared to chlorophyll, is demonstrated. Among the natural photochemically active compounds, F_{420} seems to be one of the most efficient photosensitizers.

In the light, in microorganisms containing F_{420} the oxidation of the organic compounds and reduction of the endogenous electron acceptors are possible. Here, the storage of the energy of light is probable in the form of the chemical energy of the reduced compounds.

Photoactivation of F_{420} may be the basis of the earlier reported photoactivation of the methane synthesis by the methanogenic bacterial culture [13], and of hydrogen photoproduction by the cell-free extracts of *Methanobacillus kusneceovii* [14]. At the illumination of the methanogenic bacteria, formation of $(NAD)_2$ and $(NADP)_2$ may also be expected. The dimers of nicotinamide coenzymes have not been found so far in biological objects, although, the ability of mitochondrial extracts to oxidize $(NAD)_2$ and the interactions of $(NAD)_2$ with a number of dehydrogenases [18] imply possible participation of the NAD^+ and $NADP^+$ one-electron reduction products in the biological oxidative-reductive processes.

Maybe, on the pathway of the photosynthesis evolution, the stage of light activation of coenzymes could exist [21]. Light activation of the reduced nicotinamide coenzymes was earlier reported by us [22].

Basing on the results obtained, it may be assumed that light activation of the deazaflavin coenzymes could lead to the conversion of solar energy in some types of archaebacteria at the primary stages of biological evolution.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. R. Wolfe (University of Illinois, USA) who kindly supplied the samples of F_{420}, and to Dr. N.A. Zorin for the gift of hydrogenase preparation.

References

1 Cheesman, P., A. Toms-wood and R.S. Wolfe (1972) J. Bacteriol. *112*, 527–531.
2 Eirich, L.D., G.D. Vogels and R.S. Wolfe (1979) J. Bacteriol. *140*, 20–27.
3 Tzeng, S.F., R.S. Wolfe and M.P. Bryant (1975) J. Bacteriol. *121*, 184–191.
4 Tzeng, S.F., M.P. Bryant and R.S. Wolfe (1975) J. Bacteriol. *121*, 192–196.
5 Daniels, L., R. Sparling and G.D. Sprott (1984) Biochim. Biophys. Acta *768*, 113–163.
6 Zeikus, J.G. (1977) Bacteriol. Rev. *41*, 514–541.
7 Elofson, W.L. and R.S. Wolfe (1980) J. Biol. Chem. *255*, 8388–8389.
8 Eirich, L.D., G.D. Vogels and R.S. Wolfe (1978) Biochemistry *17*, 4588–4593.
9 Massey, V. and P. Hemmerich (1977) J. Biol. Chem. *252*, 5612–5614.

10 Goldberg, M., P. Israel, H.E.A. Kramer, R. Traber and P. Hemmerich (1981) Biochim. Biophys. Acta *673*, 570–593.
11 Krasna, A. (1980) Photochem. Photobiol. *31*, 75–82.
12 Visser, A.J.W.G. and J.H. Fendler (1982) J. Phys. Chem. *86*, 2406–2409.
13 Pantskhava, E.S. (1977) Biokhimia (Russ.) *42*, 549–559.
14 Pantskhava, E.S. (1976) Dokl. Acad. Nauk SSSR (Russ.) *230*, 478–482.
15 Gogotov, I.N., N.A. Zorin and E.N. Kondratjeva (1976) Biokhimia (Russ.) *41*, 836–842.
16 Oshchepkov, V.P. and A.A. Krasnovsky (1974) Prikladn. Biochim. Microbiol., v. 10, pp. 760–764.
17 Burnett, R.W. and A.L. Underwood (1968) Biochemistry *7*, 3328–3333.
18 Finazzi-Argo, A., L. Avigliano, V. Carelli, F. Liberatore and A. Casini (1981) Biochim. Biophys. Acta *661*, 120–123.
19 Czochzalska, B., W. Kawczynski, G. Bartosz and B. Shugar (1984) Biochim. Biophys. Acta *801*, 403–409.
20 Farrington, J.A., E.J. Land and A.J. Swallow (1980) Biochim. Biophys. Acta *590*, 273–276.
21 Krasnovsky, A.A. (1957) *In*: The origin of Life on the Earth (A.I. Oparin et al., eds.) pp. 606–618, Pergamon Press, New York.
22 V.V. Nikandrov, G.P. Brin and A.A. Krasnovsky (1978) Biokhimiya (Russ.) *43*, 636–645.
23 Doherty, D. (1970) *In*: Methods of Enzymology (H. Tabor and E.W. Tabor, eds.) vol. *17*, Part A, pp. 850–856.
24 Schmakel, C.O., K.S.V. Santhanam and P.J. Elving (1975) J. Am. Chem. Soc. *97*, 5083–5092.

"Fundamental Research 1986
in Homogeneous Catalysis"
ed. A.E. Shilov, 1986
Vol. 3 Gordon & Beach Science Publ. INC
New York N.Y. 10276 1189-1199

PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER MODELING

V.V.NIKANDROV, A.N.SEMENOVA, A.A.KRASNOVSKY
A.N.Bach Biochemistry Institute, USSR Academy of Sciences, Moscow, USSR

Abstract Model photobiochemical systems were proposed that transform light energy into chemical one. Chlorophyll and pheophytin incorporated in detergent micelles or lipid vesicles, and inorganic semiconductors were used as photocatalysts. Transmembrane electron transfer coupled to hydrogen photoproduction in liposomes was observed.

INTRODUCTION

In photosynthesis, the solar energy conversion mechanism is based on charge separation in the reaction centers and vectorial electron transport across the photosynthetic membranes that spatially separate the light-initiated oxidizing and reducing agents. We have attempted to implement these principles of photosynthetic light energy conversion in model photobiochemical systems. Specifically, we have looked into the capability of the system stuided to photoreduce methyl viologen (MV^{2+}), with a redox potential close to that of a hydrogen electrode, and to photoproduce molecular hydrogen.

The simplest system capable of H_2 photoproduction contains chlorophyll in detergent micelles, as well as electron donors, dithiothreitol, cystein, or NADH, methyl viologen as a mediator, and bacterial hydrogenase (Figure I).[1,2,3] Hydrogen is formed in this system as the result of two coupled reactions: a chlorophyll-

sensitized photoreduction of methyl viologen and a hydrogenase-catalyzed reduction of water molecules to H_2 proceeding along with the oxidation of reduced methyl viologen. The chlorophyll-sensitized photoreduction of methyl viologen follows the oxidation mechanism: in the first step, an electron is carried from triplet-state chlorophyll to the electron acceptor. The reaction is highly reversible at this step, for both a strong reducer, the reduced methyl viologen (E_o=-0.44 V), and a strong oxidizer, the chlorophyll cation-radical (E_o= +0.78), are formed. The reverse reaction is partially

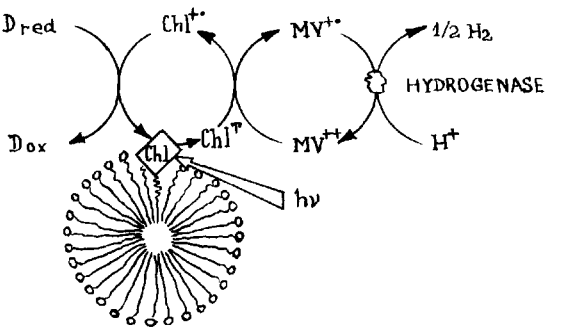


FIGURE I Hydrogen photoproduction in micellar solution of detergent.

inhibited during chlorophyll cation-radical reduction by the electron donor. However, with the accumulation of reduced methyl viologen, the rate of back electron transfer increases. This is manifested in a drop of the methyl viologen photoreduction rate with illumination time: at the very begining, the quantum yield is 20%; later, 2%. One could expect a decrease in back reaction in the presence of a hydrogenase that catalizes the oxidation of reduced methyl viologen. Indeed, the rate of

chlorophyll-sensitized H_2 photoproduction, once it has reached a steady-state level, does not go for the rest of the illumination time. The efficiency of the H_2 production depends on the nature of the hydrogenases being used. With clostridium, photosynthesizing, and sulfate-reducing bacteria hydrogenases, the maximum quantum yield (6%) is shown for the hydrogenase from sulfate-reducing bacteria that, having a high affinity for reduced methyl viologen, ensures that it is very efficiently "pumped out" from the system.

With the use of reversibly oxidizing compounds as electron donors, neither methyl viologen reduction nor hydrogen evolution is detected in micellar solutions of detergent on account of the highly efficient oxidation of reduced methyl viologen by the oxidized electron donor. A possible way of preventing the reversibility of a photosensitized reaction is a spatial separation of the electron donor and acceptor. With this aim in view, we introduced Na ascorbate into the interior compartment of lipid bilayer vesicles obtained from phosphatidilcholine (liposomes) and containing chlorophyll a in the membrane. Indeed, in this case, it was possible to observe the photoreduction of methyl viologen located in the exterior aqueous space (Figure 2).[4] But if both ascorbate and methyl viologen are in the interior space of liposomes, no accumulation of reduced methyl viologen will be detected. The inhibition of the reaction by I% Triton X-I00, which solubilizes the lipid membrane, likewise testifies that methyl viologen photoreduction takes place under transmembrane electron transport. It has not been possible to achieve a full separation of methyl viologen and ascorbate with the aid of lipid membrane because reduced

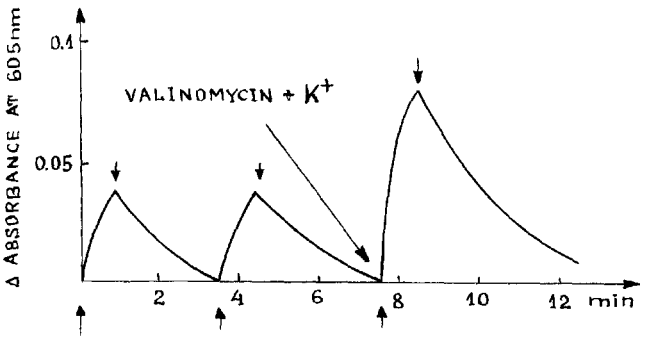


FIGURE 2 Photoreduction of methyl viologen due to transmemrane electron transfer in chlorophyll-containing liposomes

methyl viologen can penetrate across the liposome membrane . This affects the reaction kinetics: the steady-state of methyl viologen reduction is attained rapidly and the reverse reaction takes place after the light has been switched off (Figure 2). The chlorophyll-sensitized electron transfer in liposomes could be limited by a difference in the electric potentials on the membrane. This is indicated by the effect of the valinomycine ionophore (10^{-6}), which, in the presence of potassium ions, increases about twofold the rate of methyl viologen photoreduction under transmembrane electron transport from the ascorbate (Figure 2). The efficiency of the chlorophyll-sensitized photoreduction of methyl viologen in transmembrane electron transport depends on the pigment:lipid ratio, i.e., on the number of chlorophyll molecules per liposome (Figure 3). The maximum quantum yield, I.7%, is achieved if the chlorophyll:lipid ratio is equal to I:300, when about 20 chlorophyll molecules are in a single

liposome. The introduction of a magnesium-free chlorophyll analogue, pheophytin, in the liposomes greatly promotes methyl viologen reduction. The maximum quantum yield may be as high as I5% and the pheophytin: lipid ratio, I:450. With increasing amounts of pigments in liposomes the methyl viologen photoreduction quantum yields decrease (Figure 3). Chlorophyll and pheophytin fluorescence is thereby quenched, probably

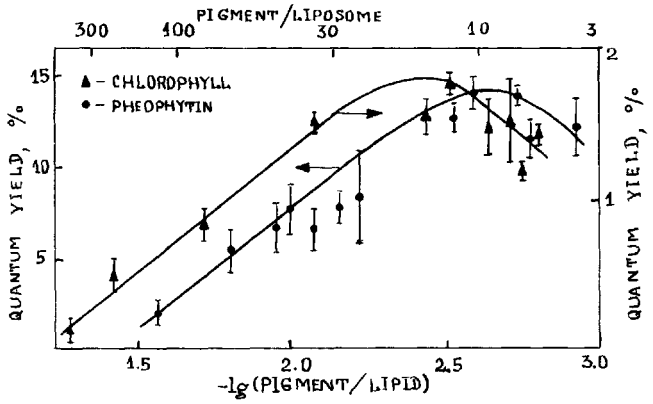


FIGURE 3 The quantum yield of methyl viologen photoreduction as a function of the pigment:lipid molar ratio.

due to the concentration quenching of pigments in liposomes.

As in the case of chlorophyll, a pheophytin-sensitized reaction is rapidly saturated, due to the penetration of reduced methyl viologen into the vesicle's interior space. A higher level of electron acceptor reductability is achieved by using ethyl viologen sulfate (Figure 4). The oxidation of reduced sulfonated viologen proceeds with a lower velocity than me-

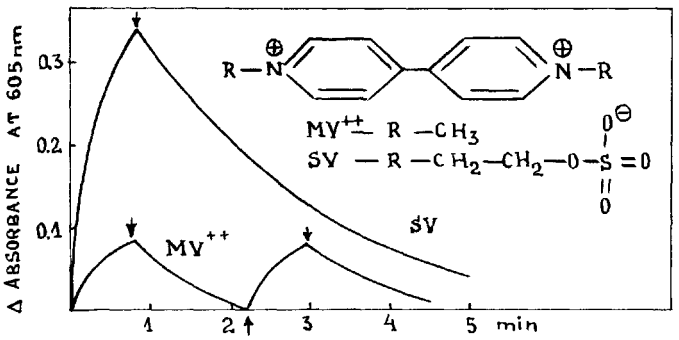


FIGURE 4 The photoreduction of methyl viologen and ethyl viologen sulfonate due to transmembrane electron transfer in pheophytin-containing liposomes.

thyl viologen upon the termination of illumination. Possibly, the radical form of sulfonated viologen with a negative charge less capable to pass through a lipid membrane than the methyl viologen cation-radical.

The methyl viologen photoreduction rate in liposomes is linearly dependent up on the intensity of the light absorbed by chlorophyll or pheophytin, which indicates that the reaction proceeds according to a one-quantum mechanism. As to the electron phototransport across a lipid membrane, the data obtained are insufficient for a definite conclusion about its mechanism. A drop in the methyl viologen reduction yield, with a low content of chlorophyll or pheophytin in liposomes (Figure 3), only indicates the involvement of more than one molecule of pigment in electron transfer. The higher efficiency of pheophytin in methyl viologen reduction may due to the fact that the electron transfer between the pheophytin molecules placed on both sides of the membrane is more facile than that of chlorophyll.

However, the differences in redox properties of pigments cannot be excluded as a possible reason.

By supplementing the suspension of chlorophyll or pheophytin-containing liposomes with hydrogenase from the bacterium Thiocapsa roseopersicina, we have been able to demonstrate hydrogen photoproduction under transmembrane electron transfer from the ascorbate in the internal compartments of liposomes (Figure 5). As in the methyl viologen photoreduction reaction, pheophytin is a more effective sensitizer than chlorophyll in hydrogen photoproduction. Thus, our conclusion is

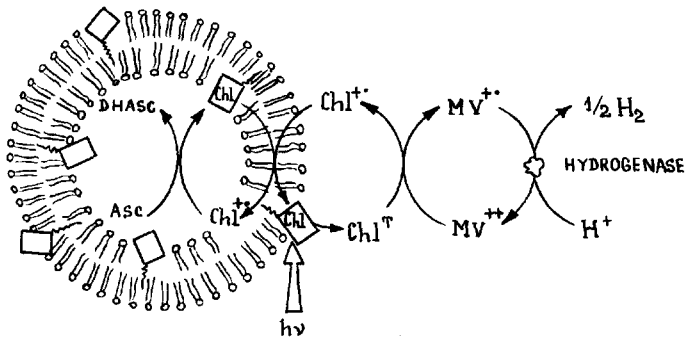


FIGURE 5 Hydrogen photoproduction in liposomes.

that suspensions of liposomes containing pigments in the membrane have better prospects than solutions of pigments and pigment-containing micelles as a model system for studying light energy conversion and accumulation because they make it possible to separate the active oxidants and reductants formed, with real light energy storage in the reaction products. One should also point that the activity of chlorophyll and pheophytin pigments in the sensitization of transmembrane electron transport is higher than that of porphyrines

and the bipyridine rhutenium complex.

In model light energy conversion and accumulation systems, it is possible to use components of the plant photosynthesis apparatus as photosensitizers. Many investigations used chloroplasts to sensitize hydrogen photoproduction (see reference 5). We have established conditions under which the electron transport capacity of chloroplasts for the photoreduction of methyl viologen and hydrogen photoproduction is utilized practically to the full.[2] For this purpose, it was necessary to isolate chloroplasts without impairing their photosynthetic membranes and, also, to apply the electron donor combination of dithiothreitol, ascorbate, and tetramethyl paraphenylendiamine. As a sensitizer of hydrogen photoproduction and methyl viologen photoreduction, we made use of primary photosystem particles obtained from chloroplasts; these particles are pigment-protein-lipid complexes with reaction centers having charge separation quantum yields close to 100%. According to comparative investigations, the particles of the primary photosystem are less efficient photosensitizers than chloroplasts; the hydrogen production rate was close to that when chlorophyll was incorporated into detergent micelles.[6] As in the chlorophyll-containing detergent micelles, both hydrogen production and methyl viologen reduction sensitized by particles of the primary photosystem are limited by back reactions which, in this case, represent cyclic electron transport. It appears that, as in the case of photosynthetic pigments, the inclusion of primary photosystem particles into the lipid membranes is required to preventing the reversibility of the reactions.

Coming back to photosynthetic electron transfer

modeling, we should note that nonbiological photoreceptors can operate as generators of separated charges as well. For this purpose, we used inorganic semiconductors in our laboratory: titanium dioxide, zinc oxide, tungsten trioxide, and cadmium sulphide. Unlike dyes, inorganic semiconductors can fulfill a two-fold role: that of light energy transforming sensitizers and that of catalysts on whose surfaces the recombination of primary active photoproducts takes place. By introducing electron donors or acceptors into the suspension, one can effect diverse redox processes modeling different sites in the chain of photosynthetic electron transfer. Thus, in I96I, an inorganic model of the Hill reaction in a system in which ferric compounds or quinones were used as electron acceptors and molecules of water as electron donors was realized in our laboratory. Molecular oxygen was evolved thereby and ox oxidants were reduced in accordance with the stoichiometry of the process. Experiments with heavy oxygen ($^{I8}O_2$)-labeled molecules of water showed that the oxygen evolved belongs to the water molecules. The quantum yield of the reaction reached 3% (it was highest in the case of tungsten trioxide). Titanium dioxide and zinc oxide also sensitized methyl viologen photoreduction in the absence of exogenous electron donors.[8] If a suspension containing titanium dioxide or zinc oxide is supplemented with bacterial hydrogenase under anaerobic conditions, the photoproduction of molecular hydrogen is observed.[9] It may be that in this case, also, the electrons come from the water molecules, although we could not observe the evolution of molecular oxygen simutaneously with hydrogen production. Such an experiment has been recently described

by Duang Hong et al.[10] Methyl viologen and organic donors of electrons activate hydrogen photoproduction. Under optimal conditions,,the quantum yield of reaction reaches 2%. If some organic compounds are used as electron donors - - such as tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, triethanolamine, ethanol, glycerol, or glucose - - hydrogen production takes place in a titanium dioxide suspension in the absence of the catalyst hydrogenase.[11] With these electron donors, titanium dioxide sensitizes methyl viologen photoreduction to a dipyridine dihydroform, which indicates the generation in reduction potential system of close to -0,8 V. Cadmium sulphide, which absorbs light at longer wavelengths than titanium dioxide and zinc oxide, sensitizes hydrogen photoproduction only in the presence of hydrogenase and organic electron donors.[10] An elementary mechanism of hydrogen photoproduction mediated by inorganic semiconductors can be visualized in this way: under the effect of light quantum, an electron passes from the semiconductor valency band to the conductivity band and the separated charges are localized at different active centers of the phase boundary between the semiconductor and the medium. The electrons are used to reduce the active center of the hydrogenase, which catalyzes the reduction of water to hydrogen,,or to reduce methyl viologen, which transfers the electrons to the hydrogenase. The holes oxidize the water molecules or the electron donors present. If some organic electron donors are used, then titanium dioxide generates a reduction potential that is sufficient to reduce the water molecules to hydrogen directly on the surface catalytic centers.

Taking into consideration the model systems we

studied and those known from the literature, we can conclude that, so far, no system has been created which has the principle asset of plant photosynthesis: the ability to transfer electrons within the range of hydrogen and oxygen electrode potentials with a fairly efficient transformation and accumulation of the energy of light. Such a system may include an efficient charge separation sensitizer as a photosynthetic reaction center or an inorganic semiconductor and membrane system separating primary photoproducts.

REFERENCES

I. A.A.Krasnovsky, V.V.Nikandrov et al., Dokl.Acad. Nauk SSSR, 225, 7II (I975).
2. A.A.Krasnovsky, Chan-van-Ni, V.V.Nikandrov,G.P.Brin, Plant.Physiol., 66, 925 (I980).
3. A.A.Krasnovsky, Topics in Photosynthesis, edited by J.Barber (Elsevier, Amsterdam, I979)pp.28I-289.
4. A.A.Krasnovsky, A.N.Semenova, V.V.Nikandrov, Photobiochem.Photobiphys., 4, 227 (I982).
5. J.Barber (ed.), Photosynthesis in relation to model systems (Elsevier/Noth Holland Biomedical Press, I979)
6. V.V.Nikavdrov, A.I.Aristarchov, A.A.Krasnovsky, Biophysika, 28, 699 (I983).
7. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Dokl.Acad.Nauk SSSR, I39, I42 (I96I).
8. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, Dokl.Acad.Nauk SSSR, 2I3, I43I (I973).
9. A.A.Krasnovsky, G.P.Brin, V.V.Nikandrov, Dokl. Acad.Nauk SSSR, 229, 990 (I976).
IO. Duang Hong, N.Serpone, M.Gratzel, Helvetica Chimica Acta, 67, IOI2 (I984).
II. V.V.Nikandrov, G.P.Brin, A.A.Krasnovsky, Photobiochem.Photobiphys., 6, IOI (I983).

Photosynthesis Research 9, 3–12 (1986)
© 1986 Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht. Printed in the Netherlands

Molecular arrangement of pigment-protein complex of photosystem 1

V.V. SHUBIN, N.V. KARAPETYAN and A.A. KRASNOVSKY

A.N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow 117071, USSR

(*Received 25 June 1985*)

Key words: ~~light-harvesting complex (pea); cPII, optical absorption, linear dichroism, chroism,~~ protein secondary structure

Abstract. The circular dichroism (CD) method was applied to study the molecular organization of P700, antenna chlorophyll and protein of photosystem 1 complexes (CP1), isolated from chloroplasts under mild treatment with Triton X-100. Analysis of CD spectra and protein:chlorophyll:P700 ratios for CP1 complexes that were different in their chlorophyll content indicate that CP1 preparations can be considered as a mixture of CP1-RC, containing P700 (10–20%), and CP1-LH without P700 (80–90%). Both types of complexes contain approximately 25 chlorophyll molecules, and the destruction of their spatial organization with detergents represents a cooperative transition. The rate of chlorophyll destruction in CP1-LH is much higher than that in CP1-RC. In both complexes a 65 kDa polypeptide predominates, whose secondary structure (typical for α/β proteins) is stable to Triton X-100 and does not depends on the chlorophyll content. Chlorophyll seems to be grouped in clusters (5–7 molecules) in the hydrophobic cores of 2–3 parallel α/β domains of the 65 kDa protein. Only one of the clusters in CP1-RC includes P700; on P700 photooxidation the change of its interaction with the nearest pigment environment results in a complicated shape of the light-induced CD spectra.

Abbreviations

PS1, photosystem 1; CP1 pigment-protein complex of PS1; Chl, chlorophyll *a*; CP1-140, CP1 with ratio Chl:P700 140; RC, reaction center; LH, light-harvesting pigment; CP1-RC, CP1, containing P700; CP1-LH, CP1 without P700 (containing LH); CD, circular dichroism; SDS, sodium dodecyl sulfate.

Introduction

It is generally accepted that the primary photosynthetic reactions take place in the reaction centers (RC) of photosystems of green plants and photosynthetic bacteria. The suggestion [5, 10] that only a part of Chl is photochemically active anticipated the discovery of the RC. Bacterial RC can be isolated in purified state and crystallized, whereas the RC's of green plants contain a large amount of antenna Chl. Difficulties in isolation and crystallization

Dedicated to Prof. L.N.M. Duysens on the occasion of his retirement

of hydrophobic complexes of green plants with a high molecular weight until now did not allow their organization to be studied by X-ray diffraction. The application of the CD method can greatly contribute to solving the problem. As is known CP1 consists of 65 dKa subunits and four 10–25 kDa polypeptides; the Chl:P700 ratio varies between 120 and 25 [1, 2, 11]. However, the structural organization of CP1 is still unclear. The aim of the present paper is to investigate the molecular arrangement of P700, antenna Chl and the protein part of CP1 using CD measurements.

Materials and methods

CP1 complexes were isolated from chloroplast membranes of pea and maize and from the cyanobacterium *Spirulina platensis* by means of chromatography on hydroxylapatite [16] and gel filtration. CP1-140 was isolated after membrane solubilization with 2% Triton X-100 in 0.05 M Tris HCl buffer, pH 8.2 (detergent: Chl = 8) and sedimentation at 20 000 × g of non-destroyed grana. The resultant supernatant after chromatography on hydroxylapatite (without washing with buffer and detergent) was gel-filtrated through Biogel A-25 m, balanced with 0.02 M Tris HCl buffer + 0.05 M Triton X-100, and again subjected to chromatography on hydroxylapatite. CP1-140 was eluted with 0.02 M phosphate buffer, pH 7.2 with 0.05% Triton X-100 after washing the column with 0.05% Triton X-100 in 0.05 M Tris HCl buffer (4–5 volumes of the column). CP1-100 and CP1-50 were isolated from CP1-140 measuring the amount of free Chl, washed off the column with hydroxylapatite, containing 0.05% or 1% Triton X-100 in Tris HCl buffer. By this method it is possible to obtain complexes with any Chl:P700 ratio (from 140 to 30). Judged by the staining of electrophoretic gels with Coomassie G-250, the 65 kDa polypeptide predominated (80–90%) in all complexes studied.

The absorption spectra and their second derivatives were registered by Beckman-35 and Hitachi-356 spectrophotometers, the CD spectra were measured by a dichrograph JASCO-40AS. The light-induced CD spectra were measured with the dichrograph using a home developed phosphoroscope attachment [18]. The light-induced absorption spectra were measured using a single-beam difference spectrophotometer [8].

P700 content was calculated using as differential extinction coefficients $6.4 \cdot 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (pea, maize) and $7.0 \cdot 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (*Spirulina*) at 698 nm [6], respectively. Light-induced CD spectra of P700 (dark minus light) were measured point by point (intervals 1–2 nm), using a data processor. These spectra are presented in terms of the differential dichroic coefficient $\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$.

The concentration of the protein in CP1 in the presence of Triton X-100 was derived from the equation proposed by us: $C = 1.98\ (A^{0.1}_{210} - A^{0.1}_{214})$, where $A^{0.1}_{210}$ and $A^{0.1}_{214}$ are the absorptions at 210 and 214 nm in a 0.1 cm cell, and C is the protein concentration (mg/ml). The coefficient 1.98 ± 0.06 was calculated

from measurements with bovine albumin, ribonuclease A, glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. The concentration of the protein was determined by Scops method [15]. Absorptions of the micellar solution of Triton X-100 at 210 and 214 nm are identical, whereas the absorption by Chl in this region is negligible.

The protein secondary structure was determined from the basic spectra of α-helix, antiparallel and parallel β-structure, β-bands and the irregular region calculated in [3, 4]. Experimental CD spectra were approximated by the sum of the basic spectra using a non-linear least squares method under the condition that $\Sigma f_i = 1$, where f_i is the molar fraction of the amino acid residues in i-th structure. A BESM-6 computer was used. A mean weight of the amino acid residues of 111 kDa was determined from the amino acid composition of the 65 kDa protein [19].

Results and discussion

The composition of the studied complexes is summarized in Table 1. In each case there are 700 000–800 000 g of protein per mole of P700. Similar values were obtained for CP1 isolated by SDS-electrophoresis [20]. Since isolated CP1 complexes contain two main 65 kDa polypeptides, it is obvious that 80–85% of the CP1 complexes contain no P700. The methods used did

Table 1. Ratio of protein, Chl and P700 in different CP1 complexes isolated from maize

Sample	Chl/P700 mole/mole	Protein/Chl g/g	Protein/P700 g/mole	Chl/65 kDa protein mole/mole
CP1-140	140	6.1	760 000	12
CP1-100	100	8.8	790 000	8.3
CP1-50	50	16	720 000	4.5
CP1, isolated by electrophoresis [20]	65	13–17	780 000–1 000 000	4.1–5.4
PS1 particles [7]	13	16	160 000	4.5

not allow us to separate CP1-RC from CP1-LH. However, centrifugation in the sucrose density gradient of the PS1 particles, extracted with ether, resulted in a preparation with protein : P700 ratio of about 160 000 g/mole [7].

The number of Chl molecules per one 65 kDa polypeptide in CP1-140 is about 12, i.e. intact CP1 complexes contain about 25 Chl molecules. This explains the instability of P700 in a complex with a ratio Chl : P700 less than 25 [2], as well as the fact that inhibition of one P700 at high detergent concentrations leads to the destruction of the spatial organization of 20–25 Chl molecules [9, 18]. Apparently, the enrichment of CP1 with RC by strong detergent treatment is achieved by a more rapid Chl solubilization from complexes without P700.

Spectral properties of CP1 are presented in Figure 1. The absorption spectra and their second derivatives are almost equal for CP1-140, CP1-100 and CP1-50 and are characterized by 6 main narrow (7–9 nm) bands at 663, 670, 677, 684 and 698 nm, four of them predominating in CD spectra of all used CP1 complexes. However, the shape of the CD spectra noticeably deformed in proportion to the removal of antenna Chl because of a drop of

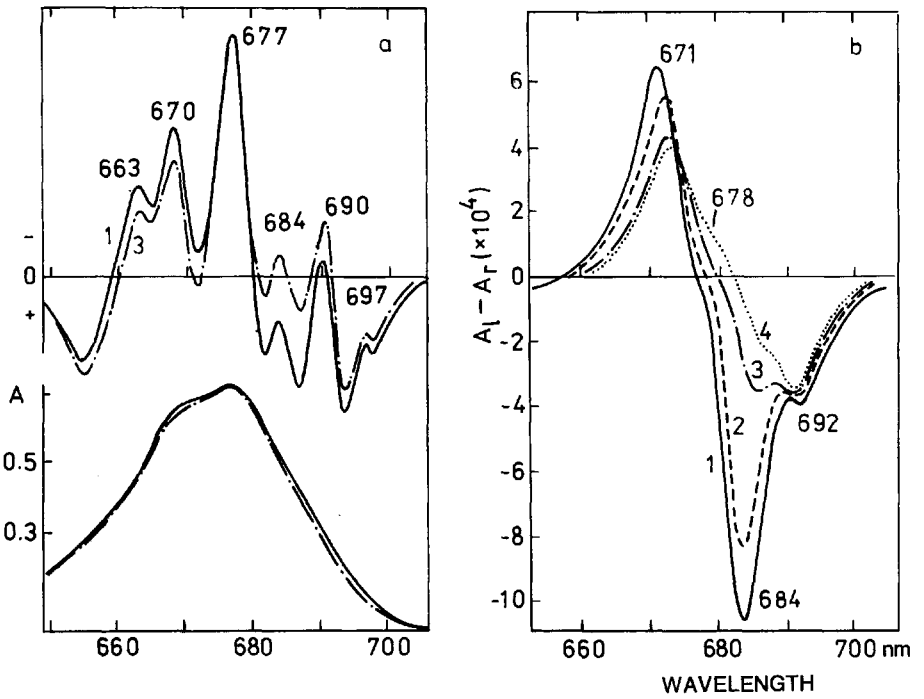


Figure 1. Absorption spectra and their second derivatives (a) and CD spectra (b) of CP1-140 (1), CP1-100 (2), CP-50 (3) and CP1-140 (4) at 77 K; CP1 isolated from maize.

rotational strength at 684 nm (without significant changes of the intensity of the band in the absorption spectrum). The observed deformation can be explained by a change of the ratio of CP1-RC and CP1-LH in the sample.

Thus, the removal of 60% of Chl from CP1-140 does not result in the disappearance of any bands in the electronic spectra of the Q transition of Chl and does not change the ratio between the intensities of the absorption bands. Moreover, the same set of spectral bands remains in the absorption spectra of PS1 particles with a Chl:P700 ratio of about 8–10 [18]. This fact is difficult to explain if one assumes that layer-to-layer removal of part of the antenna Chl from every complex leads to enrichment of CP1 by P700 [11]. Besides, this indicates a significant similarity of the spatial organization

of Chl molecules in CP1-RC and CP1-LH. The destruction of the spatial organization of interacting pigment molecules under the effect of Triton X-100 occurring in each type of CP1 complex thus represents a cooperative transition. We have shown the 'cooperativeness' of the same process for CP1-RC, measuring the time course of disappearance of the CD signals of Chl in CP1-40 treated with Triton X-100 [18], the $t_{1/2}$ of the process being about 3–4 h, and for CP1-LH under the same conditions (1–2 min). We can conclude that the two processes are independent. Due to the difference in the stability of the complexes against detergents it is possible to enrich them in P700 without separation of the protein characteristics of CP1-LH.

Since the amount of low molecular proteins (10–25 kDa) in the studied preparations is essentially less than that in highly purified CP1-RC [2], it is obvious that these proteins are absent in CP1-LH (Figure 2). These proteins seem to bring about a higher stability of Chl in CP1-RC against detergent as well as of the activity of P700.

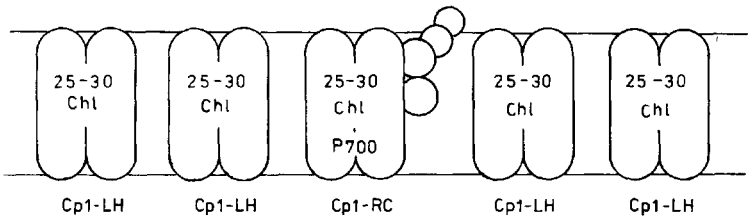


Figure 2. A scheme for the organization of CP1-RC and CP1-LH complexes in the thylakoid membrane.

The secondary structure of the 65 kDa protein was calculated from the CD spectra in the region 190–250 nm, presented in Figure 3. The shape of the spectra is independent of the Chl content and practically identical for CP1-140, CP1-100 and CP1-40. Accordingly, their secondary structures completely coincide (Table 2). Thus, Chl has no significant effect on the stability of the secondary structure of the CP1 protein. Pigments from the complexes could be removed by substituting detergent for them without protein conformational changes. The secondary structure of the 65 kDa protein is rather stable against SDS. A 3-hour incubation of CP1-50 with 0.1% SDS at 22–22 °C (detergent : protein : Chl = 150 : 10 : 1) resulted in destroying a considerable amount of pigments, but caused no significant changes in the secondary structure of the 65 kDa protein. Only a slight decrease of the proportion of the parallel β-structure from 0.24 to 0.18 was observed. The secondary structure of the CP1 complexes studied becomes similar to that of the CP1 isolated by SDS electrophoresis [9]. Even the disturbance of the

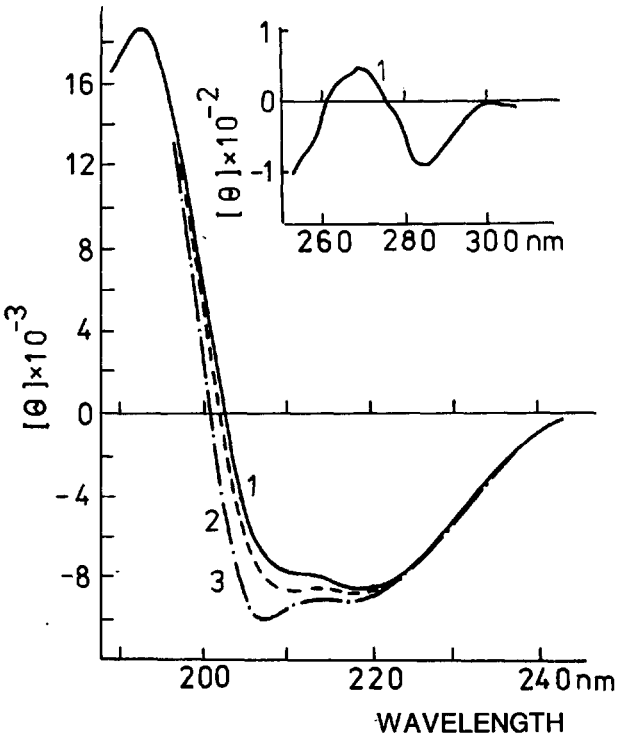


Figure 3. CD spectra of CP1-50 without additions (1) and after treatment with 0.1% SDS (2) or 1% SDS (3); 0.1 m Na-phosphate buffer, pH 7.0; CP1 isolated from maize.

quarternary structure and Chl solubilization with 1% SDS (5 h, 20–22 °C) failed to cause complete denaturation of the protein (Figure 2, Table 2).

The presence in CP1 of a significant amount of parallel β-structure indicates that the 65 kDa protein consists of parallel α/β domains. Thus, the structure of CP1 protein differs to a great extent from the bacteriorhodopsin structure, where α-helices predominate, as well as from water-soluble bacteriochlorophyll protein of green sulfur bacteria, where antiparallel β-layers predominate [14]. It is noteworthy that, when the secondary structure of the protein was calculated only on the basis of the shape of the CD spectra (without determining the molar ellipticity), the absence of β-structure in CP1 was suggested [12]. The observed qualitative correlation between the destruction of the parallel β-structure and the disturbance of the Chl organization by SDS allows us to suppose Chl molecules to be located in parallel β-bands.

Since the parallel α/β domains consist of 150–250 amino acid residues (from which 15–20% of the amino acids form β-layers [14]), we may expect that the 65 kDa protein consists of 2–3 such domains. In this case 12–13

Table 2. Secondary structure of CP1 protein with various content of antenna Chl (f, fraction of component); CP1 isolated from maize

Sample	$f_{\alpha\text{-helices}}$	$f_{\beta\text{-antiparallel}}$	$f_{\beta\text{-parallel}}$	$f_{\beta\text{-bends}}$	$f_{\text{irregular}}$	Root-mean-square error (degree · cm^2 · $dmol^{-1}$)
CP1-140	0.34	0	0.25	0.23	0.18	820
CP1-100	0.34	0.02	0.24	0.20	0.20	730
CP1-50	0.32	0.01	0.24	0.22	0.21	650
CP1-50 + 0.01% SDS	0.30	0.04	0.18	0.21	0.25	624
CP1-50 + 1% SDS	0.32	0.06	0.09	0.26	0.32	320
CP1-70 [9]	0.34	0.04	0.14	0.19	0.29	640

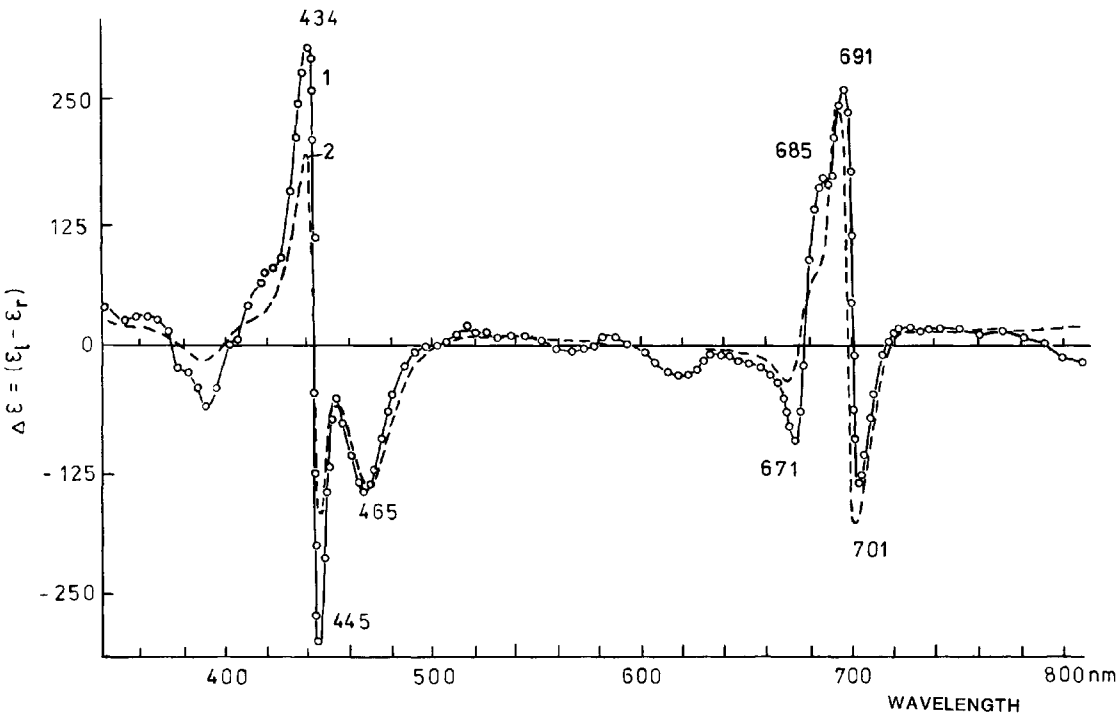


Figure 4. Light-induced (dark minus light) CD spectra of P700 in CP1-40, isolated from pea (2), and CP1-70, isolated from *Spirulina* (1); Tris HCl buffer, pH 8.0, 0.01 M Na-ascorbate, 10 μM methylviologen.

Chl molecules bound to the 65 kDa protein probably form clusters of 4–6 molecules in each domain. This estimate of the number of Chl molecules in each domain coincides with the number of the observed spectral bands. The similarity in the domain organization explains the degeneration of the structure in CP1-25.

In the light-induced CD spectra of P700 (Figure 4) besides intense bands at 690 and 700 nm, components of the dimer splitting of the Q_y transition [13, 17], and bands at 434 and 445 nm, components of the splitting of the Soret band, also broad bands of the cation radical of P700 appeared at 465 and 720–800 nm [17], as well as minor components at 663, 672, 677 and 685 nm [9, 18]. The coincidence of the positions of these minor bands with those of the main forms of antenna Chl indicates that the former are due to a change of the rotational strength of the antenna pigments that are nearest to P700. On oxidation of P700 the rotational strength of the (+) 672 nm band increases and that of the (+) 667 and (−) 684 nm bands decrease. It is possible that the 691 nm band in the light-induced CD spectra of P700 is due to a change of the rotational strength of antenna Chl absorbing at 692 nm. The same changes are also possible, if P700 forms a complex (aggregate) with 4–6 antenna Chl molecules. Thus, P700 may be considered as neither a dimer, nor a monomer, but it is part of a spatially organized group composed of 5–7 Chl molecules, which are located on one of the domains of the 65 kDa protein.

References

1. Anderson JM (1980) Biochim Biophys Acta 591:113–126
2. Bengis C and Nelson N (1977) J Biol Chem 252:4564–4569
3. Bolotina IA, Chekhov VO, Lugauskas VYu and Ptitsyn OB (1980) Mol Biol (USSR) 14:902–909
4. Bolotina IA, Chekhov VO, Lugauskas VYu and Ptitsyn OB (1981) Mol Biol (USSR) 15:167–175
5. Duysens LNM (1952) Doctoral thesis, University of Utrecht
6. Hiyama T and Ke B (1972) Biochim Biophys Acta 267:160–172
7. Ikegami I and Ke B (1984) Biochim Biophys Acta 764:70–79
8. Karapetyan NV, Litvin FF and Krasnovsky AA (1963) Biofizika (USSR) 8:191–200
9. Karapetyan NV, Shubin VV, Rakhimberdieva MG, Vashchenko RG and Bolychevtseva YuV (1984) FEBS Lett 173:209–212
10. Krasnovksy AA, Kosobutskaya LM and Voinovskaya KK (1953) DAN USSR 92: 1201–1204
11. Mullet JR, Burke JJ and Arntzen CJ (1980) Plant Physiol 65:814–822
12. Nabedryk E, Biaudet P, Darr S, Arntzen CJ and Breton J (1984) Biochim Biophys Acta 767:640–647
13. Philipson KD, Sato VL and Sauer K (1972) Biochemistry 11:4591–4595
14. Richardson JS (1981) In: Anfinsen CB, Edsall JT and Richards PM (eds) Advances in protein chemistry, pp. 167–337. New York: Academic Press
15. Scops RK (1974) Anal Biochem 59:277–282
16. Shiozawa JA, Alberte RS and Thornber JF (1974) Arch Biochem Biophys 165: 388–397

17. Shubin VV, Efimovskaya TV and Karapetyan NV (1981) J Phys Chem (USSR) 55: 2916–2921
18. Shubin VV, Vashchenko RG and Karapetyan NV (1985) Mol Biol (USSR) 19: 841–850
19. Thornber JP (1975) Annu Rev Plant Physiol 26:127–158
20. Vierling E and Alberte RS (1983) Plant Physiol 72:625–633

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
Том 21 1987 Вып. 3

УДК 557.344 : 577.311.342.3

АСКОРБАТ И ГЛЮТАТИОН — ВОЗМОЖНЫЕ ЭНДОГЕННЫЕ ДОНОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ ПРИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ ФЕРРЕДОКСИНА И NADP ХЛОРОПЛАСТАМИ

А. И. АРИСТАРХОВ, В. В. НИКАНДРОВ, В. К. ГИНС, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Определены условия, при которых аскорбат и глютатион с высокой эффективностью используются хлоропластами в качестве доноров электрона при фотовосстановлении ферредоксина и NADP. Обработанные диуроном хлоропласты в присутствии аскорбата и глютатиона, взятых в физиологических концентрациях (50 и 5 мМ соответственно), способны к фотовосстановлению ферредоксина со скоростью 70 мкмоль на 1/мг хлорофилла в 1 ч, которая сравнима со скоростью этой реакции, когда исходным донором электронов служат молекулы воды. Скорость фотовосстановления ферредоксина увеличивается в присутствии разобщителей фотофосфорилирования, с увеличением температуры и pH среды; реакция развивается в течение 10—20 мин после добавления аскорбата в реакционную среду. Непосредственным донором электронов для электронтранспортной цепи хлоропластов является аскорбат. Функция глютатиона сводится к поддержанию аскорбата в восстановленном состоянии и подавлению реакции окисления ферредоксина образующимся дегидроаскорбатом. 50 мМ аскорбат в присутствии ферредоксина и ферредоксин — $NADP^+$-редуктазы в аналогичных условиях также эффективно обеспечивает фотовосстановление $NADP^+$ хлоропластами. Предполагается, что пара аскорбат — глютатион служит пулом эндогенных доноров электронов, способным замещать ФС2 при фотовосстановлении ферредоксина и NADP хлоропластами в стрессовых условиях (например, при повышении температуры, увеличении pH среды или нарушении целостности тилакоидной мембраны). Обсуждается возможность участия аскорбата и глютатиона в циклическом транспорте электронов, связанном с ФС1.

В хлоропластах высших растений в летний период накапливаются аскорбат и глютатион в концентрациях 50—100 и 5 мМ соответственно [1—6]. Предполагается, что эти соединения необходимы в таком количестве для дезактивации в хлоропластах продуктов фотовосстановления кислорода: супероксидного и гидроксильного радикалов [7, 8], перекиси водорода [9, 10] и синглетного кислорода [8, 11]. Показано, что непосредственно взаимодействует с продуктами фотовосстановления кислорода аскорбат, а глютатион поддерживает аскорбат в восстановленном состоянии, взаимодействуя с дегидроаскорбатом либо с участием глютатионзависимой дегидроаскорбатредуктазы, либо в неэнзиматической реакции [12—16].

В литературе, однако, имеются данные об участии аскорбата совместно с рядом сульфгидрильных соединений в фотохимических реакциях хлоропластов в качестве донора электронов для цепи переноса электронов в хлоропластах. В нашей лаборатории было показано, что совместное добавление 50 мМ аскорбата и дитиотреита позволяет достичь высоких скоростей фотовосстановления метилвиологена и фотообразования водорода хлоропластами и субхлоропластными фрагментами [17]. Предполагалось, что дитиотреит поддерживает в восстановленном состоянии аскорбат, а комбинация доноров электронов, эффективно восстанавливая переносчики электронов, расположенные между ФС2 и ФС1, подавляет циклический транспорт электронов в ФС1. В работе Муаллем и

Принятые сокращения ФС1, ФС2 — фотосистемы 1 и 2, ТМФД — N,N,N′,N′-тетраметил-*п*-фенилендиамин дигидрохлорид.

Холла [18] было подтверждено предположение о том, что дитиотреит необходим для поддержания аскорбата в восстановленном состоянии. Розен и Красна [19] показали, что дитиотреит можно заменить другими реагентами, содержащими сульфгидрильную группу, такими, как цистеин, дитиоэритрит или тиогликолевая кислота. Эти данные указывают на то, что аскорбат и глютатион могут участвовать в качестве эндогенных доноров электронов в фотохимических реакциях хлоропластов.

Цель настоящей работы — исследование условий использования аскорбата совместно с глютатионом в качестве доноров электронов при фотовосстановлении ферредоксина и NADP хлоропластами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Хлоропласты выделяли из 10-дневных проростков гороха сорта Победитель. 100 г листьев измельчали в гомогенизаторе РТ-1 (5 периодов по 10 с) в 200 мл среды, содержащей 50 мМ буфер трицин-NaOH (pH 7,5), 300 мМ маннит, 25 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$. Профильтрованный через два слоя полотна гомогенат центрифугировали 5 мин при 3000 *g*. После промывания осадка хлоропластов средой выделения центрифугирование повторяли. Выделение проводили непосредственно перед измерениями.

Ферредоксин и ферредоксин — $NADP^+$-редуктаза были выделены из листьев гороха по методу Мухина и Гинс [20]. Все операции по выделению проводили при 4° С.

Окислительно-восстановительные превращения ферредоксина и NADP регистрировали по изменению оптической плотности при длинах волн 465 и 340 нм соответственно на спектрофотометре «Hitachi 356». Измерения проводили под лучом действующего света (выделяя водным фильтром и светофильтром КС-14 область излучения лампы накаливания 700 Вт с длиной волны >650 нм и интенсивностью 80 Дж/м^2). Фотоумножитель спектрофотометра был защищен светофильтром СЗС-22.

Фотовосстановление ферредоксина и NADP проводили в анаэробных условиях, которые создавали, продувая аргон через кварцевую кювету (1 см) с резиновой пробкой, а также ферментной системой, устраняющей свободный кислород (глюкозооксидаза с глюкозой и каталаза с этанолом). Концентрированную суспензию хлоропластов добавляли в кювету с помощью шприца после продувания.

При фотовосстановлении ферредоксина реакционная среда содержала: 50 мМ буфер HEPES-NaOH (pH 7,5, кроме специально оговоренных случаев), 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 30 мМ глюкозу, 1%-ный этанол, 0,3 мг/мл глюкозооксидазы, 0,2 мг/мл каталазы, 100 мкМ ферредоксина и хлоропласты с концентрацией хлорофилла 8 мкг/мл. Концентрация доноров электронов: аскорбат — 50 мМ, глютатион — 5 мМ.

При изучении фотовосстановления NADP добавляли 1 мМ NADP и насыщающее реакцию количество ферредоксин — $NADP^+$-редуктазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ ФЕРРЕДОКСИНА

Донор электронов — аскорбат. В согласии с предыдущими исследованиями [21, 22] при освещении суспензии хлоропластов в анаэробных условиях наблюдается фотовосстановление ферредоксина, которое полностью подавляется диуроном — ингибитором переноса электронов от ФС2 (рис. 1). Введение в реакционную среду аскорбата возвращает хлоропластам, обработанным диуроном, способность к фотовосстановлению ферредоксина (рис. 1).

С увеличением концентрации аскорбата скорость восстановления ферредоксина увеличивается и достигает насыщения при 50 мМ аскорбата (рис. 2).

Скорость восстановления ферредоксина зависит также от длительности инкубации хлоропластов с аскорбатом. При использовании 50 мМ

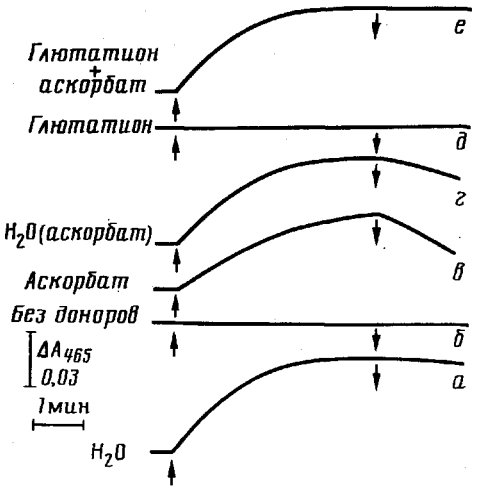


Рис. 1

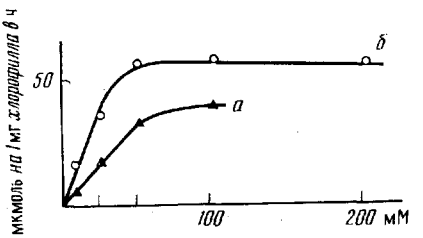


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые фотовосстановления ферредоксина, в отсутствие (*а, г*) и в присутствии диурона (*б, д, е*). Возле кривых указаны доноры электронов. Стрелки — включение и выключение света. Хлоропласты инкубировали перед освещением с донорами электронов 2 мин

Рис. 2. Зависимость скорости фотовосстановления ферредоксина от концентрации аскорбата в отсутствие (*а*) и в присутствии (*б*) глютатиона в концентрации 5 мМ. Хлоропласты инкубировали 10 мин

аскорбата для достижения максимального значения скорости реакции требуется 10—20 мин инкубации независимо от того, инкубировали хлоропласты в темноте или на свету (рис. 3).

Инкубация необработанных диуроном хлоропластов в течение 15 мин на свету в отсутствие аскорбата приводит к практически полному подавлению фотовосстановления ферредоксина (рис. 3, *б*).

Следует отметить, что при световой инкубации кювету с реакционной средой, содержащую суспензию хлоропластов, освещали до полного восстановления внесенного ферредоксина, регистрируя скорость реакции, затем окисляли ферредоксин введением небольшого количества воздуха в кювету, не прекращая освещения, и вновь регистрировали восстановление ферредоксина. Такую операцию проводили неоднократно в течение инкубации.

Максимальная скорость фотовосстановления ферредоксина обработанными диуроном хлоропластами в присутствии аскорбата несколько ниже, чем при использовании хлоропластов, необработанных диуроном (т. е. использующими в качестве донора электронов воду) (табл. 1). По-видимому, это связано с протеканием на свету обратного переноса электронов — окисления восстановленного ферредоксина образующимся в ходе фотореакции дегидроаскорбатом. Способность дегидроаскорбата

Таблица 1

Влияние аскорбата и глютатиона на скорость фотовосстановления ферредоксина хлоропластами и его темнового окисления (мкмоль на 1 мг хлорофилла в ч)

Экзогенные доноры электронов	Скорость фотовосстановления и темнового окисления (в скобках) ферредоксина	
	без диурона	в присутствии диурона
Без доноров электронов	42 (4)	0
Аскорбат	41 (10)	30 (21)
Глютатион	43 (3)	0
Аскорбат + глютатион	45 (2)	57 (1)

Примечание. Хлоропласты инкубировали в реакционной среде 5 мин до освещения.

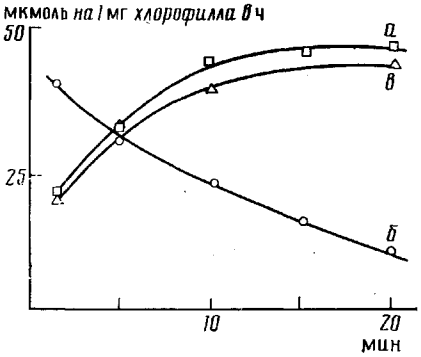


Рис. 3

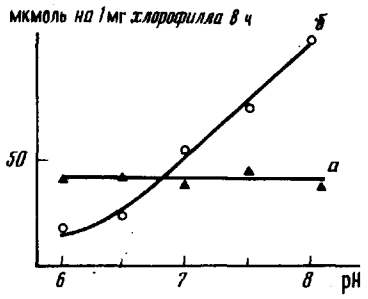


Рис. 4

Рис. 3. Влияние длительности световой (*а, б*) и темновой (*в*) инкубации хлоропластов на скорость фотовосстановления ферредоксина в отсутствие (*б*) или в присутствии 50 мМ аскорбата и 50 мкМ диурона (*а, в*). Концентрация ClCCP 20 мкМ

Рис. 4. Зависимость скорости фотовосстановления ферредоксина от pH в случае, когда донором электронов является вода (*а*) и пара — аскорбат (50 мМ) и глютатион (5 мМ) в присутствии 50 мкМ диурона (*б*). Темновая инкубация хлоропластов продолжалась 10 мин

окислять восстановленный ферредоксин была установлена ранее Нойманом и Дрехлером [22]. В наших опытах окисление восстановленного ферредоксина дегидроаскорбатом наблюдается в «чистом виде» после завершения освещения хлоропластов и приводит к обращению фотореакции (рис. 1, *в*).

Добавление 50 мМ аскорбата к хлоропластам, необработанным диуроном, практически не изменяет скорость фотовосстановления ферредоксина, но несколько увеличивает скорость его окисления после выключения света (рис. 1, *г*). По-видимому, это может быть следствием окисления восстановленного ферредоксина дегидроаскорбатом (присутствующим в коммерческом препарате аскорбата или образовавшимся в результате окисления аскорбата хлоропластами или же выделившимся в ходе фотореакции кислородом).

Доноры электронов — аскорбат и глютатион. Совместное использование аскорбата в концентрации 10—100 мМ и 5 мМ глютатиона в качестве доноров электронов для хлоропластов, обработанных диуроном, приводит к увеличению скорости фотовосстановления ферредоксина в 1,5—2,2 раза по сравнению со скоростью реакции, наблюдаемой в присутствии одного аскорбата (рис. 1, *е*, 2, табл. 1). При использовании 50 мМ аскорбата и 5 мМ глютатиона скорость фотовосстановления ферредоксина в 1,5 раза превышает скорость исследуемой реакции, осуществляемой хлоропластами, необработанными диуроном (табл. 1).

Активирующее действие глютатиона, по-видимому, не связано с его участием в реакции как донора электронов, непосредственно взаимодействующего с цепью переноса электронов в хлоропластах, а определяется его способностью восстанавливать дегидроаскорбат [5, 12, 14]. На это указывают следующие факты. Во-первых, в отсутствие аскорбата 5 мМ глютатион не способен поддерживать фотовосстановление ферредоксина обработанными диуроном хлоропластами (рис. 1, *д*, табл. 1). Во-вторых, присутствие глютатиона приводит к практически полному подавлению окисления восстановленного ферредоксина после окончания фотореакции (рис. 1, *е*, табл. 1).

Добавление 5 мМ глютатиона совместно с аскорбатом к хлоропластам, осуществляющим фотовосстановление ферредоксина при использовании в качестве донора электронов воды, практически не изменяет скорость реакции и лишь несколько уменьшает скорость окисления восстановленного ферредоксина в темноте (табл. 1).

Влияние pH реакционной среды. Скорость фотовосстановления ферредоксина обработанными диуроном хлоропластами в присутствии ас-

Таблица 2

Влияние разобщителя фотофосфорилирования NH_4Cl на фотовосстановление ферредоксина хлоропластами, инкубированными с донорами электронов в течение 2 или 20 мин (указано в скобках)

Добавки	Скорость фотовосстановления ферредоксина (мкмоль/мг хлорофилла в ч)	
	$-NH_4Cl$	$+NH_4Cl$
Аскорбат	17 (36)	30 (47)
Аскорбат + диурон	6 (13)	25 (45)
Аскорбат + глютатион	32 (38)	40 (45)
Аскорбат + глютатион + диурон	22 (22)	60 (70)

Примечание. Инкубацию хлоропластов с донорами электронов проводили до освещения при 20° С.

корбата и глютатиона увеличивается с ростом pH среды от 6 до 8 (рис. 4). Скорость этой реакции, сенсибилизированной хлоропластами, в которых донором электронов является вода, в этих интервалах pH существенно не изменяется. Следует отметить, что в этих опытах в реакционной среде присутствовал разобщитель фотофосфорилирования ClCCP, выравнивающий pH по обе стороны тилакоидной мембраны.

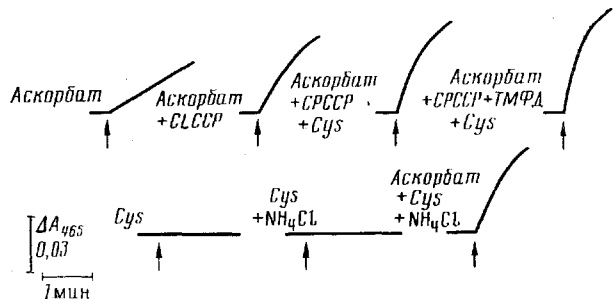


Рис. 5. Влияние разобщителей фотофосфорилирования на фотовосстановление ферредоксина в присутствии 50 мкМ диурона и различных доноров электронов (50 мМ аскорбат или 5 мМ цистеин), а также в присутствии 5 мМ NH_4Cl, 20 мкМ ClCCP, 0,1 мМ ТМФД. Темновая инкубация хлоропластов продолжалась 5 мин. Стрелки — включение света

Активация фотовосстановления ферредоксина с увеличением pH среды связана, по-видимому, с ростом донорной способности аскорбата, вызванным уменьшением его окислительно-восстановительного потенциала [23, 24]. Возможно, что с ростом pH улучшается также доступность для аскорбата переносчиков электронов, расположенных в тилакоидной мембране, или увеличивается проникающая способность аскорбата в тилакоидную мембрану. Кроме того, известно, что в щелочных условиях глютатион эффективнее восстанавливает дегидроаскорбат [14], что может выразиться в уменьшении скорости окисления восстановленного ферредоксина дегидроаскорбатом.

Влияние разобщителей фотофосфорилирования. Мы применили два известных разобщителя фотофосфорилирования — ClCCP и NH_4Cl. Действие их на фотовосстановление ферредоксина аскорбатом было сходным и приводило в обработанных диуроном хлоропластах к ускорению реакции в 3—5 раз независимо от присутствия в реакционной среде глютатиона или цистеина (табл. 2, рис. 5).

Возможны два объяснения этого явления, которые различаются по предполагаемому месту донирования аскорбата. Во-первых, аскорбат может взаимодействовать с пластохинонами, окисление которых является лимитирующей стадией переноса электронов в хлоропластах [25] и

сильно зависит от внутритилакоидного pH [26]. Когда под действием света pH внутри тилакоида снижается за счет работы цепи переноса электронов, скорость окисления пула пластохинонов уменьшается, что и является причиной замедления функционирования всей цепи [27]. Присутствие разобщителя фотофосфорилирования, выравнивающего pH по обе стороны тилакоидной мембраны, приводит к увеличению скорости окисления пластохинонов и тем самым может увеличить скорость фотовосстановления ферредоксина. Во-вторых, аскорбат может замещать пластохиноны в восстановлении компонентов комплекса цитохромов *b/f* и пластоцианина. В этом случае зависимость между pH внутри тилакоида и скоростью окисления аскорбата будет сходна с подобной зависимо-

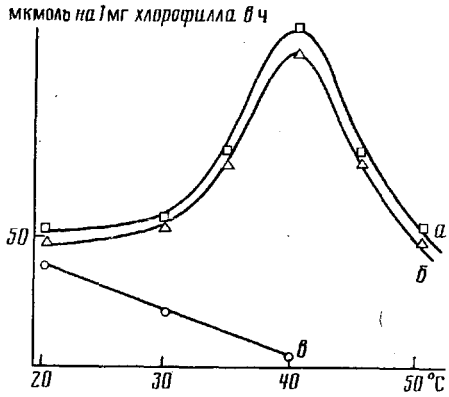


Рис. 6. Зависимость скорости фотовосстановления ферредоксина хлоропластами от температуры для различных доноров электронов: аскорбат (50 мМ) и глютатион (5 мМ) в присутствии 50 мкМ диурона (*а*); то же, но без диурона (*б*); вода (*в*). Темновая инкубация — 10 мин

стью для пластохинонов. Такое явление может быть также следствием сходства зависимостей от pH окислительно-восстановительных потенциалов аскорбата и пластохинона.

Разобщитель фотофосфорилирования, препятствуя смещению pH внутри тилакоидов в сторону более низких значений, может способствовать проявлению донорных свойств аскорбата, особенно заметных в щелочных условиях [23, 24].

В том случае, когда единственным донором электронов является глютатион или цистеин, введение в реакционную среду NH_4Cl не приводило к фотовосстановлению ферредоксина (рис. 4).

Влияние температуры. Увеличение температуры реакционной среды от 20 до 40° С приводит к почти полной потере хлоропластами способности к фотовосстановлению ферредоксина в отсутствие экзогенных доноров электронов (рис. 6). Это согласуется с хорошо известным фактом тепловой инактивации окисляющего воду комплекса ФС2 [21, 28, 29]. В присутствии аскорбата и глютатиона при использовании хлоропластов, как обработанных, так и необработанных диуроном, с увеличением температуры от 20 до 40° С скорость исследуемой реакции, напротив, существенно возрастает. Возможно, когда ФС2 инактивируется при повышении температуры, восстановление переносчиков электронов между ФС2 и ФС1 обеспечивается аскорбатом. Увеличение скорости исследуемой реакции указывает, по-видимому, на бóльшую проницаемость тилакоидной мембраны при повышенной температуре [30]. Дальнейший нагрев до 50° С приводит к падению скорости реакции, что согласуется с результатами по ингибированию фотовосстановления NADP и метилового красного ФС1 хлоропластов при 40—50° С ФС1 [21] и является, вероятно, следствием тепловой денатурации связанных акцепторов электронов в ФС1 [31].

Влияние ингибиторов переноса электронов. Как уже отмечалось, введение в реакционную среду, содержащую 50 мМ аскорбат, диурона — ингибитора переноса электронов от первичного акцептора ФС2 на пластохиноны — не только не устраняет, но и в отдельных случаях (в присутствии 5 мМ глютатиона) активирует реакцию фотовосстановления ферредоксина (табл. 1, 2). Другой ингибитор переноса электронов на уровне

пластоцианина — KCN — полностью подавляет исследуемую реакцию независимо от присутствия в реакционной среде экзогенных доноров электронов (данные не представлены). Это позволяет предположить, что аскорбат способен восстанавливать естественные переносчики электронов между ФС2 и ФС1.

Влияние условий освещения. Все описанные опыты проводили при интенсивности света, в 3 раза превосходящей насыщающую для реакции фотовосстановления ферредоксина хлоропластами в данных условиях. При уменьшении интенсивности света до 10% по сравнению с исходной интенсивностью скорость исследуемой реакции, сенсибилизированной необработанными диуроном хлоропластами при pH 7,5, становилась в 2 раза меньше, чем скорость исходной реакции. Скорость реакции, сенсибилизированной обработанными диуроном хлоропластами в присутствии 50 мМ аскорбата и 5 мМ глютатиона в тех же условиях, уменьшалась в той же степени. Этот факт позволяет заключить, что низкая освещенность не является условием более эффективного донирования электронов парой аскорбат — глютатион, чем донирования ФС2.

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ NADP

При освещении суспензии обработанных диуроном хлоропластов в присутствии аскорбата в концентрации 50 мМ, ферредоксина и ферредоксин — $NADP^+$-редуктазы наблюдается восстановление NADP со скоростью 60 мкмоль на 1 мг хлорофилла в 1 ч, что несколько превышает скорость этой реакции (55 мкмоль на 1 мг хлорофилла в 1 ч), сенсибилизированной хлоропластами, в которых донором электронов является вода (рис. 7).

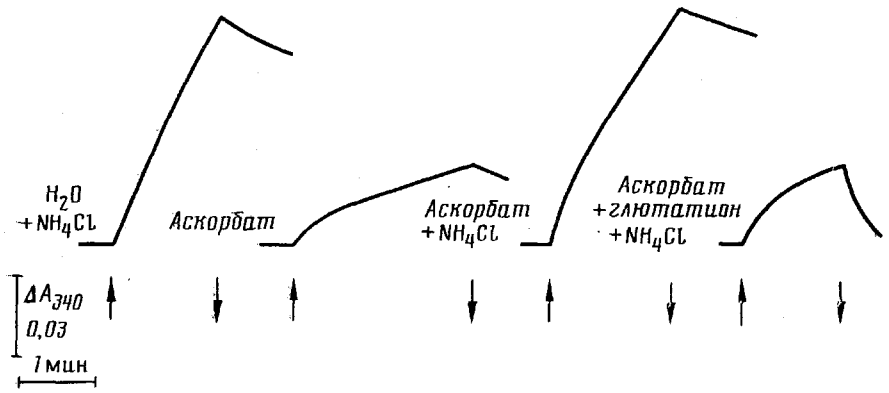


Рис. 7. Кинетические кривые фотовосстановления NADP хлоропластами для различных доноров электронов: аскорбат 50 мМ и глютатион 5 мМ. Концентрация NH_4Cl 5 мМ. Темновая инкубация продолжалась 10 мин. Стрелки — включение и выключение света. Ферредоксин — $NADP^+$-редуктазу вносили в насыщающем реакцию количестве

Необработанные диуроном хлоропласты при введении в реакционную среду 50 мМ аскорбата в аналогичных условиях незначительно снижают скорость фотовосстановления NADP до 45 мкмоль на 1 мг хлорофилла в 1 ч. Все перечисленные факты соответствуют данным, полученным при исследовании реакции фотовосстановления ферредоксина. И это не удивительно, так как ферредоксин является субстратом для вводимой в реакционную среду ферредоксин — $NADP^+$-редуктазы.

Однако реакции фотовосстановления ферредоксина и NADP различаются по эффекту присутствия в реакционной среде глютатиона. Глютатион в концентрации 10 мМ существенно уменьшает скорость фотовосстановления NADP хлоропластами в присутствии аскорбата (рис. 7). В 1977 г. Шедл и Бесшам [32] обнаружили $NADP^+$-зависимую глютатион-редуктазную активность в листьях шпината. Ингибирующее действие глютатиона на реакцию восстановления NADP, по-видимому, связано с

тем, что окисленный глютатион (коммерческие препараты глютатиона содержат ~1% окисленной формы) при действии фермента $NADP^+$-зависимой глютатионредуктазы, который присутствовал в хлоропластах или вносился с препаратами ферредоксин — $NADP^+$-редуктазы, окисляет образующийся под действием света NADPH. На это указывает увеличение скорости окисления фотовосстановленного NADPH после выключения света в присутствии глютатиона.

Таким образом, введение в суспензию хлоропластов аскорбата предотвращает подавление фотовосстановления NADP при прерывании потока электронов от воды и ФС2. При этом донором электронов становится аскорбат.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ряде фотопроцессов, осуществляемых фотосинтезирующими организмами, таких, как фотопоглощение кислорода (см. обзор [33]), фотовыделение водорода [34, 44] и фиксация азота (см. обзор [34]) предполагается использование эндогенных органических доноров электронов. Предполагали, что роль эндогенных доноров электронов могут играть глюкоза [36—39], NADPH [44], NADH [37, 40—43], органические кислоты [33].

Вопрос об участии аскорбата в фотохимических реакциях хлоропластов в качестве донора электронов рассматривали, начиная с работ Меллера [45], показавшего, что аскорбат активирует фотопоглощение кислорода хлоропластами. В последующих работах этот эффект был изучен и сделан вывод о способности аскорбата замещать воду в ФС2 [46—48]. Однако этот вывод был опровергнут в опытах с применением супероксиддисмутазы, в которых было установлено, что аскорбат активирует поглощение кислорода путем непосредственного взаимодействия с супероксидрадикалом [49, 50]. Было показано, что аскорбат не окисляется компонентами электронтранспортной цепи хлоропластов и становится донором электронов лишь в хлоропластах, имеющих разрушенную различными способами тилакоидную мембрану [51—54], стареющих [55] или прогретых при 40° С [3, 46].

К настоящему времени сложилось мнение, что аскорбат как донор электронов не способен обеспечить высокие скорости переноса электронов в хлоропластах вследствие его низкой проникающей способности в тилакоидную мембрану. Следует отметить, однако, что этот вывод сформировался на основании данных из приведенных выше работ, в которых аскорбат использовали в концентрации, не превышающей нескольких мМ.

В хлоропластах высших растений аскорбат накапливается в летний период [1]; содержание аскорбата становится сравнимым с содержанием хлорофилла [2], концентрация его в строме достигает 50 мМ [3, 6] — 75 мМ [4].

В настоящей работе мы применяли аскорбат в физиологической концентрации, что позволило определить условия, при которых аскорбат или аскорбат совместно с глютатионом эффективно используются хлоропластами в качестве доноров электронов при фотовосстановлении ферредоксина и NADP.

Тот факт, что присутствие в суспензии окисляющих воду хлоропластов 50 мМ аскорбата и 5 мМ глютатиона не влияет на скорость фотовосстановления ферредоксина (табл. 1), а также то, что при использовании одного аскорбата в качестве донора электронов образуется лишь незначительное количество дегидроаскорбата, указывает на неспособность аскорбата и глютатиона составить существенную конкуренцию ФС2 в восстановлении переносчиков электронов, расположенных между ФС2 и ФС1.

Аскорбат совместно с глютатионом может окисляться хлоропластами лишь после уменьшения скорости притока электронов от ФС2. В наших опытах это достигалось обработкой хлоропластов диуроном (рис. 1, табл. 1), прогреванием их при 30—40° С (рис. 6) или повышением pH

реакционной среды (рис. 4). Существенно, что в этих условиях хлоропласты осуществляли фотовосстановление ферредоксина и NADP со скоростью, сравнимой или превышающей скорость этих реакций, когда донором электронов являлась вода.

В реальных условиях «отключение» потока электронов от одного источника электронов — ФС2 (или воды) — и «включение» другого — аскорбата и глютатиона — возможно при обработке растений гербицидами (подобными диурону), повышении температуры окружающей среды, защелачивании внутрихлоропластной среды, нарушении целостности тилакоидной мембраны по различным причинам и др.

Рассматривая роль каждого компонента пары аскорбат — глютатион, необходимо отметить следующее. Глютатион не способен к непосредст-

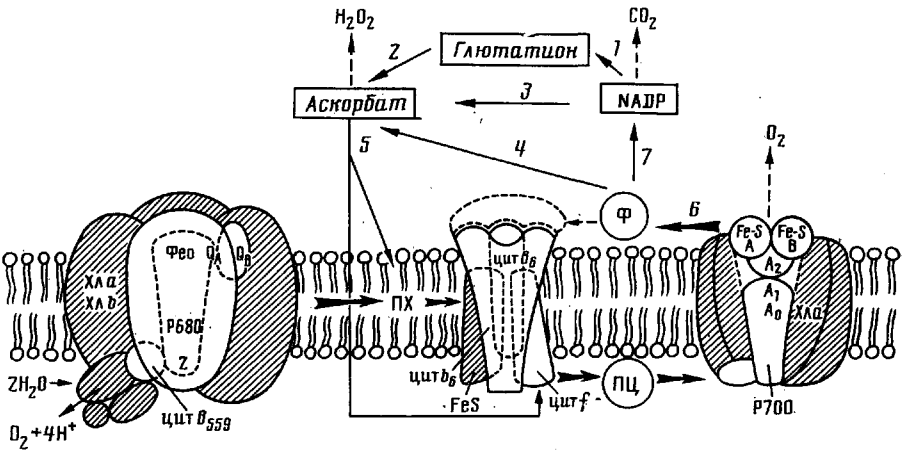


Рис. 8. Гипотетическая схема реакций циклического транспорта электронов в хлоропластах, протекающего с участием аскорбата и глютатиона. Введенные обозначения: Ф — ферредоксин, ПХ — пул пластохинонов, ПЦ — пластоцианин, P680 — реакционный центр ФС2, P700 — реакционный центр ФС1, A, A_0, A_1, A_2, B — комплекс первичных акцепторов ФС1

венному взаимодействию с цепью переноса электронов хлоропластов (см. табл. 1, 2) и необходим, по-видимому, для поддержания в восстановленном состоянии аскорбата. Глютатион может восстанавливать дегидроаскорбат либо в неэнзиматической реакции, идущей особенно интенсивно при высоких значениях pH среды, либо с участием фермента глютатионзависимой дегидроаскорбатредуктазы [12]. Восстанавливая дегидроаскорбат, образовавшийся в ходе фотореакции хлоропластов с аскорбатом, глютатион предотвращает тем самым обратный перенос электронов от ферредоксина на дегидроаскорбат.

Функцию глютатиона в паре аскорбат — глютатион может столь же успешно выполнять цистеин (рис. 5) и, по-видимому, некоторые другие природные соединения. Однако в интактных хлоропластах ведущая роль в восстановлении дегидроаскорбата принадлежит глютатиону [5].

Непосредственным донором электронов для цепи переноса электронов в хлоропластах является аскорбат. Действительно, в обработанных диуроном хлоропластах аскорбат способен обеспечивать фотовосстановление ферредоксина, однако, в отсутствие глютатиона скорость этой реакции снижена вследствие эффективной обратной реакции восстановленного ферредоксина с образующимся дегидроаскорбатом.

Ингибирование цианидом калия фотовосстановления ферредоксина хлоропластами в присутствии аскорбата свидетельствует о том, что аскорбат не взаимодействует непосредственно с P700, а восстанавливает компоненты цепи переноса электронов, расположенные между ФС1 и ФС2 (рис. 8). Имеются данные о способности аскорбата восстанавливать цитохром *f* [56]. Поскольку эти компоненты цепи переноса электронов находятся в тилакоидной мембране (пластохиноны, цитохромный комп-

лекс) или внутри тилакоида (пластоцианин), внесенному в реакционную среду аскорбату необходимо определенное время для установления контакта с ними. Действительно, в реакции фотовосстановления ферредоксина аскорбатом имеется индукционный период продолжительностью 10—15 мин, в течение которого скорость реакции увеличивается (см. рис. 3, табл. 2).

О достаточно эффективном взаимодействии аскорбата с компонентами цепи переноса электрона хлоропластов свидетельствует тот факт, что липофильный переносчик электронов — ТМФД увеличивает скорость фотовосстановления ферредоксина хлоропластами в присутствии 50 мМ аскорбата лишь в 1,5—2 раза.

Основываясь на данных, полученных в нашей работе, и данных других авторов, следует указать на возможность протекания в хлоропластах циклического транспорта электронов, связанного с ФС1, в котором участвуют ФС1, ферредоксин, ферредоксин — $NADP^+$-редуктаза, NADP, NAD(P)H-зависимая глютатион-редуктаза, NAD(P)H-зависимая монодегидроаскорбатредуктаза, глютатион, глютатионзависимая дегидроаскорбатредуктаза, аскорбат и компоненты цепи переноса электронов, расположенные между ФС2 и ФС1 (пластохиноны, цитохромный комплекс *b/f*, пластоцианин).

Как показано ранее [12], в хлоропластах NADPH восстанавливает окисленный глютатион при участии NADPH-зависимой глютатионредуктазы (рис. 8, реакция *1*). В свою очередь восстановленный глютатион либо в неэнзиматической реакции, либо с помощью глютатионзависимой дегидроаскорбатредуктазы восстанавливает дегидроаскорбат до аскорбата [15] (рис. 8, реакция *2*). Дегидроаскорбат может быть также восстановлен либо NADPH [13], либо ферредоксином [22] (рис. 8, реакции *4*, *5*). Кроме того, регенерация восстановленной формы аскорбата происходит при восстановлении монодегидроаскорбата от NADPH при участии NAD(P)H-зависимой монодегидроаскорбатредуктазы [57] (рис. 8, реакция *4*). И, как следует из настоящей работы, аскорбат в определенных условиях окисляется компонентами цепи переноса электронов, расположенными между ФС2 и ФС1 (рис. 8, реакция *5*), при фотовосстановлении ферредоксина и NADP (рис. 8, реакции *6*, *7*).

Такой циклический транспорт электронов, связанный с ФС1, возможен, по-видимому, в условиях пониженного притока электронов от ФС2 и при накоплении NADPH вследствие уменьшения скорости ассимиляции CO_2 (например, при недостатке CO_2). Так же, как и циклический транспорт электронов, медиатором которого является ферредоксин [58, 59], циклический транспорт электронов с участием аскорбата и глютатиона может, по-видимому, приводить к образованию АТР.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rabinovitch E. I.* In: Photosynthesis. Chemistry of photosynthesis, chemosynthesis and related processes *in vivo* and *in vitro*. 1945. V. 1. P. 269—271.
2. *Frank W., Heber U.*//Z. Naturforsch. 1964. 19b, S. 1146—1149.
3. *Gernardt B.*//Planta. 1964. V. 61. P. 101—129.
4. *Walker D. A.*//Methods Enzymol. 1971. V. 23. P. 211—220.
5. *Halliwell B.*//Prog. Biophys. Mol. Biol. 1978. V. 33. P. 1—54.
6. *Law M. Y., Charles S. A., Halliwell B.*//J. Biochem. 1983. V. 210. P. 899—9.
7. *Eickerbuch J. D., Beck E.*//FEBS Lett. 1973. V. 31. P. 225—231.
8. *Rabinovitch H. D., Fridovich I.*//Photochem. Photobiol. 1983. V. 37. P. 679—684.
9. *Groden D., Beck E.*//Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 546. P. 426—435.
10. *Jablonski P. P., Anderson J. W.*//Plant Physiol. 1982. V. 69. P. 1407—1413.
11. *Allen J. F.*//FEBS Lett. 1977. V. 84. P. 221—224.
12. *Foyer C. H., Halliwell B.*//Planta. 1976. V. 133. P. 21—23.
13. *Kow Y. W., Smyth D. A., Gibbs M.*//Plant Physiol. 1977. V. 69. P. 740—741.
14. *Foyer C. H., Halliwell B.*//Phytochemistry. 1977. V. 16. P. 1347—1350.
15. *Foyer C. H., Rowell J., Walker D.*//Planta. 1983. V. 157. P. 224—232.
16. *Hossain M. A., Nakomo Y., Assada K.*//Plant Cell Physiol. 1984. V. 25. P. 385—395.
17. *Аристархов А. И., Никандров В. В., Красновский А. А.* Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С. 1344—1355.
18. *Muallem A., Hall D. O.*//Plant Physiol. 1982. V. 69. P. 1116—1120.
19. *Rosen M. M., Krasna A. I.*//Photochem. Photobiol. 1980. V. 31. P. 259—265.
20. *Мухин Е. Н., Гинс В. К.*//Биохимия. 1972. Т. 37. С. 1012—1018.
21. *Katoh S., San Pietro A.*//Arch. Biochem. Biophys. 1967. V. 122. P. 144—152.

22. *Neumann J., Drechler Z.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 2070—2074.
23. *Ball E. G.*//J. Biol. Chem. 1937. V. 118. P. 219—235.
24. *Barsook H., Davenport H. W., Jeffreys C. E. P., Warner K. C.*//J. Biol. Chem. 1937. V. 117. P. 237—279.
25. *Witt H. T.*//Bioenergetics of Photosynthesis/Govinjee, ed. N. Y.: Acad. Press. 1975. P. 493—554.
26. *Remberg B., Seggel H.*//Naturwiss. 1969. B. 56. S. 130—132.
27. *Stichl H. H., Witt H. T.*//Z. Naturforsch. 1969. 24b. S. 1588—1598.
28. *Красновский А. А., Брин Г. П.*//Докл. АН СССР. 1968. Т. 179. С. 726—729.
29. *Yamashita T., Butler W. L.*//Plant Physiol. 1969. V. 44. P. 435—438.
30. *Гольдфельд М. Г.* и соавт.//Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 1143—1153.
31. *Koike H., Satch K., Katch S.*//Plant Cell Physiol. 1982. V. 23. P. 293—299.
32. *Schaedle M., Bassham J. A.*//Plant Physiol. 1977. V. 59. P. 1011—1012.
33. *Бекина Р. М., Гусейнова В. Е.*//Физиология растений. 1986. Т. 1. С. 171—184.
34. *Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* В кн.: Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука. 1981. С. 39—88.
35. *Мальцев С. В., Красновский А. А.*//Физиология растений. 1982. Т. 29. С. 951—958.
36. *Stuart T. S.*//Planta. 1972. V. 106. P. 91—100.
37. *Персанов В. М., Гоготов И. Н.*//Физиология растений. 1979. Т. 26. С. 560—567.
38. *Kessler I.*//Algae Physiology and Biochemistry/Stewart W. D. P. ed. Oxford: Blackwell, 1974. P. 456.
39. *Randt C., Senger H.*//Photoche. Photobiol. 1985. V. 42. P. 553—557.
40. *Ощепков В. П., Красновский А. А.*//Физиология растений. 1972. Т. 19. С. 1090—1097.
41. *Healey F. P.*//Plant Physiol. 1970. V. 45. P. 153—159.
42. *Ben-Amotz A., Gibbs M.*//Biochem. Biophys. Res. Communs. 1975. V. 64. P. 355—359.
43. *Godde P., Trelst A.*//Arch. Microbiol. 1980. V. 127. P. 169—176.
44. *Bennoun P.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4352—4356.
45. *Mehler A. N.*//Arch. Biophys. 1951. V. 34. P. 339—351.
46. *Böhme H., Trebst A.*//Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 180. P. 137—148.
47. *Ben-Hayyim G., Avron M.*//Eur. J. Biochem. 1970. V. 15. P. 155—160.
48. *Fracowiak B., Kaninca Z.*//Photosynthetica. 1973. V. 7. P. 28—33.
49. *Epel B. L., Neumann J.*//Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 325. P. 520—529.
50. *Allen J. F., Hall D. O.*//Biochem. Biophys. Res. Communs. 1973. V. 53. P. 579—585.
51. *Elstner E., Pietacus E., Böger P., Trebst A.*//Planta. 1968. V. 79. P. 146—161.
52. *Katoh S.*//Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 283. P. 293—301.
53. *Захаров Н. И.* и соавт.//Биофизика. 1982. Т. 27. С. 572—577.
54. *Marre E., Aricgoni O., Rassi G.*//Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 36. P. 56—64.
55. *Dodge A. D., Harris W., Morgan L. A.*//Phytochemistry. 1971. V. 11. P. 1681—1682.
56. *Horton P., Cramer W. A.*//Biochim. Biophys. Acta. 1974. V. 368. P. 348—360.
57. *Hossain M. A., Nakho Y., Assada K.*//Plant Cell Physiol. 1984. V. 25. P. 385—395.
58. *Arnon D. I., Chain R. K.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 4961—4965.
59. *Tsujimoto H. Y., Hijama T., Arnon D. I.*//Biochem. Biophys. Res. Communs. 1980. V. 93. P. 215—222.

Поступила в редакцию
26.XI.1986

ASCORBATE AND GLUTATHIONE AS POSSIBLE ENDOGENOUS ELECTRON DONORS IN PHOTOREDUCTION OF FERREDOXIN AND NADP BY CHLOROPLASTS

A. I. ARYSTARKHOV, V. V. NIKANDROV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The conditions for ascorbate and glutathione being efficient electron donor in the reaction of HADP and ferredoxin photoreduction by chloroplasts were determined. Chloroplasts treated with diurone in the presence of ascorbate and glutathione in physiological concentrations (50 mM and 5 mM, respectively) are capable to photoreduce ferredoxin at a rate of 70 μmol/mg Chl *a*. This rate is comparable with the rate of the same reaction where the initial electron donor is water molecules. The rate of ferredoxin photoreduction increases in the phosphorylation uncouplers, with higher temperature or higher pH. The reaction gradually develops after ascorbate addition for 10—12 mins. The direct electron donor for the electron transport chain of chloroplasts is ascorbate. The function of glutathione is to maintain ascorbate in the reduced state and, perhaps, to inhibit ferredoxin oxidation by dehydroascorbate formation. In the presence of ferredoxin and ferredoxin-NADP-reductase 50 mmolar ascorbate under the same conditions provides NADP photoreduction by chloroplasts with the same efficiency. The pair ascorbate-glutathione is supposed to serve as a pool of endogenous electron donors capable to replace PS-2 in the photoreduction of ferredoxin and NADP by chloroplasts under stress (at a rise of temperature, alkalinization of the medium, or the break of the thylakoid membrane). The possibility of ascorbate and glutathione participation in the cyclic electron transport around PS-1 is discussed.

БИОХИМИЯ
Т. 52, вып. 12 1987

УДК 577.23

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ДЛЯ АСКОРБАТА; ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПЛАСТОХИНОНОВ И ЦИТОХРОМА *f*

АРИСТАРХОВ А. И., НИКАНДРОВ В. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Инкубация хлоропластов с 50 мМ аскорбатом вызывает практически полное восстановление пластохинонов и приводит к связыванию аскорбата с тилакоидами в количестве 0,5±0,1 мг/мг хлорофилла. Хлоропласты, обработанные 0,5%-ным тритоном X-100 или 0,8%-ным дигитонином, связывают аскорбат в значительно меньших количествах: 0,2 и 0,05 мг/мг хлорофилла соответственно. Введение аскорбата в суспензию хлоропластов, освещаемых светом с длиной волны более 650 нм и обработанных диуроном или освещаемых дальним красным светом с длиной волны более 700 нм, приводит к появлению медленной компоненты в кинетике фотоиндуцированных изменений поглощения при 553 нм и вызывает темновое восстановление фотоокисленного цитохрома *f*, скорость которого зависит от концентрации аскорбата. Предполагается, что аскорбат способен диффундировать через тилакоидные мембраны и накапливаться во внутритилакоидном пространстве; в условиях, когда фотосистема II не способна к восстановлению переносчиков электронов, расположенных между фотосистемами I и II, аскорбат поддерживает их в восстановленном состоянии.

Известно, что в хлоропластах высших растений в летний период накапливается аскорбат в концентрации 50—100 мМ [1—4]. Предполагается, что он необходим хлоропластам для устранения активных продуктов восстановления кислорода — перекиси водорода, супероксидного и гидроксильного радикалов [5—9], которые образуются в процессе фотосинтеза. В то же время при таком высоком содержании аскорбата возможно его участие в фотохимических реакциях хлоропластов в качестве эндогенного донора электронов. На такую возможность указывает способность аскорбата в концентрации 50 мМ обеспечивать высокие скорости фотопереноса электронов через фотосистему I (ФСI) на метиловый красный [10], метиловиологен и фотообразования H_2 хлоропластами [11, 12]. Нами также было показано [13], что скорость фотовосстановления ферредоксина и NADP обработанными диуроном хлоропластами, когда непосредственным донором электронов является аскорбат, сравнима со скоростью этих реакций в том случае, когда донором электронов является вода, и что аскорбат, по-видимому, взаимодействует с переносчиками электронов, расположенными в электронтранспортной цепи между ФСII и ФСI.

Окислительно-восстановительный потенциал аскорбата при pH 7,0 составляет 0,054 В [14, 15], что указывает на возможность переноса электронов от аскорбата на компоненты электронтранспортной цепи хлоропластов — пластохинон А (E_0'=0,080 В [16]), цитохром b_{559} (E_0'=0,340 В [17]), цитохром *f* (E_0'=0,350 В [18]), *P*700 (E_0'=0,430 В [19]), пластоцианин (E_0'=0,370 В [20]).

Действительно, было показано восстановление аскорбатом изолированных из хлоропластов пластохинона [21], пластоцианина [22], а также *P*700 в хлорофилл-белковых комплексах ФСI [23].

Установлена способность аскорбата к восстановлению *Z*-переносчика электронов хиноновой природы, расположенного на донорной стороне ФСII [24]. Хортон и Крамер наблюдали в хлоропластах восстановление аскорбатом цитохрома *f*, окисленного феррицианидом [25]. Като показал, что аскорбат способен также восстанавливать цитохром *f*, окисленный на свету в присутствии диурона [26].

Взаимодействие аскорбата с переносчиком электронов Z и цитохромом f, расположенными на внутренней стороне тилакоидной мембраны, позволяет предположить, что тилакоидная мембрана проницаема для аскорбата. Однако этот вопрос не привлекал до настоящего времени внимания исследователей, хотя перенос аскорбата через внешнюю мембрану хлоропластов был изучен в работе Бека и соавт. [27].

Большое число работ посвящено изучению механизма транспорта аскорбата через искусственные мембраны [28—30] и мембраны животных клеток [31, 32—34]. Показано, что транспорт аскорбата через мембраны животных клеток осуществляется по активному механизму [31]. Однако в высоких концентрациях он может транспортироваться через мембраны клеток и искусственные мембраны посредством диффузии [33, 34].

Цель настоящей работы — исследование проницаемости тилакоидной мембраны для аскорбата и взаимодействия аскорбата с находящимися в тилакоидной мембране компонентами электронтранспортной цепи хлоропластов — пластохинонами и цитохромом f.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хлоропласты из листьев 10-дневных проростков гороха выделялись методом, описанным ранее [13].

Восстановление пластохинонов, находящихся в мембране хлоропластов, определяли по модифицированному методу Окаямы [16]. 5 мл суспензии хлоропластов, содержащей 50 мМ HEPES-NaOH-буфер, pH 7,5, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ диурон и 1 мг/мл хлорофилла, инкубировали в темноте 15 мин при перемешивании в присутствии 50 мМ аскорбата. В контроле суспензия инкубировалась без аскорбата. Далее проводили экстракцию пластохинонов двумя способами.

1. Суспензию быстро замораживали в круглодонной колбе при вращении в жидком азоте и лиофилизировали в течение 4 ч. Сухой порошок хлоропластов растирали в холодном петролейном эфире легких фракций (30—70°). Растирание проводили 3 раза, используя по 7 мл эфира. Экстракт собирали.

2. Суспензию хлоропластов центрифугировали 10 мин при 1000 g. Плотный «сухой» осадок растирали в стеклянном гомогенизаторе 3 раза в 7 мл петролейного эфира.

Экстракт из хлоропластов в петролейном эфире в обоих случаях промывали дважды в делительной воронке двойным объемом 95%-ного метанола и высушивали при 30° в роторном испарителе. Высушенный экстракт растворяли в 4 мл этанола. Часть раствора обрабатывали сухим порошком $NaBH_4$ для полного восстановления пластохинонов. Дифференциальный спектр — «окисленный» экстракт (экстракт без $NaBH_4$) минус «восстановленный» экстракт (экстракт+$NaHB_4$) — измеряли на спектрофотометре Perkin-Elmer-554 (США).

Фотоиндуцированные окислительно-восстановительные превращения цитохрома f определяли методом дифференциальной спектроскопии по двухволновой схеме на спектрофотометре Hitachi-356 (Япония). Длина волны измеряющего света 553 нм, опорная длина волны 540 нм. Измерения проводили под лучом действующего света, создаваемого лампой накаливания, выделяя водным фильтром, а также светофильтром КС-14 область с длиной волны более 650 нм и интенсивностью света $5 \cdot 10^5$ эрг/см^2, или светофильтром КС-19 — область с длиной волны более 700 нм и интенсивностью света $2 \cdot 10^5$ эрг/см^2. Фотоумножитель спектрофотометра защищался светофильтром СЗС-22.

Восстановление цитохрома f аскорбатом проводили в 1-см кварцевой кювете в анаэробных условиях при комнатной температуре. Реакционная среда содержала: 50 мМ HEPES-NaOH-буфер, pH 7,5, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ метилвиологен и 70 мкг/мл хлорофилла. Концентрация аскорбата (кроме особо указанных случаев) составляла 50 мМ.

Связывание тилакоидными мембранами аскорбата и других соединений оценивали путем их определения в «сухом» осадке подвергнутых осмотическому шоку хлоропластов после инкубирования их с испытуемым соединением. Для отделения хлоропластов от среды инкубации использовали метод ультрафильтрации малых объемов под действием силы тяжести. Хлоропласты подвергали осмотическому шоку, суспендируя в 5 мл среды, содержащей 25 мМ HEPES-NaOH-буфер, pH 7,5, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$. Аскорбат вносился вместе с 5 мМ дитиотреитом для устранения обнаруженного эффекта окисления аскорбата в растворе при освещении измеряющим ультрафиолетовым светом в спектрофотометре во время определения его концентрации. Концентрация хлорофилла в суспензии хлоропластов составляла 0,5 мг/мл. После 15-минутной инкубации в темноте 1 мл суспензии помещали в центрифужную пробирку специальной конструкции на закрепленный в ее середине на пластиковом основании фильтр Synpor № 6 с диаметром пор 0,4 мкм и центрифугировали 20 мин при 15 000 g в центрифуге К-24. После центрифугирования «сухой» осадок хлоропластов тщательно смывали с фильтра в 1 мл среды инкубации без испытуемого соединения. Наличие в суспензии испытуемого соединения определяли при регистрации с помощью спектрофотометра Perkin-Elmer-565 спектра поглощения суспензии или дифференциального спектра поглощения по отно-

шению к контрольной суспензии хлоропластов, в которую при инкубации не вносилось никаких добавок. Концентрации испытуемых соединений определялись по величине соответствующего максимума поглощения: аскорбат 260, феррицианид — 300 нм, декстран голубой, NADP-Na, ATP, NAD, NADH — 255 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Восстановление пластохинонов аскорбатом. Для изучения переноса электронов от аскорбата на пластохиноны в хлоропластах нами был использован метод определения окисленных пластохинонов в тилакоидной мембране, основанный на экстракции их петролейным эфиром из хлоропластов и последующей регистрации дифференциального спектра — «экстракт минус экстракт, содержащий полностью восстанавливающий пластохиноны боргидрид». Этот метод, по мнению Окаямы [16], позволяет установить степень окисленности пластохинонов в тилакоидной мембране.

Дифференциальный спектр экстракта хлоропластов, инкубированных без аскорбата (рис. 1, кривая *1*), имеет положительный максимум при 255 нм, плечо при 262 нм и отрицательный максимум при 290 нм и близок дифференциальным спектрам (окисленный минус восстановленный) изолированных пластохинонов А [35] и В [36].

Инкубация хлоропластов в течение 15 мин в темноте в присутствии 50 мМ аскорбата приводит к практически полному исчезновению в дифференциальном спектре максимума при 255 нм (рис. 1, кривая *3*), что указывает на полное восстановление пластохинонов А и В. Этот результат получается независимо от того, как проводилась экстракция — растиранием в петролейном эфире сухого порошка лиофилизированных хлоропластов или осадка, полученного после центрифугирования суспензии хлоропластов.

Дифференциальный спектр экстракта инкубированных с аскорбатом хлоропластов (без $NaBH_4$ минус с $NaBH_4$) с положительным максимумом при 294 нм (рис. 1, кривая *3*) совпадает с дифференциальным спектром (окисленный минус восстановленный) очищенного препарата пластохинона С [37]. Это свидетельствует о том, что пластохинон С в хлоропластах, по-видимому, не полностью восстанавливается аскорбатом или окисляется при экстракции.

Для того чтобы устранить вероятность восстановления пластохинонов аскорбатом в процессе их экстрагирования, хлоропласты после инкубации с аскорбатом отмывались дважды средой инкубации без аскорбата. При этом аскорбат полностью вымывался из хлоропластов (данные не представлены). При сравнении дифференциальных спектров, показанных на рис. 1 (кривые *1* и *2*), видно, что отсутствие аскорбата в суспензии инкубированных с аскорбатом хлоропластов в момент экстракции приводит к уменьшению количества восстановленных форм пластохинонов в экстракте в ~ 2 раза. Это может быть обусловлено процессами темнового окисления пластохинонов в отсутствие достаточных количеств восстановителей в среде, содержащей промытые хлоропласты. Данные процессы приводят к установлению равновесия между окисленными и восстановленными формами пластохинонов в темноте [38, 39], которое регистрируется при экстракции.

Восстановление цитохрома *f* аскорбатом. При освещении суспензии хлоропластов ближним красным светом с длиной волны более 650 нм наблюдается уменьшение поглощения при 553 нм (по отношению к поглощению в области 540 нм), в кинетике которого имеются быстрая и медленная компоненты (рис. 2, кривая *1*). Быстрая компонента фотоиндуцированных изменений поглощения отражает фотоокисление цитохрома *f*. На это указывает совпадение зависимости величины быстрой компоненты от длины волны измеряющего света (рис. 3), со спектром α-полосы дифференциального спектра «восстановленный минус окисленный» выделенного из хлоропластов цитохрома *f* [40].

Наличие медленной компоненты может быть связано с окислением группы цитохромов *f*, пространственно удаленных от пластоцианина и

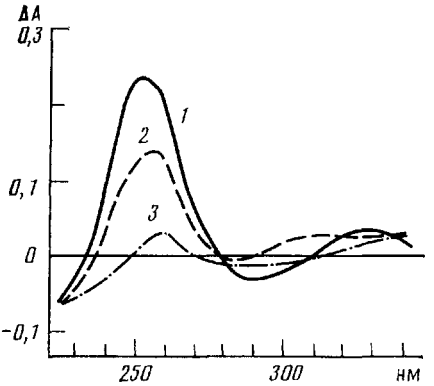


Рис. 1. Дифференциальные спектры экстрактов из хлоропластов («экстракт без $NaBH_4$ минус экстракт, восстановленный $NaBH_4$»). *1* — хлоропласты инкубированы 15 мин в отсутствие аскорбата, *2* — хлоропласты промыты после инкубации с аскорбатом, *3* — инкубированы в присутствии 50 мМ аскорбата. Условия эксперимента см. в разделе «Методы исследования»

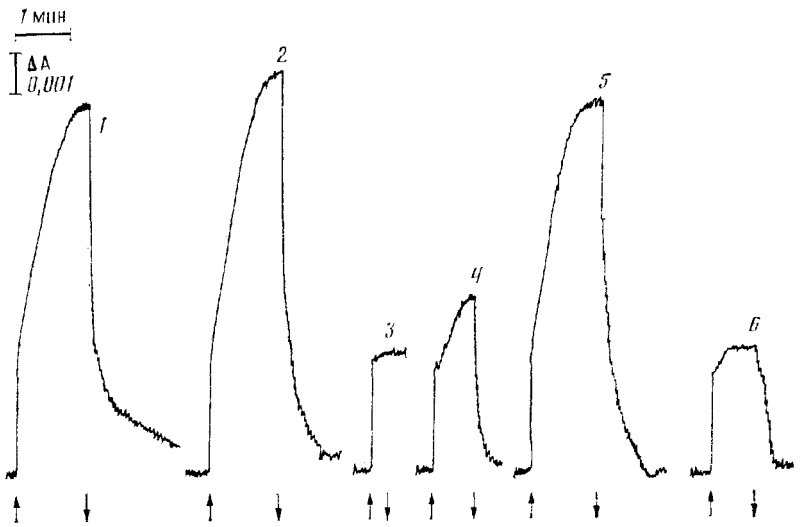


Рис. 2. Фотоиндуцированные изменения поглощения при 553 нм хлоропластов, освещенных светом с длиной волны более 650 нм, в отсутствие (*1*) и в присутствии (*2—6*) аскорбата. Хлоропласты обрабатывали 10 мкМ диуроном (*3—6*) и освещали непосредственно после добавления аскорбата (*3*) или после инкубации с ним в течение 5 мин (*4*), 20 мин (*2, 5, 6*), в присутствии 10 мкМ ClCCP (*6*). Реакционная среда содержала: 50 мМ HEPES-NaOH-буфер, pH 7,5, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ метилвиологен и 70 мкг/мл хлорофилла. Стрелками отмечены включение и выключение действующего света

ФСI, присутствие которых в хлоропластах предполагают Хортон и Крамер [25]. Вклад в фотоиндуцированное медленное изменение поглощения при 553 нм могут дать также окислительно-восстановительные превращения других цитохромов: b_{559}, c_{550}, а также P 700, электрохромный сдвиг поглощения пигментов и светорассеяние [41]. Неоднозначность причин, вызывающих подобные изменения, отражается, по-видимому, в отсутствие четко выраженных максимумов в зависимости амплитуды медленной компоненты от длины волны измеряющего света в области 540—570 нм и в частичном подавлении медленной компоненты валиномицином в присутствии калия.

При выключении ближнего красного света наблюдается возрастание поглощения при 553 нм до исходного уровня, указывающее на восстановление цитохрома f (рис. 2, кривая *1*).

Введение в реакционную среду 50 мМ аскорбата не отражается на кинетике фотоиндуцированного изменения поглощения при 553 нм хлоропластов, освещенных ближним красным светом, и вызывает лишь небольшое ускорение возрастания поглощения при 553 нм в темноте (рис. 2, кривая *2*).

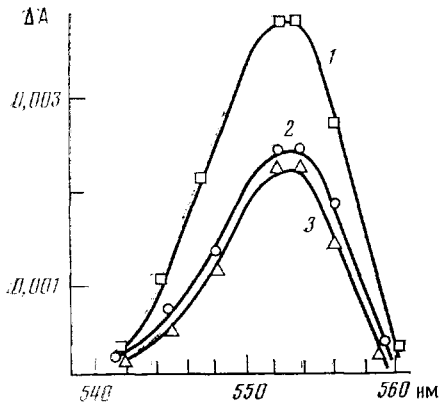


Рис. 3

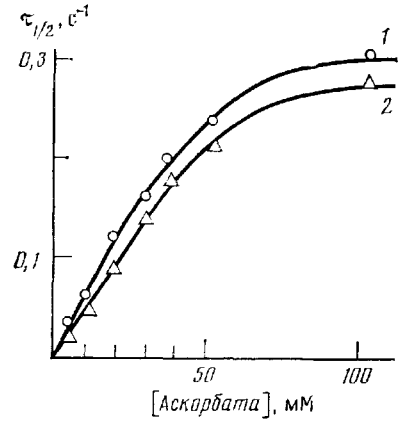


Рис. 5

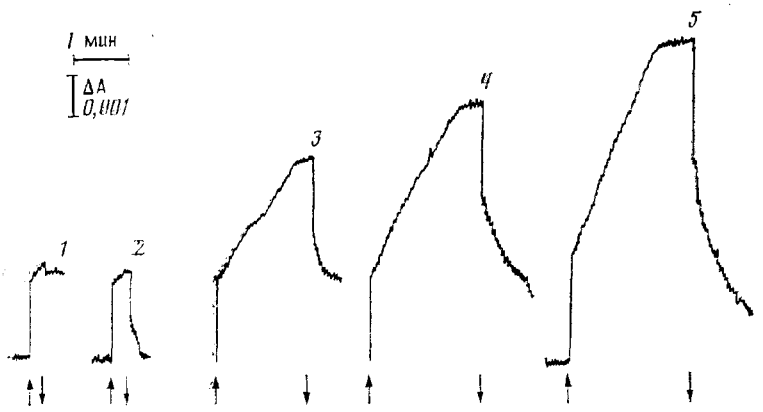


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость амплитуды быстрой компоненты фотоиндуцированных изменений поглощения хлоропластов от длины волны измеряющего света. Опорная длина волны 540 нм. Изменения поглощения регистрировали при освещении ближним красным светом (длина волны более 650 нм) (*1*), дальним красным светом (длина волны более 700 нм) (*2*), а также после выключения действующего света (более 700 нм) (*3*). Состав реакционной среды указан в подписи к рис. 2. Концентрация аскорбата 50 мМ

Рис. 4. Фотоиндуцированные изменения поглощения при 553 нм хлоропластов, освещенных светом с длиной волны более 700 нм, в отсутствие (*1*) или в присутствии (*2*—*5*) 50 мМ аскорбата. Хлоропласты инкубировали с аскорбатом до освещения 2 мин (*2*), 5 мин (*3*), 10 мин (*4*), 15 мин (*5*). Состав реакционной среды указан в подписи к рис. 2. Стрелками отмечены включение и выключение действующего света

Рис. 5. Зависимость $1/\tau_{1/2}$ восстановления фотоокисленного цитохрома *f* от концентрации аскорбата. Суспензия хлоропластов освещалась ближним красным светом (длина волны более 650 нм) (*1*) и дальним красным светом (длина волны более 700 нм) (*2*). Состав реакционной среды указан в подписи к рис. 2

Иная картина наблюдается при действии аскорбата на хлоропласты, освещенные дальним красным светом (с длиной волны более 700 нм), или на хлоропласты, освещенные ближним красным светом, но обработанные диуроном. Кинетика фотоиндуцированных изменений поглощения при 553 нм таких хлоропластов в отсутствие аскорбата характеризуется быстрым уменьшением поглощения, необратимым после выключения действующего света, что отражает стабильность уровня фотоокисления цитохрома *f* (рис. 2, кривая *3* и рис. 4, кривая *1*). Эти наблюдения согласуются с результатами других авторов [25, 26, 42] и являются следствием того, что у хлоропластов, освещенных дальним красным светом, так же как у хлоропластов, обработанных диуроном, функционирует ФСI, осуществляющая окисление цитохрома *f*, и не функционирует

ФСII, обеспечивающая фотовосстановление компонентов электронтранспортной цепи, расположенных между ФСI и ФСII, в том числе цитохрома *f*.

Введение в суспензию 50 мМ аскорбата возвращает хлоропластам, обработанным диуроном, и хлоропластам, освещенным дальним красным светом, способность к восстановлению фотоокисленного цитохрома *f*. На это указывает тот факт, что в присутствии 50 мМ аскорбата в реакционной среде прекращение освещения таких хлоропластов приводит к возрастанию поглощения в области 540—570 нм (рис. 3) до исходного уровня, максимально выраженному при 553 нм (рис. 2 и 4).

Инкубация хлоропластов, обработанных диуроном или освещаемых дальним красным светом, с аскорбатом приводит также к появлению медленной компоненты в кинетике фотоиндуцированных изменений поглощения при 553 нм (рис. 2, кривые *4*, *5*, и рис. 4, кривые *2*—*5*). При увеличении времени инкубации обработанных диуроном хлоропластов с аскорбатом амплитуда медленной компоненты возрастает, и после 20 мин инкубации кинетическая кривая фотоиндуцированного изменения поглощения при 553 нм совпадает с аналогичной кривой изменения поглощения хлоропластов, не обработанных диуроном (рис. 2, кривая *5*). Скорость и амплитуда фотоиндуцированного изменения поглощения при 553 нм у хлоропластов, освещаемых дальним красным светом и инкубированных 15 мин с 50 мМ аскорбатом, несколько меньше (рис. 4, кривая *5*), что, по-видимому, определяется меньшей интенсивностью действующего света.

При кратковременном освещении (5 с) в кинетической кривой фотоиндуцированных изменений поглощения при 553 нм у инкубированных с аскорбатом хлоропластов, которые были обработаны диуроном или освещались дальним красным светом, так же как и у «контрольных» (не обработанных диуроном, освещаемых ближним красным светом в отсутствие аскорбата) хлоропластов, преобладает быстрая компонента, отражающая окислительно-восстановительные превращения цитохрома *f*. Увеличение концентрации аскорбата в суспензии хлоропластов в этом случае приводит к увеличению скорости послесветового возрастания поглощения при 553 нм, отражающего восстановление цитохрома. Как видно из зависимости $\tau_{1/2}$ увеличения поглощения при 553 нм от концентрации аскорбата, скорость восстановления цитохрома *f* аскорбатом достигает максимального значения при 50—100 мМ аскорбата (рис. 5). Существенно, что при этих концентрациях аскорбата скорость восстановления цитохрома *f* близка скорости восстановления цитохрома *f* в «контрольных» хлоропластах (рис. 4). Следует отметить, что цитохром *f* полностью восстанавливается, хотя и с невысокой скоростью, уже при концентрации аскорбата 10 мМ.

Введение в реакционную среду, содержащую аскорбат, протонофора ClCCP или ионофора валиномицина в присутствии ионов калия вызывает подавление медленной компоненты фотоиндуцированного изменения поглощения при 553 нм у хлоропластов, освещаемых ближним красным светом и обработанных диуроном (рис. 2, кривая *6*), и у хлоропластов, освещаемых дальним красным светом, в той же степени, что и у «контрольных» хлоропластов (данные не представлены).

Эти факты свидетельствуют о том, что аскорбат способен замещать ФСII в восстановлении переносчиков электронов, расположенных между ФСII и ФСI, и восстанавливать цитохром *f* столь же эффективно, как это осуществляет ФСII через посредство пластохинонов.

Проницаемость тилакоидной мембраны хлоропластов для аскорбата. Для того чтобы определить, проницаемы ли тилакоидные мембраны для аскорбата, хлоропласты, инкубированные с 50 мМ аскорбата, отделяли от инкубационной среды при использовании метода ультрафильтрации под действием силы тяжести (см. раздел «Методы исследования»). «Сухой» осадок хлоропластов суспендировали для определения количества аскорбата, связавшегося с тилакоидными структурами, по поглощению в области 260 нм. Поскольку с аскорбатом инкубировались хлоропласты

с нарушенной внешней оболочкой, тилакоидные мембраны были доступны для аскорбата.

При концентрации хлорофилла в суспензии 0,5 мг/мл в осадке хлоропластов обнаруживается 3±0,4% аскорбата, находившегося в среде инкубации, что соответствует связыванию аскорбата с тилакоидными мембранами в соотношении 0,5±0,1 мг/мл хлорофилла.

Связывание аскорбата и некоторых соединений тилакоидными мембранами хлоропластов

Соединение	Содержание в тилакоидах, %	Соединение	Содержание в тилакоидах, %
Аскорбат	3	NAD	0,3
Декстран голубой	0	NADP	0,2
Феррицианид	0	ATP	0,3
NADH	0		

Примечание. Содержание испытуемого соединения в инкубационной среде принято за 100%. Среда инкубации содержала: HEPES-NaOH-буфер, pH 7,5, 35 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мг/мл хлорофилла. Концентрация испытуемых соединений составляла: аскорбат — 50 мМ (вместе с дитиотреитолом 5 мМ), феррицианид — 50 мМ, декстран голубой (M_r 2 000 000) — 5 мкМ, NADP-Na — 25 мМ, NADH — 25 мМ, NAD — 25 мМ, ATP — 25 мМ.

Мы оценили в тех же условиях способность некоторых других природных соединений, а также феррицианида и декстрана голубого ($M_r = 10^6$) к связыванию с тилакоидами. Как видно из результатов, представленных в таблице, NAD, NADP и ATP связываются с тилакоидами в ~10 раз менее эффективно, чем аскорбат. NADH, феррицианид и декстран голубой в осадке хлоропластов, отделенном от среды инкубации, не были обнаружены.

Тот факт, что феррицианид [43] и декстран голубой, которые не способны проникать через тилакоидную мембрану, в отличие от аскорбата не связываются с тилакоидами, позволяет сделать предположение о способности аскорбата проникать в тилакоидную мембрану и(или) во внутритилакоидное пространство.

Для проверки этого предположения мы обработали хлоропласты перед инкубацией с аскорбатом детергентами, вызывающими перфорацию мембран тилакоидов. Действительно, содержание аскорбата, связавшегося с осадком хлоропластов, в пересчете на хлорофилл уменьшалась при обработке 0,2%-ным дигитонином в 2 раза, 0,8%-ным дигитонином — в 9 раз и 0,5%-ным тритоном X-100 — в 3 раза. Это говорит о том, что основная часть связанного тилакоидными структурами аскорбата, по-видимому, находится в мембране или во внутритилакоидном пространстве.

Для выяснения вопроса об обратимости связывания аскорбата с тилакоидными структурами хлоропластов были проведены две последовательные операции. Вначале хлоропласты, суспендированные с 50 мМ аскорбатом, отделялись фильтрованием от инкубационной среды и ресуспендировались в среде без аскорбата. Затем полученная суспензия вновь фильтровалась и осадок хлоропластов ресуспендировался в среде без аскорбата. Таким образом, инкубированные с аскорбатом хлоропласты были промыты средой инкубации без аскорбата. Если аскорбат обратимо связывается с тилакоидными структурами, то при подобной процедуре он может быть обнаружен во втором фильтрате. Действительно, аскорбат найден во втором фильтрате в той же концентрации, что и в суспензии хлоропластов после первого фильтрования. В ресуспендированном осадке после второго фильтрования аскорбат не обнаружен. По-видимому, за время второго фильтрования (20 мин) аскорбат способен десорбировать с тилакоидной мембраны или выйти из внутритилакоидного пространства.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отмеченный выше факт накопления аскорбата в хлоропластах высших растений в концентрации 50—100 мМ [1—4], а также способность 50 мМ аскорбата как донора электронов поддерживать эффективное фотовосстановление ферредоксина и NADH в хлоропластах [13] позволяют предположить взаимодействие аскорбата с переносчиками электронов, расположенными между ФСII и ФСI в хлоропластах. Результаты настоящей работы показывают, что аскорбат способен эффективно восстанавливать находящиеся в тилакоидной мембране пластохиноны и цитохром *f*.

По сравнению с ФСII, восстанавливающей 40—60% пластохинонов [37], и NADPH, инкубация хлоропластов с которым приводит к восстановлению не более 20% пластохинонов [38], 50 мМ аскорбат практически полностью восстанавливает пластохиноны А и В (рис. 1), которые составляют основную часть фонда пластохинонов в хлоропластах [44].

Фотоокисленный цитохром *f* восстанавливается 50 мМ аскорбатом с такой же скоростью и амплитудой, как ФСII (рис. 2). Существенно, что в присутствии 50 мМ аскорбата кинетика фотоиндуцированных изменений поглощения при 553 нм в хлоропластах, в которых блокирована ФСII, близка кинетике фотоиндуцированных изменений поглощения при 553 нм в хлоропластах, в которых функционируют ФСI и ФСII. Этот факт, по-видимому, указывает на способность аскорбата восстанавливать все компоненты цепи переноса электронов от пластохинонов до ФСI.

Таким образом, можно предположить, что 50 мМ аскорбат поддерживает в восстановленном состоянии пул пластохинонов и связанные с ним переносчики электронов в хлоропластах столь же эффективно, как это осуществляет на свету ФСII.

Поскольку пластохиноны связаны с гидрофобной областью тилакоидной мембраны, а N конец белковой части цитохрома *f*, с которым связан гем, обращен во внутритилакоидное пространство [45], аскорбату для контакта с этими переносчиками электронов необходимо проникнуть в тилакоидную мембрану и(или) во внутреннее пространство тилакоида.

Известна способность аскорбата диффундировать через мембраны животных клеток [30—33] и внутренние мембраны митохондрий [46]. Для объяснения восстановления аскорбатом переносчика электронов, расположенного на донорной части ФСII, было предположено, что аскорбат проникает через тилакоидные мембраны хлоропластов [24].

В наших опытах показано, что инкубация хлоропластов с 50 мМ аскорбатом приводит к связыванию аскорбата с тилакоидами в соотношении $0{,}5 \pm 0{,}1$ мг аскорбата на 1 мг хлорофилла. Основываясь на установленной в работе Бенша и соавт. [47] способности аниона аскорбата образовывать ионные связи с белками, этот результат можно было бы объяснить связыванием аскорбата с белками тилакоидной мембраны. Однако в нашей работе получен ряд фактов, указывающих на то, что связывание аскорбата с тилакоидными мембранами происходит в результате проникновения аскорбата во внутритилакоидное пространство. Показана способность аскорбата к восстановлению цитохрома *f*. Обработка хлоропластов детергентами, приводящая к перфорации тилакоидов, значительно уменьшает количество связанного аскорбата. Дополнительным свидетельством в пользу этого предположения является совпадение опытных данных о количестве связанного с хлоропластами аскорбата с расчетными, основанными на допущении, что при инкубации хлоропластов с аскорбатом происходит выравнивание концентрации аскорбата в реакционной среде и во внутритилакоидном пространстве. Действительно, при объеме внутритилакоидного пространства 50 мкл/мг хлорофилла (по данным Ротенберга и соавт. [48], полученным при осмотических условиях реакционной среды, близких к используемым в нашей работе) и концентрации аскорбата во внутритилакоидном пространстве 50 мМ количество аскорбата, связанного с тилакоидами, будет составлять 0,49 мг/мг хлорофилла. Выравнивание концентраций аскор-

бата в реакционной среде и во внутритилакоидном пространстве в данных условиях, по-видимому, происходит за 15—20 мин. На это указывает тот факт, что хлоропласты теряют связанный аскорбат за 20 мин, а также то, что для достижения максимального восстановления фотоокисленного цитохрома *f* необходимо инкубировать хлоропласты с аскорбатом 15—20 мин.

Полученные данные позволяют предположить, что находящийся в хлоропластах растений аскорбат способен проникать во внутритилакоидное пространство и эффективно восстанавливать переносчики электронов, которые включены в электронтранспортную цепь между ФСII и ФСI, что может обеспечивать фотовосстановление ферредоксина и NADP при снижении скорости переноса электронов через ФСII.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rabinovitch E. I.*//Photosynthesis. Chemistry of Photosynthesis, chemosynthesis and related processes *in vitro* and *in vivo*. 1945. V. 1. P. 269—271.
2. *Frank W., Heber U.*//Z. Naturforsch. 1964. B. 19b. S. 1146—1149.
3. *Gerhardt B.*//Planta. 1964. V. 61. P. 101—129.
4. *Walker M.*//Methods in Enzymology/Ed. San Pietro A. L.: Acad. Press, 1971. V. 23. P. 211—220.
5. *Jblonskj P. P., Anderson J. W.*//Plant Physiol. 1962. V. 69. P. 1407—1413.
6. *Eickerbusch J. D., Beck E.*//FEBS Letters. 1973. V. 31. P. 225—231.
7. *Foyer C. H., Halliwell B.*//Planta. 1976. V. 133. P. 21—23.
8. *Groden D., Beck E.*//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 546. P. 426—435.
9. *Rabinovitch H. D., Fridovich I.*//Photochem. photobiol. 1983. V. 37. P. 679—684.
10. *Аристархов А. И., Никандров В. В., Красновский А. А.*//Молекуляр. биология. 1986. Т. 5. С. 1344—1356.
11. *Krasnovsky A. A., Chan Van Ni, Nikandrov V. V., Brin G. P.*//Plant Physiol. 1980. V. 69. P. 925—930.
12. *Muallem A., Hall D. O.*//Plant Physiol. 1982. V. 69. P. 1116—1120.
13. *Аристархов А. И., Никандров В. В., Гинс В. К., Красновский А. А.*//Молекуляр. биология. 1987. Т. 3.
14. *Ball E. G.*//J. Biol. Chem. 1937. V. 118. P. 219—235.
15. *Barsook H., Davenport H. W., Jeffreys C. E. P., Warner V. C.*//J. Biol. Chem. 1937. V. 117. P. 237—279.
16. *Okayama Sh.*//Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 440. P. 331—336.
17. *Rich P. R., Bendall D. S.*//Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 591. P. 153—161.
18. *Davenport H. E., Hill R.*//Proc. Roy. Soc. (London). Ser. B. 1952. V. 139. P. 327—335.
19. *Clanton R. K.*//The Chlorophylls/Eds Vernon L. P., Seely G. R. N. Y.: Acad. Press, 1966. P. 609.
20. *Katoh S., Shiratorj I., Takamiya A.*//J. Biochem. 1962. V. 51. P. 32—45.
21. *Okayama Sh., Okayama S., Chiba Y.*/Plant Cell Physiol. 1967. V. 8. P. 475—482.
22. *Wood P. M.*//Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 357. P. 370—379.
23. *Захарова Н. И., Шубин В. В., Бухов Н. Г., Карапетян Н. В.*//Биофизика. 1982. Т. 27. С. 572—577.
24. *Yerkes C. T., Babcock G. T.*//Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 590. P. 360—372.
25. *Horton P., Cramer W. A.*//Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 368. P. 348—360.
26. *Katoh S.*//Plant Cell Physiol. 1977. V. 18. P. 893—906.
27. *Beck E., Burkert A., Hofmann M.*//Plant Physiol. 1983. V. 73. P. 41—45.
28. *McConnell H.*//Biochemistry. 1971. V. 10. P. 1111—1120.
29. *Strittmorttes H., Sapper H., Paul H.-H., Lohmann W.*//Biophys. Struct. und Mech. 1981. V. 7. P. 325—330.
30. *Lohmann W., Winzenburg J.*//Z. Naturforsch. 1983. B. 38. S. 923—925.
31. *Халмурадов А. Г., Тоцкий В. Н.*//Укр. биохим. журн. 1982. Т. 54. С. 96—107.
32. *Hammarstrom L.*//Acta Physiol. Scand. 1966. V. 70. Suppl. 289. P. 1—83.
33. *Hughnes R. E., Morton S. C.*//Brit. J. Haematol. 1968. V. 14. P. 247—253.
34. *Spector R., Lorenzo A. V.*//Amer. J. Physiol. 1973. V. 25. P. 757—763.
35. *Redfearn E. R., Friend J.*//Phytochemistry. 1962. V. 1. P. 147—151.
36. *Henninger M. D., Barr R., Crane F. L.*//Plant Physiol. 1966. V. 41. P. 696—700.
37. *Henninger M. D., Crane F. L.*//Plant Physiol. 1964. V. 42. P. 1246—1252.
38. *Crane F. L., Ehrlich B., Kegel L. P.*//Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1960. V. 3. P. 37—40.
39. *Fried J., Redfearn E. R.*//Phytochemistry. 1963. V. 2. P. 397—405.
40. *Cramer W. A., Whitmarsh J.*//Annu. Rev. Plant Physiol. 1977. V. 28. P. 131—172.
41. *Bouqes-Bocquet B.*//Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 462. P. 362—370.
42. *Мажорова Л. Е., Пшенова К. В., Мутускин А. А.*//Биохимия. 1979. Т. 44. С. 2005—2012.
43. *Bangham A. D.*//Ann. Rev. Biochem. 1972. V. 41. P. 765—773.
44. *Willey D. I., Auttret A. D., Gray J. C.*//Cell. 1984. V. 36. P. 555—562.
45. *Barr R., Henninger M. D., Crane F. L.*//Plant Physiol. 1967. V. 42. P. 1246—1254.
46. *Ingebretsen O. C., Normann P. T.*//Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 684. P. 21—26.

47. *Bensch K., Kaerner O., Lohmann W.*//Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1981. V. 101. P. 312—316.
48. *Rottenberg T., Grunwald T., Avron M.*//Europ. J. Biochem. 1972. V. 25. P. 54—63.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
13.I.1987

PERMEABILITY OF CHLOROPLAST THYLAKOID MEMBRANE FOR ASCORBATE; REDUCTION OF PLASTOQUINONES AND CYTOCHROME *f*

ARISTARKHOV A. I., NIKANDROV V. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Incubation of chloroplasts with 50 mM ascorbate results in a nearly complete reduction of plastoquinones and in ascorbate binding to the thylakoids (0.5 ± 0.1 mg/mg Chl). The chloroplasts treated with 0.5% Triton X-100 or with 0.8% digitonin bind markedly smaller amounts of ascorbate (0.2 mg/mg Chl and 0.05 mg/mg Chl, respectively). Ascorbate was introduced into chloroplast suspensions illuminated with a 650 nm wavelength light with subsequent treatment with diurone or with the far-red light at wavelengths >700 nm. This procedure caused the appearance of a slow component in the kinetics of the photo-induced changes at 553 nm and the dark reduction of the photo-oxidized cytochrome *f*. The rate of the latter is dependent on ascorbate concentration. It is assumed that ascorbate penetrates inside thylakoid membranes and is accumulated in the inner thylakoid space. When photosystem II is unable to reduce the electron carriers located between photosystems I and II; these carriers are sustained in the reduced state by ascorbate.

Доклады Академии наук СССР
1987. Том 295, № 1

УДК 577.117

БИОХИМИЯ

В.Я. БЫХОВСКИЙ, Н.И. ЗАЙЦЕВА, М.Г. ШАПОШНИКОВА,
Ю.В. БАЛНОКИН, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОРФИРИНОВ ВОДОРОСЛЬЮ DUNALIELLA MARITIMA В ПРИСУТСТВИИ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Изучение регуляции биогенеза тетрапиррольных соединений в растительных и животных организмах показало, что уровень их накопления в значительной степени зависит от активности ферментных систем, катализирующих образование 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК), которая является общим предшественником данной группы пигментов (см. обзор [1]). В связи с этим вызывают интерес работы по образованию порфиринов в присутствии экзогенной 5-АЛК. Оказалось, что обработка этим соединением листьев высших растений приводила к накоплению в темноте целого ряда предшественников хлорофилла – протопорфирина IX, метилового эфира Mg-протопорфирина и протохлорофиллида, обусловливающих последующий фотодинамический эффект, связанный с фотогербицидным действием [2].

Значительно меньше данных о влиянии 5-АЛК на накопление порфиринов водорослями. Было установлено, что добавление 5-АЛК к зеленой водоросли Chlorella не оказывало какого-либо влияния на накопление тетрапиррольных пигментов [3], тогда как одноклеточные красные водоросли Cyanidium caldarium при выращивании с 5-АЛК экскретировали в среду ряд порфиринов, представленных уропорфирином III, копропорфирином III и протопорфирином IX [4]. Эти данные привлекли внимание в связи с возникшими в последнее время перспективами широкого использования порфиринов.

В данной работе обнаружено образование порфиринов из 5-АЛК зеленой водорослью рода Dunaliella, отдельные виды которого являются эффективными продуцентами глицерина и β-каротина [5].

В работе использовали водоросль D. maritima Massjuk (штамм 18 коллекции Института ботаники Академии наук УССР). Культуру выращивали на минеральной среде при непрерывном продувании воздухом с CO_2 и освещении белым светом (15 000 л) в течение 16 ч в сутки [6]. Спектры поглощения внутриклеточных пигментов измеряли на спектрофотометре "Perkin–Elmer 554" после осаждения клеток на мембранный фильтр "Сынпор-3" с диаметром пор 1,5 мкм [7], а спектры фильтрата культуральной среды – после центрифугирования суспензии водорослей (10 мин, 10 000 g). Хлорофилл определяли по Арнону. Внеклеточные порфирины экстрагировали этилацетатом с последующим извлечением 1,5 N HCl. Метиловые эфиры порфиринов, полученные по методу Фолка, хроматографировали на Silufol UV-254 в системе растворителей: бензол–этилацетат–метанол (85 : 13,5 : 1,5) и гексан–$н$-пропанол–метанол (5 : 2 : 1) [8].

Опыты проводили с 7-суточной культурой D. maritima, выращенной в указанном выше режиме. По окончании культивирования суспензию разливали разными порциями в колбы, причем в половину образцов добавляли 5-АЛК из расчета 5 мг на 100 мл суспензии. Образцы выдерживали в течение 3-х суток при 30 °С при непрерывном освещении белым светом (9000 лк) или в темноте.

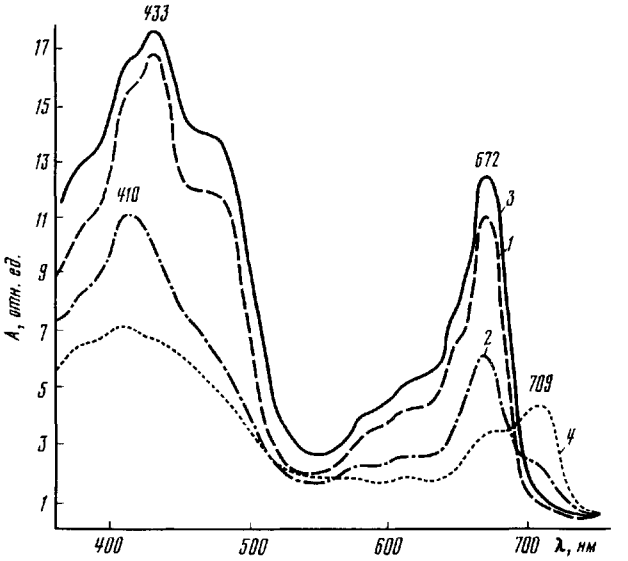


Рис. 1. Спектры поглощения внутриклеточных пигментов D. maritima после экспозиции на свету (*1, 3*) или в темноте (*2, 4*). *1, 2* – после 3 дней экспозиции; *3, 4* – после 20 дней экспозиции. Спектр проб с 5-АЛК и без 5-АЛК совпадают

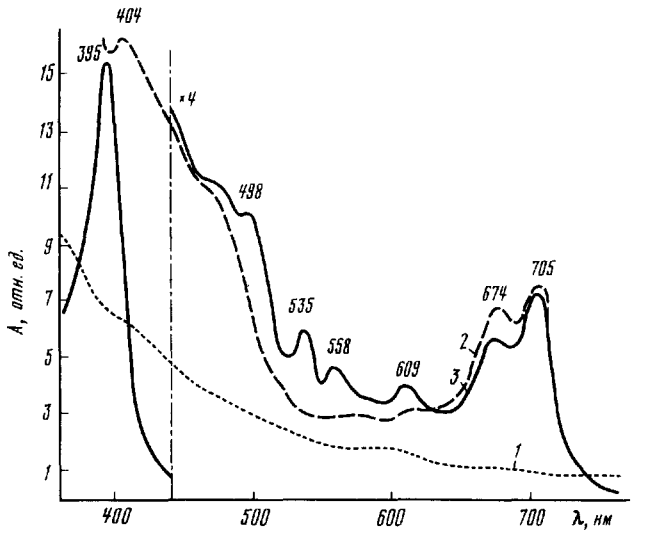


Рис. 2. Спектры поглощения культуральной среды после 3 дней экспозиции водорослей: *1* – на свету (спектры проб с 5-АЛК и без 5-АЛК совпадают), *2* – в темноте без 5-АЛК, *3* – в темноте с 5-АЛК

На рис. 1 представлены спектры поглощения клеток водорослей после инкубирования с 5-АЛК и без нее. Обращает на себя внимание тот факт, что различия в спектрах поглощения проявляются лишь между световым и темновым вариантом опыта, а не связаны с присутствием 5-АЛК в пробах. В световых пробах нет разницы и в содержании хлорофилла. В темноте количество хлорофилла уменьшается, очевидно, за счет образования продукта его разрушения – феофитина, о чем свидетельствует появление характерных максимумов в длинноволновой области спектра и в

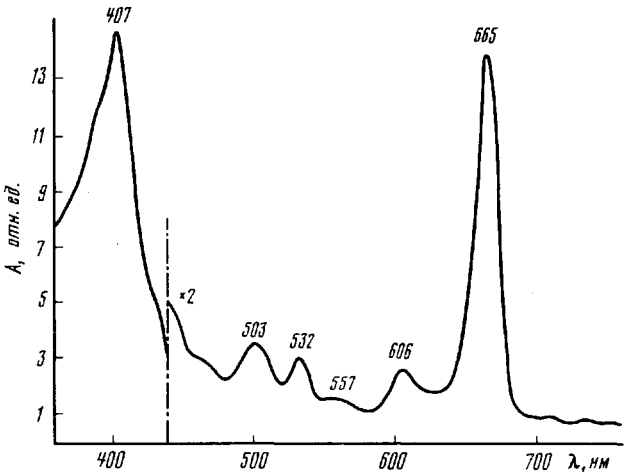


Рис. 3. Спектр поглощения феофитина, выделенного из культуральной среды после 20 дней экспозиции водорослей в темноте с 5-АЛК (в диэтиловом эфире)

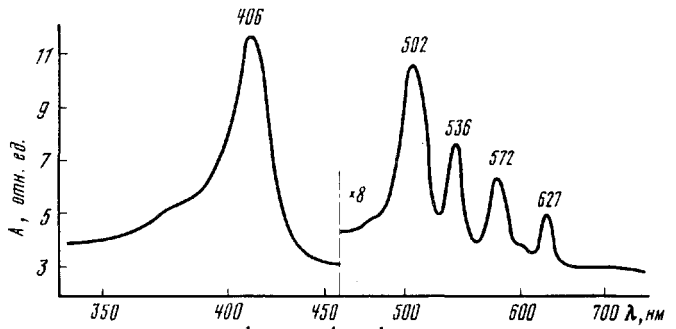


Рис. 4. Спектр поглощения метилового эфира уропорфирина, выделенного из культуральной среды после 3 дней экспозиции водорослей в темноте с 5-АЛК (в хлороформе)

полосе Соре. Начальные этапы этого процесса наблюдали ранее по спектрам низкотемпературной флуоресценции [9]. После 20 дней экспозиции все изменения становятся более выраженными.

В спектрах поглощения культуральной среды световых вариантов также нет различий между пробами, содержащими и не содержащими 5-АЛК, даже после 20 дней экспозиции. В темновом варианте опыта спектр поглощения проб без 5-АЛК представлен агрегированными формами хлорофилла и феофитина, а в спектрах проб с 5-АЛК отчетливо проявляются дополнительные максимумы, характерные для порфиринов – предшественников гема и хлорофилла (рис. 2). После длительной экспозиции в темноте как с 5-АЛК, так и без 5-АЛК практически весь хлорофилл превращается в феофитин, который легко экстрагируется из среды диэтиловым эфиром. Спектр экстракта соответствует стандартному спектру поглощения феофитина (рис. 3). Накапливающийся в присутствии 5-АЛК порфирин не экстрагировался диэтиловым эфиром, что свидетельствует о его поликарбоксильной природе. Порфирин можно было выделить экстракцией этилацетатом с последующим переводом в 1,5 *N* HCl. Спектр поглощения метилового эфира очищенного пигмента имел максимумы, характерные для изомеров уропорфирина (рис. 4). На хроматограмме положение полос порфирина, выделенного из культуральной

среды, и стандарта уропорфирина совпадало. Выявлена количественная зависимость накопления уропорфирина суспензиями клеток водорослей в темноте от концентрации добавленной 5-АЛК

Концентрация 5-АЛК мг/100 мл	0	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
Уропорфирин, мкг/л	нет	199	1200	1620	2250	3850

Таким образом, было показано, что в условиях развития культуры D. maritima при освещении добавление 5-АЛК не оказывало влияния на биосинтез хлорофилла и предшествующих ему тетрапиррольных пигментов. Возможно, клеточная плазмалемма этой водоросли непроницаема для 5-АЛК, однако не следует исключать возможности регуляции биосинтеза тетрапирролов на уровне АЛК-дегидратазы – фермента, катализирующего образование порфобилиногена из 5-АЛК.

Значительно больший интерес представляет накопление в суспензии водорослей уропорфирина, наблюдаемое в темноте лишь в присутствии 5-АЛК. В высших растениях в подобных условиях накапливаются главным образом более близкие предшественники хлорофилла, одноклеточные красные водоросли C. caldarium накапливали в клетках и выделяли в культуральную среду ряд порфиринов, а зеленые одноклеточные водоросли Chlorella вообще не использовали экзогенную 5-АЛК. Накопление и выделение в среду только уропорфирина отличает D. maritima от других водорослей. Этот феномен, вероятнее всего, связан со спецификой строения клеток водоросли, лишенных целлюлозной оболочки и окруженных тонкой плазматической мембраной. По-видимому, в темновых условиях происходит изменение проницаемости плазмалеммы, что приводит к вовлечению 5-АЛК в цепь начальных этапов биосинтеза хлорофилла. В этих условиях экзогенная 5-АЛК подвергается воздействию АЛК-дегидратазы, представляющей собой наиболее стабильный фермент тетрапиррольного метаболизма. Образующийся под действием АЛК-дегидратазы порфобилиноген конденсируется с образованием смеси изомеров уропорфириногена, окисляющихся растворенным кислородом до уропорфиринов. Известно, что окисленные порфирины, вплоть до стадии образования протопорфирина IX, не могут служить субстратами биосинтеза тетрапирролов. Поэтому образующиеся в среде изомеры уропорфирина не подвергаются дальнейшим превращениям. Именно этим обстоятельством можно объяснить отсутствие в культуральной среде и в клетках водоросли других тетрапиррольных соединений.

В заключение следует отметить, что обнаруженный путь накопления внеклеточных порфиринов D. maritima в присутствии 5-АЛК, отличающий эту водоросль от других, ранее исследованных растений, свидетельствует о многообразии путей образования тетрапиррольных пигментов из экзогенных предшественников.

Институт биохимии им. А.Н. Баха
Академии наук СССР
Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
15 XII 1986

ЛИТЕРАТУРА

1. *Быховский В.Я., Зайцева Н.И., Полулях О.В.* – Микробиологический синтез порфиринов. М., 1985. 52 с. 2. *Rebeiz C.A., Montaizer-Zouhoor A., Hopen H.J., Wu S.M.* – Enzyme Microb. Technol., 1984, vol. 6, № 9, p. 390–401. 3. *Beale S.I.* – Plant Physiol., 1971, vol. 48, № 3, p. 316–319. 4. *Troxler R.F., Bogorad L.* – Plant Physiol., 1966, vol. 41, № 3, p. 491–499. 5. *Ben-Amotz A., Avron M.* – Ann. Rev. Microbiol., 1983, vol. 37, p. 97–119. 6. *Балнокин Ю.В., Медведев А.В., Бондар И.В.* – Физиол., раст., 1983, т. 30, вып. 5, с. 955–963. 7. *Лебедев Н.Н., Пакшина Е.В., Шиффел П., Красновский А.А.* – Биохимия, 1986, т. 51, вып. 1, с. 33–38. 8. *Быховский В.Я., Жилина Т.Н., Зайцева Н.И.* – Прикл. биохим. и микробиол., 1983, т. 19, № 5, с. 579–589. 9. *Лебедев Н.Н., Шапошникова М.Г., Красновский А.А.* – Биофизика, 1986, т. 31, вып. 2, с. 382–383.

БИОХИМИЯ
Т. 52, вып. 4 1987

УДК 577.152.1

АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БЛИЖНЕГО УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ВОДОРОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ CLOSTRIDIUM BUTYRICUM

ЖУКОВА Л. В., НИКАНДРОВ В. В., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Исследовалось действие света на выделение водорода гетеротрофными анаэробными бактериями *Clostridium butyricum* в зависимости от продолжительности инкубации бактерий, спектрального состава, интенсивности света и длительности освещения. При действии ближнего УФ-света на бактерии, кратковременно инкубированные в фосфатном буфере с глюкозой, наблюдали фотоактивацию выделения водорода. Наибольший эффект оказывало освещение в области 330—360 нм. С увеличением интенсивности света, продолжительности освещения или продолжительности инкубации бактерий наблюдали переход от фотоактивации к фотоподавлению выделения водорода. Предполагается, что свет активирует выделение водорода бактериями *C. butyricum* вследствие усиления образования восстановленных соединений — предшественников водорода. Возможно, что роль фоторецепторов, ответственных за фотоактивацию выделения водорода, выполняют молекулы NADH.

Изучение механизма действия света на метаболизм гетеротрофных анаэробных бактерий *C. butyricum*, относящихся к одному из наиболее древних в эволюционном отношении роду, представляет интерес в связи с предположением, что световая активация первичных гетеротрофов могла быть эволюционным вариантом перехода к автотрофии [1]. Влияние света на метаболизм *C. butyricum* представляет интерес также в связи с практическими целями, так как *C. butyricum* привлекают внимание как продуценты водорода [2, 3]. Ранее наблюдалось, что освещение этих бактерий в определенных режимах стимулировало синтез белка и клеточное деление [4]. Нами было обнаружено, что свет может активировать или подавлять выделение водорода *C. butyricum* [5]. В связи с изучением эволюции фотобиологических реакций, а также для практических целей наибольший интерес представляет явление фотоактивации выделения водорода. С целью определения условий фотоактивации выделения водорода бактериями в данной работе исследовалось действие света на выделение водорода *C. butyricum* в зависимости от продолжительности инкубации бактерий, спектрального состава, интенсивности света и длительности освещения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуру бактерий *C. butyricum*, полученную из коллекции культур кафедры микробиологии МГУ им. М. В. Ломоносова, выращивали из спор на глюкозо-пептонной среде [6] с добавлением $FeSO_4$ (0,05 г/л) и биотина (10 мкг/л) при 37°. Для создания анаэробных условий среду перед посевом кипятили на водяной бане в течение 1 ч и быстро охлаждали. В опытах использовали культуру через 15—16 ч роста, в период максимального выделения водорода. Для проведения опытов бактерии отделяли от среды центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин, отмывали 1/15 М калий-натрий-фосфатным буфером, pH 5,0, и ресуспендировали в нем с добавлением глюкозы (20 г/л). Полученную суспензию продували аргоном (для создания анаэробных условий), инкубировали 20 мин при 37° для активации бактерий и отбирали пробу для опыта с доведением оптической плотности до 3,0 ед. при величине оптического пути, равного 1 см. Толщина слоя суспензии в опыте была равна 0,3 см. Оптическую плотность бактерий измеряли на приборе Specord UV VIS (ГДР) в кюветном отделении для рассеивающих образцов при 400 нм. В тех случаях, когда из этой же суспензии в дальнейшем еще отбирались пробы для опыта, суспензию продували аргоном после каждого отбора проб и выдерживали при температуре опыта, равной 28±1°.

Измерение выделяемого водорода проводили газохроматографическим методом, описанным ранее [7]. В соответствии с этим методом стеклянная ячейка с объектом

подключалась перед колонкой аналитической линии газового хроматографа. Для опыта 1 мл суспензии бактерий вносили в ячейку и продували аргоном. После этого при постоянном перемешивании для определения образовавшегося водорода газовую фазу из ячейки выдували через каждые 2 мин в линию хроматографического анализа. Ячейку с бактериями освещали равномерно по всей поверхности ртутными лампами СВД-120А или ДРШ-250, или лампой накаливания 750 Вт. Инфракрасную часть спектра отсекали светофильтром СЗС-24 (полоса пропускания 310—800 нм) или раствором $CuSO_4$. При исследовании зависимости фотоактивации выделения водорода от длины волны света линии ртутной лампы выделяли интерференционными светофильтрами («Carl Zeiss Jena», ГДР) с шириной полосы пропускания, соответствующей 0,5 от $T_{макс}$, 10 нм. Светофильтры устанавливали в том месте светового потока, где пучки света были практически параллельными. Изучение действия света 365 и 334 нм проводили в кварцевой ячейке. Интенсивность светового потока измеряли термостолбиком.

По окончании опыта измеряли скорость выделения водорода бактериями из исходной суспензии, которая в течение эксперимента выдерживалась в условиях опыта, но без освещения. Это измерение служило контролем на темновое изменение скорости выделения водорода за время опыта. Фотоактивация выделения водорода определялась как дополнительный объем водорода (%), выделившегося во время и после освещения, по отношению к контрольному выделению водорода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние продолжительности инкубации бактерий. В результате действия света ртутной лампы СВД-120А интенсивности 200 Вт/м² на бактерии, предварительно инкубированные в фосфатном буфере с глюкозой, в зависимости от длительности инкубации наблюдалось увеличение или уменьшение количества выделившегося водорода (рис. 1). Освещение бактерий, преинкубированных менее 1—1,5 ч, приводило к возрастанию скорости выделения водорода как во время, так и после освещения (рис. 1*а*). При этом во время освещения рост скорости выделения водорода замедлялся или сменялся ее падением. Возрастание скорости выделения водорода после 10 мин освещения было обратимым. При этом максимальная скорость выделения водорода после выключения света превышала таковую, достигаемую на свету. Таким образом, в начальный период инкубации бактерий (до ~1,5 ч) наблюдалась обратимая фотоактивация выделения водорода.

По мере увеличения продолжительности инкубации бактерий происходит переход от фотоактивации к фотоподавлению выделения водорода. Так, при освещении бактерий, предварительно инкубированных 1,5—3,0 ч, выделение водорода во время освещения подавлялось, однако после освещения скорость выделения водорода возрастала до величины, превышающей исходную (до освещения) (рис. 1*б*). В результате количество водорода, выделенного за время освещения и последующего темнового периода, превышало или же при бóльших временах преинкубации было несколько меньше количества водорода, выделенного неосвещенными бактериями.

Во время освещения бактерий, преинкубированных более 3 ч, наблюдалось падение скорости выделения водорода, которая после выключения света возрастала, не превышая исходную (рис. 1*в*, *г*). В контрольных опытах (без освещения) при инкубации бактерий в фосфатном буфере с глюкозой наблюдалось уменьшение скорости выделения водорода на 5—10% в 1 ч.

Для исследования влияния спектрального состава, интенсивности света и длительности освещения на выделение водорода бактериями последние брались после 20 мин предварительной инкубации, когда наблюдалась фотоактивация выделения водорода.

Влияние спектрального состава. Выделение водорода активировалось светом с длиной волны 405 нм и короче, причем наибольший эффект оказывали линии ртути 334 и 365 нм (рис. 2).

Влияние интенсивности света. Зависимость активации выделения водорода от интенсивности света определялась при освещении линиями ртути 365 нм. При 10 мин освещения активация выделения водорода линейно зависела от интенсивности света до 20 Вт/м² (рис. 3). С дальнейшим увеличением интенсивности света наблюдалось подавление выделения водорода во время и после освещения.

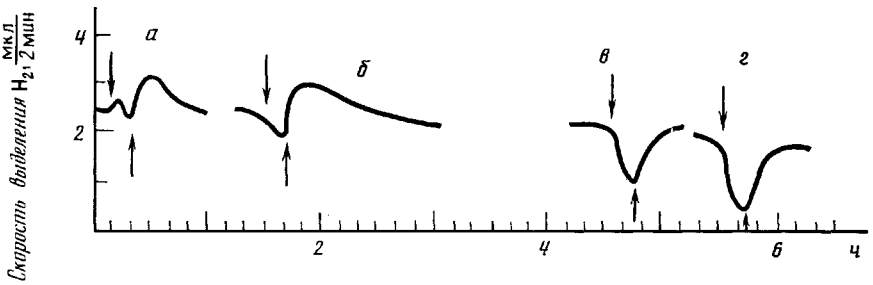


Рис. 1. Эффект действия света на выделение водорода *C. butyricum* в зависимости от длительности предварительной инкубации (*а—г* — см. текст). Освещение ртутной лампой СВД-120А, I=200 Вт/м^2. Здесь и на рис. 4: стрелка вниз — включение света, стрелка вверх — выключение света

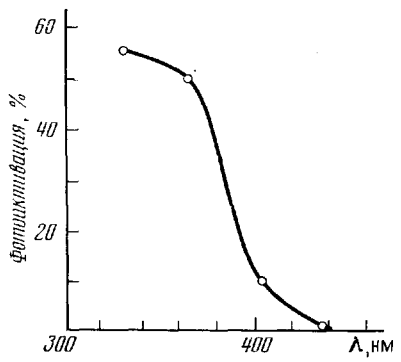


Рис. 2. Зависимость фотоактивации выделения водорода *C. butyricum* от длины волны света. I=1,66·10^{-9} Е/см^2·с при всех длинах волн

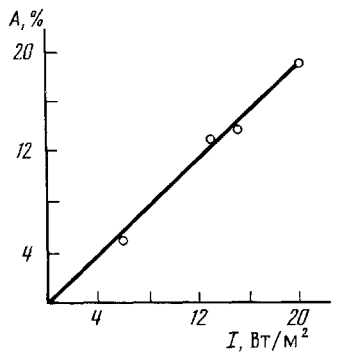


Рис. 3. Зависимость фотоактивации выделения водорода (A) от интенсивности света 365 нм

Влияние длительности освещения. На рис. 4 представлены результаты влияния света 365 нм интенсивности 20 Вт/м^2 на выделение водорода бактериями при разной длительности освещения. Видно, что при 10 мин освещения наблюдается фотоактивация, а при 30 мин — фотоподавление выделения водорода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, фотоактивация выделения водорода *C. butyricum* наблюдается только в начальный период инкубации бактерий и при малых значениях интенсивности света и длительности освещения. Переход от фотоактивации к фотоподавлению выделения водорода с увеличением интенсивности света и длительности освещения можно объяснить тем, что свет вызывает противоположные процессы: одни ведут к активации, другие — к подавлению выделения водорода бактериями. При малых значениях интенсивности света и длительности освещения преобладает фотоактивация, при больших — фотоподавление. Наблюдаемое явление, по-видимому, представляет собой наложение этих процессов.

При использовании глюкозы в качестве субстрата брожения образование водорода бактериями *C. butyricum* происходит при фосфорокластическом расщеплении пирувата и при окислении избыточного количества NADH, который не используется на другие метаболические процессы (рис. 5). Одними из причин фотоактивации выделения водорода *C. butyricum* могут быть активация светом ферментов, участвующих в образовании водорода, и (или) увеличение количества восстановленных соединений, из которых образуется водород. Ранее сообщалось, что УФ-свет может активировать гидрогеназу *Alcaligenes eutrophus* [10]

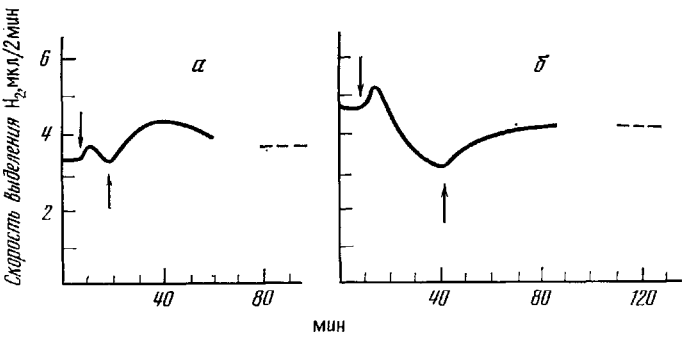


Рис. 4. Эффект действия света 365 нм на выделение водорода *C. butyricum*: *а* — при 10 мин, *б* — при 30 мин освещения. $I = 20$ Вт/м². Пунктиром указано выделение водорода в контрольных образцах

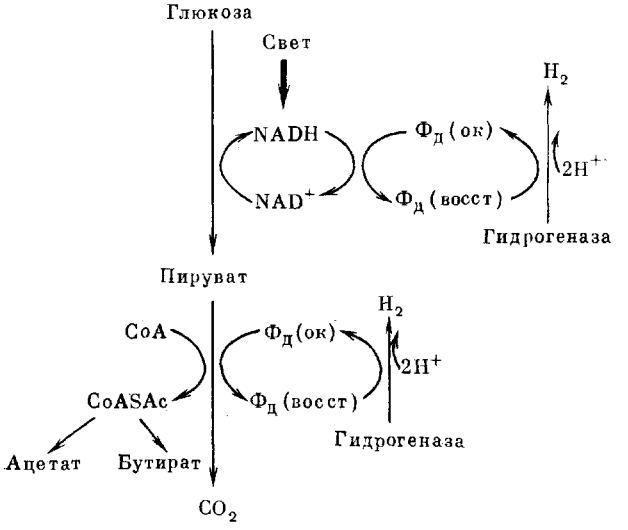


Рис. 5. Схема образования водорода при сбраживании глюкозы *C. butyricum* [8, 9]. Фд—ферредоксин. Стрелкой указано предполагаемое место действия света

и гидрогеназу *Proteus vulgaris* [11]. Но если предположить, что усиление выделения водорода в наших опытах происходило благодаря фотоактивации ферментов, то следовало ожидать необратимого увеличения скорости выделения водорода. Однако в наших опытах фотоактивация выделения водорода была обратимой, что дает возможность предположить усиление на свету образования восстановленных соединений — предшественников водорода. Возможно, что усиление образования восстановленных соединений происходит и тогда, когда в процессе освещения наблюдается подавление выделения водорода (рис. 1*б*). Об этом свидетельствует тот факт, что общее количество водорода, выделившегося на свету и после освещения, превышало контрольное. В этом случае, по-видимому, на свету происходило образование восстановленных соединений, но подавлялось образование водорода из них.

Возможно, что фотоактивация выделения водорода у *C. butyricum* идет по пути NADH — ферредоксин — гидрогеназа — H_2 вследствие фотовозбуждения молекул NADH. На это указывает тот факт, что наибольшую активацию выделения водорода вызывало освещение светом 330—360 нм, т. е. в области максимума поглощения NADH. Фотохимическая активность восстановленных никотинамидных коферментов показана ранее [12, 13].

У *C. butyricum* NADH восстанавливает ферредоксин при участии фермента NADH-ферредоксин-оксидоредуктазы [9]. Вследствие того,

что редокс-потенциал ферредоксина почти на 100 мВ более отрицательный, чем потенциал NADH, такой перенос электрона от NADH к ферредоксину возможен только при избытке NADH или же при наличии эффективной системы восстановления NAD^+. Однако возбужденный светом NADH может восстанавливать ферредоксин в отсутствие фермента, и при этом не требуется избытка NADH [13]. Возможно, что при действии света на *C. butyricum* такой механизм также имеет место и при этом происходит накопление восстановленного ферредоксина.

Предположение об усилении образования восстановленных соединений в клетке на свету согласуется с результатами предыдущих исследований, которые показали, что стимулирующее действие света на синтез белка и размножение *C. butyricum* в начальный период инкубации выражается в конечном итоге не в увеличении абсолютного значения этих показателей по сравнению с контролем, а в ускорении прохождения бактериями начальных стадий развития. В частности, значительно сокращалась длительность лаг-фазы [4]. Известно, что в период лаг-фазы происходит возрастание восстановительного потенциала культуры и что добавление в среду инкубации восстановительных агентов ускоряет начало роста. И если свет стимулирует образование восстановленных соединений, то можно ожидать сокращения продолжительности лаг-фазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А. А.*//Возникновение жизни на земле. М.: Изд-во АН СССР, 1957. С. 355—366.
2. *Karube I., Urano N., Matsunaga T., Suzuki S.*//Europ. J. Appl. Mikrobiol. and Biotechnol. 1982. V. 16. № 1. P. 5—9.
3. *Miyake J., Mao X., Kawamura S.*//J. Ferment. Technol. 1984. V. 62. № 6. P. 531—535.
4. *Рубин Л. Б., Еремеева О. В., Фрайкин Г. Я., Швинка Ю. Э.*//Докл. АН СССР. 1973. Т. 210. № 4. С. 971—974.
5. *Жукова Л. В., Никандров В. В., Красновский А. А.*//Биофизика. 1980. Т. 25. № 6. С. 1095—1096.
6. *Азова Л. Г., Гусев М. В., Ивойлов В. С.*//Микробиология. 1970. Т. 39. № 1. С. 55—59.
7. *Ощепков В. П., Красновский А. А.*//Прикл. биохимия и микробиология. 1974. Т. 10. № 5. С. 760—764.
8. *Шлегель Г.*//Общая микробиология. М.: Мир, 1972. С. 268—271.
9. *Jungermann K., Thauer R. K., Leimenstoll G., Decker K.*//Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 305. № 2. P. 268—280.
10. *Schneider K., Schlegel H. G.*//Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 452. № 1. P. 66—80.
11. *Schengrund C., Krasna A. I.* Biochim. et biophys. acta. 1969. V. 185. № 2. P. 332—337.
12. *Красновский А. А., Брин Г. П.*//Проблемы эволюционной и технической биохимии. М.: Наука, 1964. С. 221—231.
13. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.*//Биохимия. 1978. Т. 43. С. 636—645.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
30.IV.1986

THE ACTIVATING EFFECT OF NEAR ULTRAVIOLET LIGHT ON HYDROGEN METABOLISM IN CLOSTRIDIUM BUTYRICUM CELLS

ZHUKOVA L. V., NIKANDROV V. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Moscow

Gas chromatography was used to study hydrogen output by the heterotrophic anaerobic bacteria *Clostridium butyricum* under various illumination conditions (spectral composition, light intensity, duration of illumination, incubation time). Illumination of bacteria incubated for a short time in a glucose-containing phosphate buffer with near UV-light was accompanied by photoactivation of hydrogen output, this effect being maximal at 330—360 nm. With an increase in light intensity, illumination or incubation time, a transition from photoactivation to photoinhibition of hydrogen output was observed. It was assumed that illumination induces the activation of hydrogen output by *C. butyricum* cells as a result of enhanced formation of reduced components, i. e., H_2 precursors. It seems probable that the role of photoreceptors responsible for hydrogen evolution photoinactivation should be ascribed to NADH molecules.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ
том 4 * № 6 * 1987

УДК 577.352.2:577.355

УСЛОВИЯ ЭФФЕКТИВНОГО ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ЛИПОСОМАХ, СОДЕРЖАЩИХ ХЛОРОФИЛЛ И ФЕОФИТИН

Семенова А. Н., Баранникова Я. В., Никандров В. В., Красновский А. А.

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Исследовали фотоиндуцированный перенос электронов через мембраны липосом, содержащих хлорофилл *a* или феофитин *a*, от аскорбата, включенного во внутренний водный объем липосом, к метилвиологену и этилвиологенсульфату. Показано, что эффективность трансмембранного переноса электронов зависит от соотношения пигмент : липид. Определена область соотношений, при которых квантовый выход ФТПЭ достигает максимального значения. В этой области величина φ для Фф-липосом в 10 раз больше, чем для Хл-липосом. Квантовый выход фотопереноса электронов на ЭВС° в 1,5 раза превышает квантовый выход фотопереноса на $МВ^{2+}$. Показано, что фотоперенос электронов активируется валиномицином в присутствии ионов K^+. Установлена зависимость эффективности ФТПЭ от трансмембранного потенциала, индуцированного валиномицином в условиях трансмембранного градиента концентрации ионов K^+. При $\Delta\psi = 180$ мВ квантовый выход ФТПЭ для Хл-липосом увеличивается в 1,8 раза, а для Фф-липосом — в 2,8 раза. Предложен механизм фотопереноса электронов в Фф-липосомах. Квантовый выход ФТПЭ достигает 30% в суспензии Фф-липосом с соотношением пигмент : липид 1 : 350 при $[K^+]_в/[K^+]_н = 10^3$ в присутствии валиномицина.

В последние годы большое число работ посвящено исследованию фотохимических реакций в бислойных липидных везикулах (липосомах), содержащих фотосенсибилизаторы. Эти работы направлены на создание систем, способных к преобразованию и запасанию солнечной энергии. Везикулы, в которых преобразование энергии света происходит в результате фотоиндуцированного переноса электронов через мембраны, содержащие пигменты, представляют также интерес как модели фотосинтетического переноса электронов. В качестве мембранных фотосенсибилизаторов применяли хлорофилл (см. обзоры [1, 2]), феофитин [3], различные порфирины [4, 5], поверхностно-активный аналог трисбипиридильного комплекса рутения [6].

Эффективность запасания энергии в везикулярных системах определяется эффективностью фотоиндуцированных трансмембранных реакций. Однако величины квантовых выходов этих реакций, полученные в большинстве исследованных систем до настоящего времени, не превышали 0,1—0,2%, т. е. не представляли практического интереса.

Сокращения: ФТПЭ — фотоиндуцированный трансмембранный перенос электронов; Хл-липосомы — липосомы, содержащие в мембране хлорофилл *a*; Фф-липосомы — липосомы, содержащие в мембране феофитин *a*; $МВ^{2+}$ — метилвиологен; $МВ^{+\cdot}$ — метилвиологен, катион-радикал; ЭВС° — этилвиологенсульфат; $^1Хл^*$ — синглетное состояние хлорофилла; $^3Хл^*$ — триплетное состояние хлорофилла; $Хл_н$, $Фф_н$ и $Хл_в$, $Фф_в$ — молекулы пигментов, локализованные во внешнем и внутреннем монослоях липосомальной мембраны; $Хл^{+\cdot}$ — хлорофилл, катион-радикал; $Фф^{-\cdot}$ — феофитин, анион-радикал; $АскН^-$ — аскорбат, анион; $АскН^\cdot$ — нейтральный радикал аскорбата; $Аск^{-\cdot}$ — аскорбат, анион-радикал; Аск — дегидроаскорбат; φ — квантовый выход; $\Delta\psi$ — трансмембранный потенциал; $[K^+]_в$ — концентрация K^+ внутри липосом, $[K^+]_н$ — концентрация K^+ во внешнем водном пространстве.

Для достижения более высокой эффективности фотоиндуцированных трансмембранных реакций были использованы различные подходы, направленные на активацию отдельных стадий трансмембранного процесса и замедление обратных реакций. Так, в ряде работ были исследованы возможности повышения эффективности первичного разделения заряда в Хл-липосомах посредством создания поверхностного заряда на мембране липосом [7], применения акцепторов электрона различной природы [8, 9], введения в мембрану холестерина [10]. Использование этих воздействий позволило авторам наблюдать увеличение выхода радикальных продуктов, времени их жизни, а также увеличение фракции потушенных акцептором электрона триплетных состояний хлорофилла. В работе [11] было показано активирующее действие ионофоров на скорость фотоиндуцированного переноса электронов через мембраны везикул, содержащих поверхностно-активный аналог трисбипиридильного комплекса рутения. В этой же работе показано, что разность электрических потенциалов на мембране, индуцированная валиномицином в условиях трансмембранного градиента концентрации ионов K^+, позволяет на порядок повысить исходный квантовый выход ФТПЭ (0,04%).

В работе [12] при использовании Хл-липосом, содержащих донор электронов (глутатион) во внутреннем объеме, а акцептор (водорастворимое производное нафтохинона) — во внешнем водном пространстве, авторы получили квантовый выход фотовосстановления акцептора электронов, приближающийся к 20%. Однако, по мнению авторов, из-за отсутствия данных о величинах окислительно-восстановительных потенциалов донора и акцептора электронов остается неясным, происходит ли в данной системе запасание энергии.

Принципиально иной подход к повышению эффективности трансмембранного переноса электронов предложен в работах [13—15]. В исследованных системах фотосенсибилизатор выведен из мембраны и помещен во внутреннее водное пространство липосом вместе с донором электронов, перенос электрона осуществлялся через фотопассивную мембрану, содержащую переносчик электрона — виологен или хинон. Хотя авторам удалось достичь сравнительно высокой эффективности трансмембранного переноса электронов (φ=15%), запасание энергии в такой системе не определялось. Кроме того, вывод сенсибилизатора из мембраны нарушал соответствие модельной системы природным фотосинтетическим мембранам.

Ранее мы изучали фотоиндуцированный перенос электронов через мембраны липосом, содержащих хлорофилл или феофитин [3, 16]. Было показано, что при освещении суспензий Хл- или Фф-липосом, содержащих аскорбат во внутреннем водном пространстве, можно наблюдать накопление восстановленного метилвиологена во внешнем водном пространстве, что является результатом ФТПЭ через мембраны липосом.

Целью настоящего исследования явилось определение условий эффективного ФТПЭ в Хл- и Фф-липосомах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для приготовления липосом по методу [17] использовали яичный лецитин (фосфатидилхолин) и пигменты, выделенные и очищенные по стандартным методикам. Для получения липосом, содержащих донор электрона во внутреннем водном объеме, концентрированный раствор пигмента и липида в спирте впрыскивали в 0,5 М раствор аскорбата натрия в буфере (50 мМ трис-HCl, 50 мМ KCl, pH 7,5). Аскорбат из внешнего объема удаляли на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным буфером, который перед употреблением продували аргоном. Для создания градиента концентраций ионов K^+ на мембране липосомы, содержащие во внутреннем объеме определенное количество K_2SO_4, пропускали через колонку, уравновешенную соответствующим требуемому градиенту количеством K_2SO_4, и добавляли Na_2SO_4 для выравнивания ионной силы. Например, при создании системы с концентрацией 0,2 М K^+ внутри и 0,02 М K^+ снаружи ко-

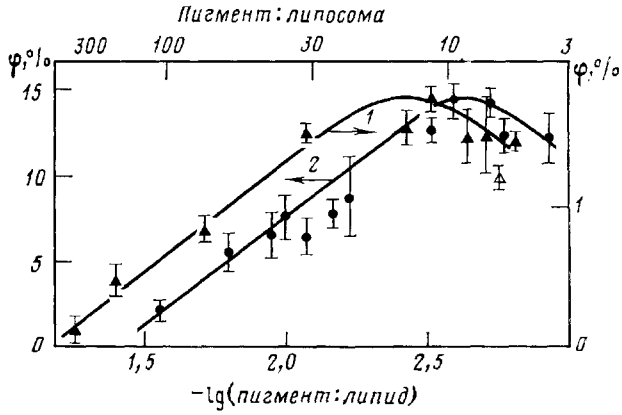


Рис. 1. Зависимость квантового выхода фотовосстановления MB^{2+} аскорбатом в суспензиях Хл- (*1*) и Фф-липосом (*2*) от соотношения пигмент : липид

лонку уравновешивали буфером, содержащим 0,01 М K_2SO_4 и 0,09 М Na_2SO_4. Расчет величины трансмембранного потенциала производили по формуле Нернста.

Фотовосстановление MB^{2+} и $ЭВС^0$ проводили в вакуумированной трубке Тунберга, приспособленной для спектральных измерений. Восстановление акцепторов электрона регистрировали по изменению поглощения при 605 и 550 нм (ε=13 300 и 8870 $M^{-1}\cdot см^{-1}$). В качестве источника света использовали лампу накаливания 300 Вт с конденсором, выделяя с помощью светофильтров область $600<\lambda<800$ нм интенсивностью света $2{,}5\cdot 10^5$ эрг/см$^2\cdot$с. При определении квантового выхода образцы освещали монохроматическим светом (λ 436 нм), выделенным из спектра ртутной лампы ДРШ-250 с помощью светофильтров ФС-1, ЖС-11. Интенсивность падающего света определяли с помощью ферриоксалатного актинометра. Спектры флуоресценции липосом измеряли на флуориметре MPF-4 («Hitachi», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение оптимальных соотношений пигмента и липида в мембране. На необходимость определения оптимальных соотношений пигмент : липид для повышения эффективности ФТПЭ указывают данные о тушении возбужденных состояний пигментов при увеличении их содержания в мембране липосом [18—20] и о падении квантового выхода ФТПЭ при уменьшении количества пигмента, приходящегося на одну липосому [6]. Зависимости φ фотовосстановления MB^{2+} аскорбатом, включенным во внутренний объем Хл- или Фф-липосом, от соотношения пигмент : липид, представленные на рис. 1, имеют сходный характер: φ растет при уменьшении соотношения пигмент : липид, достигает максимума и падает при соотношениях, приближающихся к 1 : 1000. При всех исследованных соотношениях пигмент : липид величина φ в случае Фф-липосом существенно выше, чем для Хл-липосом. Максимальное значение φ для Хл-липосом, равное 1,7%, достигается при соотношении хлорофилл *а*: липид 1 : 300, когда в одной липосоме находится примерно 20 молекул пигмента. Максимум φ в случае Фф-липосом близок к 15% при соотношении феофитин *а* : липид 1 : 450. Таким образом, оптимальное соотношение пигмент : липид составляет 1 : 300 для Хл-липосом и 1 : 450 для Фф-липосом. В этих условиях феофитин сенсибилизирует ФТПЭ примерно в 10 раз более эффективно, чем хлорофилл. Эти соотношения пигмент : липид соответствуют области, где тушение флуоресценции хлорофилла *а* и феофитина *а* отсутствует (рис. 2). При увеличении соотношения наблюдается тушение флуоресценции этих пигментов в липосомах, сопровождающееся смещением максимумов излучения флуоресценции в длинноволновую область, а также ростом полосы испускания феофитина *а* при 700—710 нм, что может указывать на образование его димера [21].

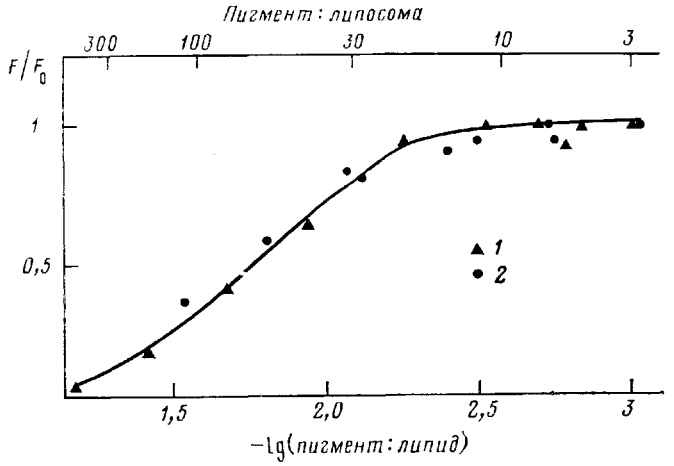


Рис. 2. Зависимость относительного выхода флуоресценции хлорофилла *а* (*1*) и феофитина *а* (*2*) в липосомах от соотношения пигмент : липид. Возбуждение при 418 нм

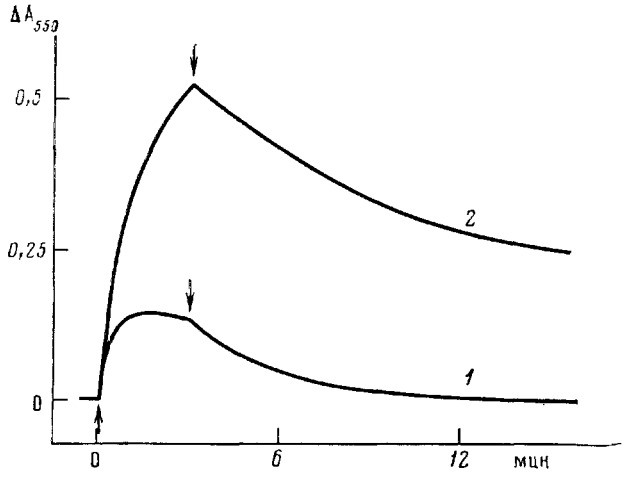


Рис. 3. Фотовосстановление метилвиологена (*1*) и этилвиологенсульфата (*2*) при трансмембранном переносе электронов от аскорбата в Фф-липосомах. Соотношение пигмент : липид 1 : 350. Концентрация метилвиологена и этилвиологенсульфата — $5 \cdot 10^{-4}$ М. Стрелка вверх — включение света, стрелка вниз — выключение

Использование в качестве акцептора электронов ЭВС⁰. Ранее нами было показано [3], что выход фотовосстановленного $МВ^{2+}$ при ФТПЭ в суспензиях Хл-липосом лимитируется обратной реакцией — окислением восстановленного метилвиологена дегидроаскорбатом, которая обусловлена способностью $МВ^{+}$ проникать через липидную мембрану. Обратная реакция протекает и в случае использования Фф-липосом. Применение акцептора электронов, не проникающего в липосому, могло бы повысить эффективность разделения продуктов трансмембранной реакции. С этой целью мы применили ЭВС⁰, восстановленная форма которого — анион-радикал, не способна проникать через липосомальную мембрану (по данным В. Я. Шафировича и результатам, полученным в нашей лаборатории). Как видно из рис. 3, замена $МВ^{2+}$ на ЭВС⁰ привела к повышению скорости и глубины трансмембранной реакции и уменьшению скорости окисления восстановленного акцептора электрона после прекращения освещения. В начальный период освещения скорость фотовосстановления ЭВС⁰ в суспензии Фф-липосом в 1,5 раза превышает скорость фотовосстановления $МВ^{2+}$, при этом квантовый выход реакции достигает 22%.

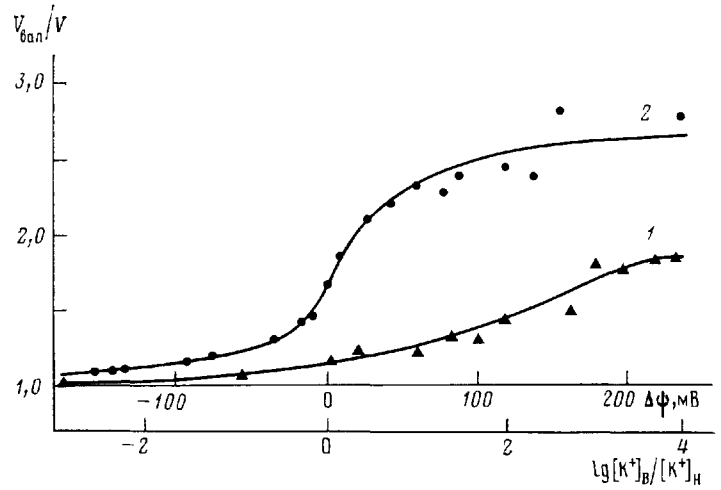


Рис. 4. Зависимость скорости фотовосстановления MB^{2+} аскорбатом натрия в Хл- (*1*) и Фф-липосомах (*2*) от индуцированной валиномицином разности электрических потенциалов на мембране липосом. $V_{вал}$ – начальная скорость фотовосстановления MB^{2+} в присутствии валиномицина; V – то же в отсутствие валиномицина, $[K^+]_в$ – концентрация K^+ во внутреннем объеме липосом, $[K^+]_н$ – то же во внешнем водном объеме. Состав реакционной среды: 50 мМ трис-H_2SO_4, pH 7,5, Хл – $3{,}3 \cdot 10^{-6}$ М, Фф – $5 \cdot 10^{-6}$ М, MB^{2+} – $5 \cdot 10^{-4}$ М, валиномицин – 10^{-6} М, аскорбат Na во внутреннем водном объеме – 0.5 М. При $[K^+]_в = [K^+]_н$ реакционная среда во внешнем и внутреннем объеме липосом содержала 0,1 М K_2SO_4. При $[K^+]_в/[K^+]_н > 1$ – реакционная среда внутри липосом содержала 0,1 М K_2SO_4, снаружи $[K_2SO_4]$ уменьшали, при этом добавляли Na_2SO_4 так, что $[K_2SO_4] + [Na_2SO_4] = 0.1$ М. При $[K^+]_в/[K^+]_н < 1$ реакционная среда внутри липосом содержала 0.01 М K_2SO_5, концентрацию K_2SO_4 во внешнем водном пространстве увеличивали

Эффект валиномицина. (Повышение ионной проводимости мембраны.) Сенсибилизированный пигментами трансмембранный фотоперенос электрона в липосомах, по-видимому, лимитируется возникающей на мембране разностью электрических потенциалов. На это указывает активация протонофорами и ионофорами, обеспечивающими повышение ионной проницаемости мембраны, фотоиндуцированных трансмембранных реакций [11]. В наших условиях добавление валиномицина к Хл- и Фф-липосомам в присутствии ионов K^+ приводило к увеличению скорости фотовосстановления MB^{2+} аскорбатом в 1,2 и 1,6 раза соответственно. При замене ионов K^+ на Na^+ в реакционной среде валиномицин не активировал ФТПЭ, что указывает на специфичность действия ионофора. Эти эксперименты проводились при соотношениях пигмент : липид, равных для Хл-липосом 1 : 300, а для Фф-липосом – 1 : 200 (при этом значения в максимумах поглощения пигментов равны), концентрация ионов K^+ внутри липосом была равна концентрации K^+ во внешнем водном пространстве ($[K^+]_в = [K^+]_н$. Квантовые выходы исследуемой реакции для этих соотношений, определенные нами ранее, равны 1,5% для Хл-липосом и 11% для Фф-липосом. В присутствии валиномицина они повышаются до 1,8 и 18,0% соответственно.

Влияние трансмембранной разности электрических потенциалов на скорость ФТПЭ в Хл- и Фф-липосомах. Ранее было показано, что разность электрических потенциалов, установленная с помощью трансмембранного градиента концентраций ионов K^+ в присутствии валиномицина, влияет на скорость фотоиндуцированной трансмембранной реакции в липосомах, содержащих в мембране трисбипиридильный комплекс рутения [11] или диглициламид мезопорфирин-IX [22]. Мы исследовали влияние величины и знака трансмембранного потенциала на скорость фотоиндуцированного трансмембранного переноса электронов от аскорбата на MB^{2+} в Хл- и Фф-липосомах. При $[K^+]_в = [K^+]_н$ трансмембранный потенциал равен нулю. Как было указано выше, в этом случае добавление валиномицина активирует ФТПЭ. При увеличении соотношения $[K^+]_в/[K^+]_н$ (внутренний отдел липосом заряжается отрицательно) скорость фотовосстановле-

ния MB^{2+} возрастает как для Хл-, так и для Фф-липосом и достигает максимального значения при $[K^+]_в/[K^+]_н=10^3$. При этом величина трансмембранного потенциала, рассчитанная по уравнению Нернста, равна 180 мВ. В этих условиях скорости реакций для Хл-липосом увеличиваются в 1,8 раза, а для Фф-липосом — в 2,8 раза (рис. 4). При установлении на мембране потенциала противоположного знака (-150 мВ$<\Delta\psi<0$) скорость процесса уменьшается и приближается к скорости в отсутствие ионофора. Таким образом, при установлении трансмембранного потенциала на липосомальной мембране удалось достичь квантового выхода ФТПЭ для Хл-липосом 3%, для Фф-липосом — 30%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы последовательно применили ряд подходов для повышения эффективности ФТПЭ в липосомах, содержащих фотосинтетические пигменты. При этом повышение квантового выхода ФТПЭ достигалось путем воздействия на его отдельные стадии.

Мы провели сравнительное исследование способности двух фотосинтетических пигментов — хлорофилла и феофитина, включенных в мембраны липосом, к сенсибилизации ФТПЭ. Основываясь на литературных данных о механизме ФТПЭ в Хл-липосомах [12, 23], окислительно-восстановительных свойствах аскорбиновой кислоты [24—27] и результатах настоящей работы, ФТПЭ от аскорбата к MB^{2+} в Хл-липосомах можно представить в виде такой последовательности реакций:

$$Хл \overset{h\nu}{\rightleftarrows} {}^1Хл^* \rightarrow {}^3Хл^*, \quad (1)$$

$${}^3Хл^* \rightarrow Хл, \quad (2)$$

$${}^3Хл^* + Хл \rightarrow Хл + Хл, \quad (3)$$

$${}^3Хл_н^* + MB^{2+} \rightarrow (Хл_н^+, MB^+), \quad (4)$$

$$(Хл_н^+, MB^+) \rightarrow Хл_н + MB^{2+}, \quad (5)$$

$$(Хл_н^+, MB^+) \rightarrow Хл_н^+ + MB^+, \quad (6)$$

$$Хл_н^+ + MB^+ \rightarrow Хл_н + MB^{2+}, \quad (7)$$

$$Хл_н^+ + Хл_в \rightarrow Хл_н + Хл_в^+, \quad (8)$$

$$Хл_в^+ + АскН^- \rightarrow Хл_в + АскН^\cdot, \quad (9)$$

$$АскН^\cdot \rightarrow Аск^- + H^+, \quad (10)$$

$$Аск^- + Аск^- + H^+ \rightarrow АскН^- + Аск, \quad (11)$$

$$Аск^- + Хл_в^+ \rightarrow Хл_в + Аск, \quad (12)$$

$$Аск + MB^+ \rightarrow Аск^- + MB^{2+}. \quad (13)$$

Для реакции фотопереноса электрона в Хл-липосомах установлен окислительный механизм сенсибилизации, т. е. на первом этапе происходит перенос электрона от триплетно-возбужденного хлорофилла на MB^{2+} [23] (реакция (4)). Эта стадия обратима, так как MB^+ является сильным восстановителем ($E_0=-0{,}44$ В), а $Хл^+$ — сильным окислителем ($E_м=0{,}78$ В) (реакция (7)). Реакция (8) представляет собой собственно перенос электрона между молекулами пигмента, расположенными в разных монослоях липидной мембраны. В настоящее время в литературе обсуждаются два возможных механизма этого переноса электрона — туннелирование [6, 12] и диффузионно-прыжковый механизм [28, 29]. Образовавшийся на внутренней стороне мембраны катион-радикал хлорофилла окисляет $АскН^-$ с образованием нейтрального радикала аскорбата (реакция (9)), который при pH 7,0 эффективно диссоциирует (реакция (10)) [25]. $Аск^-$ может вступать в реакцию диспропорционирования (реакция (11)) [26], кроме того, вероятно, способен восстановить $Хл_в^+$, поскольку $E_0'(Аск^-/Аск)=-0{,}21$ В [27]. Реакция (13) подробно обсуждается ниже.

Используя данные о величинах окислительных потенциалов основного и триплетного состояний хлорофилла и феофитина, можно предложить другой механизм сенсибилизации ФТПЭ в Фф-липосомах. Действительно, при равенстве энергий триплетных состояний хлорофилла и феофитина ($E_т$=1,33 В) [30] феофитин в основном и триплетном состояниях имеет более положительный окислительный потенциал, чем хлорофилл ($E_м$(Фф/$Фф^+$)=1,1 В, $E_м$(Хл/$Хл^+$)=0,78 В; $E_м$($^*Хл^*/Хл^+$)=−0,55 В, $E_м$($^*Фф^*/Фф^+$)=−0,23 В) [31, 32], что делает маловероятным перенос электрона от триплетного феофитина на $МВ^{2+}$, имеющий E_0=−0,44 В. По-видимому, феофитин сенсибилизирует фотовосстановление $МВ^{2+}$ по восстановительному механизму: на первом этапе переноса электрона происходит восстановление $^3Фф^*$ аскорбатом, а $МВ^{2+}$ восстанавливается анион-радикалом феофитина, имеющим $E_м(Фф^-/Фф)$=−0,61 В [33]. Учитывая это предположение, схему ФТПЭ в Фф-липосомах можно представить следующим образом:

$$^3Фф_в^* + АскН^- \rightarrow (Фф_в^-, АскН^*), \quad (4')$$

$$(Фф_в^-, АскН^*) \rightarrow Фф_в + АскН^-, \quad (5')$$

$$(Фф_в^-, АскН^*) \rightarrow Фф_в^- + АскН^*, \quad (6')$$

$$Фф_в^- + АскН^* \rightarrow Фф_в + АскН^-, \quad (7')$$

$$Фф_в^- + Фф_н \rightarrow Фф_в + Фф_н^-, \quad (8')$$

$$Фф_н^- + МВ^{2+} \rightarrow Фф_н + МВ^+. \quad (9')$$

Реакции (1′)—(3′) и (10′)—(13′) для Фф-липосом совпадают с реакциями (1)—(3) и (10)—(13) для Хл-липосом.

Данные, полученные в настоящей работе, не позволяют однозначно объяснить бóльшую эффективность феофитина как сенсибилизатора ФТПЭ по сравнению с хлорофиллом. Иной механизм сенсибилизации заведомо не обусловливает бóльшую эффективность ФТПЭ, однако можно предположить, что выход радикалов из ион-радикальной пары ($Фф^-_в$, $АскН^*$) больше, чем из ион-радикальной пары ($Хл_н^+$, $МВ^+$), а константа скорости обратной реакции между $Фф_в^+$ и $АскН^*$ (реакция (7)) меньше константы скорости реакции между $Хл_н^+$ и $МВ^+$.

Кроме того, известно, что наличие Mg в молекуле хлорофилла определяет его ассоциацию с фосфатной группировкой лецитина [2, 34]. Учитывая отсутствие атомов Mg в молекулах феофитина, можно предположить отличное от хлорофилла расположение и подвижность феофитина в мембране. Это может обеспечивать бóльшую доступность молекул феофитина для доноров и акцепторов электрона (реакция (4′) и (9′), а также привести к облегчению обмена электронами между молекулами феофитина, расположенными в разных монослоях липидной мембраны, и таким образом воздействовать на эффективность первичного разделения зарядов путем снижения скорости рекомбинации анион- радикала феофитина и $АскН^*$ (реакция (7′)).

Наличие максимумов в зависимостях квантового выхода ФТПЭ в Хл- и ФФ-липосомах от соотношения пигмент : липид (рис. 1), т. е. наличие оптимальных соотношений можно объяснить зависимостью процессов (1), (3), (8) и (1′), (3′), (8′) для Хл- и Фф-липосом соответственно от локальной концентрации пигментов в мембране. С одной стороны, повышение содержания пигментов в мембране может привести к снижению выхода $^3Хл^*$ и $^3Фф^*$, участвующих в ФТПЭ, в результате концентрационного тушения синглетных (рис. 2) и триплетных состояний Хл и Фф, а с другой стороны, при уменьшении количества пигмента, приходящегося на одну липосому, должна уменьшаться эффективность обмена электронами между $Хл_н^+$ и $Хл_в$, $Фф_в^-$ и $Фф_н$ вследствие уменьшения вероятности сближения пигментов, расположенных в разных монослоях мембраны, на расстояние, при котором возможен обмен электронами между ними [35]. Однако следует отметить, что вследствие большого разброса экспериментальных дан-

ных, полученных при использовании липосом с низким соотношением пигмент : липид (рис. 1), мы не можем с полной определенностью сделать вывод о падении квантового выхода ФТПЭ при уменьшении содержания пигментов в липосомах.

Валиномицин активирует ФТПЭ в Хл- и Фф-липосомах только в присутствии ионов K^+, что указывает на специфичность его действия, а именно на то, что скорость ФТПЭ увеличивается вследствие увеличения проницаемости мембраны для ионов K^+. По-видимому, активацию ФТПЭ валиномицином можно объяснить, предположив, что ФТПЭ приводит к генерации разности электрических потенциалов на мембране; при этом возникает электрическое поле, которое противодействует дальнейшему переносу электронов. Транспорт ионов K^+ через мембрану с помощью валиномицина снимает (или уменьшает) фотоиндуцированную разность потенциалов, что приводит к облегчению ФТПЭ.

Следует отметить, что величина активирующего эффекта валиномицина больше в случае Фф-липосом. В настоящее время мы не можем дать этому однозначного объяснения, однако можно предполагать, что причиной является различие механизмов протекания трансмембранных реакций в Хл- и Фф-липосомах.

Зависимость скорости ФТПЭ в Хл- и Фф-липосомах от величины и знака трансмембранного потенциала, полученная в нашей работе (рис. 4), аналогична зависимости квантового выхода фотовосстановления гептилвиологена при трансмембранном переносе электрона от EDTA, представленной в работе [11]. Так же как и в цитируемой работе, где в качестве фотосенсибилизатора использовали поверхностно-активный аналог трисбипиридильного комплекса рутения, скорость ФТПЭ в Хл- и Фф-липосомах увеличивалась в 2—3 раза, если внутренний отдел липосом заряжался более отрицательно по отношению к внешнему, и уменьшалась при установлении потенциала противоположного знака до величины, близкой к скорости ФТПЭ в отсутствие валиномицина (рис. 4). Полученные данные можно объяснить, предположив, что разность электрических потенциалов, установленная при помощи валиномицина, влияет на скорость обмена электронами между окисленной и восстановленной формами пигментов, расположенными на противоположных сторонах мембраны (реакции (8) и (8′)). Известно, что углеводородная часть мембраны создает энергетический барьер для прохождения заряженных частиц, в частности электронов. В работе [36] было показано, что создание на плоской липидной мембране разности электрических потенциалов изменяет высоту энергетического барьера для переноса электронов через углеводородную зону и таким образом может влиять на эффективность трансмембранного фотопереноса электронов.

Способность восстановленного метилвиологена проникать через липидную мембрану обусловливает протекание обратных реакций (13) и (13′) и приводит к снижению выхода фотовосстановленного акцептора электронов. Повышение эффективности трансмембранной фотореакции при использовании $ЭВС^0$, вероятно, определяется двумя факторами: более положительным окислительно-восстановительным потенциалом $ЭВС^0$ (E_0=—0,36 В) по сравнению с $МВ^{2+}$, а также тем, что восстановленная форма $ЭВС^0$, несущая отрицательный заряд, не способна проникать через липидную мембрану.

Таким образом, в настоящей работе показано, что использование липосом с оптимальным соотношением пигмент : липид, применение акцептора электронов, не проникающего через липидную мембрану, повышение ионной проводимости липосомальной мембраны и создание трансмембранной разности электрических потенциалов позволяют осуществить эффективный ФТПЭ от аскорбата (E_0'=+0,06 В) к $МВ^{2+}$ (E_0=—0,44 В). Максимальный квантовый выход ФТПЭ (30%) достигается при использовании липосом, содержащих феофитин.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ti Tien H.* Topics in Photosynthesis/Ed. Barber J. V. 3. Amsterdam: Elsevier, 1979. P. 115–173.
2. *Hurley J. K., Tollin G.* // Solar Energy. 1982. V. 28. P. 187–196.
3. *Семенова А. Н., Никандров В. В., Красновский А. А.* // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. С. 189–193.
4. *Matsuo T., Itoh K., Takuma K., Hashimoto K., Nagamura T.* // Chem. Lett. 1980. № 9. P. 1009–1012.
5. *Лымарь С. В., Цветков И. М., Пармон В. Н., Замараев К. И.* // Хим. физика. 1982. Т. 1. С. 405–410.
6. *Ford W. E., Otvos J. W., Calvin M.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 3590–3593.
7. *Fang Y., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1983. V. 38. P. 429–439.
8. *Senthilathipan V., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1985. V. 42. P. 437–445.
9. *Ford W. E., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1986. V. 43. P. 319–330.
10. *Ford W. E., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1984. V. 40. P. 249–259.
11. *Laan C., Ford W. E., Otvos J. W., Calvin M.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 2017–2020.
12. *Ford W. E., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1983. V. 38. P. 441–449.
13. *Яблонская Е. Е., Шафирович В. Я.* // Кинетика и катализ. 1983. Т. 24. С. 1022.
14. *Пармон В. Н., Храмов М. И., Цветков И. М., Лымарь С. В., Замараев К. И.* // Кинетика и катализ, 1983. Т. 24. С. 1019–1020.
15. *Яблонская Е. Е., Клабуновский Е. И., Шафирович В. Я., Шилов А. Е.* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286. С. 150–152.
16. *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.* // Докл. АН СССР. 1982. Т. 262. С. 469–472.
17. *Batzri S., Korn E. D.* // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 298. P. 1015–1019.
18. *Beddard G. S., Carlin S. E., Porter G.* // Chem. Phys. Lett. 1976. V. 43. P. 27–32.
19. *Hurley J. K., Castelly F., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1980. V. 32. P. 79–86.
20. *Luisetty J., Galla H. J., Mohwald H.* // Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 1978. B. 82. S. 911–916.
21. *Луганская А. Н., Лебедев Н. Н., Красновский А. А.* // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. С. 963–971.
22. *Tsvetkov I. M., Maravin G. B., Lymar S. V., Parmon V. N.* // React. Kinet. Catal. Lett. 1984. V. 25. P. 95–99.
23. *Ford W. E., Tollin G.* // Photochem. and Photobiol. 1982. V. 35. P. 809–819.
24. *Ball E.* // J. Biol. Chem. 1937. V. 118. P. 219–238.
25. *Laroff G. P., Fessenden R. W., Schuler R. H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 9062–9075.
26. *Willams N. H., Yandell J. K.* // Austral. J. Chem. 1982. V. 35. P. 1133–1144.
27. *Takashi I., Isao Y., Koichi A. F.* // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 806 (B 70). P. 255–261.
28. *Hinkle P.* // Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1970. V. 41. P. 1375–1381.
29. *Tabushi I., Nishiya T., Shimommura M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 219–224.
30. *Красновский А. А.* (*мл.*), *Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.* // Докл. АН СССР. 1974. Т. 216. С. 1406–1409.
31. *Seely G. R.* // Photochem. and Photobiol. 1978. V. 27. P. 639–654.
32. *Stanienda A.* // Z. Phys. Chem. 1965. B. 229. S. 257–261.
33. *Киселев Б. А., Козлов Ю. Н., Евстигнеев В. Б.* // Докл. АН СССР, 1976. Т. 266. С. 210–213.
34. *Oetmier W., Norris J. R., Katz J. J.* // Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1976. V. 71. P. 445–451.
35. *Замараев К. И., Хайрутдинов Р. Ф., Жданов В. П.* Туннелирование электрона в химии. Новосибирск: Наука, 1985.
36. *Polymeropoulos E. E., Möbius D., Kuhn H.* // J. Chem. Phys. 1978. V. 68. P. 3918–3931.

Поступила в редакцию
13.XI.1986

CONDITIONS FOR THE EFFICIENT PHOTOINDUCED TRANSMEMBRANE ELECTRON TRANSFER IN CHLOROPHYLL- AND PHEOPHYTIN-CONTAINING LIPOSOMES

SEMENOVA A. N., BARANNIKOVA Ya. V., NIKANDROV V. V., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The photoinduced electron transfer across the membranes of chlorophyll *a*- and pheophytin *a*-containing liposomes (Chl-liposomes and Pp-liposomes) from ascorbate, incorporated into the inner aqueous phase, to methyl viologen (MV^{2+}) or ethyl viologen

sulfate (EVS^0) was studied. The efficiency of the photoinduced transmembrane elecrtron transfer (PTET) was shown to depend on the pigment/lipid ratio. The ratio range in which the PTET quantum yield (φ) is maximal was determined. Within this range the quantum yield φ for Pp-liposomes was 10 times higher, than that for Chl-liposomes. The quantum yield for electron phototransfer to EVS^0 was 1,5 times higher than that for phototransfer to MV^{2+}. The activation of electron phototransfer by valinomycin in the presence of K^+ was shown. The dependence of the PTET efficiency on the transmembrane valinomycin-induced diffusion potential value under transmembrane gradient of K^+ was established. The quantum yield of PTET for Chl-liposomes increases by 1,8 times and that for Pp-liposomes by 2,8 times at $\Delta\varphi$=180 mV. The mechanism for electron phototransfer in Pp-liposomes is proposed. In the presence of valinomycin at $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$ ratio equal to 10^3 and pigment/lipid ratio equal to 1/350, the PTET quantum yield for Pp-liposomes suspension approaches 30%.

БИОФИЗИКА

Том XXXII, вып. 2 1987

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

ХОТЧЕНКОВ В. П., ДРОЗДОВА Н. Н., КРАСНОВСКИЙ А. А.

В реакционных центрах (РЦ) фотосинтезирующих бактерий происходит преобразование энергии света с высокой эффективностью — квантовый выход разделения зарядов достигает единицы [1]. Исследование РЦ привлекает внимание многих лабораторий в связи с проблемой создания эффективных преобразователей солнечной энергии и управления фотохимическим переносом электрона в организмах. Преобразование энергии квантов света в РЦ во многом определяется организацией (молекулярной) этих структур.

Пигменты фотосинтезирующих бактерий локализованы преимущественно в мембранах и связаны с белками и липидами, образуя отдельные классы пигмент-белковых комплексов (реакционные центры и светособирающие антенны), различающиеся спектральными и функциональными свойствами. Главная масса всех пигментов мембран представляет собой пигмент-белковые комплексы антенны, функцией которых является поглощение солнечной радиации и передача ее энергии реакционному центру. Реакционные центры, которые содержат лишь небольшую долю пигментов, непосредственно участвуют в первичном переносе электрона.

В отличие от высших растений и водорослей фотосинтезирующие бактерии содержат только одну фотосистему, что делает их удобным объектом для изучения первичных фотохимических реакций и молекулярной организации. В настоящее время из многих видов фотосинтезирующих бактерий выделены комплексы РЦ, свободные от пигментов антенны и других компонентов фотосинтезирующего аппарата [2—4]. Благодаря применению различных физико-химических и биохимических методов исследования определены спектральные свойства, состав и мембранная топография многих бактериальных РЦ. Первичные фотохимические процессы, протекающие при поглощении кванта света пигментами реакционного центра, подробно рассмотрены в обзорах [5—7].

Задача настоящего обзора — изложение современных представлений о молекулярной организации реакционных центров пурпурных фотосинтезирующих бактерий.

ПИГМЕНТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА

Состав. РЦ несерных пурпурных фотосинтезирующих бактерий (Rhodopseudomonas sphaeroides, Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas capsulata, Rhodopseudomonas viridis и др.), выделенные с помощью детергентов, содержат четыре молекулы бактериохлорофилла (Бхл), две из которых образуют димер (первичный донор электронов) с максимумом поглощения при 865 нм (P870) у бактерий, содержащих Бхл *a*, и при 965 нм (P960) у содержащих Бхл *b*, а также две мономерные молекулы Бхл с максимумами поглощения при 800 нм (P800) и 830 нм (P830) у бактерий, содержащих Бхл *a* и Бхл *b* соответственно [1, 8]. В состав РЦ входят также две молекулы бактериофеофитина (Бфф) *a* или *b*, одна-две молекулы хинона, один атом негеминового железа и, как правило, одна молекула каротиноида [2, 3]. Эти кофакторы переноса электрона связаны с тремя белковыми субъединицами, которым даны названия *H* (тяжелая), *M* (средняя) и *L* (легкая), согласно кажущимся молекулярным массам, определенным при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДДС-Na). РЦ, выделенные из пурпурных бактерий, содержащих Бхл *a* и Бхл *b*, в основном показывают сходство как в составе, так и в спектральных свойствах. Однако имеются некоторые фотосинтезирующие бактерии, например Chloroflexus aurantiacus, РЦ которых отличаются по соотношению пигментов и по количеству белковых субъединиц. Они содержат больше Бфф и меньше Бхл, чем РЦ Rps. sphaeroides и только две белковые субъединицы (*M* и *L*) [3, 9].

Спектры поглощения пигментов РЦ, а также антенных комплексов всех фотосинтезирующих бактерий характеризуются более длинноволновым поглощением по сравнению с растворами этих пигментов. Работы, проведенные в лаборатории Красновского [10] и Катца [11], показали, что «красное смещение» зависит от взаимодействия молекул пигментов и агрегация пигментов in vitro ведет к тем же спектральным эффектам, которые наблюдаются in vivo. При солюбилизации пленки Бхл *a* в растворе тритона X-100 появляются новые формы с поглощением при 835, 860 и 930 нм. Спектры кругового дихроизма (КД) показали, что этот процесс обусловлен переходом мономерной формы Бхл *a* (770 нм) в ди- (860 нм), а затем и тримерную (835, 930 нм) форму [12]. При увеличении отношения детергент/Бхл происходит сдвиг максимума поглощения в коротковолновую сторону. Таким образом, была подтверждена зависимость поглощения в ближней ИК-области от степени агрегации пигмента.

О том, что длинноволновый сдвиг спектральных полос поглощения пигментов in vivo обусловлен исключительно резонансным взаимодействием дипольных моментов перехода пигментов, свидетельствует также соблюдение для них характерной для димеров in vitro прямой пропорциональной зависимости между величинами длинноволнового сдви-

га и энергии резонансного расщепления [13, 14]. В то же время нельзя исключить то, что взаимодействие молекул пигментов in vivo определяется структурой и конформацией белков, с которыми они связаны. Стефен и Кальвин при исследовании октановой кислоты (мягкий детергент) на спектры КД хроматофоров Rps. sphaeroides R-26 показали, что длинноволновое смещение поглощения Бхл in vivo возникает при образовании пигмент-белкового комплекса за счет специфического взаимодействия между π-электронной системой мономерного Бхл с некоторыми функциональными группами белка [15]. Недавно было предположено, что батохромный сдвиг максимума поглощения in vivo может быть обусловлен взаимодействием пигментов с заряженными аминокислотными остатками в белке. Расчет по методу молекулярных орбиталей подтвердил, что такой сдвиг наблюдается в поле точечных зарядов, причем величина сдвига увеличивается в ряду Хл$<$Бхл $a<$Бхл b [16]. Поскольку взаимодействие пигментов определяется взаимным расположением в пространстве, а их молекулы связаны с белком, то естественно ожидать, что места связывания пигментов на белке и третичная структура белка в значительной мере определяют спектральные свойства всего комплекса.

Каротиноиды. Значение каротиноидов для структурной организации и функциональной активности РЦ окончательно не выяснено. Согласно имеющимся данным, каротиноиды могут выполнять несколько функций. Во-первых, они могут служить в качестве дополнительных светособирающих пигментов, осуществляя синглет-синглетный перенос электронного возбуждения на хлорофилл [17, 18]. Эффективность передачи энергии от каротиноидов на хлорофилл у разных видов фотосинтезирующих бактерий составляет от 30 до 90%. Во-вторых, каротиноиды защищают фотосинтезирующие организмы от фотодинамической деструкции, дезактивируя триплетный хлорофилл и синглетный кислород, фотообразование которого сенсибилизируется триплетным хлорофиллом [18] и наиболее длинноволновыми пигментами Бхл и Бфф b [19].

Специфическое связывание каротиноидов в РЦ фотосинтезирующих бактерий определяется различием в белковом составе субъединиц. Так, на бескаротиноидном мутанте Rps. sphaeroides R-26 было показано, что он связывает чистый all-trans сфероиден, так же как и сфероиденон в отношении 1 : 1 к P870. В отличие от Rh. rubrum G9, реакционные центры из Rps. sphaeroides R-26 не могут связывать ни каротин, ни спириллоксантин, которые отсутствуют и в диком штамме этой бактерии [20].

Организация пигментного аппарата. Использование ряда оптических методов (КД, фотодихроизм, линейный дихроизм ориентированных РЦ и др.) позволило описать взаимодействие пигментов друг с другом, представить схему расположения основных «фотоактивных» молекул пигментов (Бхл и Бфф) в РЦ, а также дать оценку расстояний между первичными переносчиками электронов. Обзор этих данных приведен в работах [5, 21]. Следует отметить, что они находятся в полном согласии с результатами рентгеноструктурного анализа (РСА) трехмерных кристаллов реакционных центров [22—24].

Первые сообщения о получении кристаллов мембранных белков, пригодных для РСА, появились в 1980 г., когда были получены кристаллы бактериородопсина и матриксного белка E. coli — порина [25, 26]. В 1982 г. с помощью детергента гептан 1,2,3-триола были получены кристаллы реакционных центров Rps. viridis [27, 28], обладающие фотохимической активностью [29], но теряющие $\sim$50% хинона от исходного содержания в РЦ-комплексе [30]. Кристаллизация основана на способности данного детергента лучше встраиваться в липофильные щели кристаллической решетки по сравнению с другими детергентами, имеющими больший размер [31]. Недавно получены кристаллические препараты реакционных центров Rps. sphaeroides [24, 32].

Размер элементарной ячейки кристаллов РЦ Rps. viridis равен 223$\times$223$\times$114 Å. Из данных РСА следует, что молекулы Бхл b в димере P960 практически параллельны, а среднее расстояние между ними равно 3 Å при расстоянии 7 Å между ионами Mg^{2+} [22]. Отмечается, что структура димера такова, что практически исключается участие молекул воды в формировании специальной пары Бхл b. Ацетильные группы пиррольных колец находятся в тесном контакте с ионами Mg^{2+} противоположной молекулы Бхл в паре. С каждой стороны димера практически перпендикулярно его плоскости располагаются две молекулы мономерного Бхл b с углом между плоскостями колец $\sim$70° и расстоянием между центральными ионами Mg^{2+} в 13 Å. С каждой стороны мономерного Бхл на расстоянии 11 Å от центра колец расположены молекулы Бфф, угол между плоскостями пиррольных колец Бхл и Бфф составляет 64°, так что плоскости колец димера Бхл и Бфф параллельны [22]. Контакт между молекулами Бхл и Бфф осуществляется посредством фитольных групп. Данные РСА кристаллических препаратов РЦ показывают также, что ячейка кристалла асимметрична и содержит один комплекс РЦ вытянутой формы. Центральная часть образует цилиндр с эллиптическим поперечным сечением наибольшего диаметра — 70 Å и наименьшего — 30 Å. Основаниями центральной части являются две параллельные плоскости с расстоянием между ними $\sim$50 Å. К каждой из боковых плоскостей присоединено по одной белковой субъединице, так что общая длина комплекса РЦ равна 120 Å [22].

БЕЛКИ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ

Состав и первичная структура. Белки реакционных центров составляют $\sim$25% от общего белка пигментсодержащих мембран пурпурных фотосинтезирующих бактерий [33] и являются высоко гидрофобными [2, 34, 35]. Очищенные РЦ Rps. sphaeroides содержат только три белковых субъединицы с молекулярной массой 21 (L) 24 (M) и 28 (H) килодальтон [2, 34]. Общее содержание неполярных аминокислотных остатков в белках РЦ этой бактерии равно 68, а полярных — 32% [34]. Содержание неполярных аминокислотных остатков в субъединицах равно 62, 70 и 71% соответственно для H, M и L [2, 35]. Количество субъединиц и их аминокислотный состав в РЦ из разных

видов пурпурных фотосинтезирующих бактерий сходны, однако белки разных видов бактерий антигенно отличаются друг от друга [33, 35]. Электрофоретическая подвижность белковых субъединиц при электрофорезе в системе ПААГ—ДДС-Na отличается от подвижности обычных, водорастворимых белков, что связано с их высокой гидрофобностью, в результате чего они связывают в ~6 раз больше ДДС-Na, чем водорастворимые белки [1, 36]. Этим и объясняется различие в молекулярных массах комплексов РЦ, определенных по данным электрофореза и аминокислотного анализа [37, 38]. Следует отметить, что по данным первичной структуры *H*-субъединица РЦ Rps. viridis на самом деле является наименьшей субъединицей [39], так как она наименее гидрофобна и связывает меньше ДДС-Na по сравнению с субъединицами *M* и *L*. То же самое справедливо и для *H*-субъединицы РЦ, выделенных из Rps. capsulata [40].

Полная аминокислотная последовательность для *M*- и *L*-субъединиц Rps. sphaeroides была установлена после определения последовательности N-концевых аминокислотных остатков этих субъединиц [41], а затем выделены и клонирования фрагментов ДНК, содержащих их структурные гены [37, 38].

M-субъединица РЦ Rps. sphaeroides содержит 307 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 34 вместо 24 кД по данным электрофореза. Средний индекс гидрофобности этой последовательности равен 1,5. В первичной структуре *M*-субъединицы выделяют пять гидрофобных сегментов, длина которых достаточна для пересечения мембраны в виде α-спирали [37].

L-субъединица содержит 208 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе 31 кД, что также значительно выше по сравнению с данными электрофореза [38]. При сравнении аминокислотных последовательностей *M*- и *L*-субъединиц обнаруживается участок, в котором 33% аминокислотных остатков идентичны, что указывает на значительную гомологию их последовательностей. Об этом же свидетельствует и практически совпадающий профиль распределения гидрофобных аминокислотных остатков в данных субъединицах [38]. Обнаружена гомология последовательностей *M*- и *L*-субъединиц Rps. sphaeroides и Rps. capsulata, а также гомология последовательностей *M*- и *L*-субъединиц этих бактерий с хинонсвязывающим белком фотосистемы II высших растений [38, 40], что указывает на эволюционную общность этих белков.

В *L*-субъединице, как и в *M*, выделяют пять гидрофобных сегментов. Предположение о том, что они могут давать α-спиральные структуры, пронизывающие мембрану, согласуется с данными КД и поляризационной ИК-спектроскопии для РЦ Rps. sphaeroides. Из этих данных следует, что РЦ содержат большую долю α-спиральной структуры, которая располагается практически перпендикулярно плоскости мембраны [42]. Результаты работ [37, 38] совпадают и с данными РСА кристаллов Rps. viridis [22, 39], показавшими, что в центральной части, где находятся все молекулы пигментов, негеминовое железо и хинон, располагаются 10 α-спиралей с длиной ~40 Å каждая. Они образуют две группы по пять спиралей, принадлежащих *M*- и *L*-субъединицам. Одиннадцатая α-спиральная структура в РЦ-комплексе принадлежит *H*-субъединице.

КОФАКТОРЫ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА И ИХ СВЯЗЬ С БЕЛКОВЫМИ СУБЪЕДИНИЦАМИ

Хиноны. РЦ содержат две молекулы хинона, различающиеся по легкости удаления под действием органических растворителей [43] и *о*-фенантролина [44]. Наиболее прочно связанная молекула хинона функционирует как первичный акцептор (Q_A), а менее прочно — как вторичный (Q_B). Конечным акцептором электрона служит комплекс хинона с железом. Установлено, что Q_A и Q_B локализованы на *M*-субъединице РЦ [45, 46]. При использовании F_{ab}-фрагментов антител к белкам РЦ Rps. sphaeroides было показано, что место связывания Q_A находится в недоступном для антител окружении, преимущественно внутри белковой глобулы, а места связывания Q_B расположены на поверхности *M*-субъединицы [46]. По-видимому, это характерно и для РЦ, содержащих Бхл *b*, так как показано, что конфигурации участков связывания Q_B в РЦ Rps. sphaeroides и Rps. viridis имеют много общего [47].

Связывание хинона с *M*-субъединицей зависит от его редокс-состояния и длины изопреноидной цепочки. Так, вторичный акцептор прочно связан с белком в семихинонной форме и менее прочно в хинонной, а UQ_{10} и UQ_9 имеют в 5—6 раз большее сродство к местам связывания на *M*-субъединице, чем UQ_i [48].

Цитохромы. В настоящее время показано, что РЦ некоторых фотосинтезирующих бактерий, содержащих как Бхл *b* (Rps. viridis), так и Бхл *a* (Chr. vinosum, Rps. gelatinosa), тесно связаны с цитохромами *c*-типа, функционирующими в качестве вторичных доноров электрона. Это высокопотенциальный цитохром c_{555} (E_m=300 мВ) и низкопотенциальный цитохром c_{553} (E_m=0). При низких редокс-потенциалах цитохром c_{553} отдает электрон катиону димера специальной пары, а при более высоких значениях потенциала в качестве первичного донора электрона выступает цитохром c_{555} [49]. С помощью методов ограниченного протеолиза [50] и использования сшивающих агентов [51, 52] показано, что цитохромы *c*-типа взаимодействуют с *M*-субъединицей и в меньшей степени с *L*-субъединицей, но не с *H*-субъединицей РЦ. В отличие от цитохромов *a*- и *b*-типов гем цитохрома *c*-типа ковалентно связан с белком. Это, по-видимому, предотвращает диссоциацию гема и его выход в окружающую среду, сохраняя цитохром в функционально активном состоянии [53]. Показано, что в связывании цитохрома c_2 с РЦ Rh. rubrum принимают участие его аминокислотные остатки глу 1, лиз109 и лиз112, которые расположены на задней по отношению к центру связывания гема поверхности молекулы цитохрома [54].

За некоторым исключением большинство бактериальных цитохромов *c*-типа локализованы не в цитоплазме, а в периплазме или образуют лабильную связь с внешней

поверхностью цитоплазматической мембраны. Так, для Rps. viridis показано, что антигенные детерминанты для цитохромов c_{553}/c_{558} имеют выход как на цитоплазматическую, так и на периплазматическую поверхность мембраны [55]. Периплазматическая локализация цитохромов с in vivo была также показана с помощью моноспецифических антител к цитохрому c_2 из Rps. sphaeroides и Rps. capsulata [56].

Таким образом, работы последних лет показали, что кофакторы переноса электрона связаны только с *M*- и *L*-субъединицами РЦ. Удаление *H*-субъединицы с помощью хаотропных агентов не приводит к ингибированию фотохимической активности РЦ, но уменьшает их устойчивость к действию детергентов. Предположено, что она необходима для переноса электрона на вторичный хинон [57] и осуществляет связь антенного комплекса с РЦ [58]. Следует отметить, что до сих пор нет окончательного ответа на вопрос о местах связывания Бхл и Бфф на *M*- и *L*-субъединицах.

ЛИПИДЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАН И РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ

Липиды мембран. Для пигментсодержащих мембран пурпурных бактерий характерно высокое содержание фосфолипидов, причем среди них преобладают фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилглицерол (ФГ), кардиолипин (КЛ) и фосфатидилхолин (ФХ) [59]. Фосфатидилхолин редко встречается в бактериальных мембранах, поэтому его наличие в пурпурных фотосинтезирующих бактериях является их отличительной чертой [60, 61]. Содержание фосфолипидов в хроматофорах разных видов фотосинтезирующих бактерий составляет 37—74% от общей массы, включая и фотосинтетические пигменты [61]. Отметим, что фотосинтетические мембраны Rps. viridis выделяются по высокому содержанию в них кардиолипина среди других пурпурных несерных бактерий и приближаются по этому показателю к пурпурным серным бактериям (табл. 1). При обработке тилакоидов Rps. viridis детергентами с последующим фракционированием их в градиенте плотности сахарозы получаются фрагменты мембран, обогащенные частицами с гексагональной упаковкой [62]. Это совпадает с уменьшением отношения фосфолипид/белок от 0,338 до 0,125 и изменением количественного соотношения фосфолипидов: ФЭ>ФХ>КЛ — до обработки и КЛ>ФХ>ФЭ — после обработки интактных мембран детергентом.

Следует отметить, что обработка мембран детергентами вызывает удаление фосфолипидов, но тем не менее они остаются в детергентных фракциях мембран в достаточном количестве. Повышение плотности таких фрагментов после обработки, возможно, свидетельствует о более тесном контакте остающихся фосфолипидов с белками [62]. Тесная ассоциация некоторых липидов с бактериальными белками была также обнаружена при измерении подвижности липидных спин-меток и поляризации флуоресцентных зондов [63, 64]. Показана также зависимость активности и структуры цитохромоксидазного комплекса от содержания в нем кардиолипина [64, 65].

В тилакоидных мембранах фотосинтезирующих бактерий установлена структурная роль фосфолипидов. Так, например, показано, что липиды определяют расположение и взаимную ориентацию молекул пигментов светособирающих комплексов B800—850 у Chr. minutissium [66], а продукты перекисного окисления липидов могут вызывать изменения в спектрах КД хлорофильных систем различных уровней организации [67].

Исследование липид-белковых взаимодействий в хроматофорах Rps. sphaeroides GA с использованием спин-меченых аналогов жирных кислот показало, что количество иммобилизованной метки прямо зависит от содержания Бхл [63]. Это подтверждает, что существенная фракция (60%) липидной спин-метки соединяется с гидрофобной поверхностью Бхл-связывающих белков. Замена отрицательно заряженной полярной головки спин-меченых липидов на положительно заряженную сильно уменьшает количество связанной метки, указывая на то, что Бхл-связывающие белки предпочтительно ассоциируют с отрицательно заряженными фосфолипидами [63]. От количества липидов в выделенных мембранах зависят и некоторые функциональные характеристики циклического транспорта электрона. Так, при увеличении отношения фосфолипид/UQ_{10} от 50 до 220 путем слияния фосфолипидных везикул с хроматофорами Rps. sphaeroides время быстрой фазы темнового восстановления замедлялось от 2,2 до 16 мс, частично восстанавливаясь при добавлении UQ_5. Предположено, что циклический транспорт электронов между РЦ и комплексами убихинон — цитохром c_2 — оксидоредуктаза в обогащенных

Таблица 1

Фосфолипидный состав (в % от общего количества фосфолипидов) в хроматофорах разных видов фотосинтезирующих бактерий (— не определяется, + показан качественно [94])

Бактерии	КЛ	ФГ	ФХ	ФЭ	Литература
Rh. rubrum	13	22	—	65	[73]
	8	29	6	57	[92]
Rps. sphaeroides	—	34	23	35	[93]
Rps. capsulata	—	41	11	48	[93]
Rps. viridis	22	+	22	51	[62]
E. halophila	25	33	16	6	[60]

Таблица 2

Общее содержание липидов ($c_{общ}$) и содержание фосфолипидов (c), мг/г сухой массы, в реакционных центрах Rhodopseudomonas sphaeroides Y, выделенных с помощью различных детергентов [70]

Компонент	$c_{общ}$	c	c^a
ЦТМБ-РЦ	477	133	285
ЛДАО-РЦ	613	133	365
Хроматофоры	525	258	655

Таблица 3

Содержание (c, мкмоль PO_4^{2-}/мг белка) и состав (% от общей массы) фосфолипидов в хроматофорах и реакционных центрах Rhodospirillum rubrum

Препарат	c	ФЭ	ФГ	КЛ
Хроматофоры	0,62	65	22	13
Чистые РЦ	0,48	51	24	25
Чистые РЦ+NaCl	0,25	45	27	28

липидами хроматофорах лимитируется латеральной диффузией хинонов в плоскости мембраны [68].

Липиды реакционных центров. О фосфолипидном составе РЦ, выделенных из дикого штамма Rsp. sphaeroides Y впервые было сообщено в работе [69]. В препаратах, выделенных с помощью катионного детергента цетилтриметиламмонийбромида (ЦТМБ) или цвитер-ионного детергента лаурилдиметиламиноксида (ЛДАО), было количественно определено содержание липидов (табл. 2). Как видно из табл. 2, содержание фосфолипидов в РЦ в ~2 раза меньше, чем в хроматофорах. Состав фосфолипидов по данным тонкослойной хроматографии экстрактов из этих РЦ был следующим: ФЭ, ФГ, ФХ и КЛ. Дальнейшая очистка таких РЦ дала образцы, содержащие только 10% липидов от исходного уровня (1,3 против 13 мкг Р/мкг белка в исходном препарате РЦ) [70]. Количество убихинона, связанного с РЦ, при этом не менялось, как не менялись спектральные и фотохимические свойства. На основании этих данных авторы сделали вывод, что фосфолипиды не являются необходимым компонентом РЦ. Однако с этим трудно согласиться, так как по более поздним данным тех же авторов РЦ Rsp. sphaeroides содержат шесть молекул фосфолипидов на РЦ [71]. Кроме того, на многих липидзависимых ферментах показано, что при еще меньшем отношении липид/белок удаление липида ведет к полной потере функции белка [64, 65, 72, 73]. Как ранее считалось, РЦ бескаротиноидного мутанта Rps. sphaeroides R-26 не содержат фосфолипидов [34], однако сейчас установлено, что они содержат четыре молекулы фосфолипидов на РЦ и от их наличия зависит количество связанного с РЦ хинона [74]. В [75] установлено, что РЦ Rps. viridis содержат 3 моля фосфолипидов на 1 моль РЦ. Там же показано, что коротковолновое смещение P960 при действии на РЦ липазы или больших концентраций ЛДАО может быть обращено при включении делипидизированных РЦ в липосомы. По мнению авторов, это является доказательством роли фосфолипидов в организации димера специальной пары. Нарушения в структурной организации пигментных форм в РЦ Rps. viridis, вызванные действием на них различных агентов, сопровождаются также изменениями в функциональной активности РЦ [76, 77].

Для РЦ Rh. rubum можно получить комплекс с минимальным содержанием фосфолипидов, причем оставшиеся липиды прочно связаны с РЦ и не удаляются при ионообменной хроматографии или высаливании сульфатом аммония [73]. Препараты РЦ с минимальным содержанием липидов легко теряют *H*-субъединицу и менее устойчивы к действию детергентов. Фосфолипидный состав этих РЦ приведен в табл. 3. Видно, что качественно он совпадает с липидным составом хроматофоров, но количественно отличается за счет увеличения доли отрицательно заряженных фосфолипидов. То, что в ближнем окружении РЦ фотосинтезирующих бактерий накапливаются отрицательно заряженные липиды, может быть существенно, так как они могут взаимодействовать с положительно заряженными областями поверхности белков РЦ и светособирающих комплексов [63, 78]. Роль фосфолипидов в поддержании структуры РЦ была также показана при солюбилизации РЦ в гексане [79]. В этом случае стабильность РЦ зависела от наличия фосфолипидов и воды. При делипидизации препаратов РЦ, солюбилизированных в гексане, происходило уменьшение индуцируемого фотоокисления до нулевого уровня, которое не обращалось даже после добавления экзогенного хинона, хотя спектральные характеристики РЦ сохранялись [79].

Несмотря на данные, свидетельствующие об электростатическом взаимодействии между белками и фосфолипидами в РЦ [62, 73, 78], нельзя отвергать возможность пря-

мого взаимодействия между Хл или Бхл с липидами. Это взаимодействие может осуществляться через контакты между фитолом и жирнокислотными остатками липидов или через координационное взаимодействие между атомом Mg пигмента с нуклеофильными группами в молекуле липида [80, 81].

МИНИМАЛЬНЫЙ РАЗМЕР ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА

В последние годы обсуждается вопрос о минимальном размере фотосинтетического реакционного центра фотосинтезирующих бактерий, сохраняющем характерные спектральные свойства и функциональную активность. Ранее уже указывалось, что минимальным размером РЦ считается *LM*-комплекс, так как *H*-субъединица не несет на себе никаких кофакторов переноса электрона [2]. Тем не менее этот вопрос окончательно не решен. Так, из Rh. rubrum были получены РЦ, содержащие только *L*-субъединицу. Такие РЦ сохраняли характерный спектр поглощения, а действующий свет вызывал изменения, которые отражали процесс разделения зарядов [82]. Однако при электрофорезе таких препаратов в системе ПААГ—ДДС-Na наблюдались уширения полосы соответствующей *L*-субъединице по сравнению с интактными РЦ. В последующем было показано, что в Rh. rubrum отмечается протеолитическая активность, которая сопутствует РЦ на всех стадиях его очистки [83, 84].

Исследования влияния трипсина и химотрипсина на изолированные РЦ показали, что при обработке химотрипсином исчезает *H*-субъединица, а *M*- и *L*-субъединицы не затрагиваются. При трипсиновом гидролизе *H*-субъединица также исчезает, а молекулярная масса *M*-субъединицы уменьшается до значения, характерного для *L*-субъединицы. При таком протеолизе разрушается 65—75% белка РЦ, но спектральные свойства и фотохимическая активность сохраняются [50]. Анализ продуктов протеолиза РЦ Rh. rubrum при использовании различных протеиназ показал, что значительное расщепление *M*-субъединицы и частичное *L*-субъединицы не приводит к изменениям в свойствах РЦ [85]. Скорость темнового восстановления фотоокисленного P870 после протеолиза замедлялась до 40 с (по сравнению с 3—5 с в контроле), а кинетика восстановления фотоокисленного экзогенного цитохрома c_2 оставалась неизменной [50]. На основании этого был сделан вывод, что «наименьшим размером» РЦ можно считать легкую субъединицу и часть средней, на которой сохраняются места связывания для кофакторов переноса электрона и цитохрома *c*-типа. Однако полного сохранения свойств в таких комплексах не наблюдается. Показано, что *LM*-комплекс, полученный из Rps. sphaeroides Y, отличается по свойствам от нативного РЦ. Во-первых, полоса поглощения Q_x-перехода P870 сдвинута до 870 нм в *LM*-комплексе (890 нм в *HML*) и расширена на 30%; во-вторых, межмолекулярные взаимодействия, обусловленные сопряженными карбонильными связями молекул Бхл в *LM*-РЦ, отличаются от таковых в нативных РЦ [84]. Показано также, что *H*-субъединица необходима для переноса электрона на вторичный хинон [57] и для координации взаимоотношений светособирающих комплексов с РЦ [52, 86]. Поэтому более правильно считать минимальной фотосинтетической единицей полный *HML*-комплекс.

ТОПОГРАФИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

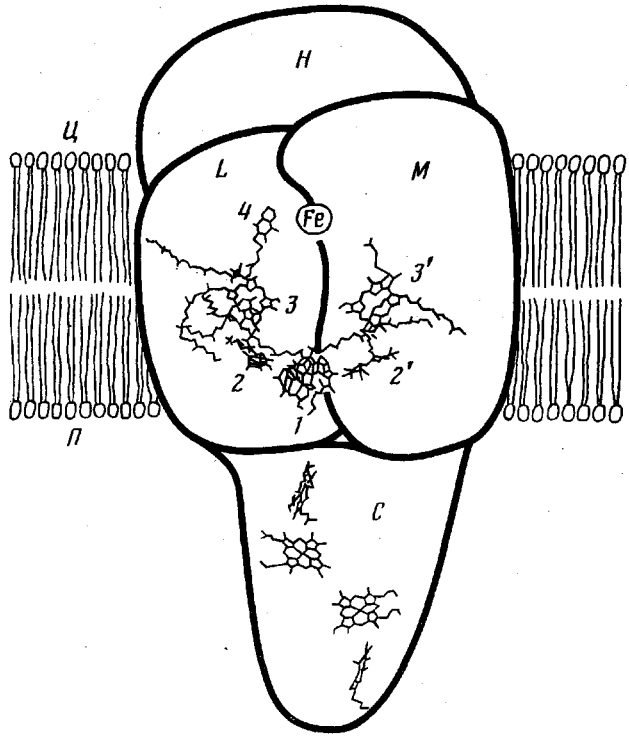
Структурная организация фотосинтетических реакционных центров в бактериальной мембране изучается, как правило, в плане трансмембранной и латеральной топографии белковых субъединиц РЦ. В основном исследования проводятся на двух типах мембранных препаратов — хроматофорах и сферопластах. Сферопласты имеют ту же

Таблица 4

Определение мембранной топографии реакционных центров Chr. minutissimum и Rps. capsulata

Метод определения	Препарат	*H*	*M*	*L*	Литература
	Chr. minutissimum				
^{125}I с лактопероксидазой	Хроматофоры	++	++	——	[95]
	РЦ	++	++	——	[95]
Флуорескамин (гф. м.)	Хроматофоры	++	+—	——	[96]
	РЦ	+—	—+	——	[96]
Дансилхлорид	Хроматофоры	+—	—+	——	[96]
	РЦ	—+	—+	——	[96]
	Rps. capsulata				
^{125}I (пов. м.)	Хроматофоры	++	+—	—+	[97]
	Сферопласты	++	++	+—	[97]
Протеолиз (протеиназа К)	Хроматофоры	++	+—	—+	[98]
	Сферопласты	+—	——	——	[98]
	РЦ	++	+—	—+	[98]
	Липосомы с РЦ	++	+—	—+	[98]

Обозначения: гф. м. — гидрофобная метка, пов. м. — поверхностная метка, ++ — положительная реакция, —— — отрицательная реакция.



Предполагаемая схема молекулярной организации реакционных центров Rhodopseudomonas viridis *H*, *M* и *L* — тяжелая, средняя и легкая белковые субъединицы реакционного центра соответственно; *C* — цитохром c_{553}/c_{558}, *1* — димер бактериохлорофилла *b*, *2*, *2'* — мономеры бактериохлорофилла *b*, *3*, *3'* — мономеры бактериофеофитина *b*, *4* — первичный акцептор электрона (Q_A) — менахинон 9, *П* и *Ц* — периплазматическая и цитоплазматическая стороны мембраны

ориентацию мембран, что и интактные клетки, а хроматофоры — противоположную. Методы выяснения мембранной топографии включают в себя обработку протеолитическими ферментами, мечение белковых компонентов радиоактивными или флуоресцентными метками, обратимые и необратимые сшивки компонентов фотосинтетических мембран и др.

Трансмембранная организация реакционных центров. Принято считать, что все три белковые субъединицы РЦ пересекают мембрану: *H*-субъединица имеет довольно большие участки, экспонированные по обе стороны мембраны, *M*- и *L*-субъединицы выдаются над внутренней стороной мембран хроматофоров, а на наружной более представлена *M*-субъединица. Некоторые данные по трансмембранной организации РЦ приведены в табл. 4 и в работе [7]. О трансмембранной асимметрии распределения белков РЦ вдоль нормали к плоскости мембраны свидетельствуют и данные по дифракции нейтронов в препаратах РЦ, встроенных в липосомы [87, 88].

Латеральная топография реакционных центров. Взаимное расположение субъединиц РЦ и их взаимоотношение с компонентами светособирающих комплексов изучается с использованием сшивающих реагентов [86, 89—91]. При обработке такими реагентами РЦ из Rps. sphaeroides вместе с цитохромом с из сердца лошади образовывались сшивки между субъединицами *L* и *M*, а также между цитохромом и *L*-субъединицей [52]. При использовании глутарового альдегида сшивались все три субъединицы РЦ. Гидрофобный реагент дитио-*бис*-сукцинимидилпропионат (ДТСП) сшивал *L*- и *M*-субъединицы со светособирающими пигмент-белковыми комплексами, если был взят в избытке, а при малых количествах давал сшивки типа *H*—*H* или *H* с другими мембранными белками, но не с *L*- или *M*-субъединицами [86]. При обработке гидрофобным реагентом (4-азидофенил)дитиосукцинимидилпропионатом (АФДП) и ДТСП РЦ из Rps. sphaeroides и Rps. capsulata было показано, что главным образом образуются сшивки *H*—*L* и в меньшей степени *M*—*L*.

Отмечаемое во всех случаях отсутствие высокомолекулярных продуктов сшивки свидетельствует о том, что в мембране РЦ находятся в виде стабильного мономерного комплекса трех субъединиц [86, 91]. Это подтверждает предположение, сделанное ранее при электронно-микроскопическом исследовании РЦ из Rh. rubrum в хроматофорных и липосомальных мембранах [92]. При использовании ДТСП и АФДП, имеющих длину 11 Å, образуются сшивки между *H*-субъединицей РЦ и низкомолекулярными полипептидами светособирающего комплекса, *H*- и в меньшей мере *M*-субъединица связываются с комплексом B800—850 [86, 90], а весь комплекс B870 связывается с РЦ, вероятно, через *M*- и *L*-субъединицы [91]. При обработке хроматофоров Rps. viridis ДТСП образовывались сшивки между цитохромом c_{553}/c_{558} и *M*-субъединицей в соотношении 1 : 1,

а *H*-субъединица сшивалась с полипептидом 8 кД светособирающего комплекса, который несет на себе весь антенный Бхл [53]. Таким образом, как и в РЦ, содержащих Бхл *a*, *H*-субъединица отвечает за контакт между РЦ и светосборщиком. Предполагают, что в Rhodospirillaceae молекулы пигментов светосборщика и первичного донора стерически координированы взаимодействием между наименьшим полипептидом антенны и *H*-субъединицы реакционного центра [56, 59].

Схема предполагаемой пространственной организации реакционных центров пурпурных фотосинтезирующих бактерий, основанная на приведенных выше данных по топографии и РСА кристаллов РЦ, представлена на рисунке.

Заключение.

Изучение фотохимических реакций бактериальных пигментов, протекающих с образованием окисленных или восстановленных форм, позволило установить, что механизм превращения энергии квантов света в РЦ в энергию разделенных зарядов определяется способностью пигментов к обратимому приему или отдаче электрона [99]. Высокая эффективность фотохимических процессов в бактериальных РЦ обеспечивается особенностями молекулярной организации пигмент-белковых комплексов. В этих структурах создается возможность осуществления нескольких стадий последовательного переноса электрона, пространственного разделения зарядов и предотвращения обратных реакций.

Для понимания молекулярной организации и механизма функционирования РЦ существенны исследования структуры белковых субъединиц, свойств кристаллов РЦ, а также выяснения мест связывания пигментов и других кофакторов переноса электрона на белковой поверхности. Имеет также значение определение роли отдельных составных частей РЦ, в частности, возможной роли фосфолипидов, в структурной организации РЦ, а также изучение внутрикомплексных взаимодействий, обеспечивающих нативную структуру и фотохимическую активность РЦ.

Изучение особенностей взаимосвязи структурной организации с функциональной активностью РЦ имеет практическое значение. В перспективе, использование методов генной инженерии, вероятно позволит получать РЦ, обладающие заданными свойствами. Более полное познание структуры и функции РЦ будет способствовать созданию искусственных систем, эффективно преобразующих солнечную энергию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Клейтон Р.* Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984. 350 с.
2. *Feher G., Okamura M. Y.* In: The Photosynthetic Bacteria/Eds Clayton R. K., Sistrom W. R. N. Y.— L.: Plenum Press, 1978, p. 349.
3. *Thornber J. P., Cogdell R. J., Pierson B. K., Seftor E. B.* J. Cell Biochem., 1983, v. 23, p. 159.
4. *Loach P. A.* In: Methods in Enzymol., 1980, v. 69, Pt C, p. 155.
5. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* Биофизика, 1981, т. 26, с. 554.
6. *Parson W. W.* Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1982, v. 11, p. 57.
7. *Рубин А. Б., Шинкарев В. П.* Транспорт электронов в биологических системах. М.: Наука, 1984. 391 с.
8. *Seftor E. B., Thornber J. P.* Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 158, p. 567.
9. *Feick R. G., Fuller R. C.* Biochemistry, 1984, v. 23, p. 3693.
10. *Krasnovsky A. A., Bystrova M. I.* Biosystems, 1980, v. 12, p. 181.
11. *Katz J. J., Norris J. R.* Curr. Top. Bioenerg., 1973, v. 4, p. 41.
12. *Gottstein J., Scheer H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 2231.
13. *Шубин В. В., Карапетян Н. В.* Журн. физ. химии, 1981, т. 55, с. 3084.
14. *Шубин В. В., Дроздова Н. Н., Вычегжанина И. В. и др.* Молекуляр. биология, 1981, т. 15, с. 359.
15. *Steffen H., Calvin M.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 1970, v. 41, p. 282.
16. *Eccles J., Honig B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 4959.
17. *Mathis P., Schenck C. C.* In: Carotenoid Chem. and Biochem. Proc., 6th Int. Symp. Carotenoids, Oxford e. a.: 1982, p. 339.
18. *Grumbach K.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1983, P. 364, S. 1133.
19. *Красновский А. А. мл., Вычегжанина И. В., Дроздова Н. Н., Красновский А. А.* Докл. АН СССР, 1985, т. 283, с. 474.
20. *Agalidis I., Lutz M., Reiss-Husson F.* Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 589, p. 264.
21. *Schuvalov V. A., Asadov A. A.* Ibid., 1979, v. 545, p. 296.
22. *Deisenhofer J., Epp O., Miki K. et al.* J. Mol. Biol., 1984, v. 180, p. 385.
23. *Gast P., Wasielevsky M. R., Schiffer M., Norris J. K.* Nature, 1983, v. 30, p. 451.
24. *Gast P., Norris J. R.* FEBS Lett., 1984, v. 177, p. 277.
25. *Michel H., Oesterhelt D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 1283.
26. *Garavatio R. M., Rosenbusch J. P.* J. Cell Biol., 1980, v. 86, p. 327.
27. *Michel H.* EBEC Reports, LBTM—CNRS Edition, 1982, v. 2, p. 223.
28. *Michel H.* J. Mol. Biol., 1982, v. 158, p. 567.
29. *Zinth W., Kaiser W., Michel H.* Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 162, p. 128.
30. *Gast P., Michalski T. J., Hunt J., Norris J. R.* FEBS Lett., 1985, v. 179, p. 325.
31. *Michel H.* Trends in Biochem. Sci., 1983, v. 8, p. 56.
32. *Norris J. R., Gast P.* J. Photochem., 1985, v. 29, p. 185.
33. *Clayton R. K., Haselkorn R.* J. Mol. Biol., 1972, v. 68, p. 97.
34. *Feher G.* Photochem. Photobiol., 1971, v. 14, p. 373.

35. *Steiner L. A., Okamura M. Y., Lopes A. D. et al.* Biochemistry, 1979, v. 18, p. 1403.
36. *Vadeboncouer C., Noel H., Poirier L. et al.* Ibid., 1979, v. 18, p. 4301.
37. *Williams J. C., Steiner L. A., Simon M. I. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 6506.
38. *Williams J. C., Steiner L. A., Feher G., Simon M. I.* Ibid., 1984, v. 81, p. 7303.
39. *Deisenhofer J., Epp O., Miki K. et al.* Nature, 1985, v. 318, p. 618.
40. *Hearst J. E., Sauer K.* Z. Naturforsch., 1984, B. 39C, S. 421.
41. *Sutton M. R., Rosen D., Feher G., Steiner L. A.* Biochemistry, 1982, v. 21, p. 3842.
42. *Nabedryk E., Tiede D. M., Dutton P. L., Breton J.* Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 682, p. 273.
43. *Cogdell R. J., Brune D. C., Clayton R. K.* FEBS Lett., 1974, v. 45, p. 344.
44. *Okamura M. Y., Isaacson R. A., Feher G.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1975, v. 72, p. 3491.
45. *Marinetti T. D., Okamura M. Y., Feher G.* Biochemistry, 1979, v. 18, p. 3126.
46. *Debus R. J., Valkirs G. E., Okamura M. Y., Feher G.* Biochim. Biophys. Acta, 1984, v. 682, p. 500.
47. *Shopes R. J., Wraight C. A.* Ibid., 1985, v. 806, p. 348.
48. *Diner B., Schenck C., Vitry C.* Ibid., 1984, v. 766, p. 9.
49. *Prince R. C., Dutton P. L.* In: The Photosynthetic Bacteria/Eds Clayton R. K., Sistrom W. R. N. Y.— L.: Plenum Press, 1978, p. 439.
50. *Wiemken V., Bachofen R.* FEBS Lett., 1984, v. 166, p. 155.
51. *Rosen D., Okamura M. Y.* Biochemistry, 1982, v. 21, p. 335.
52. *Peters J., Welte W., Drews G.* FEBS Lett., 1984, v. 171, p. 267.
53. *Wood P. M.* Ibid., 1983, v. 164, p. 223.
54. *Rieder R., Wiemken V., Bachofen R., Bosshard H. R.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, v. 128, p. 120.
55. *Jay F., Lambillote M., Mühlethaler K.* Eur. J. Cell Biol., 1983, v. 30, p. 1.
56. *Prince R. C., Baccarini-Melandri A., Hauska G. A. et al.* Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 387, p. 212.
57. *Debus R. J., Feher G., Okamura N. Y.* Biochemistry, 1985, v. 24, p. 2488.
58. *Zuber H.* Photochem. Photobiol., 1985, v. 42, p. 821.
59. *Keynon C.* In: The Photosynthetic Bacteria/Eds Clayton R. K., Sistrom W. R. N. Y.— L.: Plenum Press, 1978, p. 281.
60. *Asselianeau J., Trüper H.* Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 712, p. 111.
61. *Imhof C.* J. Bacteriol., 1982, v. 150, p. 1192.
62. *Welte W., Kreutz W.* Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 692, p. 479.
63. *Birrel G. B., Sistrom W. R., Griffith O. H.* Biochemistry, 1978, v. 17, p. 3768.
64. *Seelig A., Seelig J.* Biochim. Biophys. Acta, 1985, v. 815, p. 153.
65. *Gwak S. H., Powell G. L.* Biophys. J., 1982, v. 37, p. 108.
66. *Ерохин Ю. Е., Синегуб О. А.* Молекуляр. биология, 1970, т. 4, с. 541.
67. *Brody M., Mathanson B.* Biophys. J., 1972, v. 12, p. 774.
68. *Casadio R., Venturoli G., di Giola A. et al.* J. Biol. Chem., 1984, v. 14, p. 9149.
69. *Jolchine G., Reiss-Husson F.* FEBS Lett., 1974, v. 40, p. 1.
70. *Jolchine G., Reiss-Husson F.* Ibid., 1975, v. 52, p. 33.
71. *Rivas E., Reiss-Husson F., Maire M.* Biochemistry, 1980, v. 19, p. 2943.
72. *Picorel R., Balanger G., Gingras G.* Ibid., 1983, v. 22, p. 2491.
73. *Snozzi M., Bachofen R.* Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 546, p. 236.
74. *Kendall-Tobias M., Seibert M.* Arch. Biochem. Biophys., 1979, v. 546, p. 255.
75. *Дроздова Н. Н., Хотченков В. П., Красновский А. А.* Биохимия, 1985, т. 50, с. 1213.
76. *Хотченков В. П., Дроздова Н. Н., Вычегжанина И. В., Красновский А. А.* Биофизика, 1983, т. 28, с. 878.
77. *Дроздова Н. Н., Вычегжанина И. В., Красновский А. А.* Биохимия, 1985, т. 50, с. 2040.
78. *Захарова Н. И., Пермяков Е. А., Фабиан Н. и др.* Молекуляр. биология, 1984, т. 18, с. 719.
79. *Kendal-Tobias M. W., Celis H., de Celis S. A., Crofts A. K.* Biophys. Acta, 1981, v. 635, p. 585.
80. *Katz J. J.* In: Adv. Biochem. Physiol. Plant Lipids. Proc. Symp. Göteborg, Aug. 28—30, 1978. Amsterdam e. a.: 1979, p. 37.
81. *Heithier H., Möwald H.* Z. Naturforsch., 1983, B. 38C, S. 1003.
82. *Gimenez-Gallego G., Suanzes P., Ramirez J.* FEBS Lett., 1982, v. 149, p. 59.
83. *Gimenez-Gallego G., Suanzes P., Ramirez J.* Ibid., 1983, v. 162, p. 91.
84. *Rivas E., Gimenez-Gallego G.* Biochim. Biophys. Acta, 1984, v. 764, p. 125.
85. *Agalidis I., Lutz M., Reiss-Husson F.* Ibid., 1984, v. 766, p. 188.
86. *Peters J., Takemoto J. Y., Drews G.* Biochemistry, 1983, v. 22, p. 5660.
87. *Pachence J. M., Dutton P. L., Blazie J. K.* Biochim. Biophys. Acta, 1984, v. 548, p. 348.
88. *Sadler D. M., Rivas E., Guilic-Krzywicki T., Reiss-Husson F.* Biochemistry, 1984, v. 23, p. 2704.
89. *Jay F., Lambillote M.* Eur. J. Cell. Biol., 1985, v. 37, p. 7.
90. *Drews G., Peters J., Dierstein R.* Ann. Microbiol., 1983, v. B134, p. 151.
91. *Bachman R. C., Takemoto J. Y.* Biochem. Int., 1983, v. 7, p. 133.
92. *Meyer R., Snozzi M., Bachofen R.* Arch. Microbiol., 1981, v. 130, p. 125.
93. *Oelze J., Drews G.* In: Organization of Procaryotic Cell Membranes/Ed. Chosh B. CRC Press, Boca Raton, Fl., 1981, p. 231.
94. *Pucheu N. L., Kerber N. L., Garcia A. F.* Arch. Microbiol., 1974, v. 101, p. 259.
95. *Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е.* Докл. АН СССР, 1983, т. 270, с. 251.
96. *Васильев Б. Г., Ерохин Ю. Е.* Биохимия, 1983, т. 48, с. 975.

97. *Peters J., Drews G.* J. Bacteriol., 1984, v. 158, p. 983.
98. *Peters J., Drews G.* FEBS Lett., 1983, v. 162, p. 57.
99. *Красновский А. А.* Преобразование света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы. М.: Наука, 1974, с. 64.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
19.VI.1986

MOLECULAR ORGANIZATION OF REACTION CENTRES OF PHOTOSYNTHESIZING BACTERIA

KHOTCHENKOV V. P., DROZDOVA N. P., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

Modern concepts are presented of molecular organization of reaction centres of purple photosynthesizing bacteria.

Главный редактор А. А. КРАСНОВСКИЙ

Заместители главного редактора Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД, Г. Р. ИВАНИЦКИЙ

Редакционный совет:

Э. Л. АНДРОНИКАШВИЛИ, А. А. БАЕВ, Б. Н. ВЕПРИНЦЕВ,
И. М. ГЕЛЬФАНД, П. Г. КОСТЮК, Ю. П. КОЗЛОВ, Л. А. ПИРУЗЯН,
В. П. СКУЛАЧЕВ, И. А. ТЕРСКОВ, А. С. ТРОШИН,
Б. А. ТАШМУХАМЕДОВ, Д. С. ЧЕРНАВСКИЙ,

Редакционная коллегия:

Г. Н. БЕРЕСТОВСКИЙ, Ю. А. ВЛАДИМИРОВ, Л. П. КАЮШИН,
С. В. КОНЕВ, С. А. КРОЛЕНКО, В. В. ЛЕДНЕВ, Ф. Ф. ЛИТВИН,
М. А. ОСТРОВСКИЙ, А. Б. РУБИН, С. Э. ШНОЛЬ

Ответственный секретарь журнала Н. Г. ЕСИПОВА

Адрес редакции: 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., д. 21.

Телефон 227-38-18

Зав. редакцией *М. А. Левитас*

Технический редактор *Ларкина Е. Н.*

Сдано в набор 10.01.87 Подписано к печати 25.02.87 Т-08909 Формат бумаги 70×108¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 15,4 Усл. кр.-отт. 27,9 тыс. Уч.-изд. л. 17,3 Бум. л. 5,5
Тираж 1783 экз. Зак. 4017

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6.

PHOTOSYNTHETICA 21 (1): 56—64, 1987

Structural and Functional Changes in Reaction Centres of *Rhodopseudomonas viridis* Resulting from a Disturbance in the Pigment-Protein-Lipid Interactions*

Natalya N. DROZDOVA, V. P. KHOTCHENKOV and A. A. KRASNOVSKIĬ

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Lenin Prospect 33, SU - 1170 71 Moscow, U.S.S.R.

Abstract

The structural and functional changes of reaction centres (RC) from *Rhodopseudomonas viridis* produced by lipase, variations in a concentration of a detergent, lauryldimethylamine oxide, (LDAO), and ionic strength (NaCl) were investigated. Partial delipidation of RC by means of lipase or high LDAO concentrations induced similar spectral changes in *P*960 and *P*830 pigment forms. These changes consisted of a gradual short-wavelength shift of the *P*960 maximum up to 30 nm and a reduced intensity of both absorption bands. The incorporation of RC subjected to limited lipolysis into liposomes resulted in a reversal of the shift. Elimination of the electrostatic interaction by increasing ionic strength resulted in an increase of absorption at Q_x and Q_y bands of the *P*960 special pair. The above effects were accompanied by variations in the proportion of an α-helical structure in RC protein moiety, which were indicative of changes in RC protein conformation associated with changes in hydrophobic interaction. The results suggest an important part played by lipids in creating a hydrophobic environment in the *P*960 dimer area, which is related to the functional activity of the dimer.

The initial transformation of the radiant energy during photosynthesis in purple bacteria occurs in specialized structures, the reaction centres (RC). The bacterial RC is a membrane complex consisting of three protein subunits non-covalently bound to pigments (four bacteriochlorophyll, two bacteriopheophytin, and one carotenoid molecule), as well as to other components (two ubiquinone molecules and one iron atom) (Dutton *et al.* 1978). Besides, the RC of *R. viridis* contains *c*-type cytochromes which function as secondary donors of the electron (Thornber *et al.* 1980, Jay *et al.* 1983).

The high efficiency of energy conversion in the RC prompts investigations of the molecular organization of these structures. Reports have been published on the structure, localization and involvement of the pigments in the initial charge separation (Shuvalov and Asadov 1982, Welte and Kreutz 1982), conformation and orientation of RC proteins (Nabedryk *et al.* 1982), and the polypeptide subunit primary structure (Marinetti *et al.* 1979). Particularly important for the understanding of the RC molecular organization are recent studies on the *R. viridis* RC crystallization (Michel 1982) and on properties of the crystals (Zinth *et al.* 1983). It is still not clear, however, whether phospholipids are involved and participate in the structural organization of bacterial RC. The presence of lipids and their importance for the stability has been demonstrated for the RC isolated from *R. sphaeroides* (Jolchine and Reiss-Husson 1975) and *Rhodospirillum rubrum* (Snozzi and Bachofen 1979), for complexes isolated from chromatophores of these bacteria, and for the ubiquinol-cytochrome *c*-reductase complex ($b—c_1$) in particular (Yu and Yu 1982). Lipids also play an important part in the native conformation of B850 in *Chromatium minutissimum* (Erokhin and Sinegub 1974).

* *Received* 5 August 1986.

In the present study we attempted to estimate the contribution of lipids to the structural organization of pigments in the RC isolated from *R. viridis* membrane chromatophores by means of a detergent, lauryldimethylamine oxide (LDAO). The preparations thus isolated retain, essentially, their native molecular organization and a high photochemical activity (Clayton and Clayton 1978).

MATERIALS AND METHODS

R. viridis cells were grown under anaerobic conditions in the light. RC were isolated from the chromatophores by chromatography on a hydroxylapatite column with the aid of LDAO, followed by precipitation with ammonium sulfate (Clayton and Clayton 1978). The samples were stored under liquid nitrogen in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.1) containing 0.05% LDAO and were resuspended in an appropriate buffer before the experiment. Bacteriochlorophyll (BChl) *b* concentration in samples was determined from absorption at 830 nm using the *E* value of 300 ± 65 mM^{-1} cm^{-1} (Clayton and Clayton 1978). The purity of RC was checked by polyacrylamide gel electrophoresis according to Laemmli (1970), using a *Pharmacia Fine Chemicals* calibration kit ($14-94 \times \times 10^3$) as a standard for determining the relative molecular mass (M_r).

The total lipid content in chromatophores and RC was determined after extraction of lipids with 20 volumes of chloroform-methanol (2:1). The denaturated protein was sedimented by centrifugation for 10 min at 117 s^{-1}. The supernatant containing lipids, pigments and residual protein was washed with 0.2 volumes of 0.04 % $MgSO_4$ to remove traces of inorganic phosphate. Pooled chloroform phases were evaporated under Ar, and the residue was dissolved in a minimal volume of chloroform-methanol (2:1). The lipid composition was determined by two-dimensional thin-layer chromatography on *KSK* silica gel plates, using a chloroform-methanol-water (65:25:4) and a chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (50:20:10:10:5) mixtures for the separation in the first and second directions, respectively. The lipid bands were visualized by iodine vapour or phosphorus reagent of Svetachev and Vaskovsky (1972). The mobility of phospholipids was compared to that of a standard phospholipid mixture. Quantitative determination of phosphorus was done after burning chromatophore or RC extracts by the method of Bartlett (1959). The pancreatic lipase preparation used for a lytic treatment of RC was kindly provided by V. A. Yeremin from our Institute. The incubation with lipase was performed in 10 mM Tris-HCl (pH 8.1) with 5 mM $CaCl_2$ at 37 °C. RC and lipase were added to the buffer to a final concentration of 0.59 μM and 60 μg cm^{-3}, respectively. The effect of lipase was estimated by a change of absorption and circular dichroism (CD) spectra and by a reversible light-induced change in absorption at 960 nm (ΔA_{960}).

RC-containing proteoliposomes were obtained by a modified method of Brunner *et al.* (1976). The phosphatidylcholine films were suspended in 0.15 M NaCl, 10 mM Na-phosphate buffer (pH 7.6) to the concentration of 15 mg cm^{-3}, then RC to the concentration of 0.33 μM and sodium cholate were added. The mixture was stirred in the dark for 30 min at 5 °C. The final sodium cholate concentration was 32 mM. The resulting suspension was applied to a *Sephadex G-50* column (1.5×30 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl, Na-phosphate buffer (pH 7.6) containing 0.05 % LDAO. The elution was done with the same buffer at 25 °C. Proteoliposomes were then concentrated to 2 cm^3 in an *Amicon* ultrafiltration cell equipped with an *XM-100* filter. To introduce RC with partially hydrolysed phospholipids into liposomes, the incubation with the enzyme was carried out directly in the ultrafiltration cell (in the dark). After a certain time interval, washings to remove the lipase were started: twice with 5 cm^3 of 10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 0.02 % LDAO, and then 3 times with 5 cm^3 of 10 mM Na-phosphate (pH 7.6), 0.15 M NaCl, 0.02 % LDAO. After the washings, the sample was concentrated to 1.5 cm^3 and incorporated into liposomes as described above.

Absorption spectra before and after lipase treatment were taken on *Specord M-40* and *Unicam SP-700* spectrophotometers in the 240—900 and 700—1100 nm regions, respectively. Both instru-

ments were equipped with thermostated cell-holders. CD spectra were taken on a *Jasco 40-AS* spectropolarimeter in the 190—250 nm range in 2-mm light path quartz cells. The protein concentration in the samples was 0.1—0.2 mg cm^{-3}. The enzyme spectrum was subtracted from the RC-enzyme mixture spectra. Reversible light-induced changes in absorption at 960 nm (A) were recorded on a one-beam spectrophotometer (Karapetyan *et al.* 1963) under illumination through a *KS-19* filter. RC protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).

RESULTS

The purity of the RC isolates could be judged from the absorption spectra (Fig. 1) using the A_{280}: A_{830} and A_{830}: A_{960} ratios whose optimal values are 2.1 and 2.5, respectively (Clayton and Clayton 1978). In our preparations these ratios usually equalled 2.3 and 2.5. Electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel indicated the presence of four subunits with molecular masses of 40, 33, 28 and 25 × 10^3. The 40 × 10^3 subunit suggests that the preparation contains a *c*-type cytochrome (Jay *et al.* 1983).

The chromatophores had an about four times greater phospholipid to protein ratio than the RC had (Table 1). If the RC protein content is 20—25 % of the total chromatophore protein (Clayton

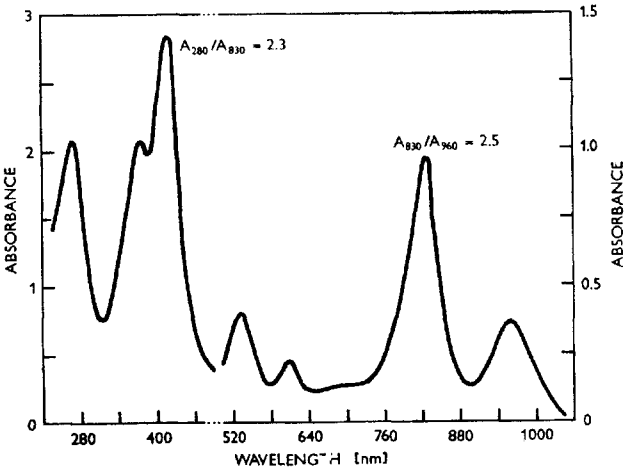


Fig. 1. Absorption spectrum of reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis*.

Table 1

Protein and phospholipid contents in reaction centres and chromatophores of *Rhodopseudomonas viridis* (average of four experiments).

Component	Chromatophores	RC
Protein [mg cm^{-3}]	5.91	1.74
Phospholipid [mg cm^{-3}]	1.92	0.13
Phospholipid/protein [mg g^{-1}]	324.90	74.70

and Haselkorn 1972), the RC phospholipid content is approximately 7 % of phospholipids in the chromatophore membrane. From the phosphorus content in the RC chloroform-methanol extracts (3 μg cm^{-3}) and the BChl *b* content (2.9 μM) it can be calculated that 1 mol of BChl corresponds to 3 mol of phospholipids. The ratio is almost the same as the one reported for RC of *R. sphaeroides* (Kendall-Tobias and Seibert 1982). The following main components were identified in *R. viridis* chromatophores by two-dimensional chromatography of the lipid extracts: phosphatidylcholine

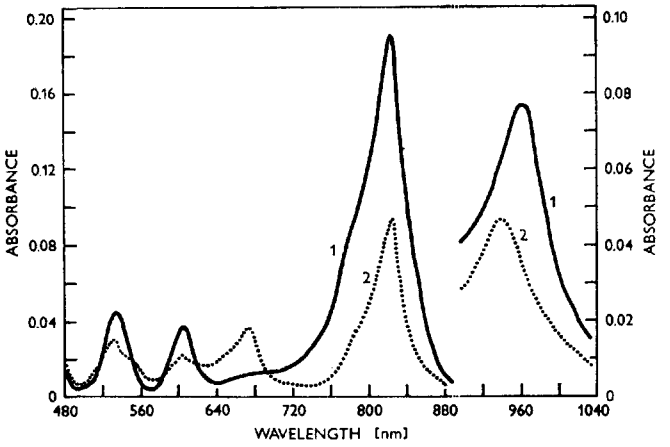


Fig. 2. Reaction centre absorption spectra before (*1*) and after (*2*) a 40 min incubation with lipase.

(PC), phosphatidyl glycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL). The identification of phospholipid fractions after separation of the RC lipid extract was hampered by LDAO which also passed into the organic solvent phase and produced a wide spot on the chromatogram overlapping the CL and PE spots. Only a weak PC spot was visible on such chromatograms after treating them with the Vaskovsky reagent.

The incubation with lipase induced the greatest changes in the absorption bands of *P*830 and *P*960 (Fig. 2). The changes in the 540—550 nm region were weaker. The 960 nm band not only

Table 2

Proportion of α-helical structure in reaction centre (RC) protein under different conditions. f_H is fraction of α-helical structure calculated according to Chen *et al.* (1972) as $[\Theta]_{222} = 30\,300\ f_H - 2340$, where $[\Theta]_{222}$ is molecular ellipticity.

Sample	f_H
RC	0.38
RC + lipase	0.28
RC + NaCl (0.34 M)	0.44
Chromatophores	0.6*
RC in phosphatidylcholine liposomes	0.5*

* Data from Nabedryk *et al.* (1982).

dropped in absorbance but also shifted to 940—945 nm, whereas the 830 nm band did not change the position of its maximum. The process was accompanied by a growth of absorption at 680 nm, which indicated oxidation of BChl *b* to a chlorophyll-like product (Bokuchava *et al.* 1974). In the 540—550 nm band, which is due to BPheo *b* and cytochrome absorption, a shoulder at about 550 nm appeared (Fig. 2); probably as a result of partial reduction of the cytochrome. CD data indicated that lipase-treated RC preparations had an altered secondary structure of protein, associated with a reduced content of the α-helix (Table 2).

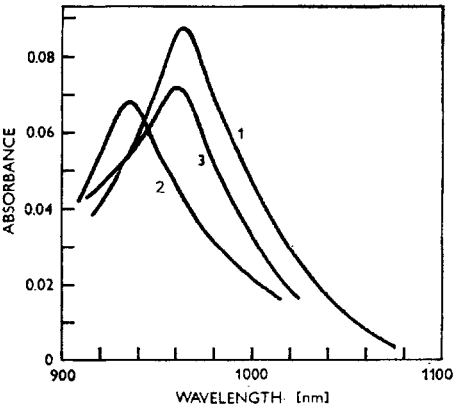


Fig. 3. Restoration of the *P*960 absorption maximum after lipase treatment. *1* — maximum position before treatment; *2* — after lipase treatment; *3* — after incorporation of lipase-treated RC into lecithin liposomes.

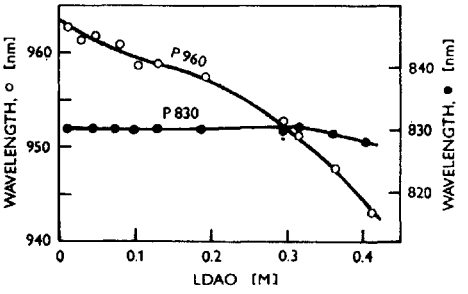


Fig. 4. Effect of LDAO concentration on band positions of *P*960 and *P*830.

In order to understand the role played by the lipid surrounding, we made an attempt to reconstruct lipid-deprived RC by means of inserting it into PC-liposomes (see Materials and Methods). Native RC incorporated into liposomes lost their ability to reversibly photooxidize *P*960 but retained their absorption spectrum. When a minimum amount of quinone was added to such proteoliposomes, the photochemical activity was completely restored. RC subjected to a limited lipolysis displayed a backward shift of the *P*960 maximum when incorporated into liposomes (Fig. 3).

The effect of a non-ionic detergent LDAO upon RC consisted in a shift of the *P*960 peak towards shorter wavelengths as the detergent concentration increased from 0.05 to 9 % (Fig. 4). This was

Table 3

Variations in absorbance (A) at $P830$ and $P960$ absorption maxima after exposure of reaction centres to different LDAO concentrations. A_g is absorbance in 9.375 % LDAO, A_o in 0.05 % LDAO.

Absorption maximum [nm]	A at LDAO concentration [%] 0.05	9.375	A_g/A_o [%]
830	0.606	0.570	94
960	0.241	0.174*	72

* The value corresponded to the new absorption maximum at 940 nm.

accompanied by a decrease in the sizes of the 830 and 960 nm peaks: the absorption at 960 nm was reduced more than that at 830 nm (Table 3). BChl *b* became progressively less resistant to oxidation with increasing LDAO concentration; this followed from the growth of absorption at 680 nm, which depended on the incubation time and was due to the oxidation product (data not shown).

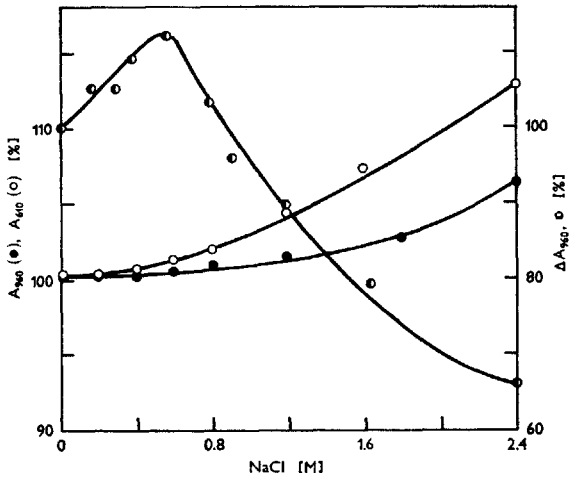


Fig. 5. Variation in absorbance (A) of $P960$ and $P610$ absorption bands and in ΔA_{960} with NaCl concentration in the medium. (A and ΔA_{960} in the absence of NaCl are taken for 100 %.)

The shielding of charges following addition of NaCl resulted in a rearrangement of the RC structure, manifested as an increase in the α-helix portion in the CD spectrum (Table 2) and a growth of absorption at Q_x and Q_y bands of the special pair dimer, as well as in an enhancement of the RC photochemical activity by 10—12 % (Table 2, Fig. 5). An increase in the relative amount of α-helix in a protein molecule makes the molecule more hydrophobic (Obraztsov *et al.* 1983). The observed greater absorption of the BChl *b* dimer bands as well as the increase in photochemical activity can be attributed to the higher hydrophobity of the RC protein. We have observed earlier a similar relationship between hydrophobic properties of the RC protein and the photochemical activity (Drozdova *et al.* 1984a, 1985).

DISCUSSION

Results of lipid phosphorus assay in chloroform-methanol RC extracts of *R. viridis* (Table 1) suggest that these RC, like those of other photosynthesizing bacteria, contain phospholipids. The amount of phospholipids [$\mu g\ mg^{-1}$(protein)] in *R. viridis* was 74.7 and thus occupied an intermediate position between the values 36.5 for *R. sphaeroides* Y (Jolchine and Reiss-Husson 1975) and 195 for *R. rubrum* (Snozzi and Bachofen 1979). In the course of RC isolation from *R. rubrum* the phospholipid composition changed towards a greater content of negatively charged phospholipids (CL and PG) (Snozzi and Bachofen 1979). A similar enrichment was observed in a study on detergent-generated fragments of *R. viridis* chromatophore membranes, which contained mainly the RC and antenna complex (Welte and Kreutz 1982). In the latter case the phospholipid composition in chromatophores was PE>PC>CL before and CL<PC<PE after treatment with *Triton X-100* or sodium cholate. The negatively charged phospholipids in RC might play a certain role by making possible an electrostatic interaction between phospholipids and positively charged surfaces of protein molecules (Birrell *et al.* 1978, Zakharova *et al.* 1984, Drozdova *et al.* 1986). Another probable function of phospholipids in RC seems to be related to retaining secondary quinone. Kendall-Tobias and Seibert (1982) observed during isolation of RC from *R. sphaeroides* R-26 in the course of washing a celite column with a buffer containing 0.3 % LDAO and 0.31 g cm^{-3} ammonium sulfate a relationship between the amounts of ubiquinone in RC and the remaining phospholipid.

A comparison of RC absorption spectra taken after a lipase treatment (Fig. 2) with those resulting from treatment with LDAO (Fig. 4, Table 3) suggested a similar mechanism of action. After exposure to either lipase or high LDAO concentrations the *P*960 peak shifted gradually towards shorter wavelengths (by up to 30 nm) and the relative amount of the α-helical structure was reduced. The *P*960 shift may be interpreted as a result of a partial release of phospholipids by RC. In the case of lipase this is caused by lipolysis, and in the case of LDAO the effect is due to formation of two types of mixed micelles: LDAO-RC-lipid and LDAO-lipid (Tanford and Reynolds 1976). Both lipase and LDAO probably affect the pigment forms indirectly, through changing the protein secondary structure which results from a disturbed protein-phospholipid interaction. However, it is still unclear whether the lipid-pigment bond may be affected directly. The two possible routes are the interactions between BChl phytol moiety and fatty acid residues of phospholipids and between magnesium and phospholipid polar groups (Katz 1979). The experiments with high ionic strength (Table 2, Fig. 5) considered together with the effects of lipase and LDAO indicated that variations in RC protein hydrophobic properties, an increase in the former case and a decrease in the latter, caused changes in spectral and functional properties of RC. These changes were the greater intensity of *P*960 absorption bands, greater photochemical activity under high ionic strength conditions, and short-wavelength shift by up to 30 nm in the lipase and LDAO experiments. The partial removal of lipids from RC caused by lipase was also accompanied by a change in RC functional activity (*cf.* Khotchenkov *et al.* 1983, Drozdova *et al.* 1984a, b, Khotchenkov and Drozdova 1984).

The results of the present study suggest that phospholipids play a predominant role in providing a hydrophobic environment in the vicinity of the BChl *b* dimer (*P*960). The same is implied by the possibility to restore the initial *P*960 peak position by incorporating lipase-treated RC into liposomes (Fig. 3) as well as by the relative increase in proportion of α-helical structure in liposome-incorporated RC (Table 2).

REFERENCES

Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. — J. biol. Chem. **234**: 466—468, 1959.

Birrell, G. B., Sistrom, W. R., Griffith, O. H.: Lipid-protein associations in chromatophores from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*. — Biochemistry **17**: 3768—3773, 1978.

Bokuchava, E. M., Drozdova, N. N., Krasnovskiĭ, A. A.: Issledovanie fotookisleniya bakteriokhlorofilla *b* fotosinteziruyushchikh bakteriĭ *Rhodopseudomonas viridis*. [Photooxidation of bacteriochlorophyll *b* from photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas viridis*.] — Biokhimiya **39**: 188—196, 1974.

Brunner, H. B., Scrabel, P., Hauser, H.: Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physico-chemical properties. — Biochim. biophys. Acta **455**: 322—331, 1976.

Chen, Y. H., Martines, H. B., Yang, J.: Determination of the secondary structure of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. — Biochemistry **11**: 4120—4133, 1972.

Clayton, R. K., Clayton, B. J.: Molar extinction coefficients and other properties of an improved reaction center preparation from *Rhodopseudomonas viridis*. — Biochim. biophys. Acta **501**: 478—487, 1978.

Clayton, R. K., Haselkorn, R.: Protein components of bacterial photosynthetic membranes. — J. mol. Biol. **68**: 97—105, 1972.

Drozdova, N. N., Khotchenkov, V. P., Vychegzhanina, I. V., Krasnovskiĭ, A. A.: The activity of reaction centres of *Rhodopseudomonas viridis* and the state of protein-lipid components. — In: 16th Meeting of the FEBO. Abstracts. P. 249. Moscow 1984a.

Drozdova, N. N., Vychegzhanina, I. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Aktivnost' reaktsionnykh tsentrov fotosinteziruyushchikh bakteriĭ *Rhodopseudomonas viridis* pri nagrevanii i izmenenii pH. [Activity of reaction centres of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas viridis* at heating and pH change.] — Biofizika **29**: 7—12, 1984b.

Drozdova, N. N., Vychegzhanina, I. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Deĭstvie poverkhnostno-aktivnykh veshchestv na funktsional'nye i spektral'nye svoĭstva reaktsionnykh tsentrov fotosinteziruyushchikh bakteriĭ *Rhodopseudomonas viridis*. [Action of surface-active substances on functional and spectral properties of reaction centres of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas viridis*.] — Biokhimiya **50**: 2040—2047, 1985.

Dutton, P. L., Prince, R. C., Tiede, D. M.: The reaction centre of photosynthetic bacteria. — Photochem. Photobiol. **28**: 939—949, 1978.

Erokhin, Yu. E., Sinegub, O. A.: O molekulyarnoĭ organizatsii pigmentnoĭ sistemy purpurnykh fotosinteziruyushchikh bakteriĭ. [Molecular organization of pigment system of purple photosynthetic bacteria.] — Mol. Biol. **4**: 401—410, 1974.

Jay, F., Lambillote, M., Mühlethaler, K.: Localization of *Rhodopseudomonas viridis* reaction centre and light-harvesting proteins using ferritin-antibody labelling. — Europe. J. Cell Biol. **30**: 1—8, 1983.

Jolchine, G., Reiss-Husson, F.: Studies on pigments and lipids in *Rhodopseudomonas sphaeroides* Y reaction center. — FEBS Lett. **52**: 33—36, 1975.

Karapetyan, N. V., Litvin, F. F., Krasnovskiĭ, A. A.: Issledovanie svetovykh prevrashcheniĭ khlorofilla metodom differentsial'noĭ spektrofotometrii. [Study of light-induced chlorophyll transformation by means of difference spectrophotometry.] — Biofizika **8**: 191—196, 1963.

Katz, J. J.: Chlorophyll-lipid interaction. — In: Adv. Biochim. Physiol. Plant Lipids. Pp. 37—56. Amsterdam 1979.

Kendall-Tobias, M. W., Seibert, M.: A rapid procedure for the isolation of photosynthetic reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26. — Arch. Biochem. Biophys. **216**: 255—258, 1982.

Khotchenkov, V. P., Drozdova, N. N.: The effect of phospholipids on the structural and functional organization of reaction centres of *Rhodopseudomonas viridis*. — In: Proceedings of the 3rd Youth Symposium on Plant Metabolism Regulation 1983. Pp. 190—193. Varna 1984.

Khotchenkov, V. P., Drozdova, N. N., Vychegzhanina, I. V., Krasnovskiĭ, A. A.: Rol' lipidov v organizatsii reaktsionnykh tsentrov iz *Rhodopseudomonas viridis*. [Role of lipids in the organization od reaction centres of *Rhodopseudomonas viridis*.] — Biofizika **28**: 878—880, 1983.

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — Nature **227**: 680—685, 1970.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. — J. biol. Chem. **193**: 265—275, 1951.

Marinetti, T. D., Okamura, M. Y., Feher, G.: Localization of the primary quinone binding site in reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26 by photoaffinity labeling. — Biochemistry **18**: 3126—3133, 1979.

Michel, H.: Three-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis*. — J. mol. Biol. **158**: 567—572, 1982.

Nabedryk, E., Tiede, D. M., Dutton, P. L., Breton, J.: Conformation and orientation of the protein in the bacterial photosynthetic reaction center. — Biochim. biophys. Acta **682**: 273—280, 1982.

Obraztsov, V. V., Selishcheva, A. A., Kozlov, Yu. P.: O vliyanii konformatsii molekuly belka na kharakter ego vzaimodeĭstviya s fosfolipidnym bisloem. [Influence of protein molecule conformation on its interaction with a phospholipid bilayer.] — Biofizika **28**: 412—417, 1983.

Shuvalov, V. A., Asadov, A. A.: Arrangement and interaction of pigment molecules in reaction centers of *Rhodopseudomonas viridis*. — Biochim. biophys. Acta **692**: 479—488, 1982.

Snozzi, M., Bachofen, R.: Characterisation of reaction centers and their phospholipids from *Rhodospirillum rubrum*. — Biochim. biophys. Acta **546**: 236—247, 1979.

Svetachov, V. I., Vaskovsky, V. E.: Phospholipid spray reagents. — J. Chromatogr. **65**: 451—453, 1972.

Tanford, C., Reynolds, J. A.: Characterization of membrane proteins in detergent solutions. — Biochim. biophys. Acta **457**: 133—170, 1976.

Thornber, J. P., Cogdell, R. J., Seftor, R. E. B., Webster, G. D.: Further studies on the composition and spectral properties of the photochemical reaction centers of bacteriochlorophyll *b*-containing bacteria. — Biochim. biophys. Acta **593**: 60—75, 1980.

Welte, W., Kreutz, W.: Formation, structure and composition of a planar hexagonal lattice composed of *Rhodopseudomonas viridis*. — Biochim. biophys. Acta **692**: 479—488, 1982.

Yu, L., Yu, C.-A.: Isolation and properties of the cytochrome *b*—*c* complex from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. — Biochem. biophys. Res. Commun. **108**: 1258—1292, 1982.

Zakharova, N. I., Permyakov, E. A., Fabian, M., Kononenko, A. A., Chamorovskiĭ, S. K., Burshtein, E. A., Rubin, A. B.: O belkovoĭ fluorestsentsii fotosinteticheskikh reaktsionnykh tsentrov iz *Rhodopseudomonas sphaeroides*. [Fluorescence from protein units of photosynthetic reaction centres of *Rhodopseudomonas sphaeroides*.] — Mol. Biol. **18**: 719—729, 1984.

Zinth, W., Kaiser, W., Michel, H.: Efficient photochemical activity and strong dichroism of single crystals of reaction centers from *Rhodopseudomonas viridis*. — Biochim. biophys. Acta **723**: 128—131, 1983.

Volume 219, number 1, 93–96 FEB 04874 July 1987

The photobiocatalytic system: inorganic semiconductors coupled to bacterial cells

A.A. Krasnovsky and V.V. Nikandrov

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leninsky prospect, 33, 117071 Moscow, USSR

Received 27 April 1987

Considering the evolutionary pathways of solar energy conversion, we suggested that some mineral components of the earth's crust might have been capable of electron phototransfer coupled to the metabolic chains of primary heterotrophic cells. We observed a peculiar type of this process when light-exposed particles of titanium dioxide or some other minerals initiated an electron transfer from organic electron donors to *Clostridium butyricum* bacterial cells, with hydrogen being evolved as a result of intra- and extracellular activity of hydrogenase. The coupling of mineral photocatalysts to bacterial cells may be regarded as a way to create a new type of photobiocatalytic system.

Hydrogen evolution; Titanium dioxide; Solar energy conversion; (*Clostridium* cell)

1. INTRODUCTION

Efficient charge separation in the reaction centers is the primary step of solar energy conversion in photosynthesis. To construct model systems, photoreceptors capable of charge separation may be employed, provided they are coupled to the electron transfer chain of cell structures or isolated enzymes (review [1]).

For primary charge photoseparation, the particles of inorganic photocatalysts-semiconductors were used. The electron and the hole formed under the action of light were localized in the active centers on the phase boundary of the photocatalyst particles suspended in the water medium.

In 1962 our laboratory proposed an inorganic model of the Hill reaction [2]. We used an aqueous suspension of photocatalysts (TiO_2, ZnO, W_2O_3), ferric compounds and *p*-benzoquinone as electron acceptors, and water molecules as primary electron donors. The quantum yield of molecular oxygen photoproduction here reached 3%, and the stoichiometry corresponded to that of the Hill reaction in chloroplasts. The success of these experiments was determined by the fact that the semiconductor particles could act both as a light energy-absorbing photoreceptor and as a catalyst on the surface of which the initially formed active products were stabilized and transformed.

Later, we observed photoreduction of MV^{2+} in a TiO_2 suspension, exogenous electron donors enhanced the efficiency of the process [3].

Formation of the 'blue' radical of reduced methyl viologen (MV^{+}) was a precondition for molecular hydrogen photoreduction, if bacterial hydrogenase preparations were introduced into the suspension. Such experiments involved the TiO_2 suspension [4] as well as CdS particles [5].

It was recently shown in our laboratory [6,7] that in the TiO_2-electron donor system, the coupling of the semiconductor to hydrogenase is needed for hydrogen evolution if the 'blue' methyl viologen radical is formed, whereas in the case of two-electron MV^{2+} photoreduction no exogenous hydrogenase is needed for hydrogen production.

Correspondence address: A.A. Krasnovsky, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leninsky prospekt, 33, 117071 Moscow, USSR

Published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)
00145793/87/$3.50 © 1987 Federation of European Biochemical Societies

Here a system is described in which the particles of inorganic catalysts-semiconductors are coupled to hydrogenase-containing *Clostridium butyricum* bacterial cells. To facilitate the electron transfer between the mineral photocatalyst particles and the bacterial cells, MV^{2+} capable, in the reduced state, of lipid membrane penetration was used as a relay.

2. MATERIALS AND METHODS

Cells of *C. butyricum* were cultivated in a glucose-peptone medium containing 10 g/l glucose, 10 g/l peptone, 2 g/l K_2HPO_4, 2 mg/l $FeSO_4 \cdot 5H_2O$ and 0.01 mg/l biotin. Spores were introduced into the sterile medium and kept for 12 h at 37°C. The cultivated cells were separated from the medium by centrifugation at 1600 × *g*, transferred into a 0.5 M sucrose solution and incubated under gaseous argon at 3°C, to keep them intact. The absence of hydrogenase activity measured by hydrogen evolution from the reduced MV^{2+} in the supernatant after cell centrifugation showed that the cells were intact. In some cases the cells were washed with a 0.5% glucose solution and subsequently centrifuged, then, diluted with the same solution, the cell suspension was pipetted into a Dewar vessel filled with liquid nitrogen, where the frozen drops were stored. Before application, the frozen drops were thawed in a stream of argon, and this led to cell destruction. The rate of hydrogen photoproduction was high enough to use a manometric Warburg apparatus, supplied with glass vessels and a quartz mercury lamp PRK-4 placed on the bottom of the vessel. The lamp was in a glass tube and immersed into the thermostatic bath of the Warburg apparatus (Hg lines at 365 nm were mainly efficient, intensity 10^5 erg/cm^2 per s).

Usually, a sample of the photocatalyst (50–300 mg), 0.1 ml of 10^{-3} M aqueous solution of MV^{2+}, 0.3 ml of a suspension of intact or disrupted cells (3 mg protein) and no more than 6 ml of a 0.05–1.0 M solution of the organic electron donor were placed into a Warburg vessel. A 40% solution of CO_2-absorbing KOH was placed into the side arm of the vessel. Experiments were carried out at 25°C. TiO_2 (anatase), CdS and ZnO were of chemical grade.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The most efficient H_2 photoproduction was observed in the system: Tris-TiO_2-MV^{2+}-bacterial cells. The rate of hydrogen evolution in the system reached 5–15 μl/min, depending on the hydrogenase activity of the cells. According to the preliminary measurements, the quantum yield of hydrogen photoproduction reached 10%. Hydrogen evolution in the light proceeded at a constant rate for several hours until the electron donor was exhausted, for the hydrogenase activity of the clostridial cells was stable under UV illumination and anaerobic conditions.

Experiments on a gas chromatograph confirmed that the evolved gas was hydrogen. In the absence of Tris, TiO_2 or bacterial cells, H_2 evolution did not exceed 0.1 μl/min. When the inactivated clostridial cells were used, no hydrogen production was observed (cell inactivation had been achieved by heating at 100°C or exposing to UV light in the air). Hydrogen photoproduction registered in the Tris-TiO_2 system was less than 0.5 μl/min, and this is in good agreement with our previous measurements [6,7].

When the intact cells were used, the exclusion of MV^{2+} from the complete Tris-containing system led to a 2–2.5-fold decrease in the rate of H_2 evolution. If ruptured clostridial cells were used, the introduction of MV^{2+} exerted little, if any, effect on H_2 evolution in the TiO_2 suspension in Tris buffer. In the course of photochemical experiments a partial destruction of the clostridial cells took place, as indicated by the appearance of some hydrogenase activity in the supernatant obtained by centrifugation of the TiO_2 suspensions containing bacterial cells after 30 min pre-illumination.

Thus, in the course of the experiment, two hydrogenase forms must have been functioning: one located inside the cells, and the other leaking from the cells as a result of cell destruction. The possibility of direct contact of hydrogenase with semiconductor particles was suggested in our previous observations [2,6,7], and in the recent experiments where hydrogenase binding to TiO_2 was shown [8]. In systems containing intact clostridial cells, their coupling to photocatalyst particles may proceed via reduced methyl viologen capable of cell membrane penetration (fig.1). However, excretion of the low-molecular mass electron carrier

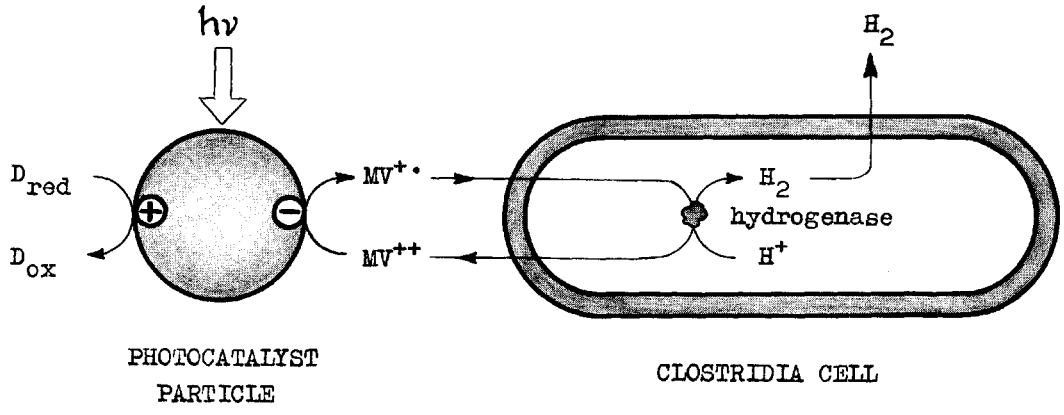


Fig.1. Scheme for hydrogen photoproduction in the coupling of mineral photocatalyst to clostridial cells. MV^{2+}, methyl viologen; D_{red} and D_{ox}, reduced and oxidized electron donor, respectively.

by the bacterial cells cannot be excluded either. But this is the subject of a special study. With all the electron donors listed, except Tris buffer, H_2 photoproduction had low efficiency in the absence of MV^{2+}. If glucose was present in the reaction medium, hydrogen evolution from clostridial cells was activated under UV illumination [9], but the rate of this process was insignificant compared with the TiO_2-containing systems. ZnO and CdS coupled to the clostridial cells appeared to be less efficient sensitizers of H_2 photoevolution than TiO_2. In suspensions of CdS, hydrogen evolution was observed only with glycine and ethanol as electron donors. It should be noted that in contrast to ZnO and CdS, TiO_2 formed stable suspensions in Tris-buffer solutions.

Table 1

Hydrogen photoproduction in the system: mineral photocatalyst–*Clostridium butyricum* cells

Electron donor	TiO_2	ZnO
Tris (0.05 M, pH 7.2)	18.4	1.8
Tricine (0.05 M, pH 7.0)	6.1	–
Glycine (0.2 M, pH 5.5)	7.0	–
Glucose (1 M)	16.1	2.3
Carboxymethylcellulose (60 mg)	1.4	–
Glycerol (1 M)	15.6	2.0
Ethanol (10%)	4.0	3.1
Methanol (10%)	6.0	4.0
Without electron donor	0.0	0.0

Reaction medium (6 ml) contained 50 mg TiO_2 or 300 mg ZnO, 5×10^{-4} M MV^{2+}, *C. butyricum* cells (3 mg protein), and an organic electron donor. Experiment lasted for 60 min. Illumination with 365 nm lines of mercury lamp, light intensity 10^5 erg·cm^{-2}. Rate of H_2 photoevolution given in μl H_2/3 min

The above experiments may be helpful in constructing artificial photobiological systems and may also serve as a model of possible evolutionary pathways of solar energy conversion. The fact that mineral compounds of the earth's crust could have been used as replicating matrixes [10] and primary photocatalysts in the course of chemical evolution has been reported [11]. According to Oparin's hypothesis [12], the primary organisms could be heterotrophs of the clostridial type, and gradual evolution towards the use of solar energy could have required photoreceptors. The above experiments illustrate such a peculiar possibility, perhaps, a blind alley of evolution.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Dr S.A. Nikiforova for skillful assistance in the experiments.

REFERENCES

[1] Krasnovsky, A.A. (1985) Physiol. Veg. 23, 611–618.
[2] Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1962) Dokl. Akad. Nauk SSSR 147, 656–659.
[3] Krasnovsky, A.A. and Brin, G.P. (1973) Dokl. Akad. Nauk SSSR 213, 1431–1434.

[4] Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Nikandrov, V.V. (1976) Dokl. Akad. Nauk SSSR 229, 990–993.
[5] Krasnovsky, A.A., Brin, G.P., Luganskaya, A.N. and Nikandrov, V.V. (1979) Dokl. Akad. Nauk SSSR 249, 896–899.
[6] Nikandrov, V.V., Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1981) Dokl. Akad. Nauk SSSR 256, 1249–1253.
[7] Nikandrov, V.V., Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1983) Photobiochem. Photobiophys. 6, 101–107.
[8] Guendet, P., Rao, K.K., Grätzel, M. and Hall, D.O. (1984) Photobiochem. Photobiophys. 7, 331–341.
[9] Zhukova, L.V., Nikandrov, V.V. and Krasnovsky, A.A. (1980) Biofizika 25, 1095–1096.
[10] Cairns-Smith, A.G. (1982) Genetic Takeover and the Mineral Origins of Life, Cambridge University Press, Cambridge.
[11] Krasnovsky, A.A. (1974) Origins of Life 5, 397–404.
[12] Oparin, A.I. (1957) Origin of Life on Earth, Izd. AN SSSR, Moscow.

PHOTOINDUCED ELECTRON TRANSFER IN PHEOPHYTIN-CONTAINING LIPOSOMES

A. N. SEMENOVA, V. V. NIKANDROV and A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Leninsky prospekt 33, Moscow 117071 (U.S.S.R.)

(Received February 21, 1987; accepted April 24, 1987)

Keywords. Liposomes, pheophytin, transmembrane electron transfer, ascorbate, methyl viologen.

Summary

Transmembrane electron transfer in liposomes from phosphatidylcholine containing chlorophyll *a* (Chl *a*) or pheophytin *a* (Pp *a*) was investigated. Chl- or Pp-sensitized reduction of methyl viologen (MV^{2+}) and hydrogen photoproduction were shown to occur during transmembrane electron transfer from ascorbate located in the internal aqueous phase of liposomes. Photoproduction of hydrogen gas was observed in the presence of hydrogenase extracted from cells of *Thiocapsa roseopersicina*. The ionophore valinomycin in the presence of K^+ increased the rate of MV^{2+} photoreduction by a factor of 1.5 - 2. The quantum yield of MV^{2+} photoreduction decreases with an increase in the pigment:lipid ratio. Simultaneously, Chl and Pp fluorescence quenching is observed, apparently connected with the concentration quenching of the excited states of the pigments in the liposomes. At a pigment:lipid ratio of close to 1:1000, when fluorescence quenching is practically negligible, the quantum yield of MV^{2+} photoreduction sensitized by Chl reached 1.7%, and that sensitized by Pp was 15%, *i.e.* Pp sensitizes the transmembrane electron transfer approximately tenfold more effectively than Chl. The reduction of ethyl viologen sulphate (EVS^0) photosensitized by Chl or Pp during transmembrane electron transfer from ascorbate is shown. The quantum yields of EVS^0 photoreduction exceed those for MV^{2+} by more than a factor of 1.5.

1. Introduction

Many attempts have been made to create artificial systems capable of solar energy conversion and storage operating on the principles of natural photosynthesis. For this purpose bilayer lipid vesicles (liposomes) containing photosensitizers located in the membranes are widely employed.

1011-1344/87/$3.50 © Elsevier Sequoia/Printed in The Netherlands

Chlorophylls [1,2], various porphyrins [3,4] and also analogs of a trisbipyridyl ruthenium complex [5] have been used as sensitizers. In some cases [6,7] liposomes containing photosensitizers in the interior aqueous phase were used. However, the efficiency of light energy conversion in the systems described thus far is still low, probably owing to an efficient back reaction. Consequently, more efficient systems should be developed.

Previously in our laboratory, we have investigated the photosensitized reduction of methyl viologen (MV^{2+}) and hydrogen photoproduction in chlorophyll-containing liposomal suspensions [8].

Recently, we have obtained data on pheophytin (Pp) involvement in the functioning of the reaction centre of Photosystem II in green plants [9]. The purpose of the present work was to study the ability of Pp *a* to sensitize transmembrane electron phototransfer in liposomes and to compare the properties of liposomes containing chlorophyll (Chl) and Pp.

2. Materials and methods

Liposomes were prepared with egg lecithin (phosphatidilcholine) and pigments isolated and purified by the procedure described in our previous paper [8]. MV^{2+} and ethyl viologen sulphate (EVS^0) were photoreduced in a Thunberg glass vacuum tube adjusted for spectral measurements. All experiments were performed in a buffer solution containing 50 mM Tris–HCl and 50 mM KCl, pH 7.5. The sodium ascorbate concentration inside the liposomes was 0.5 M. The reduction of MV^{2+} and EVS^0 was monitored by the absorbance changes at 605 nm ($\epsilon = 13\,300\ M^{-1}\ cm^{-1}$). As a light source a 300 W tungsten lamp supplied with a condenser and filters ($600\ nm < \lambda < 800\ nm$) was used, the light intensity being $2.5 \times 10^{-2}\ W\ cm^{-2}$. To determine the quantum yield φ, the samples were illuminated with monochromatic light ($\lambda = 436$ nm) isolated from the spectrum of a DRSh-250 mercury lamp with the aid of filters. The light intensity was measured with a ferrioxalate actinometer. The fluorescence spectra of Chl- and Pp-containing liposomes were measured using an MPF-4 (Hitachi) spectrophotofluorometer. Hydrogen evolution was recorded with a gas chromatograph; for these experiments liposome suspensions were initially concentrated by passage through an XM-100 A filter (Amicon).

3. Results and discussion

The first experiments with Pp liposomes containing ascorbate in the interior aqueous phase showed an increase in the rate and degree of MV^{2+} photoreduction during transmembrane electron transfer, as compared with the Chl liposomes (Fig. 1). To gain a better understanding of the capacity of Chl and Pp to photosensitize transmembrane electron transfer, the depen-

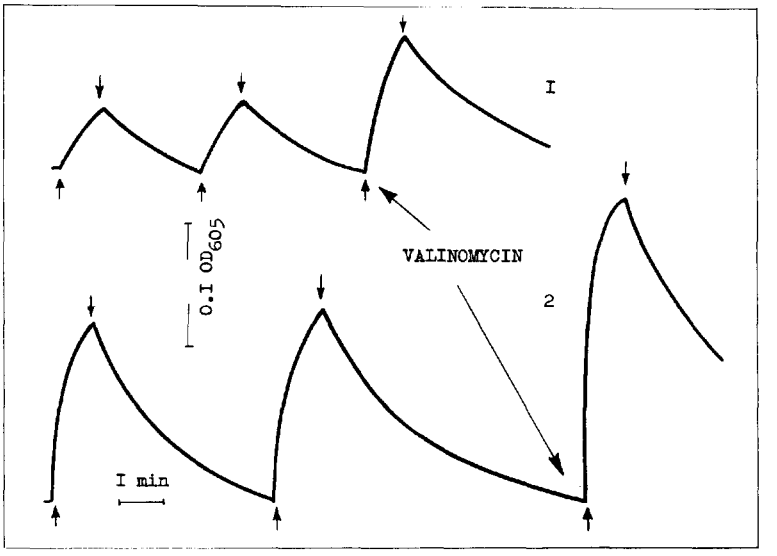


Fig. 1. Photoreduction of MV^{2+} during transmembrane electron transfer from ascorbate in suspensions of Chl liposomes (curve 1) and Pp liposomes (curve 2). The effect of valinomycin is shown. (7.5×10^{-6} M Chl, 1.2×10^{-5} M Pp, 7.2×10^{-4} M lipid, 5×10^{-4} M MV^{2+}, 10^{-6} M valinomycin.)

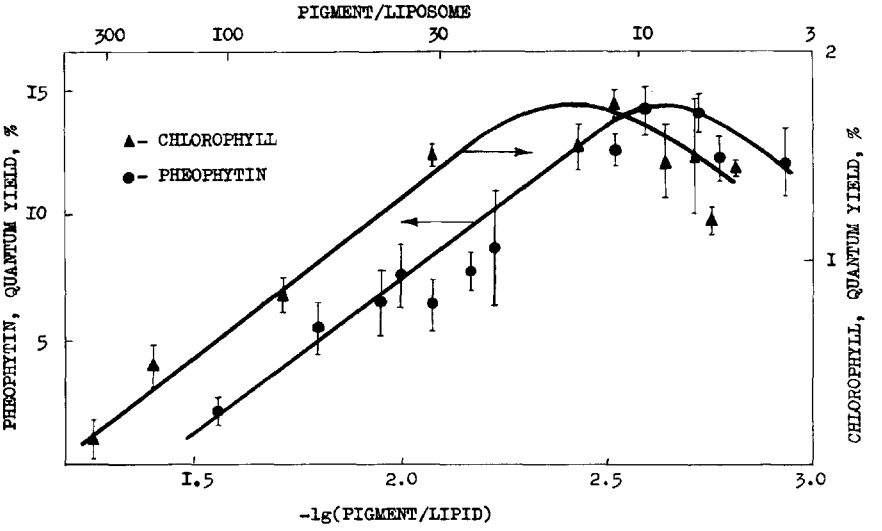


Fig. 2. Quantum yield of MV^{2+} photoreduction by ascorbate in suspensions of Chl liposomes (▲) and Pp liposomes (●), as a function of the pigment:lipid molar ratio.

dence of the MV^{2+} photoreduction quantum yield on the pigment:lipid (P/L) ratio was investigated. As seen in Fig. 2, the dependences of φ on the P/L ratio for Chl liposomes and Pp liposomes exhibit a similar pattern: φ increases with a decrease in the P/L ratio, reaches a maximum and then drops at ratios close to 1:1000. At all the P/L ratios investigated, the φ

values for Pp liposomes significantly exceeded those for Chl liposomes. The maximal φ value for Chl liposomes of 1.7% is achieved at the Chl:lipid ratio 1:300, when an average of 20 pigment molecules are contained in one liposome. As for Pp liposomes, the maximal φ value is close to 15% (at a P/L ratio of about 1:450), *i.e.* Pp sensitizes transmembrane electron transfer approximately ten times more effectively than chlorophyll. Significantly, in MV^{2+} photoreduction by dithiothreitol, in which transmembrane electron transfer is not involved (both the electron donor and the acceptor are located in the external aqueous phase) the value of φ for Pp liposomes is about one order of magnitude lower than that for Chl liposomes.

The decrease in the quantum yield of MV^{2+} photoreduction with the increase in the endoliposomal content of the pigment (Fig. 2) may be due to concentration quenching of the excited states of the Chl [10, 11] and the Pp [12] in the liposomes, as has been observed previously. In fact, the decrease in the intensity of Chl and Pp fluorescence (Fig. 3), as well as in the quantum yield of MV^{2+} photoreduction (Fig. 2) occur at the same P/L ratios, the maximal values being achieved when fluorescence quenching is absent. The decay of the fluorescence intensity with the increase in Chl and Pp content in liposomes reflects the decrease in the quantum yields for the generation of the first excited singlet and triplet states of the pigments, as a strict correlation between singlet and triplet quantum yields was observed [11]. An increase in the pigment content in the liposomes is accompanied by fluorescence quenching, and the Chl and Pp fluorescence maxima (676 nm, 678 nm) are shifted to the long-wavelength region, and the Pp emission

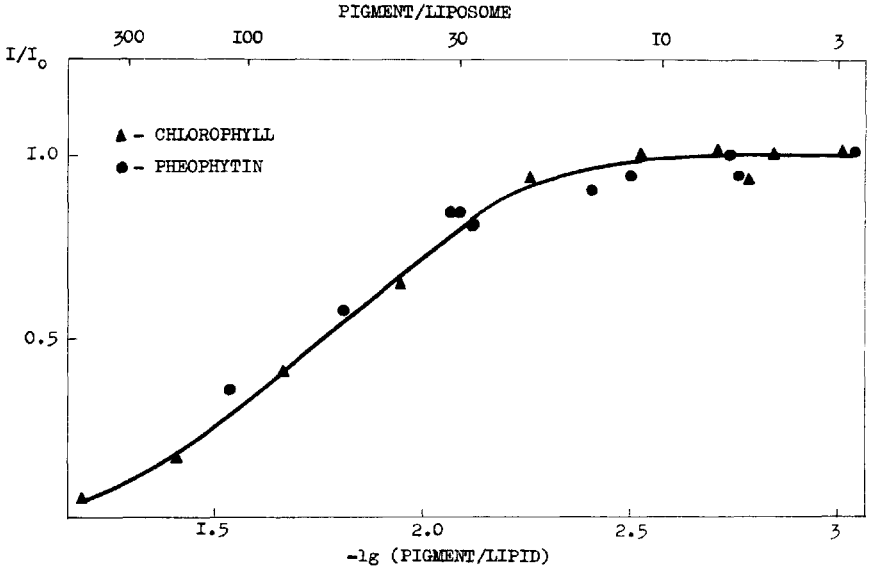


Fig. 3. Relative fluorescence yield of Chl *a* (▲) and Pp *a* (●) in liposomes, as a function of the pigment:lipid molar ratio. Fluorescence was excited at λ = 418 nm.

intensity increases at 700 - 710 nm, an indication that a Pp dimer is formed [13].

Transmembrane electron phototransfer in liposomes is apparently limited by a potential difference generated across the membrane. This is indicated by the effect of the ionophore valinomycin, which increases the rate of MV^{2+} photoreduction in the presence of K^+ by a factor of 1.5 - 2.

We showed earlier that the yield of photoreduced MV^{2+} in suspensions of Chl-containing liposomes is also limited by a back reaction caused by the ability of reduced MV^{2+} to penetrate across the lipid membrane. The back reaction (oxidation of photoreduced MV^{2+} by dehydroascorbate) also occurs in the case of Pp liposomes (Fig. 1). Transmembrane reaction products may be separated more efficiently by using an electron acceptor incapable of liposome penetration. For this purpose we used EVS^0. In this case (Fig. 4) an increase in the rate and depth of the transmembrane reaction and a decrease in the oxidation rate of the reduced electron acceptor were observed in a Pp liposome suspension. In Table 1 the results of a comparative study of MV^{2+} and EVS^0 photoreductions in Triton X-100 micellar solutions containing Chl, in Chl liposome suspensions and in Pp liposome suspensions are summarized. In liposome suspensions the reduction of the acceptor by ascorbate occurred via transmembrane electron transfer. In the case when dithiothreitol was used, reduction was not connected with the transmembrane transfer (since both the donor and the acceptor are located in the external aqueous phase of the liposome suspension). Obviously, in all the cases studied, the φ value of EVS^0 photoreduction is higher than the φ of MV^{2+} photoreduction, and the use of EVS in the transmembrane reaction results in a greater increase in φ than in the reaction not connected with transmembrane electron transfer. The higher efficiency of the transmembrane photoreaction involving EVS^0 is probably determined by two factors: (i) EVS^0 has a more positive redox potential ($E = -0.36$ V) than MV^{2+} ($E = -0.44$ V); (ii) the reduced form of

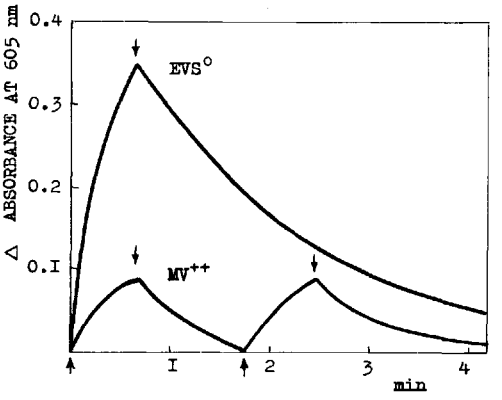


Fig. 4. Photoreduction of MV^{2+} and EVS^0 during transmembrane electron transfer from ascorbate in Pp liposomes. (5×10^{-6} M Pp, 7.2×10^{-4} M lipid, 5×10^{-4} M MV^{2+}, 5×10^{-4} M EVS^0.)

TABLE 1

Quantum yields φ of MV^{2+} and EVS^0 photoreduction

System: donor/acceptor of electrons	*Chl micelles*	*Chl liposomes*	*Pp liposomes*
DTT/MV^{2+}	17.0	6.0	0.4
DTT/EVS^0	37.0	9.9	1.0
$Ascorbate/MV^{2+}$	0	1.7	11.5
$Ascorbate/EVS^0$	0	4.4	20.6

The absorbance of all the reaction mixtures at the red maximum was the same. The pigment:lipid ratio was 1:300 for Chl liposomes and 1:200 for Pp liposomes. The mixtures contained 3×10^{-6} M Chl, 5×10^{-6} M Pp, 10^{-3} M lipid, 5×10^{-2} M dithiothreitol, 5×10^{-4} M MV^{2+} and 5×10^{-4} M EVS^0.

EVS has a lower capacity to carry a negative charge across the lipid membrane, in comparison with the cation radical of MV^{2+}.

By adding 0.1 ml hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* to Chl and Pp liposome suspensions containing ascorbate in the interior aqueous phase, we obtained the following rates of molecular hydrogen photoproduction: 0.34 μl H_2 $(10\ min)^{-1}$ ml^{-1} for Pp liposomes and 0.12 μl H_2 $(10\ min)^{-1}$ ml^{-1} for Chl liposomes.

The quantum yields of MV^{2+} and EVS^0 photoreduction in transmembrane transfer of an electron from ascorbate ($E_0' = +0.08$ V) in Pp liposomes significantly exceed the values for the corresponding reactions in Chl liposomes, and are close to the φ of MV^{2+} and EVS^0 photoreductions sensitized by chlorophyll solubilized in detergent micelles, when the irreversibly oxidized electron donor dithiothreitol is used ($E_0' = -0.32$ V). The higher efficiency of Pp, as compared with Chl, may be attributed to the different mechanisms of the sensitized reactions in Pp liposomes and Chl liposomes. The oxidative mechanism of sensitization was established for electron phototransfer reactions in Chl-containing liposomes [14]. At equal energies of Chl and Pp triplet states ($E_T = 1.33$ eV) [15], Pp has a more positive redox potential than Chl ($E_m(Pp/Pp^+) = +1.1$ V and $E_m(Chl/Chl^+) = +0.78$ V [16, 17]) and thus electron transfer from the Pp triplet excited state to MV^{2+} or EVS^0 can hardly take place. Pp seems to sensitize the photoreductions of MV^{2+} and EVS^0 as follows: at the initial stage of electron transfer, triplet Pp localized in the inner lipid monolayer is reduced by ascorbate with the production of Pp anion radical. The next step is the electron exchange between the Pp anion radical and Pp molecules located in the outer lipid monolayer. The last stage is likely to be reduction of viologen by the Pp anion radical of the outer membrane monolayer.

Taking into account the absence of magnesium atoms in Pp molecules, some specific localization and lability of Pp molecules in the membrane may be suggested. This may ensure a greater accessibility of Pp molecules for

electron donors and acceptors and facilitate electron transfer between Pp molecules located on both sides of the lipid membrane.

References

1 H. Ti Tien, Photoeffects in pigmented bilayer lipid membranes. In J. Barber (ed.), *Photosynthesis in Relation to Model Systems*, Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 115 - 173.

2 J. K. Hurley and G. Tollin, Photochemical energy conversion in chlorophyll-containing lipid bilayer vesicles, *Sol. Energy, 28* (1982) 187 - 196.

3 T. Matsuo, K. Itoh, K. Takuma, K. Hashimoto and T. Nagamura, A concerted two-step activation of photoinduced electron transport across lipid membrane, *Chem. Lett., 9* (1980) 1009 - 1012.

4 S. V. Lymar, I. M. Tsvetkov, V. N. Parmon and K. I. Zamaraev, Photoinduced electron transfer across lipid vesicle membranes sensitized by zinc tetraphenylporphin, *Khim. Fiz., 1* (1982) 405 - 410.

5 W. E. Ford, J. W. Otvos and M. Calvin, Photosensitized electron transport across lipid vesicle walls: quantum yield dependence on sensitizer concentration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76* (1979) 3590 - 3593.

6 E. E. Yablonskaya and V. Ya. Shafirovitch, Electron transfer chain in chemical models of photosynthesis, *Kinet. Katal., 24* (1983) 1022.

7 V. N. Parmon, M. I. Khramov, I. M. Tsvetkov, S. V. Lymar and K. I. Zamaraev, Photocatalytic electron transfer through the photopassive membrane of lipid vesicles, *Kinet. Katal., 24* (1983) 1019 - 1020.

8 A. A. Krasnovsky, A. N. Semenova and V. V. Nikandrov, Chlorophyll-containing liposomes: photoreduction of methyl viologen and photoproduction of hydrogen, *Dokl. Akad. Nauk SSSR, 262* (1982) 469 - 472.

9 V. V. Klimov and A. A. Krasnovsky, Pheophytin participation in primary processes of electron transfer in the photosystem 2 reaction centres, *Biofizika, 27* (1982) 179 - 189.

10 G. S. Beddard, S. E. Carlin and G. Porter, Concentration quenching of chlorophyll fluorescence in bilayer lipid vesicles and liposomes, *Chem. Phys. Lett., 43* (1976) 27 - 32.

11 J. K. Hurley, F. Castelli and G. Tollin, Chlorophyll photochemistry in condensed media. Triplet state quenching and electron transfer to quinone in liposomes, *Photochem. Photobiol., 32* (1980) 79 - 86.

12 J. Luisetti, H. J. Galla and H. Mohwald, Energy transfer and fluorescence quenching in chlorophyll containing vesicles, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 82* (1978) 911 - 916.

13 A. N. Luganskaya, N. N. Lebedev and A. A. Krasnovsky, Molecular arrangement of pheophytin *a* in detergent–water systems, *Mol. Biol., 18* (1984) 963 - 971.

14 W. E. Ford and G. Tollin, Direct observation of electron transfer across a lipid bilayer: pulsed laser photolysis of an asymmetric vesicle system containing chlorophyll, methyl viologen and EDTA, *Photochem. Photobiol., 35* (1982) 809 - 819.

15 A. A. Krasnovsky, Jr., N. N. Lebedev and F. F. Litvin, Phosphorescence spectral characteristics of chlorophylls and pheophytins, *Dokl. Akad. Nauk SSSR, 216* (1974) 1406 - 1409.

16 A. Stanienda, Elektrochemische untersuchuchungen der chlorophyll (*a*, *b*) und pheophytine (*a*, *b*), *Z. Phys. Chem., 229* (1965) 257 - 272.

17 G. R. Seely, The energetics of electron-transfer reaction of chlorophyll and other compounds, *Photochem. Photobiol., 27* (1978) 639 - 654.

PHOTOSYNTHETICA 21 (1): 23—28, 1987

Detection of Short-Wavelength Chlorophyll *a* Emission in Green Leaves*

P. ŠIFFEL**, N. N. LEBEDEV*** and A. A. KRASNOVSKIĬ***

*Institute of Experimental Botany, Czechoslovak Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, CS-160 00 Praha 6, Czechoslovakia***
*A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Lenin Prospect 33, SU-117 071 Moscow, U.S.S.R.****

Abstract

In the short-wavelength region of low-temperature fluorescence emission spectra of French bean mature leaves and isolated chloroplasts a chlorophyll (chl) *a* emission band of very low intensity with maximum at 672—675 nm was detected. This band was accompanied by the emission of chl *b* localized at 653 nm. After ultracentrifugation of leaf homogenates these two bands and a long-wavelength one (maximum at 736 nm) represented the overall chl emission in the supernatant. The room temperature chl fluorescence of the supernatant had a great degree of polarization ($P = 0.18 \pm 0.03$), which indicated binding of chl to a large molecule. The changes in intensity of the short-wavelength chl *a* and chl *b* emission during leaf ontogeny were in close connection with the changes in rate of chl accumulation. Thus the short-wavelength chl *a* and *b* emissions seemed to be due to a chl complex (or complexes) arising during the synthesis of a membrane pigment component and may be used as a sensitive indicator of changes in chl synthesis in green leaves.

The development of etiolated leaves during irradiation is a useful system for studying the pathway of chlorophyll (chl) synthesis. However, chl synthesis in green leaves may not follow the same course. The course of chl formation after irradiation of etiolated leaves varies: it depends on the plant age (*cf.* Šesták 1984) and the experimental conditions (Litvin and Belyaeva 1971); changes in structure and function of the photosynthetic apparatus during leaf greening probably induce also changes in the chl synthesis reactions. This is confirmed by the difference in structure of most protochlorophyllides in green and etiolated leaves (Chereskin *et al.* 1984, Lebedev *et al.* 1985) and by the effects of the irradiation on NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (Santel and Apel 1981). A direct study of protochlorophyllide and the intermediate products of its reduction in green leaves is complicated because the amounts of these chl precursors are very low.

Using fluorescence difference spectroscopy at 77 K two spectral forms of protochlorophyllide were detected in green irradiated leaves and chl *b* emission and excitation spectra were described (Lebedev *et al.* 1985). Chl *b* emission seemed to belong to newly synthetized pigment molecules.

In this paper a short-wavelength chl *a* emission, some of its characteristics, and the ontogenetic course of its relative intensity are described.

* *Received* 20 June 1986.

MATERIAL AND METHODS

Plants of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Harzgruss were grown in a greenhouse without heating (temperature 16 °C — night or 25 °C — day) or at high night temperature (with heating, night temperature 32 °C, during the day the greenhouse was cooled by ventilating to 24 °C). Primary leaves were ground in a sucrose-phosphate buffer (0.4 M sucrose, 10 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 10 mM sodium ascorbate, 70 mM phosphate buffer, pH = 7.8) and the chloroplasts were separated by differential centrifugation (2 min at 300 × *g* and 10 min at 2000 × *g*). For the separation of short-wavelength chl, homogenates of leaves or isolated chloroplasts were resuspended in the isolation medium and first centrifuged at 12 000 × *g* for 30 min; the supernatant was then centrifuged at 150 000 × *g* for 3 h. The relative intensities of the short-wavelength chl *a* and chl *b* emissions were measured on homogenates of leaves prepared in a glass homogenizer in the isolation medium.

The amounts of chl *a* and *b* were determined spectrophotometrically in 80 % acetone extracts using the equations of Arnon (see Šesták 1971). The fluorescence emission and excitation spectra were recorded with a home-made apparatus containing two high transmission monochrom rs (aperture *F/2*), a high pressure xenon lamp, a photomultiplier (*FEU-79*), a direct current amplifier, and an x–y recorder. For correction and subtraction of the spectra a microprocessor (*DCSU-2*, Perkin Elmer) was used. To obtain the background of emission and excitation spectra of fluorescence, excitation at 500 nm and detection at 605 nm were used. Excitation and emission slitwidths were 4 and 3 nm, respectively, for emission spectra measurements, and 2 and 5 nm for the recording of excitation spectra. For the fluorescence measurements the chloroplasts were frozen up to 77 K on the surface of a membrane filter as described in Šiffel *et al.* (1985); leaves, their homogenates and supernatants after ultracentrifugation were frozen on the surface of plexiglass.

The fluorescence polarization was measured at room temperature in a right angle arrangement for excitation and detection of the emission in the same measuring apparatus to which two polarization filters (*LOMO*, U.S.S.R.) were added. The excitation radiation was obtained by a monochromator plus interference filter at 632 nm; the emission intensity was measured by a monochromator at 673 nm (slitwidth 10 nm). Corrections for the polarization of the measuring set and the measurements of the degree of polarization were made by a microprocessor, where each measurement represented the average from 300 values stored in the memory.

The absorption spectra of the supernatant after ultracentrifugation and the chl concentration were measured on the spectrophotometer *Perkin Elmer 554* at room temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

The fluorescence excitation spectrum of isolated chloroplasts and of homogenates of leaves in the Soret (blue) region strongly depended on the wavelength of registration below 680 nm (Fig. 1*A*). The emission at 677 nm was markedly "supported" by chl *b* and carotenoids bands between 450 and 520 nm. The very low emission at 667 nm had an excitation spectrum without carotenoids bands. As reported by Lebedev *et al.* (1985), the band at 465 nm belongs to chl. *b*, which has an emission maximum at 653 nm (Fig. 1*B*). The shape of the excitation spectrum measured at 667 nm, but without the chl *b* band, corresponded to the absorption of chl *a*. Difference emission spectra for excitation at 435 (maximu of chl *a* absorption) and 500 nm (minimum of chl absorption in the Soret region) had maxima at 672—675 nm (Fig. 1*B*), typical for the monomer of chl *a* in model systems (Szalay *et al.* 1974). The same emission and excitation bands were observed also in whole leaves; this excluded any formation of these bands during the preparation of the samples.

Ratios of the intensities of the short-wavelength bands of chl *a* or *b* and the main emission (measured at 740 nm), *i.e.* F_{673}/F_{740} or F_{653}/F_{740} varied from 10^{-3} to 2×10^{-1} (Fig. 3). In the

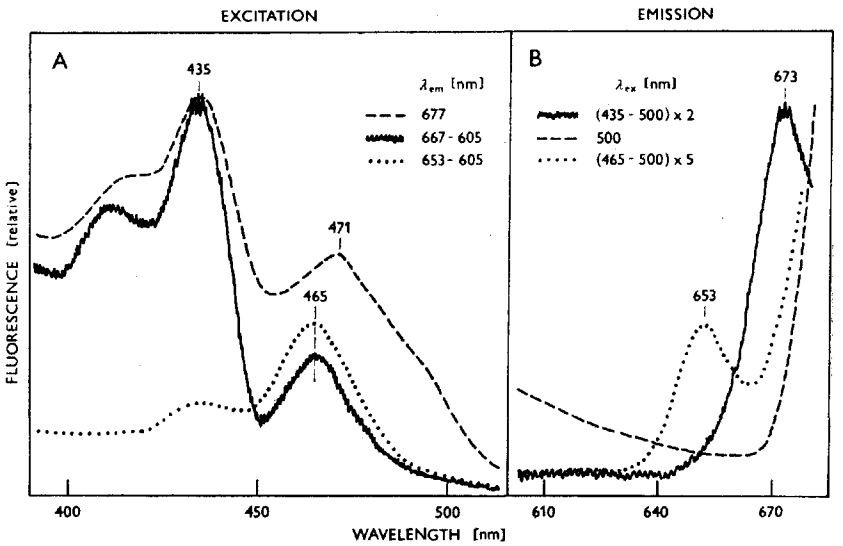


Fig. 1. Fluorescence spectra of the homogenate — frozen to 77 K — of 19 d old primary bean leaves cultivated under high night temperature regime (day 24 °C and night 32 °C). *A*: Excitation spectrum measured at 677 nm (- - -) and differential excitation spectrum measured at 667 to 605 nm (—) were normalized at the maximum. Differential excitation spectrum of chl *b* measured at 653—605 nm (•••) is in relation to the spectrum of short-wavelength chl *a*. *B*: Differential emission spectra of short-wavelength chl *a* (—, excited at 435—500 nm, twice expanded) and chl *b* (•••, excited at 465—500 nm, five times expanded), and the background emission spectrum excited at 500 nm (- - -).

supernatant this ratio increased when increasing the speed of centrifugation. In material run at about 80 000 × *g* for 3 h the emission spectrum of chl in the supernatant was composed mainly of short-wavelength emissions of chl *a* and *b*. The long-wavelength emission band with the maximum at 736 nm was also present (Fig. 2). Its relative intensity, calculated as the ratio F_{736}/F_{673} varied among individual separations and was in general higher if the supernatant after ultracentrifugation of the resuspended pellet from the chloroplasts isolation was used for measuring. The pellet contained a high chl concentration and thus the aggregation of short-wavelength chl, displayed by long-wavelength emission, might occur.

The emissions at 653 and 673 nm might be due to the water-soluble pigments (chlorophyllide), or to the chl or chlorophyllide water-soluble complex or complexes. Fluorescence of molecules or complexes in solution at room temperature is depolarized by fast thermal motions in dependence on the size of the molecules or complexes. As the chlorophyllide and chl are spectrally identical, we used the symbol chl for both these pigments. The degree of fluorescence polarization of the supernatant after ultracentrifugation of the leaf homogenates was much higher ($P = 0.18 \pm 0.03$, mean value from four separations) than in isolated chloroplasts ($P = 0.03 \pm 0.02$, measured at 685 nm) or in their diluted acetone extracts ($P = 0.00 \pm 0.01$, measured at 670 nm). This result indicated that the short-wavelength chl was bound to a large molecule.

If the chl concentration in the supernatant was high, its red absorption band could be detected. Its absorbance at the maximum (about 668 nm) was in all separations lower than 10^{-3}. This corresponded to the chl concentration in the samples lower than 10^{-8} M.

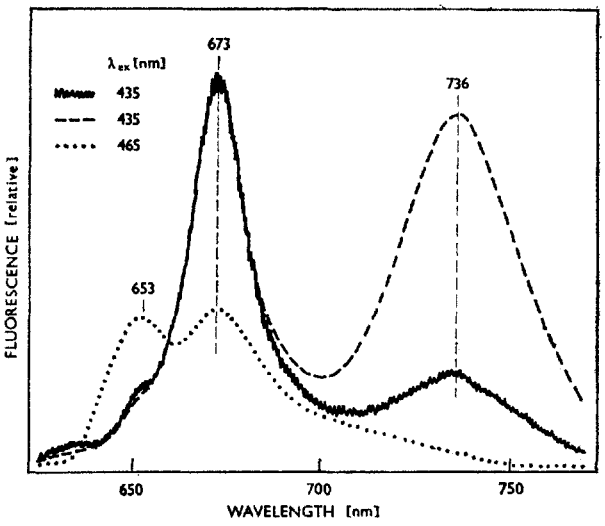


Fig. 2. Emission spectra of supernatant after centrifugation at 150 000 × *g* for 3 h. The supernatant (—, •••) or the resuspended pellet (- - -) produced during chloroplasts isolation were used for further centrifugation. Emission spectra excited at 435 nm (—, - - -) were normalized at the maximum.

The excitation spectra (Fig. 1*A*) showed that the carotenoids were not connected with the short-wavelength chl *a* or *b*, hence their triplets were not quenched by carotenoids and the short-wavelength chl might have a high phosphorescence quantum yield. This is also indicated by the similar positions of the red maxima of the chl phosphorescence excitation spectrum *in vivo* (670 nm, Krasnovsky *et al.* 1977) and of the absorbance of the short-wavelength chl *a*.

The relative intensity of the short-wavelength chl emission, characterized by the ratios F_{653}/F_{740} and F_{673}/F_{740}, varied during ontogeny of primary bean leaves in correspondence with changes in chl synthesis (Fig. 3). This correspondence was more marked during cultivation at high night temperature (Fig. 3*B*). In the greening leaves (7 d old), when chl *a* was accumulated more rapidly than chl *b*, the intensity of the short-wavelength chl *a* fluorescence was extremely high in comparison with that of chl *b*: the ratio F_{673}/F_{653} calculated from the values presented in Fig. 3 for 7 d old plants was 40 (Fig. 3*B*) or 10 (Fig. 3*A*). Later this ratio decreased to 4—7 and both ratios F_{673}/F_{740} and F_{653}/F_{740} had similar ontogenetic courses. The increase in the rate of chl accumulation after plant decapitation (16th d after sowing) induced a rapid increase in relative intensity of the short-wavelength chl *a* and *b* emissions. On the other hand, during cultivation of intact plants at high night temperature, a marked transient decrease in both ratios was observed between the 19th and 31st d after sowing when the primary leaves supported the rapid growth (start 18 d after sowing) of secondary leaves.

The positions of the absorption and emission maxima of the short-wavelength chl *a* and *b* corresponded to the spectral properties of products formed after irradiation of etiolated leaves: (*1*) In the first stages of protochlorophyllide phototransformation a part of chl formed has an absorption maximum at 668—670 nm and an emission maximum at 674—675 nm (Sironval and Michel 1967, Litvin and Belyaeva 1971, Thorne 1971, Michel and Sironval 1973). (*2*) After prolonged irradiation and darkening of etiolated leaves the chl *b* fluorescence with an emission maximum at 653 nm and a blue excitation maximum at 466 nm is present (Fradkin *et al.* 1969, Shlyk 1971).

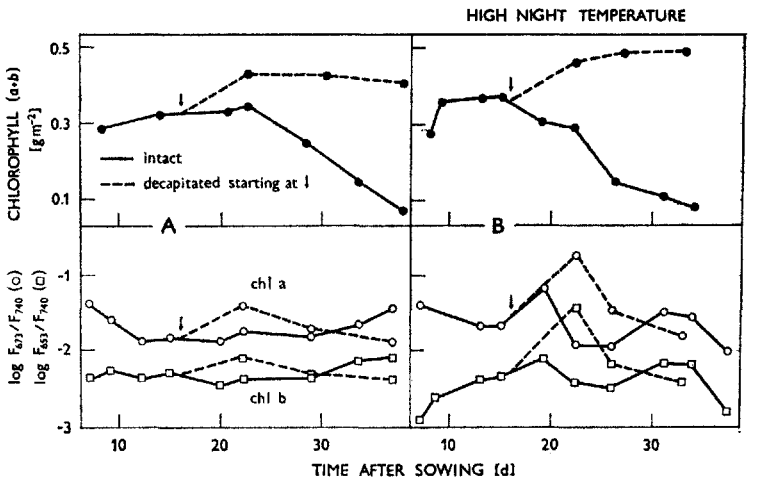


Fig. 3. Changes in amount of chl$(a+b)$ per leaf area and in relative intensities of short-wavelength fluorescence of chl *a* and *b* during the ontogeny of primary bean leaves. Cultivation at normal night temperature (day 25° C and night 16°C — *A*) or high night temperature (as in Fig. 1 — *B*).

As follows from the excitation spectrum in Fig. 1*A*, carotenoids do not transfer excitation energy to the short-wavelength chl *a* and chl *b*. The same property characterizes also the new chl formed after irradiation of etiolated leaves (Fradkin *et al.* 1969). Hence the short-wavelength chl *a* and *b* fluorescence is probably emitted by a part of the newly synthetized chl complexes in green leaves.

The present results show that the intensity of the short-wavelength chl emission is very sensitive to the changes in chl formation in irradiated green leaves and thus it may be used, together with protochlorophyllide emission (see Lebedev *et al.* 1985) for studying chl synthetic processes during the whole ontogeny of green leaves growing in light.

REFERENCES

Chereskin, B. M., Castelfranco, P. A., Dallas, J. L., Straub, K. M.: Identification of a chlorophyll biosynthetic intermediate as MG-2,4-divinyl pheoporphyrin A5 using nuclear magnetic resonance spectroscopy and soft ionization mass spectrometry. — In: Sybesma, C. (ed.): Advances in Photosynthetic Research. Vol. IV. Pp. 709—712. M. Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague — Boston — Lancaster 1984.

Fradkin, L. I., Shlyk, A. A., Kalinina, L. M., Faludi-Dániel, Á.: Fluorescence studies on the reaction centres of chlorophyll biosynthesis at the early stages of greening. — Photosynthetica **3**: 326—337, 1969.

Krasnovsky, A. A., Jr., Lebedev, N. N., Litvin, F. F.: Phosphorescence and delayed fluorescence of chlorophyll and its precursors in solutions, leaves and chloroplasts at 77 °K. — Stud. biophys. **65**: 81—89, 1977.

Lebedev, N. N., Šiffel, P., Krasnovskiĭ, A. A.: Detection of protochlorophyllide forms in irradiated green leaves and chloroplasts by difference fluorescence spectroscopy at 77 K. — Photosynthetica **19**: 183—187, 1985.

Litvin, F. F., Belyaeva, O. B.: Sequence of photochemical and dark reactions in the terminal stage of chlorophyll biosynthesis. — Photosynthetica **5**: 200—209, 1971.

Michel, J.-M., Sironval, C.: Effet de la fréquence d'éclairs de faible intensité sur les caractères des changements spectraux produits dans une feuille étoilée. — Physiol. vég. **11**: 291—300, 1973.

Santel, H. J., Apel, K.: The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). The effect of light on the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase. — Europe. J. Biochem. **120**: 95—103, 1981.

Šesták, Z.: Determination of chlorophylls *a* and *b*. — In: Šesták, Z., Čatský, J., Jarvis, P. G. (ed.): Plant Photosynthetic Production. Manual of Methods. Pp. 672—701. Dr. W. Junk N. V. Publ., The Hague 1971.

Šesták, Z.: Effect of leaf age on protochlorophyllide and chlorophyllide formation (a review). — In: Sironval, C., Brouers, M. (ed.): Protochlorophyllide Reduction and Greening. Pp. 365—375. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague — Boston — Lancaster 1984.

Shlyk, A. A.: Biosynthesis of chlorophyll *b*. — Annu. Rev. Plant Physiol. **22**: 169—184, 1971.

Šiffel, P., Lebedev, N. N., Šesták, Z.: Changes in chloroplast absorption and fluorescence spectra during ontogeny of primary bean leaves. — Photosynthetica **19**: 127—137, 1985.

Sironval, C., Michel, J.-M.: On a "photoenzyme" or, the mechanism of the protochlorophyllide-chlorophyllide photoconversion. — In: Photochemistry and Photobiology in Plant Physiology. Europe. Photobiol. Symp. Hvar, Yugoslavia, 19th—22nd September 1967. Book of Abstracts. Pp. 105—108. Hvar 1967.

Szalay, L., Tombácz, E., Singhal, G. S.: Effect of the solvent on the absorption spectra and Stokes' shift of absorption and fluorescence of chlorophylls. — Acta phys. Acad. Sci. hung. **35**: 29—36, 1974.

Thorne, S. W.: The greening of etiolated bean leaves. I. The initial photoconversion process. — Biochim. biophys. Acta **226**: 113—127, 1971.

Том 35, вып. 3 1988 г.

УДК 581.174.1

ВЛИЯНИЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОГЕНЕЗ ПИГМЕНТОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ *NOSTOC MUSCORUM*

О. Д. БЕКАСОВА, М. И. БЫСТРОВА, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

Пигментный состав и перенос энергии возбуждения в клетках *Nostoc muscorum* исследованы после инкубации цианобактерий с 5-аминолевулиновой кислотой (АЛК) в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-2}$ М при различных условиях освещения и значениях pH среды. Характер изменений спектров поглощения и флуоресценции цианобактерий под действием АЛК позволил заключить, что в темноте при инкубации с АЛК в клетках накапливаются Mg-протопорфирин и протохлорофиллид. В последующий световой период разрушаются фикоцианин и фикоэритрин$_{571}$, увеличивается набор спектральных форм хлорофилла, при этом перенос энергии возбуждения по цепи фикобилиновых пигментов нарушается. Инкубация цианобактерий с глутаминовой кислотой сопровождается накоплением Mg-протопорфирина, обесцвечиванием хлорофилла, перераспределением энергии возбуждения между фотосистемами в пользу ФС I. Полученные данные о накоплении тетрапирролов в цианобактериях и культуральной среде, нарушении переноса энергии возбуждения и постепенном обесцвечивании клеток при инкубации с АЛК позволяют сделать вывод о фотодинамическом действии АЛК на *Nostoc muscorum*.

Цианобактерии — 5-аминолевулиновая кислота — биосинтез — деструкция.

Предшественник хлорофилла и фикобилиновых пигментов в биосинтезе — 5-аминолевулиновая кислота способна приводить к накоплению в растительных тканях в темноте больших количеств тетрапирролов — промежуточных продуктов биосинтеза пигментов [1—3], которые оказывают фотодинамическое гербицидное действие, по-видимому, вследствие генерации синглетного кислорода [4]. Предшественники хлорофилла — протопорфирин и протохлорофилл образуют синглетный кислород в растворах с высоким квантовым выходом [5, 6]. Активным сенсибилизатором при развитии фотодинамического процесса в высших растениях является протохлорофиллид [7]. Фотодинамическое действие сопровождается выцветанием пигментов, обезвоживанием и разрушением растительных тканей, что приводит к постепенной гибели растений [4]. Подобное действие экзогенной АЛК показано для зеленых водорослей на примере *Chlorella* [1]. Что касается цианобактерий, то на примере *C. caldarium* обнаружена гибель клеток в присутствии высоких концентраций ^{14}C-АЛК даже в темноте, при этом в культуральную среду выделяется фикоцианин без изотопной метки [8]. Однако содержание фикоцианина в клетках увеличивается относительно хлорофилла при добавлении в среду АЛК в сочетании с Mn^{2+} [9].

Цель настоящей работы — исследовать спектральными методами влияние экзогенной АЛК на пигментный состав, перенос энергии возбуждения в фикобилисомах и на хлорофилл ФС I и II в цианобактериях *Nostoc muscorum*. Молекулярная организация пигментов и миграция энергии в фикобилисомах, а также пути сопряжения их с хлорофиллом

Сокращения: АЛК — 5-аминолевулиновая кислота; ФС I и II — фотосистемы I и II.

ФС II в интактных клетках *N. muscorum* описаны в работах [10—12]. Включение экзогенной АЛК в биогенез пигментов *N. muscorum* ранее не изучалось.

МЕТОДИКА

Цианобактерии *N. muscorum* выращивали на среде Кратца и Майерса [13].

АЛК в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-2}$ М, глутаминовую кислоту, глицин, мочевину или аммоний фосфорно-кислый ($5 \cdot 10^{-2}$ М) вносили в среду при плотности культуры 65 г·л$^{-1}$. Длительность инкубации — 48 ч, в отдельных опытах — до 6 сут.

Цианобактерии выращивали на солнечном свету при освещенности около 2000 лк в полдень с тем, чтобы ночью в отсутствие света накапливались ощутимые количества тетрапирролов — продуктов промежуточных стадий биосинтеза хлорофилла и фикобилиновых пигментов, которые в последующий световой период (день) могли бы действовать как фотодинамические сенсибилизаторы. В контрольных опытах по выяснению влияния света на действие АЛК цианобактерии либо освещали непрерывно лампами дневного света (освещенность около 2000 лк), либо помещали в темноту на 48 ч.

Спектры поглощения при 77 и 266 К измеряли при помощи спектрофотометра марки «Specord UV VIS» фирмы «Carl Zeiss» (ГДР).

Спектры флуоресценции измеряли при 77 К на спектрофлуориметре MPF-4 фирмы «Hitachi» (Япония) при ширине щелей 4 нм. В спектры флуоресценции введена поправка на чувствительность ФЭУ. Низкотемпературные спектры поглощения и флуоресценции измерены в 60%-ном глицерине.

Спектры поглощения и флуоресценции интерпретировали в соответствии со спектральными характеристиками пигментов и их предшественников, приведенными в работах [12, 14—16].

Относительное содержание фикоцианина и хлорофилла в клетках оценивали согласно [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектральные характеристики цианобактерии претерпевали наиболее существенные изменения в первые 48 ч инкубации с АЛК на солнечном свету. Так, в спектре поглощения максимум фикоцианина при 630 нм резко уменьшался, максимум фикоэритрина смещался от 578 к 570 нм. Поглощение хлорофилла с максимумом при 686 нм уменьшалось, при этом полуширина полосы возрастала с 28 до 60 нм (рис. 1). Кроме того, наблюдалось интегральное возрастание поглощения в области 400—560 нм. Вследствие обесцвечивания фикоцианина и частично хлорофилла окраска цианобактерий вместо изумрудной становилась бордовой.

На рис. 2 (*А* и *Б*) показаны изменения спектра флуоресценции *N. muscorum* в присутствии $5 \cdot 10^{-2}$ М АЛК. При возбуждении светом 440 нм, поглощаемым преимущественно хлорофиллом, основная полоса флуоресценции с максимумом у 730 нм, обусловленная излучением хлорофилла ФС I, снижалась пропорционально длительности воздействия АЛК на цианобактерии (рис. 2, *А*). Разительные изменения претерпевал спектр флуоресценции при возбуждении светом 560 нм (рис. 2, *Б*). Если до инкубации с АЛК наблюдалась собственная флуоресценция фикобилиновых пигментов (максимумы при 662 и 580 нм, «плечо» около 647 нм) и сенсибилизированная флуоресценция ФС II и I (максимумы у 690 и 730 нм соответственно), то под действием АЛК практически исчезала флуоресценция фикобилиновых пигментов и хлорофилла ФС II. Одновременно обнаруживалось излучение Mg-протопорфирина (максимум при 592 нм) и протохлорофиллида при 640 нм. Кроме этого, в первые

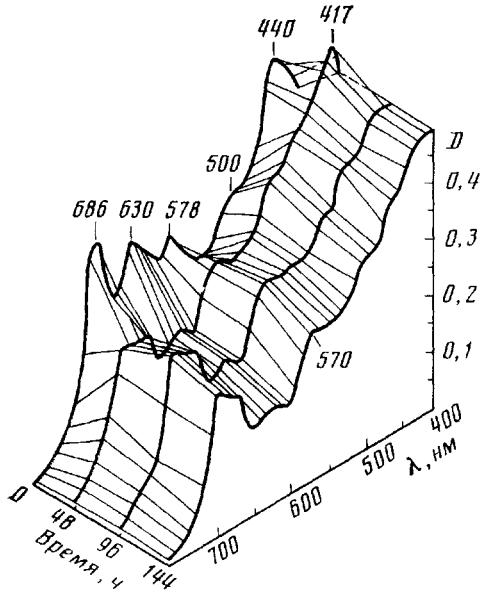


Рис. 1. Спектр поглощения *N. muscorum* в зависимости от длительности инкубирования цианобактерий с $5 \cdot 10^{-2}$ М АЛК при pH 5,0

Температура при записи спектров 266 К. У кривых указано положение максимумов.

Рис. 2. Спектры флуоресценции *N. muscorum* в зависимости от длительности инкубации цианобактерий с $5 \cdot 10^{-2}$ М АЛК при pH 5,0

а — $\lambda_{возб}$ = 440 нм, *б* — $\lambda_{возб}$ = = 560 нм. Температура 77 К. У кривых указано положение максимумов

Рис. 1

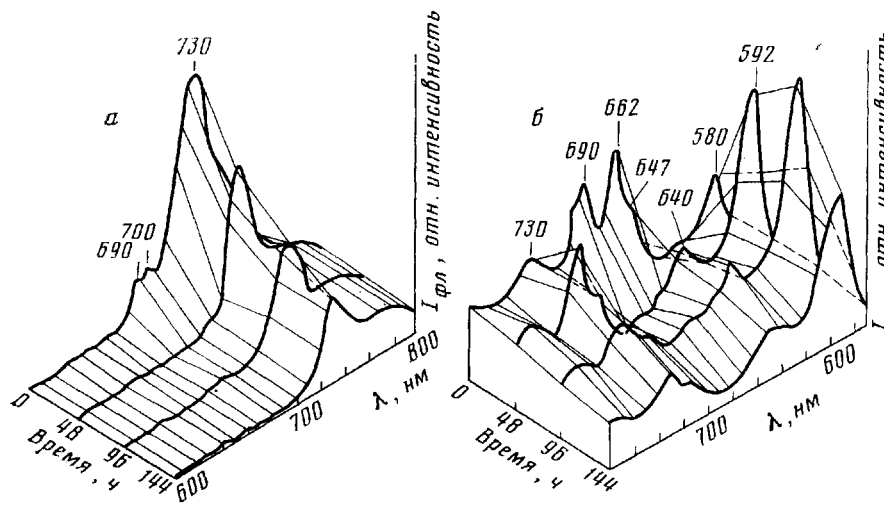


Рис. 2

48 ч инкубирования с АЛК возрастала интенсивность полосы флуоресценции ФС I (при 730 нм). При селективном возбуждении фикоцианина (λ=620 нм), аллофикоцианина (655 нм) и аллофикоцианина *B* (680 нм) спектры флуоресценции подобны представленному на рис. 2, *Б* по положению, полуширине и соотношению полос.

После удаления АЛК путем многократного промывания культуры средой Кратца — Майерса цианобактерии через несколько дней снова становились зелеными вследствие частичной обратимости действия АЛК.

Отметим, что АЛК в концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ М смещала pH среды от 8,0 до 5,0. В контрольных опытах в отсутствие АЛК такое подкисление среды приводило к гибели цианобактерий и выделению фикоэритрина и фикоцианина в культуральную среду. В условиях pH 8,0 влияние АЛК на *N. muscorum* существенно уменьшалось и обнаруживалось по спект-

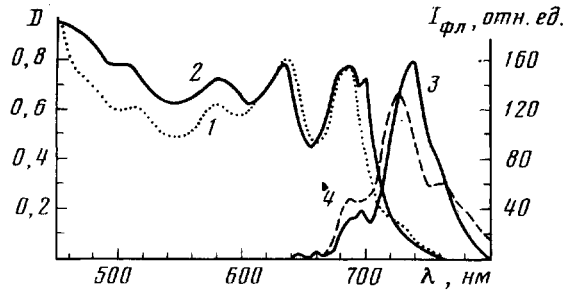


Рис. 3. Низкотемпературные спектры поглощения (*1*, *2*) и флуоресценции (*3*, *4*) *N. muscorum* в отсутствие АЛК (*1*, *3*) и после инкубации цианобактерий с $5 \cdot 10^{-2}$ М АЛК в течение 48 ч при pH 8,0

Для *3*, *4* — $\lambda_{возб}$=440 нм. Спектры поглощения нормированы при 680 нм, флуоресценции — при 600 нм

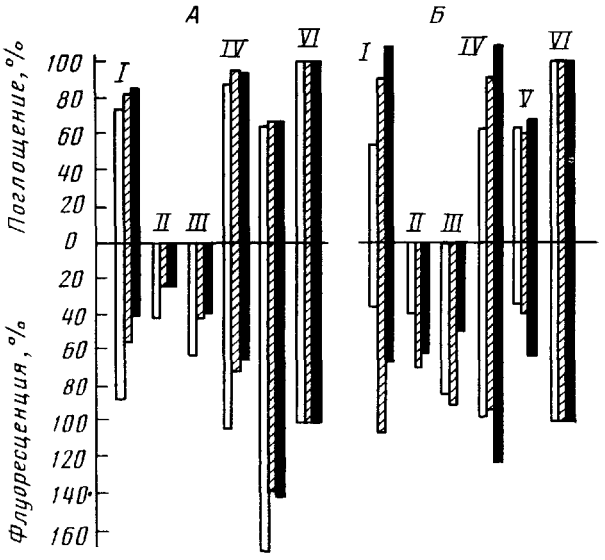


Рис. 4. Влияние света в отсутствие АЛК (*А*) и при инкубации клеток с $5 \cdot 10^{-2}$ М АЛК в течение 48 ч при pH 8,0 (*Б*) на изменение поглощения и флуоресценции ($\lambda_{возб}$=560 нм) пигментов

I — фикоэритрин$^{580}_{571}$, *II* — Mg-протопорфирин^{592}, *III* — протохлорофиллид^{640}, *IV* — фикоцианин$^{647}_{625}$, *V* — аллофикоцианин$^{662}_{656}$, *VI* — хлорофилл$^{730}_{678}$. Индексы у названий пигментов соответствуют длинам волн, при которых сравниваются поглощение (нижний индекс) и флуоресценция (верхний индекс). Они совпадают с максимумами поглощения и флуоресценции указанных пигментов за исключением *IV*, где 625 нм соответствует положению суммарного максимума поглощения фикоцианина$_{620}$ и фикоцианина$_{630}$. За 100% в каждом случае принято поглощение (флуоресценция) хлорофилла$^{730}_{678}$ (*VI*). Незаштрихованные столбики — непрерывное освещение люминесцентными лампами (~2000 лк); заштрихованные — солнечный свет (~2000 лк в полдень), черные — темнота в течение 48 ч

рам поглощения только при 77 К (рис. 3, *1*, *2*). При этом в спектре флуоресценции ($\lambda_{возб}$=440 нм) наблюдалось перераспределение интенсивности излучения по длинам волн (ср. кривые *3* и *4* на рис. 3). При возбуждении светом 560 нм, так же как в кислой среде, флуоресценция хлорофилла ФС II и аллофикоцианина тушилась, но излучение фикоэритрина и фикоцианина сохранялось (рис. 4). При этом основная полоса флуоресценции при 580 нм приобретала асимметричность вследствие наложения излучения Mg-протопорфирина с максимумом при 592 нм. Кроме

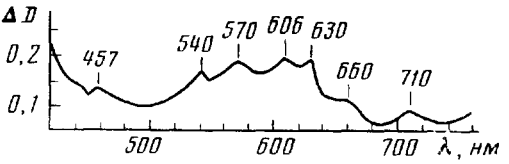


Рис. 5. Дифференциальный спектр «темнота минус свет» культуральной среды после инкубации *N. muscorum*

В темноте в присутствии $5 \cdot 10^{-2}$ М АЛК, pH 5,0 в течение 48 ч и на солнечном свету в отсутствие АЛК

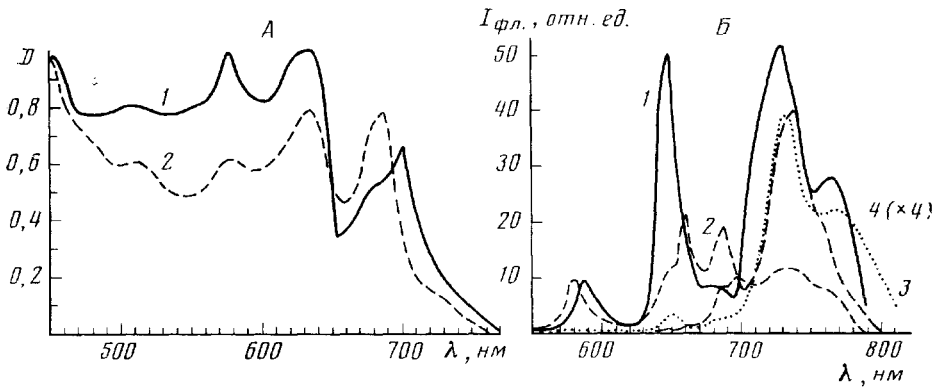


Рис. 6. Низкотемпературные спектры поглощения (*А*) и флуоресценции (*Б*) после инкубации клеток с $5 \cdot 10^{-2}$ М глутаминовой кислотой в течение 48 ч (*1, 3*) и в отсутствие глутаминовой кислоты (*2, 4*)

Для *Б*: *1*, *2* — $\lambda_{возб}$=560 нм; *3*, *4* — $\lambda_{возб}$=440 нм. Спектры поглощения нормированы к значениям при 455 нм, флуоресценции — 640 нм

этого, максимум при 647 нм смещался к 644 нм в результате суперпозиции полос флуоресценции фикоцианина (647 нм) и протохлорофиллида (640 нм). Изменения поглощения и флуоресценции, вызванные АЛК при pH 8,0, полностью обратимы в течение 48 ч после отмывания цианобактерий от экзогенной АЛК.

Непрерывное освещение клеток в течение 48 ч при pH 8,0 сопровождалось уменьшением поглощения фикоэритрина и фикоцианина, тогда как в темноте оно возрастало. Инкубирование с АЛК лишь усиливало эту тенденцию. Интенсивность флуоресценции фикоэритрина и фикоцианина менялась пропорционально изменению поглощения. Что касается аллофикоцианина, то его содержание сохранялось неизменным в темноте и при непрерывном освещении вне зависимости от АЛК, однако интенсивность флуоресценции резко снижалась в присутствии АЛК в любых режимах освещения (рис. 4). Флуоресценция хлорофилла, сенсибилизированная фикобилиновыми пигментами, уменьшалась в присутствии АЛК независимо от условий освещения.

При темновой инкубации с АЛК в клетках обнаруживались по спектрам флуоресценции Mg-протопорфирин и протохлорофиллид. В культуральной среде дополнительно к этим тетрапирролам накапливались билидиены (рис. 5). При непрерывном освещении в присутствии АЛК, судя по флуоресценции, доминирует только один предшественник — протохлорофиллид.

Инкубация *N. muscorum* с АЛК в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М не вызывала видимых изменений в пигментном аппарате цианобактерий.

При внесении в культуральную среду глутаминовой кислоты вместо аминолевулиновой цианобактерии становились через 48 ч серо-голубыми вследствие относительного возрастания содержания фикобилиновых пиг-

ментов и уменьшения хлорофилла (рис. 6, *А*). Поглощение фикоцианина, адекватное относительному количеству, возрастало с 0,6 до 0,9 *D*, а хлорофилла уменьшалось с 0,7 до 0,5 *D*. При этом полоса поглощения хлорофилла смещалась в длинноволновую область, обнаруживая максимум при 702 нм.

При преимущественном возбуждении хлорофилла в присутствии глутаминовой кислоты наблюдалось резкое уменьшение интенсивности флуоресценции ФС I, более сильное, чем под действием АЛК. При возбуждении светом 560 нм, поглощаемым в основном фикоэритрином, в спектре флуоресценции доминировали максимумы излучения фикоцианина и хлорофилла ФС I, обнаруживалось излучение Mg-протопорфирина с максимумом около 590 нм, причем излучение ФС I возгоралось по сравнению с контролем. Флуоресценция хлорофилла ФС II и всех других фикобилиновых пигментов была полностью потушена (рис. 6, *Б*).

Глицин в отличие от АЛК и глутаминовой кислоты не вызывал видимых изменений в спектрах поглощения и флуоресценции цианобактерий при pH 8,0. Подкисление среды до pH 5,0 как в контрольных, так и опытных вариантах с глицином приводило к гибели цианобактерий и накоплению в культуральной среде фикоэритрина и фикоцианина, максимально поглощающих при 571 и 620 нм соответственно. Именно эти пигменты, как было показано ранее [14], образуют периферический ряд субчастицы 1 в частице 34 S, с которого энергия не передается на ядро фикобилисомы, включающее аллофикоцианин [11].

Мочевина и аммоний фосфорно-кислый подобно глицину не вызывали видимых изменений в пигментном аппарате *N. muscorum*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение поглощения в сине-зеленой области спектра, смещение максимума поглощения от 440 к 417 нм, а также появление полос флуоресценции при 590—592 нм (Mg-протопорфирин) и при 640 нм (протохлорофиллид) свидетельствуют о возрастании концентрации тетрапирролов в клетках при инкубации с АЛК на солнечном свету, особенно заметное в кислой среде.

Накопление в цианобактериях предшественников хлорофилла — Mg-протопорфирина и протохлорофиллида при инкубации клеток с АЛК означает, что экзогенная АЛК включается в биосинтез хлорофилла в *N. muscorum*. Обнаружение в присутствии АЛК билидиенов в культуральной среде (по дифференциальному спектру поглощения, см. рис. 5) свидетельствует о влиянии АЛК также на биогенез фикобилиновых пигментов. Накопление в заметных количествах Mg-протопорфирина при инкубации цианобактерий с глутаминовой кислотой (из нее образуется АЛК в процессе биосинтеза пигментов) подтверждает вывод о включении экзогенной АЛК в биосинтез хлорофилла и фикобилиновых пигментов. Отрицательный результат, полученный в опытах с другим предшественником АЛК — глицином, может быть обусловлен дефицитом сукцинил-СоА, который необходим для синтеза АЛК из глицина [18, с. 195; 19, с. 14]. Отсутствие изменений в пигментном аппарате в присутствии азотсодержащих соединений — мочевины и аммония фосфорнокислого, не включающихся в биогенез пигментов, подтверждает вывод о воздействии АЛК на клетку через биосинтез пигментов.

Уширение полосы поглощения хлорофилла в спектре поглощения *N. muscorum* в присутствии АЛК может быть обусловлено увеличением числа спектральных форм хлорофилла и изменением их соотношения, а также частичной феофитинизацией хлорофилла возможной при pH 5,0.

Тушение флуоресценции при 690 нм и возгорание при 730 нм, наблюдаемое при возбуждении фикобилиновых пигментов, свидетельствует о нарушении миграции энергии с фикобилипротеинов на хлорофилл ФС II

и усилении переноса энергии на ФС I под действием экзогенной АЛК. В присутствии глутаминовой кислоты также наблюдается перераспределение энергии возбуждения между ФС I и ФС II в пользу ФС I.

Длительное воздействие АЛК (как и глутаминовой кислоты) приводит к гибели цианобактерий.

Таким образом, накопление тетрапирролов — промежуточных соединений биосинтеза пигментов, в цианобактериях и культуральной среде, нарушение переноса энергии возбуждения на реакционные центры фотосистем, постепенное обесцвечивание клеток и, наконец, их гибель при инкубации с АЛК в условиях естественного освещения позволяют сделать вывод о фотодинамическом действии экзогенной АЛК. Отметим, что динамика спектральных характеристик пигментной системы при включении экзогенной АЛК в растительный организм позволяет обнаружить фотогербицидный эффект задолго до появления видимых повреждений.

Фотодинамический процесс имеет место также и при непрерывном освещении, хотя накопление предшественников хлорофилла в этом случае менее выражено вследствие их возможного превращения в хлорофилл и разрушения.

В условиях длительного затемнения (от 2 до 6 сут) независимо от присутствия АЛК цианобактерии погибают при pH 5,0, тогда как при pH 8,0 гибель клеток не наблюдается. Одинаковый конечный результат — гибель цианобактерий при снижении pH среды и под действием АЛК достигается различными путями. В кислой среде без АЛК клетки погибают вследствие процессов деструкции, о чем свидетельствует выход фикоцианина и фикоэритрина в культуральную среду. АЛК же действует, включаясь в метаболизм растительного организма, приводя к накоплению в клетках тетрапирролов, которые вызывают гибель клеток на свету. Наибольшая эффективность фотодинамического действия достигается в кислой среде, которая способствует снижению активности ферментов, участвующих в биосинтезе хлорофилла.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Граник С.* (*S. Granick*). Пигменты биосинтетической цепи хлорофилла и их взаимодействие со светом//Тр. V Междунар. биохим. конгр. «Механизм фотосинтеза». Симпозиум VI. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 184.
2. *Rebeiz C. A., Abou-Haidar M., Yaghi M., Catel|ranco P. A.* Porphyrin biosynthesis in cell-free homogenates from higher plants//Plant Physiol. 1970. V. 46. № 4. P. 543.
3. *Sisler E. C., Klein W. H.* The effect of age and various chemicals on the lag phase of chlorophyll synthesis in dark grown bean seedlings//Physiol. plantarum. 1963. V. 16. Fasc. 2. P. 315.
4. *Rebeiz C. A., Montazer-Zouhoor A., Hopen H. J., Wu S. M.* Photodynamic herbicides. I. Concept and phenomenology//Enzyme and microbiol. technol. 1984. V. 6. № 6. P. 390.
5. *Красновский А. А., мл.* Синглетный кислород в фотосинтезирующих организмах// Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1986. Т. 31. С. 562.
6. *Krasnovsky A. A.*, jar. Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions// Photochem. Photobiol. 1979. V. 29. № 1. P. 29.
7. *Егоров С. Ю., Красновский А. А., мл., Сафронова И. А., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Фотогенерация синглетного молекулярного кислорода пигментами — предшественниками хлорофилла//Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. № 1. С. 234.
8. *Troxler R. F., Lester R.* Biosynthesis of Phycocyanobilin//Biochemistry. 1967. V. 6. № 12. P. 3840.
9. *Csatorday K., Gombos Z., Szalontai B.* Mn^{2+} and Co^{2+} toxicity in chlorophyll biosynthesis//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 2. P. 476.
10. *Бекасова О. Д., Муслимов И. А., Синещеков В. А.* Исследование организации пигментов в фикобилисоме методом сенсибилизированной флуоресценции/Биофизика. 1984. Т. 29. Вып. 3. С. 403.
11. *Синещеков В. А., Муслимов И. А., Бекасова О. Д.* Миграция энергии возбуждения в фикобилисомах//Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 2. С. 447.
12. *Бекасова О. Д., Синещеков В. А., Синещеков А. В.* Исследование путей переноса энергии возбуждения от фикобилисом к хлорофиллу в *Nostoc muscorum* методом производной и селективной флуориметрии//Биофизика. 1988. Т. 33. Вып. 1. С. 71.
13. *Kratz W. A., Myers J.* Nitrition and growth of several blue-green algae//Amer. J. Bot. 1955. V. 42. № 3. P. 282.

14. *Бекасова О. Д., Муслимов И. А., Красновский А. А.* Фракционирование фикобилисом синезеленой водоросли *Nostoc muscorum*//Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 1. С. 262.
15. *Фрадкин Л. И., Калинина Л. М., Сай П. К.* О накоплении пигментов и об их длинноволновой флуоресценции в этиолированных листьях в присутствии экзогенной дельта-аминолевулиновой кислоты//Весці Акад. навук БССР. Сер. біял. навук. 1978. № 1. С. 36.
16. *Beale S. J.* δ-ALA in plants: its biosynthesis, regulation and role in plastid development//Ann. Rev. Plant Physiol. 1978. V. 29. P. 95.
17. *Myers J., Grahm J. R., Wang R. T.* On spectral control of pigmentation in *Anacystis nidulans (Cyanophyceae)*//J. Phycol. 1978. V. 14. № 4. P. 513.
18. *Бриттон Г.* Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 422 с.
19. *Быховский В. Я., Зайцева Н. И., Полулях О. В.* Микробиологический синтез порфиринов. М.: Изд. ВНИИСЭНТИ, 1985. 52 с.

Поступила в редакцию
5.III.1987

EFFECT OF 5-AMINOLEVULINIC ACID ON PIGMENT BIOGENESIS IN THE CYANOBACTERIUM *NOSTOC MUSCORUM*

O. D. BEKASOVA, M. I. BYSTROVA, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Pigment composition and excitation energy transfer in *Nostoc muscorum* cells were studied after the cyanobacterium incubation with 5-aminolevulinic acid (ALA) of $5 \cdot 10^{-3}$ M and $5 \cdot 10^{-2}$ M under varied illumination conditions and pH values in the medium. The cyanobacterium exposed to ALA accumulated Mg-protoporphyrin and protochlorophyllide, as shown by changes in absorption and fluorescence spectra. During the subsequent light period, phycocyanin and phycoerythrin$_{571}$ degraded, the number of spectral forms of chlorophyll increased, and the excitation energy transfer along the phycobilin pigment chain got disturbed. Incubation of the cyanobacteria with glutamic acid was accompanied by Mg-protoporphyrin accumulation, chlorophyll bleaching, and by he redistribution of excitation energy between photosystems in favour of photosystem-I. The results on tetrapyrrole accumulation in the cyanobacteria and cultural medium, disturbances in excitation energy transfer and gradual cell bleaching upon incubation with ALA led to a conclusion on the photodynamic action of ALA on *Nostoc muscorum*.

БИОХИМИЯ
Т. 53, вып. 12 1988

УДК 577.355.2

СОСТОЯНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА, ОБРАЗОВАННОГО В ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЯХ ИЗ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

БЫСТРОВА М. И., НАЗАРОВА И. Г., КРАСНОВСКИЙ А. А.

Изучены условия накопления протохлорофиллида (ПХд) в зеленых листьях пшеницы в присутствии экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) при ее введении через срезы стеблей. По мере накопления ПХд происходит последовательная самосборка трех основных форм пигмента, имеющих максимумы низкотемпературной люминесценции *in situ* соответственно при 633±1, 640±2 и 652±1 нм. Образование форм ПХд с люминесценцией 640—652 нм обусловлено агрегацией пигмента. ПХд 633 нм не агрегирован, хотя, по-видимому, тоже связан с белком и передает энергию возбуждения обеим длинноволновым формам пигмента. Установлено, что моновинил-ПХд является основной модификацией пигмента на всех стадиях его темнового накопления. Накопление ПХд в оптимальных условиях сопровождается накоплением «мономерных» форм порфиринов — более ранних предшественников хлорофилла *a*, в фонде которых доминируют протопорфирин IX (ПП) и монометиловый эфир магний-протопорфирина IX (Mg-ППМЭ), идентифицированные как дивинильные порфирины. При освещении листьев, инкубированных с АЛК, обнаружено образование цинкового производного диэфира протопорфирина IX (Zn-ППДЭ). На свету после инкубации с АЛК в листьях развивается фотодинамический процесс, который проявляется в виде характерных изменений низкотемпературной люминесценции хлорофилла и сопровождается падением веса растений. Полученные данные позволяют предположить, что ПХд 633 нм является сенсибилизатором фотодинамического процесса как при сочетании с порфиринами, так и при его индивидуальном существовании в клетке. При освещении основная масса ПХд в составе длинноволновых форм подвергается быстрой деструкции; небольшая часть пигмента (главным образом в составе ПХд 652 нм) превращается в хлорофилл (хлорофиллид) *a*.

5-Аминолевулиновая кислота — ключевой предшественник всех тетрапиррольных пигментов. Давно известно [1, 2], что при введении в растительные ткани она вызывает синтез больших количеств протохлорофиллида. Многочисленные исследования [1—8] посвящены изучению свойств протохлорофиллида, накапливающегося в присутствии экзогенной АЛК (так называемого АЛК-ПХд) в этиолированных листьях высших растений. В недавней работе [9] приведены количественные данные по индуцированному АЛК и дипиридилом накоплению ПХд и некоторых порфиринов — более ранних предшественников хлорофилла *a* — в зеленых листьях и описан сенсибилизированный этими пигментами фотодинамический процесс, развивающийся под действием света и приводящий растения к летальному исходу. Однако природа состояния АЛК-ПХд в зеленых листьях и связь функциональной активности пигмента с его состоянием не были изучены.

Данная работа была проведена с целью получения информации о фотоактивности разных форм АЛК-ПХд в зеленых растениях. Прежде всего нас интересовало, какие формы пигмента активны в фотодинамическом процессе, происходящем на свету после инкубации с АЛК, а также то, какие изменения испытывает при освещении пигментная система листьев. Предпринятое исследование связано с пониманием молекулярного механизма действия АЛК как фотодинамического гербицида.

Принятые сокращения: АЛК — 5-аминолевулиновая кислота; ПХд — протохлорофиллид; МВ — моновинил(ьный); ДВ — дивинил(ьный); ПП — протопорфирин IX; Mg-ППМЭ — монометиловый эфир Mg-протопорфирина IX; Zn-ППДЭ — диметиловый эфир Zn-протопорфирина IX. Термин АЛК-ПХд введен в работе [5].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были зеленые проростки пшеницы (сорт Юбилейная) 6—7-дневного возраста, выращиваемые при 18—20° на «белом» свету под люминесцентными лампами (освещенность ~3000 лк), в условиях чередования световых (16 ч) и темновых (8 ч) периодов. Для опытов использовали растения 6—7-см длины; 5-см отрезки листьев (считая от верхушки) погружали срезанными частями в водный раствор АЛК (с концентрацией 10^{-2} М или $2 \cdot 10^{-3}$ М) и выдерживали в нем на протяжении 2—20 ч. По окончании инкубации растения ставили в водопроводную воду и экспонировали на свету под люминесцентными лампами (освещенность 1600 лк, температура 28—30°), чтобы вызывать развитие фотодинамического процесса.

В наших опытах листья пшеницы после обработки АЛК описанным выше способом (через срезы) проявляли высокую чувствительность к освещению и в результате развития фотодеструкции необратимо завядали, т. е. избранные растения оказались удобным объектом для моделирования фотодинамического процесса. В цитированной работе [9] обработка растений АЛК (в сочетании с дипиридилом) производилась путем опрыскивания — через листовую поверхность. Пшеница при таком способе обработки проявляла устойчивость к освещению, что, скорее всего, объясняется плохим проникновением указанных соединений через покровные ткани.

По мере инкубации с АЛК и после нее, по мере освещения, регистрировали люминесценцию интактных листьев при —196° в спектральном диапазоне 570—780 нм, охватывающем области свечения протохлорофиллида (615—670 нм), порфиринов (570—610 нм) и хлорофилла *а* (660—780 нм). Люминесценцию листьев возбуждали на расстоянии 3 см от верхушки. Измерения производили с помощью флуоресцентного спектрофотометра MPF-44B фирм «Perkin-Elmer» (США) и «Hitachi» (Япония).

Для экстракции пигментов пользовались смесью ацетон — гидроокись аммония (0,1 N водный раствор) в соотношении 9 : 1 [2, 10], чтобы предотвратить возможную феофитинизацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление ПХд в зеленых листьях при темновой инкубации с АЛК; его состояние и природа. В зеленых листьях пшеницы, как и в этиолированных, при инкубации с АЛК накапливается ПХд. По нашим оценкам, сделанным на экстрактах, максимальное количество АЛК-ПХд (до 80 мкг/г свежего веса) накапливалось при инкубации с 10^{-2} М раствором АЛК (в водопроводной воде или фосфатном буфере с pH 6,9—7,2) в течение 15—20 ч. Указанное количество АЛК-ПХд приблизительно в 1,5 раза меньше по сравнению с количеством пигмента, накапливающимся в этиолированных проростках пшеницы в близких условиях [4]. При использовании $2 \cdot 10^{-3}$ М раствора АЛК максимальное количество АЛК-ПХд уменьшалось обычно в 3—4 раза по сравнению с 10^{-2} М раствором.

Изменение pH инкубационной среды до значений $\leqslant 3{,}5$ или $\geqslant 9$ снижало уровень АЛК-ПХд в листьях на 25—40%, что согласуется с результатами, ранее полученными для этиолированных проростков пшеницы [4].

По мере роста растений наблюдалось значительное снижение количества АЛК-ПХд. Так, листья пшеницы 3-недельного возраста в оптимальных условиях обработки АЛК синтезировали в 5—10 раз меньше ПХд по сравнению с 6-дневными.

Мы проследили изменения низкотемпературной флуоресценции АЛК-ПХд в процессе инкубации листьев с $2 \cdot 10^{-3}$ и 10^{-2} М АЛК.

При инкубации листьев с $2 \cdot 10^{-3}$ М АЛК уже через 2 ч в спектрах (при возбуждении монохроматическим светом с λ 440 нм) обнаруживался отчетливый максимум ~633 нм (рис. 1*а*, спектр *1*). Он принадлежит самой «ранней», или начально синтезирующейся из АЛК форме пигмента — ПХд633. Аналогичная спектральная форма наблюдалась ранее [7, 8] в этиолированных листьях фасоли и пшеницы в присутствии экзогенной АЛК.

ПХд633 соответствует полоса 440—442 нм в спектре возбуждения (рис. 1*б*, спектр *8*).

Таким образом, у ПХд, начально синтезирующегося из АЛК, максимумы флуоресценции и ее возбуждения заметно (т. е. на 7—8 и 3—5 нм соответственно) смещены в длинноволновую область по сравнению с теми же показателями у пигмента, растворенного в диэтиловом эфире. Вероятно, АЛК-ПХд в составе самой ранней спектральной формы, т. е. «первичный» АЛК-ПХд, связан с белком.

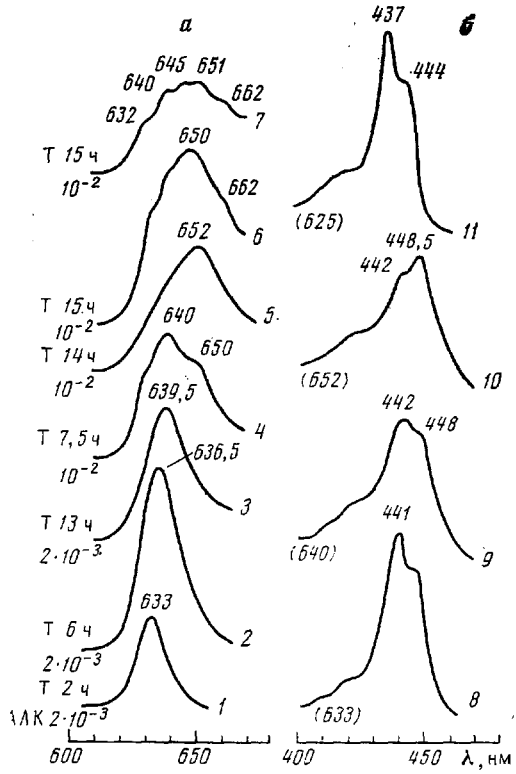


Рис. 1. АЛК-ПХд в зеленых листьях пшеницы при темновом накоплении. Низкотемпературные (—196°) спектры флуоресценции (*а*) и возбуждения флуоресценции (*б*): *1*—*7* — интактные листья после темновой инкубации с АЛК; возбуждение 440 нм. Слева указаны концентрации АЛК и время инкубации. *8*—*10* — образцы 1, 3 и 5 соответственно; *11* — эфирный экстракт листьев после инкубации с 10^{-2} М АЛК в течение 16 ч. Цифры в скобках — длины волн регистрации

По мере увеличения инкубационного периода и возрастания количества накапливающегося ПХд его спектр обнаруживает длинноволновое смещение; основной максимум люминесценции проявляется через несколько часов инкубации при 635—637 нм и затем через 10—12 и более часов — около 640 нм (рис. 1, спектры *2*, *3*).

Смещение основного максимума низкотемпературной флуоресценции АЛК-ПХд от 632 до 643 нм наблюдалось ранее [8] в этиолированных проростках пшеницы при накоплении пигмента. При инкубации зеленых листьев пшеницы с $2 \cdot 10^{-3}$ М АЛК, как показано в нашей работе, появление максимума ~640 нм, доминирующего в спектре, является конечным итогом изменений люминесценции АЛК-ПХд в процессе его накопления. При использовании данной концентрации АЛК мы обычно не наблюдали заметного образования более длинноволновых полос в спектрах флуоресценции АЛК-ПХд; максимум ~640 нм сохранял доминирующее положение даже после длительной (20 ч и дольше) инкубации.

Спектр возбуждения люминесценции при 640—642 нм, хотя и имеет основной максимум при 443±1 нм, соответствующий поглощению (полосе Соре) ПХд633, все же довольно заметно отличается от спектра возбуждения коротковолновой формы (см. рис. 1*б*, спектры *8*, *9*). Это отличие позволяет отнести полосу люминесценции при ~640 нм к отдельной форме АЛК-ПХд (ПХд640). Несмотря на дискретность ПХд640 всегда существует в сочетании с ПХд633 и является акцептором его энергии возбуждения.

При инкубации листьев с 10^{-2} М АЛК (в течение 10—16 и более часов) в низкотемпературных спектрах люминесценции кроме полосы 640—642 нм обнаруживается более длинноволновая полоса — при 650—653 нм. Последняя обычно проявлялась сначала (через 6—8 ч инкубации) в виде «плеча» у полосы 640—645 нм и затем (через 12—16 и более часов инкубации) в виде максимума, доминирующего в спектре (см. рис. 1*а*, спектры *4*, *5*).

Максимум 650—653 имеет спектр возбуждения (рис. 1*б*, спектр *10*), достаточно отличающийся от спектров возбуждения обеих более коротковолновых полос (633 и 640 нм), что указывает на его принадлежность

отдельной, дискретной, форме пигмента — ПХд652. Вместе с тем один из двух основных максимумов в спектре возбуждения ПХд652 по положению совпадает с полосами возбуждения ПХд633 и ПХд640 (рис. 1*б*, спектры *8*, *9*). Это в свою очередь свидетельствует о том, что свечение при 650—655 обязано процессу миграции энергии от более коротковолновых форм пигмента и прежде всего от ПХд633.

В некоторых опытах после длительной инкубации с 10^{-2} М АЛК в листьях можно было наблюдать более или менее заметную полосу люминесценции при 660—665 нм, которая всегда сопутствовала более коротковолновому свечению (рис. 1*а*, спектр *6*). Иногда после инкубации с 10^{-2} М АЛК вместе с небольшой полосой около 660 нм в листьях обнаруживался набор максимумов в области 630—655 нм (рис. 1*а*, спектр 7). Максимум 660—665 нм, по-видимому, так же, как и более коротковолновые, принадлежит соответствующей отдельной форме (формам) пигмента. Длинноволновая люминесценция АЛК-ПХд в этиолированных листьях высших растений при —196° с рядом полос в диапазоне 650—700 нм наблюдалась ранее в нашей работе [6] и работе [11].

Количественное соотношение между разными формами АЛК-ПХд в зеленых листьях значительно варьирует у разных образцов, тогда как увеличение относительной доли длинноволновых форм по мере накопления пигмента является общей закономерностью.

Обнаруженная прямая зависимость образования длинноволновых форм АЛК-ПХд от концентрации пигмента указывает на то, что такие формы являются агрегированными структурами. Ранее [12] было сделано предположение об агрегационной природе АЛК-ПХд на основании данных по круговому дихроизму ПХд-голохрома, выделенного из этиолированных листьев ячменя, обработанных АЛК.

Формам АЛК-ПХд с люминесценцией 640—642 нм, 652 нм (или более длинноволновой) на любой стадии накопления всегда сопутствует самая коротковолновая форма пигмента — ПХд633, поглощение которого при 440—443 нм (полоса Соре) проявляется в спектрах их возбуждения *in situ*. По способности к существованию в виде сочетания форм разного типа АЛК-ПХд в зеленых листьях сходен с АЛК-ПХд в этиолированных листьях [6], а также с изолированным протохлорофиллидом в искусственных системах [13].

Идентификация АЛК-ПХд была проведена на основании измерений спектров возбуждения низкотемпературной флуоресценции растворов в диэтиловом эфире (максимум свечения 625 нм). Эфирные растворы получали по мере инкубирования с АЛК из водно-ацетоновых экстрактов листьев после предварительного промывания гексаном [14]. Оказалось, что в зеленых листьях пшеницы после введения АЛК на всех стадиях темнового накопления ПХд доминирует его моновинильная (МВ) модификация.

На рис. 1*б* приведен спектр возбуждения (кривая *11*) эфирного раствора ПХд при —196° после 16 ч инкубации с 10^{-2} М АЛК. Наличие в спектре максимумов при 437 и 443—444 нм в их определенном соотношении и при отсутствии длинноволнового ($\sim$450 нм) плеча является характерным признаком МВ-ПХд [15].

Наши результаты согласуются с данными [14] по преимущественному синтезу МВ модификации ПХд в зеленых листьях пшеницы при затемнении (без введения АЛК) и преобладанию у данного вида растений МВ пути образования хлорофилла *а*.

Обнаружение и идентификация порфиринов-предшественников ПХд при темновой инкубации листьев с АЛК. При инкубации зеленых листьев пшеницы с 10^{-2} М АЛК в них, кроме ПХд, обнаруживается монометиловый эфир Mg-протопорфирина IX. Этот порфирин образуется в растительных тканях при введении АЛК [2, 10, 16—19] как продукт ее метаболизма, являясь предшественником ПХд в цепи реакций биосинтеза хлорофилла *а* [20]. Спектральные характеристики пигмента приведены во многих работах (см., например, [2, 10, 16, 18, 19, 21]. Количество Mg-ППМЭ, накапливающегося в зеленых листьях пшеницы, об-

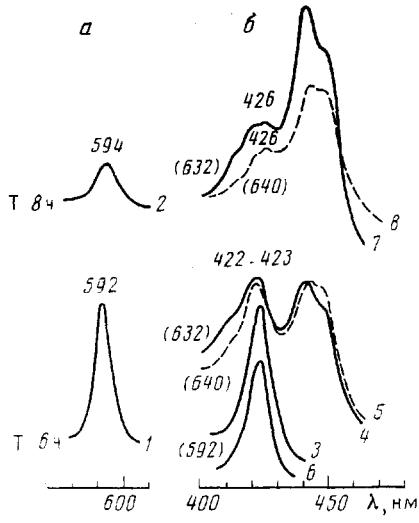


Рис. 2

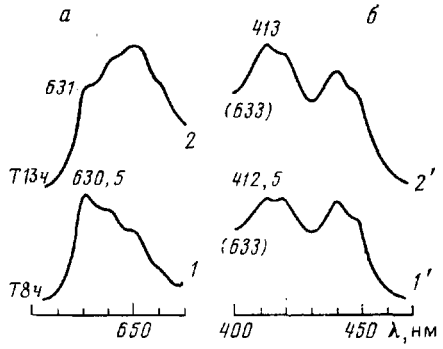


Рис. 3

Рис. 2. Mg-Порфирины в зеленых листьях пшеницы, инкубированных с 10^{-2} М АЛК. Низкотемпературные (—196°) спектры флуоресценции (*а*) и возбуждения флуоресценции (*б*): *1*, *2* — образцы интактных листьев; возбуждение 420 нм. Время инкубации указано слева. *3*—*5* — образец 1; *6* — эфирный экстракт листьев после 6 ч инкубации с АЛК; *7*, *8* — образец 2. Цифры в скобках — длины волн регистрации

Рис. 3. Обнаружение ПП IX в зеленых листьях пшеницы, инкубированных с 10^{-2} М АЛК. Спектры флуоресценции (*а*) и возбуждения флуоресценции (*б*). *1*, *2* — образцы листьев; возбуждение 415 нм. Время темновой инкубации указано слева. *1'*, *2'* — соответственно те же образцы. Цифры в скобках — длины волн регистрации

работанных смесью АЛК и 2,2′-дипиридила, более, чем на порядок меньше по сравнению с количеством ПХд, по данным работы [9].

Мы наблюдали присутствие Mg-ППМЭ в интактных листьях пшеницы, инкубированных с одной АЛК, по спектрам низкотемпературной флуоресценции; при возбуждении светом 420 нм пигмент проявлялся в виде заметной полосы при 591—592 нм (рис. 2*а*, спектр *1*) с интенсивностью, различающейся у разных образцов. Близкое (593 нм) положение основной полосы флуоресценции указанного порфирина в зеленеющих злаках *in situ* ранее было отмечено в работе [17].

Наиболее интенсивное свечение Mg-ППМЭ обнаруживали, как правило, образцы, инкубированные с 10^{-2} М АЛК в течение 6—8 ч. При более продолжительной инкубации (10—12 ч и дольше) уровень пигмента обычно снижался, что сопровождалось увеличением содержания ПХд и ростом относительного количества форм с длинноволновой (650—660 нм) люминесценцией.

Флуоресценция Mg-ППМЭ (при 592 нм) *in situ* имеет основной максимум возбуждения 422—423 нм (рис. 2*б*, спектр *3*), соответствующий полосе Соре пигмента. Этот максимум отчетливо проявляется в спектрах возбуждения АЛК-ПХд (рис. тот же, спектры *4*, *5*). Следует отметить, что разбавленные растворы Mg-ППМЭ в эфире по положению основных максимумов флуоресценции и ее возбуждения (см. рис. 2*б*, спектр *6*) практически не отличаются от интактных листьев. Это явление приводит к мысли о том, что в естественном состоянии названный порфирин не связан с белком, тогда как ПХд, даже свежеобразованному из предшественника, свойственно взаимодействие с белковыми компонентами мембранных структур.

У эфирных растворов Mg-ППМЭ, получаемых из водно-ацетоновых экстрактов листьев в ходе инкубации с АЛК, положения основных максимумов флуоресценции и ее возбуждения (591—592 и 422—423 нм соответственно) не изменялись. Это позволило идентифицировать Mg-ППМЭ на всех стадиях его темнового накопления как дивинильный порфирин [15, 19]. Обнаруженное нами отсутствие четко регистрируемого

накопления МВ-Mg-ППМЭ позволяет полагать, что этот порфирин после образования из ДВ-Mg-ППМЭ (в результате восстановления боковой винильной группы в 4-м положении до этильной) быстро превращается в МВ-ПХд, который и является основным компонентом фонда АЛК-ПХд в зеленых листьях пшеницы. Заметим, что ранее в работе [22] было сделано предположение о существовании в гомогенатах этиолированных проростков пшеницы мультиферментной системы, катализирующей и восстановление ДВ-Mg-ППМЭ в МВ-Mg-ППМЭ, и быстрое превращение последнего в МВ-ПХд.

В некоторых опытах при инкубации листьев с АЛК в течение 4—12 ч в спектрах возбуждения флуоресценции АЛК-ПХд обнаруживался максимум при ~425 нм (рис. 2*б*, спектры *7*, *8*), более или менее заметный у разных образцов. Его скорее всего можно приписать Mg-протопорфирину IX (Mg-ПП), который отличается от Mg-ППМЭ положениями основных полос низкотемпературной флуоресценции и возбуждения, несколько (на 2 нм) смещенными в длинноволновую область [23]. У образцов, содержащих Mg-ПП, основной максимум свечения в порфириновой области проявлялся при 593—594 нм (рис. 2*а*, спектр *2*).

Кроме Mg-ППМЭ и Mg-ПП при инкубации листьев с 10^{-2} М АЛК в них можно было наблюдать присутствие протопорфирина IX, который является предшественником Mg-порфиринов в цепи реакций биосинтеза хлорофилла *а* [20]. В нашей работе ПП обнаруживался в низкотемпературной флуоресценции листьев (при возбуждении светом 415 или 420 нм) в виде компонента ~630 нм (рис. 3*а*, спектры *1*, *2*), перекрывающегося с коротковолновой (632—633 нм) люминесценцией АЛК-ПХд. Интенсивность свечения ПП сильно изменялась у разных образцов, что связано с вариабельностью биологического материала и может свидетельствовать о зависимости образования пигмента от физиологического состояния растений. Наиболее интенсивное свечение ПП мы, как правило, наблюдали у образцов с наименьшим содержанием Mg-ППМЭ (судя по величине максимума 591—592 нм). В этих случаях в спектрах возбуждения флуоресценции при 630—633 нм (область свечения ПП и коротковолнового ПХд) довольно заметно проявлялась полоса 412—413 нм (рис. 3*б*), которую можно приписать полосе Соре ДВ-ПП [23]. У разных образцов указанная полоса была или соизмеримой с максимумами возбуждения ПХд (~440 и ~448 нм) или доминировала в спектре (рис. 3*б*).

Спектры возбуждения низкотемпературной флуоресценции при 630—633 нм интактных листьев, обработанных АЛК — хороший тест на присутствие ПП (полоса возбуждения 412—414 нм), Mg-ППМЭ (полоса возбуждения 422 нм), а также Mg-ПП (полоса возбуждения ~425 нм). По спектрам возбуждения, измеряемым в процессе обработки АЛК (равно, как и каким-либо другим соединением) можно оценивать относительные количества различных порфиринов, что, на наш взгляд, может иметь перспективы практического использования в диагностике и отборе сортов, устойчивых к гербицидам фотодинамического действия.

Наличие в спектрах возбуждения флуоресценции при 632 (область свечения ПП и ПХд633) полос, принадлежащих Mg-ППМЭ (~422 нм) и ПП (~413 нм) допускает предположение с одной стороны — о миграции энергии возбуждения от первого из указанных порфиринов ко второму и, с другой стороны — о миграции энергии от каждого из них к ПХд. Однако вопрос об энергетическом взаимодействии между пигментами, образующимися в присутствии экзогенной АЛК, составляет предмет самостоятельного изучения.

При инкубации листьев с $2 \cdot 10^{-3}$ М АЛК мы не наблюдали накопления четко регистрируемых количеств ПП. Присутствие же Mg-ППМЭ обнаруживалось от случая к случаю при измерении флуоресценции непосредственно после инкубации с АЛК (на протяжении 12 и более часов). Если листья, инкубированные с $2 \cdot 10^{-3}$ М АЛК в течение 12—16 ч, поместить в воду (без АЛК) и выдержать в темноте несколько часов, то в них весь накопившийся Mg-ППМЭ практически исчезает, по всей

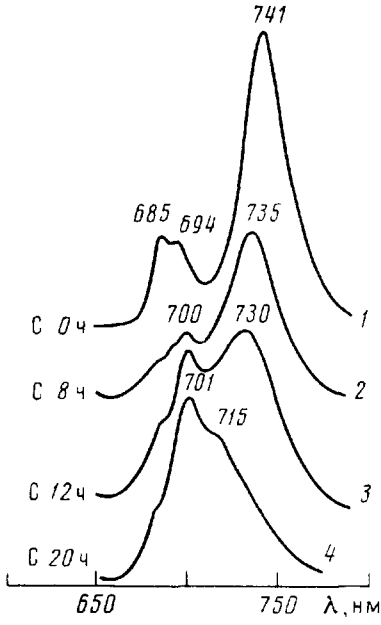


Рис. 4

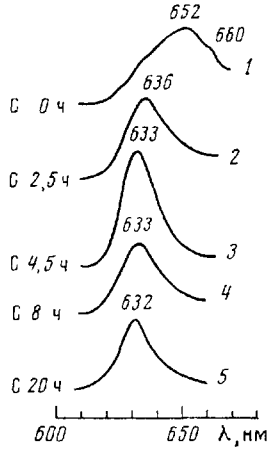


Рис. 5

Рис. 4. Изменение системы хлорофилла под действием света в листьях, инкубированных 16 ч с 10^{-2} М АЛК. Спектры флуоресценции при —196° (возбуждение 440 нм): *1* — исходный лист; *2—4* — листья по мере освещения в течение 8—20 ч. Время освещения указано слева

Рис. 5. Изменение под действием света АЛК-ПХд в интактных листьях пшеницы, инкубированных с 10^{-2} М АЛК 16 ч. Спектры флуоресценции при —196° (возбуждение 440 нм): *1* — исходный лист; *2—5* — листья по мере освещения в течение 2,5—20 ч. Слева от спектров указано время освещения. При регистрации спектров 3—5 усиление увеличено в 3,3 раза по сравнению со спектрами 1 и 2

вероятности, путем превращения в ПХд. По нашим данным, листья после инкубации с $2 \cdot 10^{-3}$ М АЛК и последующего выдерживания в темноте (без АЛК) кроме АЛК-ПХд (основная форма ~640 нм) не содержали заметных количеств порфиринов-предшественников ПХд; на свету их новообразования также не наблюдалось. Такие листья и использовались в наших опытах для доказательства фотодинамического действия АЛК-ПХд (см. ниже).

Изменения пигментной системы листьев при освещении. При выставлении на свет растений, инкубированных с АЛК и содержащих накопленные в темноте пигменты, развивается фотодинамический процесс, приводящий к постепенному завяданию и в конце концов — к летальному исходу.

Спектральными признаками происходящего при фотодинамическом процессе завядания, которые проявляются в области низкотемпературной люминесценции хлорофилла, являются появление и рост максимума 700—703 нм, а также постепенное падение интенсивности длинноволновой (около 740 нм) полосы вместе с ее коротковолновым смещением, до 720—715 нм — в конечном итоге. На рис. 4 приведены спектры низкотемпературной люминесценции листьев в области хлорофилла на разных стадиях фотодинамического процесса. В конце фотодинамического процесса — при полном завядании — люминесценция около 700 нм становится доминирующей.

Путем экстракции пигментов, проводившейся в ходе световой экспозиции, было показано, что содержание хлорофилла *a* по мере развития фотодинамического процесса падает лишь незначительно, не более, чем на 10—15% по сравнению с исходным уровнем — при полном завядании. Отсюда следует, что отмеченные изменения люминесценции не свя-

заны с уменьшением количества хлорофилла. Их вероятной причиной является нарушение энергетического взаимодействия между основными формами пигмента в составе 1 и 2 фотосистем, которое в свою очередь может быть следствием дезорганизации белково-липидных компонентов фотосинтетических мембран, происходящей при фотодинамическом процессе [9].

Следует отметить, что спектральные проявления фотодинамического процесса в зеленых листьях не специфичны для фотодеструкции, и изменения люминесценции хлорофилла, сходные с вышеописанными, могут быть вызваны любым «несветовым» воздействием, приводящим к завяданию (например, механической травмой, длительным затемнением, обезвоживанием и др.).

Если этиолированные листья пшеницы после инкубации с 10^{-2} М АЛК и накопления большого количества АЛК-ПХд экспонировать на свету (с интенсивностью $\sim$1000 Лк) в течение 20 ч и дольше, то происходящий в них процесс зеленения не приводит, как было показано, к формированию характерной для взрослого зеленого листа структуры низкотемпературной люминесценции хлорофилла (с максимумами $\sim$685, $\sim$695 и 740 нм), а ограничивается появлением в спектральной области хлорофилла одиночной полосы при 680 нм. Это означает, что формирование 1 и 2 фотосистем при зеленении блокируется, когда параллельно с этим процессом развивается фотодинамический процесс.

Наблюдение характерных спектральных признаков завядания, на наш взгляд, может быть практическим критерием в диагностике физиологического состояния растений.

Наиболее простым способом оценки эффективности фотодинамического процесса является наблюдение за изменением веса листьев в процессе освещения. Пользуясь этим способом, мы сопоставили эффективности фотодинамических процессов двух групп листьев. Одну из них составляли листья, инкубированные с $2 \cdot 10^{-3}$ М АЛК 13 ч и затем, перед световой экспозицией, выдержанные в темноте без АЛК 3 ч. Такие листья как перед началом освещения, так и на всем протяжении световой экспозиции содержали только ПХд при практически полном отсутствии порфиринов — продуктов более раннего метаболизма АЛК. Другую группу составляли листья, инкубированные с 10^{-2} М АЛК 16 ч. Листья этой группы кроме ПХд на всем протяжении световой экспозиции (до 20 ч) содержали четко регистрируемые количества ПП и металлопорфиринов (см. ниже). Оказалось, что изменения весов при фотодинамических процессах в листьях обеих групп соизмеримы. Как правило, к концу фотодинамического процесса вес растений составлял в том и другом случаях 60—65% по сравнению с исходным, что характерно для полного, необратимого завядания. Развитие спектральных признаков завядания по мере освещения в обоих случаях, как показали многочисленные измерения, также протекало в достаточной мере синхронно.

Полученные результаты привели к выводу о том, что АЛК-ПХд независимо от присутствия каких бы то ни было порфиринов, способен активно сенсибилизировать фотодинамический процесс, приводящий растения к летальному исходу.

Рассмотрим, что происходит на свету с АЛК-ПХд.

При выставлении на свет листьев, накопивших после инкубации с АЛК протохлорофиллид, его люминесценция (исходный максимум 650—655 нм) претерпевает коротковолновое смещение, продолжающееся до тех пор, пока полоса 632—633 нм не станет доминирующей в спектре (рис. 5), что происходит обычно через 4—6 ч действия света. Ранее в работах [7, 8] наблюдался сдвиг максимума люминесценции АЛК-ПХд в этиолированных листьях при освещении от 640—643 нм до 632 нм. Люминесценция ПХд с максимумом 632—633 нм в зеленых листьях пшеницы сохраняется на всем протяжении световой экспозиции (рис. 5, спектр *5*), что может свидетельствовать о фотоустойчивости коротковолновой формы пигмента.

Опыты по экстракции пигментов, проводившиеся по мере освещения, параллельно с измерением люминесценции листьев, показали, что только небольшая часть АЛК-ПХд (в составе формы с люминесценцией 650—655 нм), обычно не превышающая 10—15% его исходного содержания, превращается (через 1—2 ч действия света) в хлорофилл. Основная же часть пигмента (более 50%), приходящаяся главным образом на долю форм с люминесценцией в области 640—660 нм, разрушается в результате фотовыцветания. Эти результаты соответствуют нашим предыдущим данным [13] по наблюдению у агрегированного ПХд (с люминесценцией 655—660 нм) в водных коллоидных растворах более высокой скорости фотоокисления, чем у коротковолновых (с люминесценцией ~635 нм) форм пигмента. Кроме фотодеструкции, вероятная при фотодинамическом процессе фотодезагрегация также может быть ответственной за наблюдаемую фотолабильность длинноволновых форм АЛК-ПХд.

В состав АЛК-ПХд633 входит пигмент в МВ модификации, как показало измерение спектров возбуждения низкотемпературной флуоресценции (максимум 625 нм) пигмента в эфире [15, 23]. МВ-ПХд доминирует в фонде пигмента на свету, как и при темновом накоплении.

Вместе с ПХд в фотосенсибилизации деструктивных процессов в листьях после инкубации с 10^{-2} М АЛК принимают участие накапливающиеся в данных условиях порфирины — продукты более раннего метаболизма АЛК. Присутствие порфиринов в листьях, инкубированных с 10^{-2} М АЛК, обнаруживалось в том или ином количестве вместе с ПХд по низкотемпературной флуоресценции на протяжении всего периода (более 20 ч) освещения. В начале световой экспозиции (в течение 2—4 ч) в фонде порфиринов обычно доминировали ДВ-Mg-ППМЭ и ДВ-ПП, а в конце периода освещения (через 16—20 и более часов) — новообразованный металло-порфирин (см. ниже).

При освещении листьев инкубированных с 10^{-2} М АЛК, общее содержание порфиринов по отношению к ПХд, как правило, увеличивалось, что было прослежено по спектрам возбуждения флуоресценции при 632 нм (см. рис. 6). Следует заметить, что в силу большой вариабельности биологического материала, опыты по наблюдению спектральных изменений в процессе световой экспозиции проводились в многократной повторности, и представленные на приведенном рисунке спектры отражают общую тенденцию.

В начальный (2—4 ч) период световой экспозиции в спектрах возбуждения флуоресценции при 632 нм можно было наблюдать увеличение относительной интенсивности полос 412—413 нм и ~422 нм, принадлежащих ПП и Mg-ППМЭ, а также появление нового компонента 417—418 нм, которому соответствует максимум флуоресценции при 585—587 нм. Указанный максимум обнаруживался в порфириновой области спектров люминесценции листьев, инкубированных с 10^{-2} М АЛК, сначала (через 1—3 ч освещения) в виде плеча у полосы ~591 нм, затем (через 4—8 ч) становился доминирующим и сохранялся после длительной (до 20 ч и более) световой экспозиции (рис. 7), с наступлением полного завядания растений. Новый порфирин по положению максимумов люминесценции и возбуждения соответствует диметиловому эфиру Zn-протопорфирина IX(Zn-ППДЭ) [19, 24].

Для Zn-ППДЭ, как и для Mg-ППМЭ, характерно мономерное (свободное) состояние внутри хлоропластов, т. е. состояние без образования связей с белково-липидными компонентами мембранных структур. Об этом свидетельствует наблюдаемое нами совпадение спектральных свойств пигмента в листьях и эфирных растворах.

Заметное новообразование Zn-ППДЭ на свету, по-видимому, связано с повышением общего уровня метаболизма в условиях освещения. Вопрос о действии света на биогенез и метаболизм Zn-ППДЭ, как и других металло-порфиринов, требует специального исследования.

Итак, в листьях пшеницы, инкубированных с АЛК высокой концентрации (10^{-2} М), в последующем развитии фотодеструкции, вызываю-

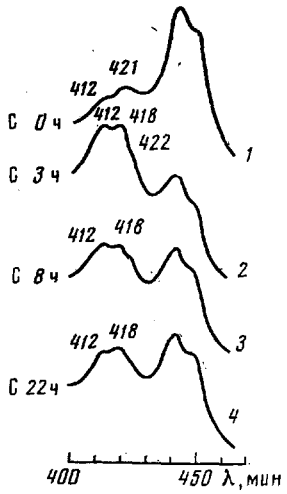


Рис. 6

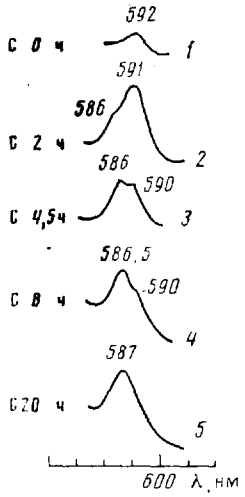


Рис. 7

Рис. 6. Изменение под действием света спектров возбуждения флуоресценции интактных листьев, инкубированных 16 ч с 10^{-2} М АЛК (λ регистрации 632 нм): *1* — исходный лист; *2—4* — листья по мере освещения. Время освещения указано слева

Рис. 7. Обнаружение Zn-ППДЭ при освещении в интактных листьях, инкубированных с 10^{-2} М АЛК 16 ч. Спектры флуоресценции при —196° (возбуждение 420 нм): *1* — исходный лист; *2—5* — листья по мере освещения в течение 2—20 ч. Время освещения указано слева. При регистрации спектров 4 и 5 усиление увеличено в 3,3 раза по сравнению со спектрами 1—3

щей завядание, МВ-ПХд как фотосенсибилизатор фотодинамического процесса разделяет функциональную нагрузку с рядом порфиринов — более ранних метаболитов АЛК — ПП, Mg-ППМЭ и Zn-ППДЭ, которые синтезируются в виде ДВ производных. В будущем предстоит решить вопрос о связи эффективности фотодинамического процесса с химической структурой бокового заместителя у 4-го атома углерода во 2-м пиррольном кольце молекулы пигмента-сенсибилизатора.

Не исключено, что между порфиринами-предшественниками и ПХд имеет место энергетическое взаимодействие; наши данные по измерению спектров возбуждения люминесценции листьев при 630—633 нм допускают вероятность миграции энергии от металло-порфиринов к АЛК-ПХд. Однако этот вопрос требует специального исследования.

В листьях, инкубированных с АЛК более низкой концентрации ($2 \cdot 10^{-3}$ М), когда накопление порфиринов, предшествующих образованию протохлорофиллида, пренебрежимо мало, МВ-ПХд является основным сенсибилизатором деструктивных процессов, вызывающих завядание.

Интересен факт, что качественный состав фотосенсибилизаторов существенным образом не сказывается на течении фотодинамических процессов в зеленых листьях. Однозначно объяснить это явление не представляется возможным. Пытаясь анализировать кинетику фотодеструкции, надо иметь в виду, что на ней может сказываться в числе других факторов и работа молекулярных механизмов защиты от фотоокисления (см. ниже).

Наиболее активная роль в фотосенсибилизации деструктивных процессов принадлежит ПХд с флуоресценцией 632—633 нм. Раннее исчезновение на свету длинноволновых форм АЛК-ПХд, которое происходит еще до развития отчетливых спектральных признаков завядания, а также то, что АЛК-ПХд633 присутствует в листьях на всех стадиях фотодеструкции, вплоть до полного высыхания и гибели растений, позволяет

отвести именно коротковолновой форме пигмента активную роль в сенсибилизации деструктивных процессов. Постоянное присутствие ПХд633 в листьях при освещении, возможно, связано не только с фотостойкостью этой формы, но и с непрерывным пополнением ее фонда за счет фотодезагрегации более длинноволновых форм (формы), образующихся *de novo* в процессе «светового» метаболизма имеющихся в листьях резервных количеств АЛК.

В составе АЛК-ПХд633 пигмент, скорее всего, не агрегирован, хотя, возможно, и связан с мембранным белком. В составе форм с более длинноволновой люминесценцией (640—645 и 650—665 нм) ПХд находится в агрегированном состоянии, которому, по-видимому, способствует взаимодействие с белковыми компонентами мембран хлоропластов. Наличие энергетического взаимодействия между пигментными формами объединяет АЛК-ПХд не только с естественно существующей системой форм предшественника хлорофилла (хлорофиллида) в растениях [25], но и вообще с пигментными системами фотосинтетического аппарата.

При освещении АЛК-ПХд в составе длинноволновых форм частично превращается в хлорофилл (хлорофиллид). Основная часть агрегированного ПХд разрушается под действием света. При этом не исключено, что продукты фотораспада включаются в происходящий фотодинамический процесс как сенсибилизаторы. Некоторая, небольшая, часть агрегированного пигмента (преимущественно в составе ПХд640), которая не всегда отчетливо регистрируется в условиях наших измерений, сохраняется на протяжении длительной световой экспозиции, что может быть связано с ее постоянным новообразованием.

Основу молекулярного механизма сенсибилизирующего действия АЛК-ПХд в деструктивных процессах, происходящих под действием света, составляет, по-видимому, генерация синглетного молекулярного кислорода ($^1O_2$). Экспериментальным подтверждением данного предположения служит обнаружение генерации $^1O_2$ мономерными формами предшественников хлорофилла, таких, как ПП, Mg-ППМЭ, протохлорофиллид и протохлорофилл [26—28]. В работе [28] на примере первых трех пигментов показана почти полная потеря способности генерировать $^1O_2$ при агрегации. В свете приведенных данных возникает мысль о возможном участии агрегированных форм ПХд в работе молекулярных механизмов защиты от фотогербицидного действия АЛК, связанной со снижением уровня $^1O_2$ в клетке путем его тушения [27].

Основные генераторы синглетного кислорода — АЛК-ПХд и его предшественники — в фотосинтетических мембранах, по-видимому, пространственно отделены от системы агрегированных форм хлорофилла, что препятствует проявлению действия последних как тушителей $^1O_2$ и тем самым их защитной роли в окислительной фотодеструкции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Granick S.*//Plant Physiol. 1959. V. 34. P. XYIII.
2. *Granick S.*//J. Biol. Chem. 1961. V. 236 P. 1168—1172.
3. *Klein S., Bogorad L.*//J. Cell. Biol. 1964. V. 22. P. 443—450.
4. *Sundqvist C.*//Physiol. Plant. 1969. V. 22. P. 147—156.
5. *Sundqvist C.*//Plant Physiol. 1970. V. 23. P. 412—424.
6. *Красновский А. А., Быстрова М. И., Ланг Ф.*//Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. С. 1485—1488.
7. *Gassman M. L.*//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. P. 693—702.
8. *Sundqvist C., Klockare B.*//Photosynthetica. 1975. V. 9. P. 62—71.
9. *Rebeitz C. A., Montazer-Zouhoor A., Hopen H. J., Wu S.*//Enzyme Microb. Technol. 1984. V. 6. P. 389—401.
10. *Rebeitz C. A., Abou-Haidar M., Yaghi M., Castelfranco P. A.*//Plant Physiol. 1970. V. 46. P. 543—546.
11. *Фрадкин Л. И., Калинина Л. М., Сай П. К.*//Весці АН БССР. 1978. № 1. С. 36—41.
12. *Henningsen K. W., Kahn A., Houssier C.*//FEBS Letters. 1973. V. 37. P. 103—108.
13. *Быстрова М. И., Сафронова И. А., Красновский А. А.*//Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 915—925.
14. *Carey E. E., Rebeitz C. A.*//Plant Physiol. 1985. V. 79. P. 1—16.
15. *Tripathy B. C., Rebeitz C. A.*//Analytical Biochemistry. 1985. V. 149, P. 43—61.

16. *Granick S.*//J. Biol. Chem. 1948. V. 175. P. 333—342.
17. *Аверина Н. Г., Шалыго Н. В., Фрадкин Л. И.*//Весці АН БССР. 1980. № 6. С. 25—29.
18. *Shlyk A. A., Averina N. G., Shalygo N. V.*//Photobiochem. Photobiophys. 1982. V. 3. P. 197—223.
19. *Belanger F. C., Rebeitz C. A.*//J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 1360—1371.
20. *Granick S.*//J. Biol. Chem. 1950. V. 183. P. 713—730.
21. *Ryberg M., Sundqvist C.*//Physiol. Plant. 1976. V. 36. P. 356—361.
22. *Ellsworth R. K., Hervish P. V.*//Photosynthetica. 1975. V. 9. P. 125—139.
23. *Rebeitz C. A., Wu S. M., Kuhadja M., Daniell H., Perkins E. J.*//Mol. Cell. Biochem. 1983. V. 57. P. 97—125.
24. *Baum S. J., Ellsworth R. K.*//J. Chromatogr. 1970. V. 47. P. 503—505.
25. *Kahn A., Boardman N. K., Thorne S. W.*//J. Mol. Biol. 1970. V. 48. P. 85—101.
26. *Красновский А. А., мл.*//Биофизика. 1976. Т. 21. С. 748—749.
27. *Красновский А. А., мл.*//Биофизика. 1977. Т. 22. С. 927—928.
28. *Егоров С. Ю., Красновский А. А., мл., Сафронова И. А., Быстрова М. И., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1988. Т. 299. С. 1266—1270.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
6.X.1987

THE STATE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PHOTOCHLOROPHYLLIDE FORMED FROM EXOGENOUS 5-AMINOLEVULINIC ACID IN GREEN LEAVES

BYSTROVA M. I., NAZAROVA I. G., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The conditions of protochlorophyllide (Pchld) accumulation in wheat green leaves in the presence of 5-aminolevulinic acid (ALA) were studied. ALA was introduced directly into the cut stems. In the course of Pchld accumulation, a successive self-assembly of the three main pigment forms with the low temperature fluorescence maxima *in situ* at 633± ±1 nm, 640±2 nm and 652±1 nm was observed. The generation of Pchld forms with luminescence at 640—652 nm is due to pigment aggregation. Pchld 633 nm is not aggregated, though, but seems to be bound to the protein and to transmit the excitation energy to the both long wavelength pigment forms. Monovinyl-Pchld was found to be the major modified forms of the pigment at all stages of its dark accumulation. Pchld accumulation under optimal conditions is accompanied by the accumulation of the «monomeric» forms of porphyrins, the earlier precursors of Chl *a*. In the pool of these porphyrins, the prevalent ones are protoporphyrin IX (PP) and monomethyl ester Mg-PP (Mg-PPME), which are classified as divinyl (DV) porphyrins. After illumination of wheat leaves preincubated with ALA, a newly formed Zn-derivative of the PP diester (Zn-PPDE) was found. In the light, after incubation of green leaves with ALA a photodynamic process develops, which is manifested in characteristic changes in the Chl low temperature luminescence accompanied by a decrease in the plant weight. The data obtained suggest that Pchld 633 nm is the sensitizer of the photodynamic process, both when it exists in the cell in combination with porphyrins and individually. Upon illumination, the bulk of Pchld localized in the long wavelength forms undergoes fast destruction; a small part of the pigment (predominantly localized in Pchld 652) is transformed into chlorophyll (chlorophyllide).

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

С.Ю. ЕГОРОВ, А.А. КРАСНОВСКИЙ мл., И.А. САФРОНОВА,
М.И. БЫСТРОВА, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТОГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА ПИГМЕНТАМИ–ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ ХЛОРОФИЛЛА

Известно, что стимуляторы биосинтеза хлорофилла – δ-аминолевулиновая кислота и α,α'-дипиридил – резко снижают фотоустойчивость фотосинтетического аппарата [1, 2]. Предложено использовать это явление в качестве основы для создания нового класса эффективных фотодинамических гербицидов [2]. В связи с этим чрезвычайную актуальность приобрел вопрос о молекулярных механизмах фотодеструкции в растениях, обработанных стимуляторами биосинтеза хлорофилла. Предполагают, что в основе фотодеструктивных процессов лежит фотосенсибилизированное предшественниками хлорофилла образование синглетного молекулярного кислорода ($^1O_2$), обладающего высокой окислительной активностью [2]. Ранее методом измерения фотосенсибилизированной люминесценции кислорода было установлено, что мономерные молекулы некоторых из таких предшественников – протохлорофилла и протопорфирина IX – действительно эффективно генерируют $^1O_2$ при освещении в насыщенных воздухом растворах в CCl_4 [3–5].

В настоящей работе исследована генерация $^1O_2$ мономерными и агрегированными молекулами четырех порфириновых предшественников хлорофилла – протохлорофиллида, протохлорофилла, протопорфирина IX и его магниевого комплекса – в разных модельных системах, в том числе в водных растворах, моделирующих некоторые особенности состояния этих пигментов в живых клетках.

В качестве метода обнаружения $^1O_2$ использовано измерение его люминесценции с максимумом 1270 нм. Измерения производились на установке, описанной в работе [6], позволяющей регистрировать спектры и кинетику затухания люминесценции кислорода. Возбуждение осуществлялось импульсами азотного лазера ЛГИ-21 (10 нс, 337 нм, 0,04 мДж). Люминесценцию начинали регистрировать через 10 мкс после лазерной вспышки. Относительные значения квантовых выходов люминесценции определяли путем сравнения ее интенсивности у растворов, имеющих одинаковую оптическую плотность в области возбуждения (0,1 – 0,3 в слое толщиной 10 мм). Полученные значения использовали для определения относительных квантовых выходов генерации $^1O_2$ пигментами ($\Phi\Delta$). Стандартом для определе-

Таблица 1

Квантовые выходы фотосенсибилизированной генерации $^1O_2$ (± 10%)

Пигмент	Эфир		D_2O + тритон X-100		$D_2O + NH_4OH$	
	отн. ед.	абс. знач.%	отн. ед.	абс. знач., %	отн. ед.	абс. знач.,%
ТФП (ТСФП)	1	70	–	–	1	70
ПХд	1,1	77	1,2	84	⩽0,03	⩽2
ПХл	1,2	84	1,2	84	⩽0,03	⩽2
ПП (ПП-ДМЕ) *	1,1	77	0,8	56	⩽0,03	⩽2
Mg-ПП-ДМЕ	1,1	77	0,8	56	⩽0,03	⩽2

* ПП-ДМЕ использовали только для опытов в эфире, так как натриевая соль протопорфирина IX в эфире не растворима.

Таблица 2

Положения основных максимумов в спектрах поглощения растворов пигментов (нм ±1)

Пигмент	Эфир	D_2O + тритон X-100	$D_2O + NH_4OH$
ПХд	432, 623	442, 635	480, 655
ПХл	432, 623	440, 628	475, 650
ПП (ПП-ДМЕ)	403, 502, 536 574, 630	407, 505, 540, 576, 632	420–430, 550, 590, 645
Mg-ПП-ДМЕ	417, 551, 589	421, 555, 593	420–430, 562, 603

ния абсолютных значений ФД служил тетрафенилпорфин (ТФП) и его водорастворимый аналог – тетра-(*п*-сульфофенил)-порфин (ТСФП), синтезированные и очищенные в Институте биофизики Минздрава СССР. В растворах этих пигментов, судя по данным фотохимических экспериментов [7–9], ФД не зависит от природы растворителей и составляет 70 ± 5%.

Протохлорофиллид (ПХд) выделяли из этиолированных листьев пшеницы (сорт Юбилейная), протохлорофилл (ПХл) – из внутренних оболочек семян тыквы (сорт Столовая) по методикам [10, 11, 13]. Исследованные пигменты представляли собой моновинильные производные. Использованы также динатриевая соль протопорфирина IX (ПП) производства фирмы "Серва" (ФРГ), диметиловые эфиры протопорфирина IX (ПП-ДМЕ) и его магниевого производного (Mg-ПП-ДМЕ), синтезированные и очищенные в Московском институте тонкой химической технологии.

Объектами исследования служили растворы пигментов ($10^{-5}M$) в диэтиловом эфире, водные мицеллярные растворы, содержащие 1% детергента тритона X-100 (фирма "Мерк", ФРГ), и водные коллоидные растворы, содержащие вместо детергента 0,5% гидроокиси аммония, присутствие которой, как показано в [11], усиливает ассоциацию молекул ПХд и ПХл. Водные коллоидные растворы готовили путем приливания воды к спиртовому раствору пигмента до концентрации этанола 5%. Вместо H_2O в опытах использовали тяжелую воду (D_2O), в которой время жизни $^1O_2$ существенно выше [6] и поэтому выше интенсивность кислородной люминесценции и точность люминесцентных измерений.

Во всех исследованных системах мы наблюдали фотосенсибилизированное излучение $^1O_2$ с максимумом 1270 нм и временем жизни 34 мкс в диэтиловом эфире и около 50 мкс в водном растворе, содержащем 1% тритона $X = 100$ (рис. 1). Полученные на основе измерения люминесценции значения ФД приведены в табл. 1.

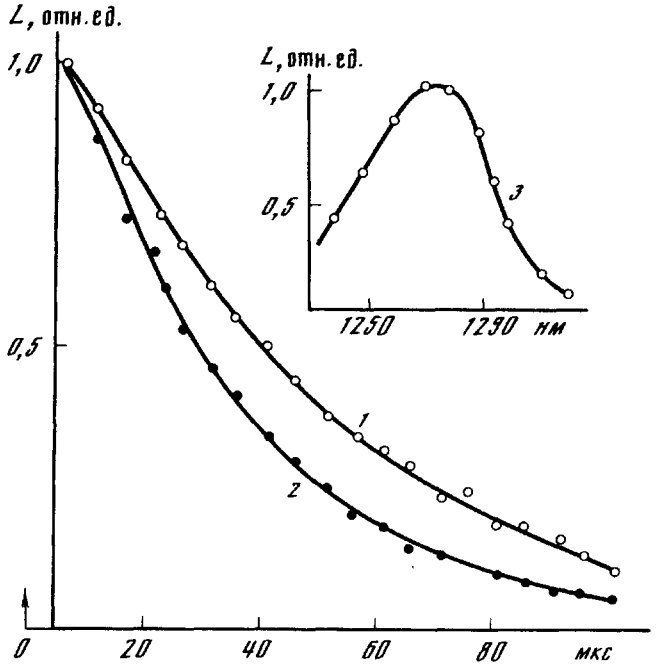


Рис. 1. Кинетика затухания (*1*, *2*) и спектр люминесценции (*3*) синглетного молекулярного кислорода в D_2O в присутствии 1% тритона X-100 (*1*, *3*) и в диэтиловом эфире (*2*); сенсибилизатор ПХд (10^{-5} *M*). Кинетические кривые усреднены из расчета на 400 тыс. лазерных импульсов.

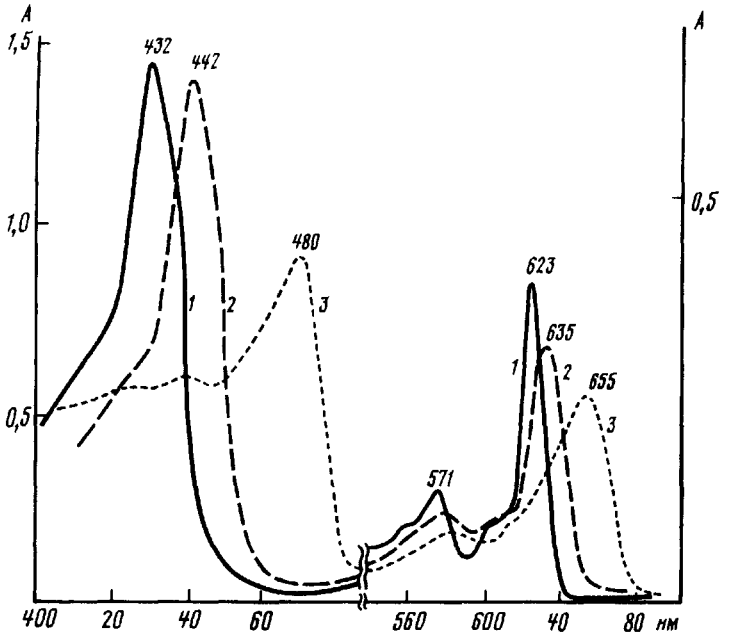


Рис. 2. Спектры поглощения растворов протохлорофиллида, 20° С. Здесь и на рис. 3 и 4: *1* – диэтиловый эфир; *2* – 1% водный мицеллярный раствор тритона X-100; *3* – водно-этаноловый коллоидный раствор

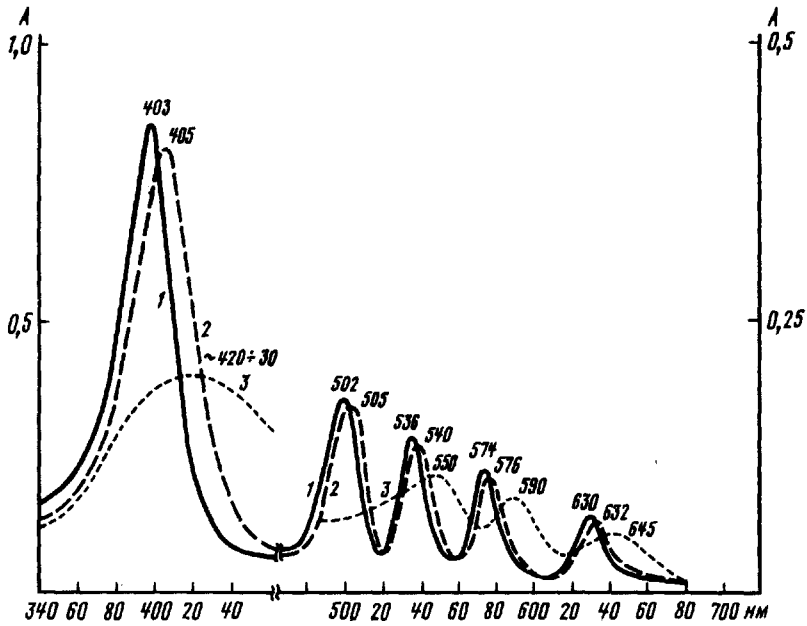


Рис. 3. Спектры поглощения раствора ПП (ПП-ДМЕ), 20 °С

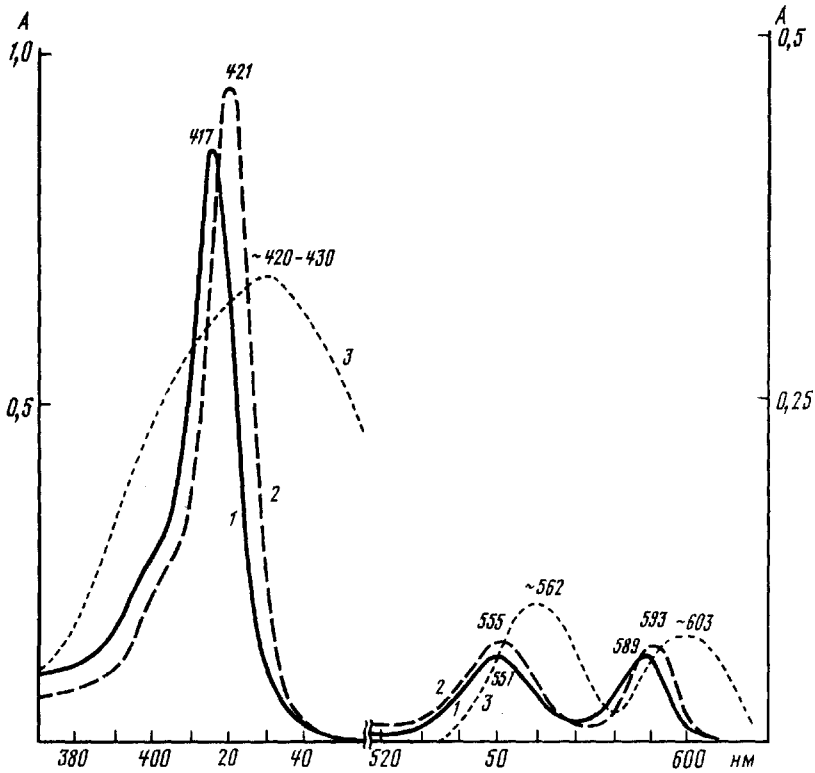


Рис. 4. Спектры поглощения растворов Mg-ПП-ДМЕ, 20 °С

Из таблицы видно, что в диэтиловом эфире все исследованные пигменты обладают близкой фотосенсибилизирующей активностью, практически совпадающей с описанной ранее [3–5] активностью ПХл ПП-ДМЕ в CCl_4. При этом значения ФД близки к значениям квантовых выходов образования триплетных состояний у молекул исследованных порфиринов [12]. Судя по данным работ [13–14] и характеру спектров поглощения (рис. 2–4), в диэтиловом эфире молекулы пигментов находятся в мономерном состоянии. Следовательно мономерные молекулы исследованных пигментов – эффективные генераторы $^1O_2$, активность которых определяется переносом энергии на O_2 от триплетных молекул сенсибилизаторов.

В мицеллярных водных растворах спектры поглощения ПП и Mg-ПП-ДМЕ близки к характерным для эфирных растворов; отличие состоит лишь в смещении основных полос на 2–8 нм в длинноволновую сторону (см. табл. 2).

Это позволяет полагать, что в мицеллярных растворах пигменты представлены также преимущественно мономерными молекулами, сорбированными, вероятно, на мицеллах детергента. Измерения ФД согласуются с этими представлениями. Из табл. 1 видно, что у ПХл и ПХд в мицеллярных растворах и в эфире значения ФД совпадают. У протопорфирина IX и его магниевого комплекса в мицеллярных растворах ФД несколько меньше, чем в эфире, что можно рассматривать как следствие неполной солюбилизации этих порфиринов в присутствии детергента.

Уширение и длинноволновое смещение основных полос в спектрах водных коллоидных растворов пигментов (рис. 2–4) указывает на образование пигментных агрегатов, по спектральным свойствам близких к основной фотоактивной форме предшественника хлорофилла в растениях. Измерения показали, что фотосенсибилизирующая активность агрегатов всех исследованных пигментов примерно на два порядка меньше, чем у мономерных пигментных молекул (табл. 1).

Таким образом, в исследованных модельных системах эффективными генераторами $^1O_2$ служили только мономерные молекулы пигментов, активность которых не зависела от природы среды и контакта с водной фазой, тогда как агрегаты оказались практически неактивными. Это позволяет полагать, что фотосенсибилизированная порфириновыми предшественниками генерация $^1O_2$ может быть основной причиной фотогербицидного действия стимуляторов биосинтеза хлорофилла.

Авторы выражают благодарность А.Ф. Миронову, А.Н. Нижнику и Г.В. Пономареву за предоставление синтетических порфиринов.

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова
Институт биохимии им. А.Н. Баха
Академии наук СССР, Москва

Поступило
2 X 1987

ЛИТЕРАТУРА

1. *Граник С.* В сб.: Механизм фотосинтеза. Тр. V Международн. биохим. конгр., М.: Изд-во АН СССР, 1962, с. 184–195. 2. *Rebeiz C.A., Montaizer-Zouhoor A., Hopen H.J., Wu S.M.* – Enzyme Microb. Technol., 1984, vol. 6, № 8, p. 390–401. 3. *Красновский А.А. мл.* – Биофизика, 1977, т. 22, № 5, с. 927–928. 4. *Красновский А.А. мл.* – Изв. АН СССР. Сер. физич., 1978, т. 42, № 2, с. 343–348. 5. *Krasnovsky A.A. jr.* – Photochem. Photobiol., 1979, vol. 29, № 1, p. 29–36. 6. *Егоров С.Ю., Красновский А.А. мл.* – Биофизика, 1983, т. 28, № 3, с. 497–498. 7. *Венедиктов Е.А., Красновский А.А. мл.* – ЖПС, 1982, т. 36, № 1, с. 152–154. 8. *Verlhac J.B., Gaudemer A., Kraljik J.* – Nouv. J. Chim., 1984, vol. 8, № 6, p. 401–406. 9. *Lambert C.R., Reddi E., Spikes J.D. et al.* – Photochem. Photobiol., 1986, vol. 44, № 5, p. 595–601. 10. *Быстрова М.И., Сафронова И.А., Красновский А.А.* – Мол. биол., 1982, т. 16, № 2, с. 291–301. 11. *Быстрова М.И., Сафронова И.А., Красновский А.А.* – Там же, 1985, т. 19, № 4, с. 915–925. 12. *Джагаров Б.М., Гуринович Г.П.* В сб.: Возбужденные молекулы. Кинетика превращений. Л.: Наука, 1982, с. 59–74. 13. *Houssier C., Sauer K.* – Biochim. et biophys. acta, 1969, vol. 172, № 3, p. 476–491. 14. *Honomoto C.M., Castelfranco P.A.* – Plant Physiol., 1983, vol. 73, № 1, p. 79–81.

Могли ли ПОЛУПРОВОДНИКИ участвовать в эволюции?

Академик **А. А. Красновский**
В. В. Никандров,
кандидат биологических наук
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР
Москва

Мы пока не знаем, как возникла жизнь и первичные организмы, способные к самовоспроизведению. Однако, вероятно, что в процессе химической эволюции и последующей биологической имели место различные варианты энергообеспечения и саморепликации. Велика вероятность того, что в этих процессах участвовали компоненты земной коры. Дж. Бернал высказал мысль о возможном участии глинистых минералов в предбиологическом синтезе и репликации макромолекул. Подобные взгляды были затем развиты А. Кейрнс-Смитом[1]. В лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР при исследовании фотохимических свойств неорганических полупроводников получены результаты, позволяющие обосновать участие неорганических компонентов земной коры в преобразовании солнечной энергии в течении химической эволюции и на ранних стадиях биологической эволюции.

Показано, что обладающие свойствами полупроводников окислы титана (TiO_2), цинка (ZnO) и вольфрама (WO_3) под действием ближнего ультрафиолета (300—400 нм) способны к окислению воды, ведущему к образованию молекулярного кислорода и восстановлению акцепторов электрона — соединений окисного железа или бензохинона[2]. Поглощение 100 квантов света частицами полупроводников приводило к образованию одной молекулы кислорода. Стехиометрические соотношения количеств восстановленного акцептора электрона, кислорода и ионов водорода, образующихся в реакции, указывали на то, что кислород выделялся из молекул воды. Впоследствии это положение было доказано в опытах с использованием меченной по кислороду воды (H_2O^{18}).

Было установлено также, что окислы титана и цинка способны при освещении восстанавливать метилвиологен — соединение, имеющее окислительно-восстановительный потенциал, близкий потенциалу водородного электрода, а при наличии в водных суспензиях полупроводников органических доноров электронов (аминов, углеводов, спиртов и др.) — образовывать молекулярный водород[3].

Способность окислов титана и цинка образовывать на свету кислород и водород объясняется тем, что эти полупроводники могут одновременно играть две роли: сенсибилизатора, поглощающего свет и переносящего электрон, и катализатора, на поверхности которого происходит стабилизация первичных активных фотопродуктов с последующим образованием устойчивых соединений. Фотокаталитические свойства неорганических полупроводников могут быть усилены введением катализаторов. Такими катализаторами могут служить как неорганические соединения — платина, окись рутения или марганца, так и биологические макромолекулы — ферменты. Так, введение бактериальной гидрогеназы, способной катализировать реакцию $2H^+ + 2e^- \rightleftarrows H_2$, в суспензию диоксида титана, содержащую органические доноры электронов, приводило к значительной активации выделения водо-

[1] Cairns-Smith A. G. Genetic Takcover and the Mineral Origins of Life. Cambridge. 1982.
[2] Красновский А. А., Брин Г. П. // Докл. АН СССР. 1962. Т. 147. С. 656—659; Krasnovsky A. A. // Origins of Life. 1974. Vol. 5. P. 397—404.
[3] Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 256. С. 1249—1253.

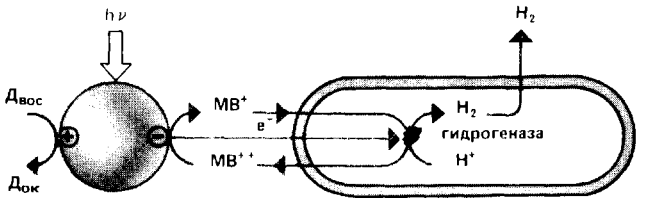


Схема фотообразования водорода при сопряжении неорганического полупроводника с клетками клостридий. Слева — частица полупроводника, справа — клетка клостридий. MB^{++} — метилвиологен, $Д_{вос}$ и $Д_{окис}$ — восстановленный и окисленный доноры электрона соответственно.

рода. В условиях, способствующих адсорбции фермента на поверхности полупроводника, каждый десятый поглощенный квант света вызывал образование одной молекулы водорода[4]. Важно, что сенсибилизированное полупроводниками образование водорода и восстановление акцепторов электрона сопровождалось преобразованием энергии света в потенциальную химическую энергию.

Недавно показана возможность преобразования энергии света при сопряжении полупроводников с бактериальными клетками[5]. При освещении водных суспензий оксидов титана, цинка или сульфида кадмия, содержащих бактерии Clostridium butyricum, доноры электрона и метилвиологен, наблюдалось образование водорода. Реакция протекала в результате совместного действия полупроводников и бактерий: под действием света полупроводники окисляли доноры электронов и восстанавливали метилвиологен, который, благодаря способности проникать сквозь липидные мембраны, переносил электроны от частиц полупроводников к внутриклеточной гидрогеназе, катализирующей образование молекулярного водорода. В ряде случаев в суспензиях диоксида титана наблюдалось эффективное фотообразование водорода в отсутствие переносчика электронов, т. е. при прямом переносе электронов от полупроводника к ферменту, находящемуся внутри бактерий.

Результаты, полученные на модельных системах, позволяют высказать предположение, каким образом неорганические полупроводники могли участвовать в химической и биологической эволюции.

Образование кислорода и окисленных элементов земной коры обычно связывают с возникновением фотосинтеза или фотолизом молекул воды под действием ультрафиолетового излучения Солнца. Учитывая способность неорганических полупроводников к фотоокислению воды, можно предположить, что некоторое количество кислорода могло образоваться при их участии еще до возникновения фотосинтеза.

Согласно гипотезе А. И. Опарина первичные клетки-пробионты и ранние организмы были гетеротрофами, использующими абиогенно образованное органическое вещество. Эта гипотеза допускает наличие в эволюции такого периода, когда истощение «запасов» органических соединений поставило живые существа на грань исчезновения и потребовало использования дополнительных, альтернативных источников энергии: солнечного излучения, восстановленных неорганических соединений и др. На этой «критической стадии развития жизни» (по Э. Брода), когда фотосинтезирующие организмы еще не появились, неорганические полупроводники, способные преобразовывать энергию света в химическую, могли поддержать примитивный метаболизм пробионтов и первичных микроорганизмов. Как показывают опыты по сопряжению двуокиси титана с бактериями, неорганические полупроводники могли обеспечить первичные микроорганизмы активными восстановителями (электронами), генерируемыми при освещении на поверхности полупроводника, и способными непосредственно проникать внутрь бактериальной клетки или с помощью переносчика электронов.

Среди метанобразующих бактерий имеются виды, использующие в качестве единственного источника углерода углекислый газ, а в качестве единственного источника энергии молекулярный водород. Эти бактерии, как известно, относятся к архебактериям, и их «предки», растущие на водороде, существовали, по-видимому, на ранних стадиях биологической эволюции. Поставщиками водорода для таких организмов могли быть неорганические полупроводники, осуществляющие на свету выделение водорода из воды и других соединений.

Эволюционным вариантом перехода от гетеротрофного способа существования к автотрофному могло быть появление организмов, содержащих неорганические фотокатализаторы. И хотя ни у одного из ныне существующих типов организмов неоргани-

[4] Никандров В. В., Шлык М. А., Зорин Н. А., Гоготов И. Н., Красновский А. А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. С. 990—994.

[5] Krasnovsky A. A., Nikandrov V. V. // FEBS Letters. 1987. Vol. 219. P. 93—96.

ческие полупроводники не включены в систему обмена веществ, нельзя исключить возможность такого варианта эволюции (учитывая экспериментальные данные о способности некоторых коллоидных неорганических полупроводников связываться с липидными мембранами). Вероятно, появление организмов, осуществляющих фотосинтез с помощью неорганических фотокатализаторов явилось тупиковой ветвью эволюции. Неорганические полупроводники не выдержали конкуренции с порфиринами, включение которых в метаболизм первичных гетеротрофных организмов привело к современному фотосинтезу.

Таким образом, экспериментальные данные по моделированию первичных процессов эволюции позволяют представить различные варианты включения неорганических полупроводников — компонентов земной коры в энергообеспечение химической и биологической эволюции. Действительно ли неорганические компоненты земной коры энергетически «поддерживали» эволюцию? Ответить на этот вопрос однозначно лишь на основании модельных экспериментов сейчас невозможно. Однако дополнительные доказательства можно, по-видимому, найти в природе. Интересно в этом отношении сообщение о том, что пески пустынь, содержащие диоксид титана, под действием солнечного света катализируют образование аммиака из атмосферного азота[6]. Вероятно, со временем появятся и другие свидетельства участия неорганических компонентов земной коры в преобразовании солнечной энергии на Земле.

[6] Schrauzer G. N. // Chem. Ehg. News. 1978. Vol. 56. P. 7.

УДК 577.344:541.145:579.852.13

В.В. НИКАНДРОВ, М.А. ШЛЫК, Н.А. ЗОРИН, И.Н. ГОГОТОВ,
академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

УСЛОВИЯ ЭФФЕКТИВНОГО ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ОТ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛУПРОВОДНИКА TiO_2 К ГИДРОГЕНАЗЕ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ THIOCAPSA ROSEOPERSICINA

Сопряжение неорганических полупроводников, способных при освещении генерировать электронодонорные и электроноакцепторные центры на границе раздела фаз, с ферментами, обеспечивающими протекание реакций с участием фотогенерированных зарядов, является одним из подходов к созданию фотокаталитических систем, преобразующих солнечную энергию.

В работах нашей лаборатории обнаружено фотообразование водорода в водных суспензиях TiO_2, ZnO, CdS, содержащих доноры электрона, бактериальную гидрогеназу и метилвиологен [1–4]. Была обнаружена также возможность сопряжения TiO_2 с клетками клостридий, содержащими гидрогеназу [5, 6]. В дальнейшем Гретцель с соавторами изучили фотообразование H_2 в подобных системах, когда бактериальные гидрогеназы иммобилизованы на частицах TiO_2 [7, 8]. Недавно описаны фотовосстановление НАД(Ф) и фотосинтез органических кислот и аминокислот в суспензиях полупроводников, содержащих ферменты [9]. В исследованных системах перенос электронов от полупроводника к ферменту осуществлялся с помощью переносчиков электрона – метилвиологена ($МВ^{2+}$), бипиридильных комплексов родия и др.

В суспензиях TiO_2 и ZnO фотообразование H_2 с низкой эффективностью наблюдалось нами и в отсутствие переносчика электрона [1, 3–6], что свидетельствовало о прямом переносе электронов от полупроводника к активному центру фермента. Возможность фотообразования H_2 в отсутствие переносчика электрона в суспензиях TiO_2, содержащих доноры электрона и бактериальные гидрогеназы, подтверждена другими исследователями [8]. Однако остается неясным, может ли быть обеспечено достаточно эффективное преобразование энергии света при безмедиаторном сопряжении полупроводника и фермента.

В данном сообщении описаны условия прямого фотоиндуцированного переноса электронов от частиц TiO_2 к гидрогеназе T. roseopersicina, при которых происходит фотообразование водорода с квантовой эффективностью до 10%.

В опытах использовали дисперсные порошки анатаза TiO_2 фирмы "Fluka" (8,5 $м^2/г$) и P25 TiO_2 фирмы "Degussa" (50 $м^2/г$). Суспензии полупроводников готовили в 0,05 *М* буферном растворе трис-(оксиэтил)-аминометана (трис), pH 7,2, а также в растворах сахарозы, дитиотреитола и 0,05 *М* фосфатного буфера, pH 7,2. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду. Хлориды кальция, бария, натрия, калия, цезия были марки "ос.ч." Гидрогеназу из фототрофных бактерий T. roseopersicina, штамм BBS, выделяли и очищали по методу [10] и добавляли в суспензии в концентрации 0,6 мг белка/мл. Ферментативная активность гидрогеназы при 20 °С составляла 2,4 мкл H_2/мин · мл в реакционной среде следующего состава: гидрогеназа – 0,6 мг белка/мл, $МВ^{2+}$ – $2 \cdot 10^{-3}$ *М*, дитионит натрия – $3 \cdot 10^{-2}$ *М*, 0,05 *М* трис-буфер (pH 7,2).

Для измерения количества образующегося H_2 в стеклянную ячейку помещали 1 мл суспензии полупроводника, содержащей 33 мг TiO_2 или 12 мг P25 TiO_2. Суспензии продували аргоном, после чего при перемешивании освещали лампой ДРШ-250 в области 320–800 нм ($2{,}8 \cdot 10^5$ эрг/$см^2$ · с); через определенные промежутки времени газовую фазу из ячейки подавали на колонку хроматографа.

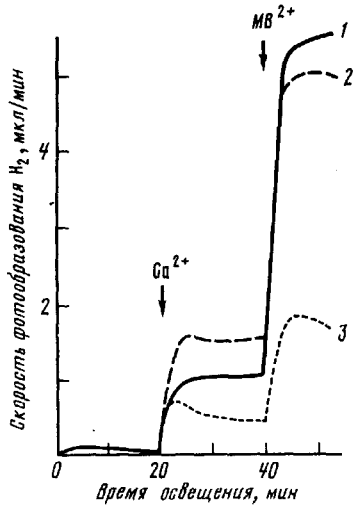


Рис. 1

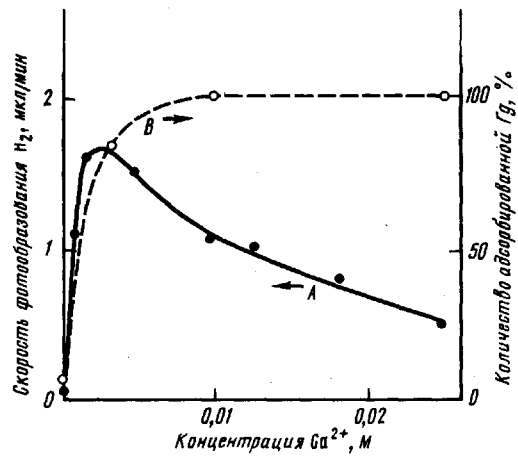


Рис. 2

Рис. 1. Фотообразование H_2 в системе трис–TiO_2–гидрогеназа. Стрелками указаны добавление $CaCl_2$ (*1* – 0,0008 *М*, *2* – 0,0032 *М*, *3* – 0,0248 *М*) и MB^{2+} ($5 \cdot 10^{-4}$ *М*)

Рис. 2. Зависимость скорости фотообразования H_2 (*A*) и количества сорбированной гидрогеназы (Гд) (*B*) от концентрации Ca^{2+} в системе трис–TiO_2–гидрогеназа

Рис. 3. Зависимость фотообразования H_2 в системе трис–TiO_2–гидрогеназа в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ *М* $CaCl_2$ от интенсивности света при освещении: *1* – ртутной лампой в области 320–800 нм, 100% соответствует $2{,}8 \cdot 10^5$ эрг/см^2 · с; *2* – светом с λ = = 365 нм, 100% соответствует $1 \cdot 10^4$ эрг/см^2 · с

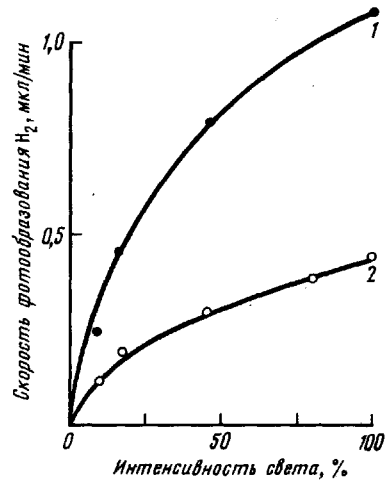


Рис. 3

Интенсивность света измеряли с помощью ферриоксалатного актинометра. Квантовый выход фотообразования H_2 рассчитывали, исходя из предположения о полном поглощении падающего света суспензией полупроводника.

В соответствии с полученными ранее результатами [1], при освещении суспензии TiO_2, содержащей гидрогеназу и трис-буфер как донор электрона, происходит образование H_2 (табл. 1). Однако скорость реакции в этих условиях на два порядка меньше, чем в присутствии переносчика электрона MB^{2+}. Это, по-видимому, объясняется низкой эффективностью прямого переноса фотогенерированных электронов от частиц полупроводника к молекулам фермента.

Мы изучили влияние хлоридов одно- и двухвалентных металлов на фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона. Было обнаружено, что добавление $CaCl_2$ в реакционную среду значительно увеличивает скорость безмедиаторного фотообразования H_2 (рис. 1). Зависимость скорости реакции от концентрации $CaCl_2$ имеет сложный характер (рис. 2). При оптимальной концентрации $CaCl_2$ ($3 \cdot 10^{-3}$ *М*) скорость фотообразования H_2 сравнима с наблюдаемой в присутст-

Таблица 1

Фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2

Состав системы	Скорость фотообразования H_2, мкл/мин · мл
TiO_2 + гидрогеназа	0,05
TiO_2 + гидрогеназа + MB^{2+} *	3,1
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+} *	1,7
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+} + MB^{2+}	5,0
TiO_2	0,01
TiO_2 + Ca^{2+}	0,01
дитионит + MB^{2+} + гидрогеназа**	2,4

* MB^{2+} ($5 \cdot 10^{-4}$ *M*) и Ca^{2+} ($3 \cdot 10^{-3}$ *M*) добавляли через 20 мин освещения системы TiO_2 + гидрогеназа.
** Опыт проводили без освещения.

Таблица 2

Адсорбция гидрогеназы T. roseopersicina на TiO_2 и P25 TiO_2

Состав среды	Количество сорбированной гидрогеназы, %	
	TiO_2	P25 TiO_2
H_2O	1	65
Трис-буфер, pH 7,2	6	100
Трис-буфер, pH 7,2 + $CaCl_2$ 0,01 *M*	100	100
Фосфатный буфер, pH 7,2	–	4

вии MB^{2+}, а также со скоростью темнового образования H_2 от восстановленного дитионитом MB^{2+} (табл. 1). Следует отметить, что $CaCl_2$ активирует фотообразование H_2 и в том случае, когда в суспензии присутствует MB^{2+}. Однако в присутствии метилвиологена $CaCl_2$ вызывает увеличение скорости реакции всего в 3 раза, тогда как в отсутствие переносчика электрона – более чем в 30 раз.

Зависимость скорости фотообразования H_2 в системе трис–TiO_2–гидрогеназа в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ *M* $CaCl_2$ от интенсивности света нелинейна (рис. 3). При интенсивности света $1 \cdot 10^4$ эрг/см^2 · с (λ = 365 нм) измерен квантовый выход фотообразования H_2 $\Phi(H) = 9 \pm 0{,}9\%$. Существенно, что в широком интервале интенсивности света реакция не достигает насыщения. Это свидетельствует о достаточно эффективном оттоке электронов из зоны проводимости полупроводника к гидрогеназе в отсутствие переносчика электрона.

Активация фотообразования H_2 хлористым кальцием наблюдается при использовании в качестве донора электрона не только трис-буфера, но и сахарозы, дитиотреитола, метанола, а также в отсутствие экзогенных органических доноров электрона. $BaCl_2$, подобно $CaCl_2$, ускоряет фотообразование H_2 в десятки раз. Хлориды одновалентных металлов – NaCl, KCl, CsCl – в концентрациях до $3 \cdot 10^{-2}$ *M* увеличивают скорость реакции в системе трис–TiO_2–гидрогеназа лишь вдвое.

Полученные данные о влиянии солей на фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2 показывают, что активирующее действие соли определяется валентностью и концентрацией катиона и не объясняется изменением ионной силы.

Опыты с применением 0,05 *М* фосфатного буфера (pH 7,2) показали, что ионы фосфата практически полностью подавляют фотообразование H_2 в системе донор электрона (сахароза 0,5 *М*) – TiO_2–гидрогеназа. В то же время, когда TiO_2 сопряжен с гидрогеназой посредством MB^{2+}, ионы фосфата снижают скорость фотообразования H_2 лишь в 1,5–2 раза.

При использовании другого образца диоксида титана – P25 TiO_2 "Degussa", так же как и TiO_2 "Fluka", в фосфатном буфере, содержащем донор электрона (10% метанол) и гидрогеназу, фотообразование H_2 в отсутствие MB^{2+} происходит с низкой скоростью (< 0,01 мкл H_2/мин · мл). Отличие образца P25 TiO_2 проявляется при проведении реакции в трис-буфере. В системе трис–P25 TiO_2–гидрогеназа обеспечивается высокая скорость фотообразования H_2 (1,0–1,5 мкл H_2/мин · мл). MB^{2+} ускоряет реакцию лишь в 1,5–2 раза, а добавление $CaCl_2$ приводит к некоторому снижению скорости фотообразования H_2.

Из сопоставления результатов, полученных при изучении сорбции гидрогеназы (рис. 2, табл. 2), с данными по фотообразованию H_2 в суспензиях TiO_2 и P25 TiO_2 следует, что эффективное фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона происходит в условиях, которые обеспечивают связывание гидрогеназы с полупроводником. Действительно, как сорбция гидрогеназы на полупроводнике (табл. 2), так и безмедиаторное фотообразование H_2 стимулируются при добавлении трис-буфера к водным суспензиям TiO_2 или P25 TiO_2 и подавляются в присутствии фосфата. В суспензиях TiO_2 в трис-буфере $CaCl_2$ в концентрации до $2 \cdot 10^{-3}$ *М* сходным образом активирует фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона, и связывание гидрогеназы с полупроводником (рис. 2). Следовательно, активация фотообразования H_2 хлоридом кальция связана с его способностью обеспечивать сорбцию гидрогеназы на TiO_2. Полученные данные пока не позволяют объяснить уменьшение скорости фотообразования H_2 при концентрациях $CaCl_2$ выше $2 \cdot 10^{-3}$ *М*, когда вся гидрогеназа связана с полупроводником. Возможно, что это связано с коагуляцией частиц полупроводника или увеличением ионной силы. Бóльшая эффективность безмедиаторного образования H_2 в суспензиях P25 TiO_2 в трис-буфере, чем в суспензиях TiO_2, объясняется тем, что с частицами P25 TiO_2 в трис-буфере связана вся гидрогеназа, а с частицами TiO_2 – лишь 6%.

Способность TiO_2 сорбировать белки установлена ранее [11, 12]. Показано также, что бактериальные гидрогеназы прочно связываются с TiO_2 [7]. Авторы предположили образование водородных связей между ферментом и поверхностными группами полупроводника [7]. Имеющиеся сведения о свойствах поверхности TiO_2 (см., например, [13]), а также данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что в основе связывания гидрогеназы T. roseopersicina с TiO_2 в условиях наших опытов лежат преимущественно электростатические взаимодействия.

Гидратированная поверхность TiO_2 в зависимости от pH раствора может быть заряжена положительно или отрицательно вследствие амфотерности поверхностных OH-групп. На заряд поверхности TiO_2 влияют такие факторы, как способ получения образца, специфическая адсорбция ионов. Для дисперсий очищенного анатаза изоэлектрическая точка лежит в интервале pH 5,0–7,5 [13, 14]. Промышленные образцы TiO_2 имеют изоэлектрическую точку при pH $\simeq$ 3 вследствие наличия на поверхности прочно связанных анионов фосфата, сульфата и др. [15]. В условиях наших опытов, при pH 7,2, двухвалентные катионы, адсорбируясь на частицах TiO_2, могут значительно уменьшить их отрицательный заряд и, таким образом, обеспечить условия для связывания гидрогеназы, молекулы которой заряжены отрицательно (p$I \simeq$ 4,2). Адсорбция гидрогеназы, стимулированная хлоридом кальция, обратима. Гидрогеназа, связанная с частицами TiO_2 в трис-буфере в присутствии $CaCl_2$, десорбируется при ресуспендировании осадка TiO_2

в трис-буфере, не содержащем $CaCl_2$. Это также согласуется с предположением об электростатическом характере взаимодействия фермента и полупроводника. В трис-буфере, молекулы которого при pH 7,2 нейтральны или заряжены положительно, заряд TiO_2 сохраняется или становится более положительным. Подавление адсорбции гидрогеназы на полупроводнике в фосфатном буфере можно объяснить тем, что анионы фосфата способны прочно связываться с поверхностью TiO_2 и увеличивать ее отрицательный заряд.

Различие в свойствах TiO_2 и P25 TiO_2 связано, по-видимому, с различной величиной поверхностного заряда образцов. Кроме того, на высоко гидроксилированной поверхности P25 TiO_2 может содержаться большее количество центров, доступных для взаимодействия с молекулами белка.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности фотообразования H_2 с квантовой эффективностью до 10% при прямом фотоиндуцированном переносе электронов из зоны проводимости TiO_2 к реакционному центру гидрогеназы в условиях, обеспечивающих связывание фермента с частицами полупроводника.

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

Институт почвоведения и фотосинтеза
Академии наук СССР, Пущино Московской обл.

Поступило
16 XI 1987

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А., Брин Г.П., Никандров В.В.* – ДАН, 1976, т. 229, № 4, с. 990–993. 2. *Красновский А.А., Брин Г.П., Луганская А.Н., Никандров В.В.* – ДАН, 1979, т. 249, № 4, с. 896–899. 3. *Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А.* – ДАН, 1981, т. 256, № 5, с. 1249–1253. 4. *Nikandrov V.V., Brin G.P., Krasnovsky A.A.* – Photobiochem. Photobiophys., 1983, vol. 6, p. 101–107. 5. *Красновский А.А., Никандров В.В., Никифорова С.А.* – ДАН, 1985, т. 285, № 6, с. 1467–1471. 6. *Krasnovsky A.A., Nikandrov V.V.* – FEBS Lett., 1987, vol. 219, № 1, p. 93–96. 7. *Cuendet P., Gratzel M., Rao K.K., Hall D.O.* – Photobiochem. Photobiophys., 1984, vol. 7, p. 331–340. 8. *Cuendet P., Rao K.K., Gratzel M., Hall D.O.* – Biochimie, 1986, vol. 68, № 1, p. 217–221. 9. *Willner I., Mandler D., Maidan R.* – Nouv. J. Chim., 1987, vol. 11, № 2, p. 109–121. 10. *Зорин Н.А., Гоготов И.Н.* – Биохимия, 1982, т. 47, № 5, с. 827–833. 11. *Glueckauf E., Patterson L.* – Biochim. et biophys. acta, 1974, vol. 351, № 1, p. 57–76. 12. *Messing R.A.* – Meth. Enzymol., 1976, vol. 44, p. 148. 13. *Калианасундарам К.* В кн.: Энергетические ресурсы сквозь призму фотохимии и катализа. М.: Мир, 1986, с. 241–287. 14. *Healy T.W., Fuerstenau D.W.* – J. Coll. Sci., 1965, vol. 20, p. 376–386. 15. *Бобыренко Ю.Я.* – Коллоид. журн., 1973, т. 33, № 6, с. 803–806.

Том 35, вып. 1 1988 г.

УДК 577.355.2

ОБРАЗОВАНИЕ ФЕОФИТИНА В ЗЕЛЕНЕЮЩИХ ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ В КИСЛЫХ СРЕДАХ

Е. В. ПАКШИНА, Н. Н. ЛЕБЕДЕВ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

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

С помощью низкотемпературных спектров излучения и возбуждения флуоресценции изучали феофитинизацию хлорофилла на разных этапах зеленения этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в кислых средах. Показана идентичность спектральных форм феофитина, образуемого на всех этапах зеленения, и необратимой структурной перестройки пигмент-белковых комплексов, предшествующей его образованию. Обсуждается природа обратимого сдвига длинноволновой полосы низкотемпературной флуоресценции при кратковременном воздействии кислых сред.

Пшеница — феофитин — флуоресценция.

Безмагниевый аналог хлорофилла — феофитин обычно рассматривается лишь как продукт деградации Хл, не выполняющий физиологической функции в неповрежденных тканях. Однако за последнее время все больше развивается представление о функциональной роли феофитина в реакционных центрах фотосинтеза [1, 2]. В связи с этим вопрос относительно его образования и состояния в фотосинтезирующих клетках приобретает новый интерес, требуя, во-первых, методов точной оценки малых количеств феофитина и, во-вторых, выработку критериев и доказательств его «встроенности» в биологическую структуру.

Процесс феофитинизации Хл и его аналогов в модельных системах различной степени сложности был предметом самостоятельного изучения во многих работах, являясь одним из путей для понимания появления нативного феофитина. Так, в ряде работ [3, 4] были выявлены зависимости скорости темновой феофитинизации от структурных особенностей молекул различных аналогов Хл и возможность ускоряющего действия света на этот процесс в специфических восстановительных условиях. Вместе с тем показано накопление феофитина в популяциях водорослей при их недостаточной освещенности [5, с. 115] и предложен чувствительный метод обнаружения феофитина, образующегося в водорослях после их затемнения [6]. Вопрос о появлении феофитина при деструкции Хл также требует исследования [7]. Данные о предпочтительной феофитинизации вновь образованных молекул Хл [8] могут являться указанием на возможность возникновения феофитина в живых клетках также в процессе биосинтетического обновления Хл. Изучение феофитинизации в естественных структурах [9—14] при действии на них кислот с неизбежностью усложняется нарушением организации пигмент-белковых комплексов при подобного рода воздействиях, причем в работе [14] нам удалось выявить первоначальные обратимые стадии этих превращений.

В данной работе мы поставили задачу исследовать феофитинизацию в более просто организованной структуре фотосинтетического аппарата в процессе его формирования в зеленеющих проростках пшеницы. При этом мы предполагали использовать системы с относительно меньшим количеством Хл, входящего в светособирающий комплекс, который явля-

Сокращение: Хл — хлорофилл.

ется более устойчивым к воздействию низких значений pH [13, 15], а также и системы, где еще не сформировались длинноволновые агрегированные формы Хл, которые, как мы показали ранее [13, 14], первыми претерпевают структурные перестройки, предшествующие феофитинизации. Кроме того, определенные стадии зеленения дают возможность одновременно следить за феофитинизацией Хл и протохлорофиллида.

МЕТОДИКА

Выращенные в темноте на водопроводной воде 2-недельные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 35 освещали люминесцентными лампами (2—7 тыс. лк) в течение 0,5 и 2 ч и 25 тыс. лк — 6 и 21 ч. Экспозиции освещенности проростков соответствовали концу шибатовского сдвига, лаг-фазе и фазе интенсивного накопления Хл [16]. Соответственно этим экспозициям, после которых выделяли этиохлоропласты, последние называются в тексте: этиохлоропласты после 0,5 ч освещения, после 2 ч освещения и т. д. Этиохлоропласты выделяли в сахарозо-фосфатном буфере по описанной ранее методике [17], подвергали осмотическому шоку в фосфатном буфере pH 7,2 и осаждали на микробиологическом фильтре («Сынпор 3», ЧССР). Кислотную обработку осуществляли в цитратном буфере pH 2,3. Измерение низкотемпературных спектров флуоресценции проводили при —196° на установке, описанной ранее [17]. Спектры поглощения и их вторые производные измеряли на спектрофотометре фирмы «Perkin—Elmer» 554. (Швеция). Спектры, представленные на рисунках, являются наиболее характерными из двух серий опытов с 3—4 аналитическими повторностями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование феофитина *a* в этиолированных и позеленевших проростках пшеницы наблюдается при инфильтрации 0,1 н. HCl и длительном выдерживании (более 1 ч) в таком состоянии. Феофитин обнаруживается в низкотемпературном спектре излучения флуоресценции (возбуждение 435 нм) по полосе в районе 670 нм. По спектру возбуждения (регистрация 670 нм) эта полоса характеризуется максимумами при 416, 513 и 537 нм. Инфильтрация листьев водой в контрольном опыте образования феофитина не вызывала. Соотношение интенсивностей полос E_{416}/E_{437}, характерных для феофитина и Хл *a*, в спектре возбуждения флуоресценции в районе 670 нм было выбрано нами как критерий для оценки появления мономерного феофитина. При регистрации флуоресценции в более длинноволновой области, особенно на стадиях многочасового зеленения, доля феофитина маскируется флуоресценцией исходного Хл. Вместе с тем в случае, когда доля агрегированных форм Хл мала, значения отношения E_{416}/E_{437} существенно не различаются в зависимости от регистрации флуоресценции при 670 или 685 нм. Сделанные ранее измерения [13] показали, что феофитинизации агрегированных форм Хл предшествует их дезагрегация, таким образом, указанную выше оценку появления феофитина мы полагали правомерной для всех стадий зеленения. С учетом этого мы далее сопоставляем во времени появление мономерного феофитина с другими спектральными эффектами взаимодействия ионов водорода и мембран этиохлоропластов на разных стадиях зеленения.

Этиохлоропласты после 0,5-часового освещения имеют в спектре излучения флуоресценции максимумы при 676 и 631 нм. Селективная регистрация спектров возбуждения флуоресценции при соответствующих длинах волн позволила фиксировать наличие соответственно Хл с максимумом при 437 нм и протохлорофиллового пигмента — с максимумом при 442 нм. Действие кислоты на этиохлоропласты приводило к падению

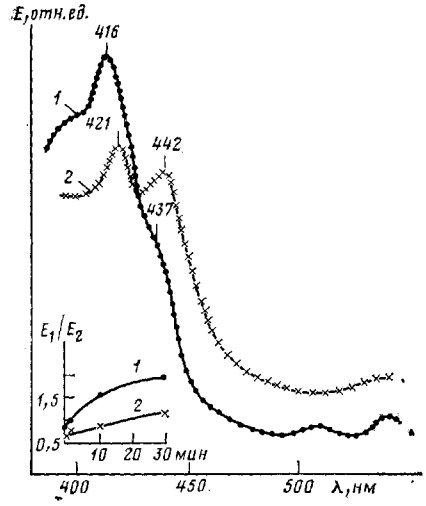


Рис. 1

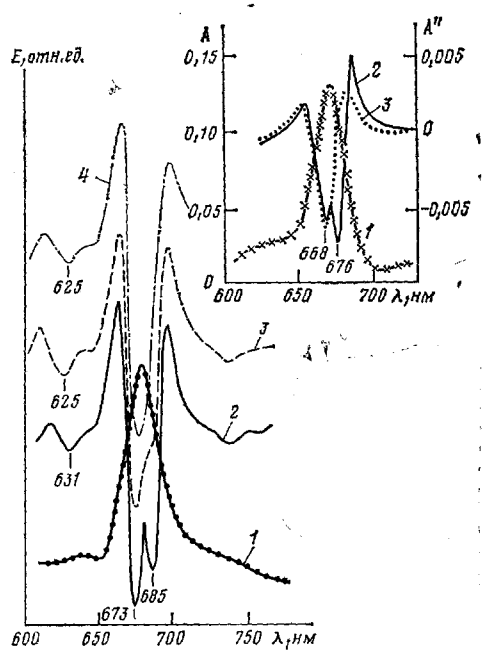


Рис. 2

Рис. 1. Действие буфера (pH 2,3) на этиохлоропласты 0,5-часового освещения

1 — спектр возбуждения флуоресценции после 30 мин кислотной обработки, регистрация при 676 нм; *2* — регистрация при 635 нм. На вставке изменение соотношения E_{416}/E_{437} (*1*) или E_{420}/E_{440} (*2*)

Рис. 2. Действие буфера (pH 2,3) на этиохлоропласты 2-часового освещения. Спектры излучения флуоресценции этиохлоропластов (возбуждение при 435 нм)

1 — до обработки кислотой, *2* — 2-я производная этого спектра, *3* и *4* — 2-е производные спектров излучения флуоресценции после соответственно 0,5 и 10 мин кислотной обработки. На вставке: *1* — спектр поглощения этиохлоропластов до обработки, *2* — 2-я производная этого спектра; *3* — 2-я производная спектра поглощения этиохлоропластов после 10 мин кислотной обработки

интенсивности полос при 437 и 442 нм и к относительному росту полос при 416 нм (феофитин *а*) и менее выраженному при 421 нм, соответствующей полосе протофеофитина в растворе [3]. Сравнительная оценка изменения соотношения E_{416}/E_{437} (регистрация при 676 нм) с изменением соотношения E_{421}/E_{442} (регистрация при 635 нм) позволила предположить, что при действии кислоты на этиохлоропласты протофеофитин накапливается с меньшей скоростью, чем феофитин Хл *а* (рис. 1). Это соответствует соотношению констант феофитинизации Хл и протохлорофилла в органических растворителях [3].

Уже 30-секундное воздействие буфера pH 2,3 на этиохлоропласты приводило к необратимому смещению максимума Хл в спектре излучения флуоресценции в коротковолновую сторону (676→672 нм), тогда как спектральные изменения, характеризующие появление мономерного феофитина, происходили и через 30 мин.

Этиохлоропласты после 2-часового освещения характеризовались преобладанием в спектре поглощения двух коротковолновых форм (668 и 675), разрешаемых по 2-м производным спектров поглощения (рис. 2, вставка). Действие буфером (pH 2,3) приводило к такого рода перестройке структуры, что доминирующей в спектре поглощения становилась форма 668 нм. По 2-м производным спектров излучения флуоресценции в этиохлоропластах рассматриваемой стадии зеленения (рис. 2) наблюдаются два максимума (при 673 и 685 нм), соответствующие, оче-

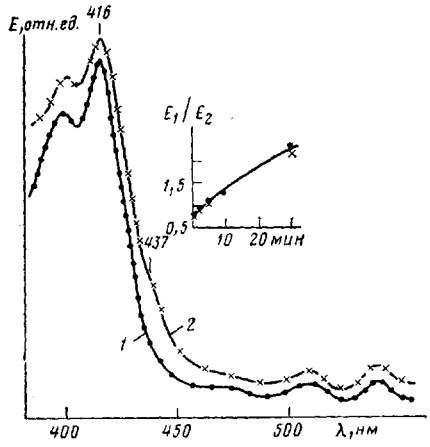


Рис. 3

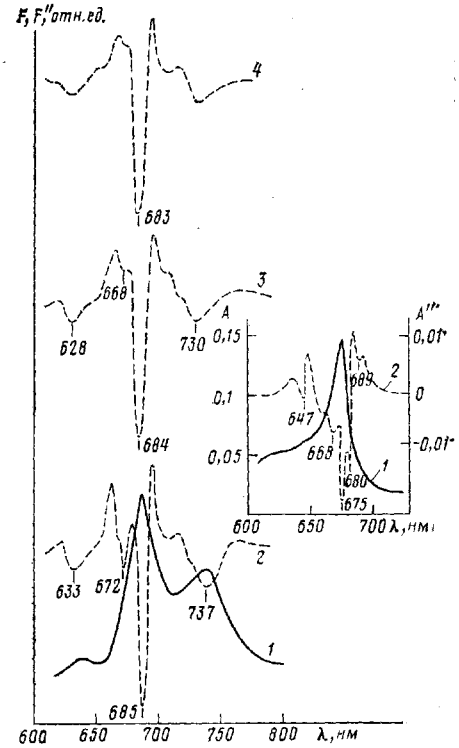


Рис. 4

Рис. 3. Спектры возбуждения флуоресценции этиохлоропластов стадии 2-часового освещения после 5,5 ч обработки буфером (pH 2,3)

1 — регистрация при 670 нм, *2* — при 686 нм. На вставке: изменение отношения E_{416}/E_{437} при кислотной обработке

Рис. 4. Действие буфера (pH 2,3) на этиохлоропласты стадии 6-часового освещения

1 — спектр излучения флуоресценции до обработки, *2* — 2-я производная этого спектра, *3* и *4* — 2-я производная спектров излучения флуоресценции после соответственно 0,5 и 10 мин обработки кислотой. На вставке: *1* — спектр поглощения этиохлоропластов до обработки их кислотой, *2* — 2-я производная этого спектра

видно, выше обозначенным коротковолновым формам в спектре поглощения. Результатом действия кислоты на эти образцы является необратимое исчезновение полосы 685 нм, которая в зависимости от времени обработки проявляется либо в виде более или менее выраженного плеча (после 0,5—3 мин действия кислотой), либо полностью отсутствует (после 10 мин действия). При дальнейшем увеличении времени действия кислотой (30 мин) не происходило изменения в положении полос в спектре излучения флуоресценции, тогда как соотношение, принятое нами за меру феофитинизации, продолжало увеличиваться, как показано на вставке к рис. 3. Характерно, что при структуре форм Хл этой стадии зеленения обсуждаемые отношения по мере феофитинизации близки, независимо от того, при какой длине волны регистрируется флуоресценция: при 670 или 686 нм. Однако при длительных экспозициях в кислом буфере эти значения были различны. Так, при 5-часовой обработке этиохлоропластов (pH 2,3) в спектрах возбуждения при регистрации флуоресценции в районе 670 нм значение E_{416}/E_{437} было равно 4,3, а при регистрации в районе 686 нм оно равнялось 2,9. Разница между этими значениями, очевидно, соответствует количеству Хл *a*, не подвергшегося феофитинизации и проявляющегося на кривой *2* (рис. 3) в виде неболь-

шого плеча при 437 нм. (Хл *b* на стадии 2-часового зеленения отсутствует и не проявляется в спектре — вставка к рис. 2).

В образцах этой стадии зеленения при регистрации спектров возбуждения флуоресценции в районе 630 нм также обнаруживается наличие протохлорофиллового пигмента, имеющего максимум при 442 нм, уменьшающийся по интенсивности после действия низких pH.

Этиохлоропласты после 6-часового освещения (рис. 4) характеризовались по спектру поглощения набором форм, присущих зеленым хлоропластам, включая длинноволновые формы фотосистемы I и Хл *b*. Однако в спектре излучения флуоресценции доля длинноволнового свечения относительно мала. Действие низких pH уменьшает ее еще больше в отличие от зеленых хлоропластов [13, 14], где в первые минуты действия кислоты относительно уменьшается доля коротковолновой флуоресценции. В спектре излучения образцов этой стадии обнаруживается форма Хл, флуоресцирующая при 672 нм. В отличие от этиохлоропластов с 2-часовой экспозицией, где форма с максимумом флуоресценции при 673 нм являлась главной в спектре и более устойчивой, чем форма с поглощением при 676 и флуоресценцией при 685 нм, в этиохлоропластах рассматриваемой стадии эта коротковолновая форма Хл, напротив, оказалась крайне неустойчивой к действию кислоты даже при кратковременной обработке (рис. 4, *3*). Возможно, эта форма является продуктом деструкции, а не аналогом соответствующей полосы у этиохлоропластов 2-часовой экспозиции. Пик при 672 нм отсутствовал в спектре излучения при возбуждении светом 465 нм (полоса поглощения Хл *b*), тогда как форма спектра излучения в районе 685—750 нм не менялась в зависимости от длины волны возбуждающего света (435 или 465 нм).

К быстрым изменениям под действием кислоты, связанным с предшествующей феофитинизации перестройкой нативных структур, следует отнести коротковолновое смещение длинноволнового максимума флуоресценции 737→730 нм, осуществляемое за 0,5 мин кислотного воздействия (pH 2,3). Накопление мономерного феофитина на этой стадии было соизмеримо с ранее описанными. Отношение E_{416}/E_{437} после 10 мин воздействия кислотой (pH 2,3) равнялось 1,6.

Этиохлоропласты после 21-часового освещения (рис. 5) по спектральным характеристикам практически не отличались от хлоропластов, полученных из зеленых растений, но в них, как и на всех предшествующих стадиях зеленения, сохранялось некоторое количество протохлорофилла, проявляющееся по свечению при 631 нм с максимумом возбуждения при 444 нм. Судя по спектрам излучения, действию кислоты прежде всего подвергается длинноволновый Хл. В интервале 30 с обнаруживается обратимый коротковолновый сдвиг $735 \underset{\text{pH 7,8}}{\overset{\text{pH 2,3}}{\rightleftarrows}} 728$ (рис. 5, *3* и *4*), а при более длительном кислотном воздействии происходят необратимые изменения, выражающиеся в уменьшении относительной доли длинноволновой флуоресценции (рис. 5, *5* и *6*). Отношение E_{416}/E_{437} после 10 мин воздействия кислотой (pH 2,3) равнялось 2 при исходном его значении в образцах, не подвергавшихся воздействию кислоты, 0,8, что соответствует величинам этого соотношения в хлоропластах из зеленых проростков пшеницы. При длительной (около 5-часовой) кислотной обработке в спектре поглощения наблюдалось увеличение поглощения в районе 685—700 нм, характеризующееся по 2-й производной максимумом при 689 нм, что соответствует агрегированному феофитину, образующемуся при аналогичном воздействии в хлоропластах из зеленых растений [13].

В хлоропластах из зеленых проростков пшеницы при действии на них кислотой мы наблюдали спектральную картину, аналогичную той, которая описана ранее для хлоропластов фасоли [13, 14] с явно выраженным обратимым коротковолновым сдвигом длинноволновой флуо-

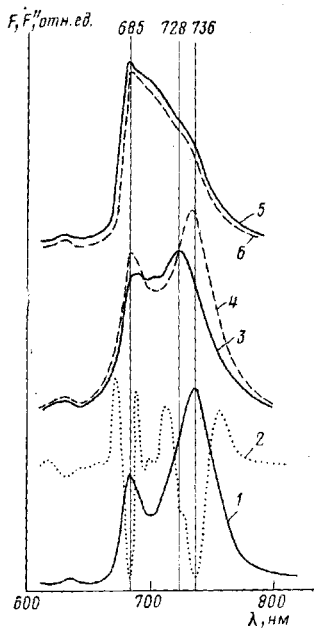


Рис. 5

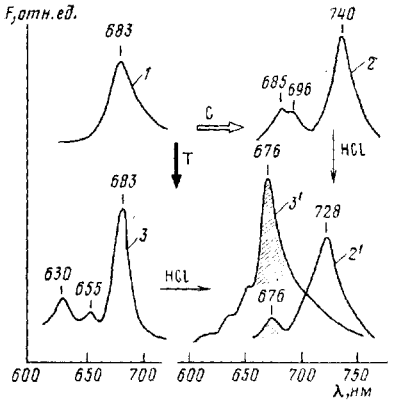


Рис. 6

Рис. 5. Действие буфера (pH 2,3) на этиохлоропласты 21-часового освещения

1 — спектр излучения флуоресценции до обработки, *2* — 2-я производная этого спектра, *3* и *5* — спектры излучения флуоресценции после соответственно 0,5 и 10 мин кислотной обработки, *4* — после 0,5 мин кислотной обработки с последующей 5-минутной обработкой буфером pH 7,8, *6* — после 10 мин кислотной обработки с последующей обработкой буфером pH 7,8

Рис. 6. Схема изменения низкотемпературной флуоресценции 2-недельных этиолированных проростков пшеницы по мере их зеленения и действия соляной кислотой

Спектры излучения: *1* — этиолированных проростков после освещения их в течение 2 ч на рассеянном дневном свету, *2* — *1*+3 сут на рассеянном свету с нормальным чередованием дня и ночи, *2'* — *2*+инфильтрация 0,1 н. HCl, *3* — *1*+3 сут темноты, *3'* — *3*+инфильтрация 0,1 н. HCl. *T* — темнота, *C* — свет

ресценции и с уменьшением в первые минуты действия кислоты доли флуоресценции при 685 и 696 нм по сравнению с широкой длинноволновой полосой флуоресценции.

Обратимый коротковолновый сдвиг длинноволновой широкой полосы флуоресценции (при 735 нм) обнаруживается специфично у этой полосы и не наблюдался нами у коротковолновых полос флуоресценции не только в зеленом листе, но и на стадиях, когда отсутствует экранирующее влияние всей системы светосборщиков. Учитывая это, при его трактовке нельзя исключить возможность сначала обратимого, а потом и необратимого нарушения связи между хлорофилл-белковыми комплексами: комплекса с длинноволновой полосой флуоресценции (735 нм) и соседствующего с более коротковолновой полосой (720 нм), соответствующих, согласно [18], свечению антенны первой фотосистемы и непосредственно реакционного центра. Характерно, что подобный коротковолновый сдвиг флуоресценции наблюдался при действии на препараты первой фотосистемы растворителями [19] и гидролитическими ферментами [20] и при хранении хлоропластов с глицерином при —196°. Но в этих случаях речь идет о необратимом сдвиге. Наблюдаемый нами коротковолновый сдвиг 735→728 нм при действии кислоты в интервале до 40 с является обратимым при последующей обработке хлоропластов

нейтральным или слабощелочным буфером. После более длительной кислотной обработки система не приходит в исходное состояние, однако свечение, связываемое с реакционным центром, сохраняется.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование этиолированных проростков и чувствительной флуоресцентной методики позволило рассмотреть образование феофитина при разных состояниях пигментной системы. Крайние точки этих состояний представлены на рис. 6. На ранней стадии зеленения при действии кислоты весь Хл превращался в мономерный феофитин с максимумом излучения при 677 нм. На конечной стадии зеленения доля его в общем свечении мала и при недостаточной кислотности среды или кратковременности кислотной обработки не проявляется в излучении самостоятельным максимумом. Следует учитывать, что в сформировавшейся структуре образуются нефлуоресцирующие агрегаты феофитина (689 нм по 2-й производной спектра поглощения). Однако по спектрам возбуждения флуоресценции, регистрируя ее в районе 670 нм, можно констатировать образование мономерного феофитина на всех стадиях зеленения и оценивать его по росту соотношения E_{416}/E_{437} и по появлению двух характерных максимумов в зеленой области в районе 500—540 нм. Из двух названных показателей первый оказался более надежным при оценке малых количеств феофитина. Не прореагировавший с кислотой Хл, представленный агрегированными формами, обнаруживается по спектрам возбуждения флуоресценции при регистрации ее в районе 686 или 730 нм.

Картина деструкции Хл при низких pH, описанная нами ранее [13], подтверждается при исследовании этого процесса по мере усложнения системы при зеленении. На ранних стадиях зеленения, когда можно было предполагать более легкую доступность молекул Хл для действия на них повышенных концентраций ионов водорода, скорость изменения соотношения E_{416}/E_{437} не превышала таковую на более поздних стадиях и в зеленых хлоропластах, напротив, значения этого коэффициента при 10-минутной обработке кислотой (pH 2,3) у этиохлоропластов 2- и 6-часовых экспозиций были несколько меньшими, чем у зеленых хлоропластов. Это можно понять, если представить, что кислота на всех этапах зеленения благодаря денатурирующему действию вначале приводит системы в какое-то одинаковое состояние и последующая феофитинизация является более медленным процессом.

Феофитин, обнаруживаемый нами после обработки кислотой этиохлоропластов на разных стадиях зеленения, сходен по спектральным характеристикам с феофитином, образуемым в темноте без действия кислоты в культуре водорослей [6], и несколько отличается от феофитина, работающего в реакционных центрах [2]. В ненарушенной мембране тилакоидов, являющейся, согласно хемиосмотической теории, непроницаемой для ионов водорода, трудно представить внутримембранное понижение значения pH, достаточное для образования феофитина. Искусственное понижение pH, приводящее к феофитинизации, вызывает деструкцию естественных хлорофилл-белковых комплексов в мембране, сопровождающуюся дезагрегацией длинноволновых форм Хл [12]. В пользу этого говорит опыт по моделированию феофитинизации в гетерогенных условиях, изучения феофитинизации бактериохлорофилла в хроматофорах и бактериях и феофитинизации Хл в хлоропластах [9, 10, 12, 13, 21]. Аналогичные перестройки, не затрагивающие еще, очевидно, связи магния с азотом в молекуле пигмента, наблюдаются при действии низких значений pH на этиолированные проростки и проявляются в предпочтительном разрушении активной формы протохлорофиллида (650 нм) с превращением ее в форму 630 нм [22]. Последняя всегда присутство-

вала на всех исследованных в данной работе стадиях образования и накопления Хл в этиолированных проростках пшеницы, в большей мере сохраняясь после обработки их буфером pH 2,3, когда Хл в значительной степени подвергался феофитинизации. Эти факты говорят против предположения о возможной избирательной феофитинизации хлорофилловых пигментов на уровне их предшественников в биосинтетической цепи.

Вместе с тем имеются модели фотофеофитинизации Хл в восстановительных условиях при слабокислых и даже нейтральных значениях pH в растворах Хл в органических основаниях и в этиловом спирте с добавками таких доноров электрона, как гидрохинон [3, 4], когда Хл количественно превращался в феофитин под действием света за время, соизмеримое с временем окислительно-восстановительных превращений Хл в этих системах. Однако реализация этой возможности, к сожалению не показана пока в нативных структурах. Возникновение нативного, встроенного в структуру мембран тилакоидов феофитина остается неясным, требуя дальнейших исследований, и здесь, конечно, наибольший интерес имеет моделирование обратимых изменений состояния хлорофилл-белковых комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шувалов В. А., Красновский А. А.* Фотохимический перенос электрона в реакционных центрах фотосинтеза//Биофизика. 1981. Т. 26. № 3. С. 544.
2. *Климов В. В., Красновский А. А.* Участие феофитина в первичных процессах переноса электрона в реакционных центрах фотосистемы II//Биофизика. 1982. Т. 27. № 1. С. 179.
3. *Пакшина Е. В., Красновский А. А.* Исследование феофитинизации хлорофилла, бактериохлорофилла, бактериовиридина, протохлорофилла и действие света на эту реакцию//Биохимия. 1964. Т. 29. № 6. С. 1132.
4. *Пакшина Е. В., Быстрова М. И., Красновский А. А.* Действие света на феофитинизацию хлорофилла и его аналогов//Молекуляр. биология. 1967. Т. 1. № 1. С. 154.
5. *Раймонт Дж.* Планктон и продуктивность океана. Т. 1. Фитопланктон. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 567 с.
6. *Лебедев Н. Н., Шапошникова М. Г., Красновский А. А.* Флуоресценция феофитина в клетках зеленой водоросли//Биофизика. 1986. Т. 31. № 2. С. 382.
7. *Kufner R. B.* The biological degradation of chlorophyll in senescent tissues//Pigment in Plants. Akad.-Ferlag, B.: 1981. P. 308.
8. *Шлык А. А., Баранов А. А., Махтюк М. Д. и др.* Избирательная феофитинизация новых молекул хлорофилла в клетках эвглены//Биохимия. 1967. Т. 32. № 1. С. 50.
9. *Chosh A. K., Olson J. M.* Effects of denaturants of the absorption spectrum of the bacterium *Chloropseudomonas ethulicum*//Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 162. P. 135.
10. *Fujimori E.* Bacteriochlorophyll pheophytinization in chromatophores and subchromatophores from *Rhocdospirillum rubrum*//Biochim. et biophys. acta. 1969. V. 180. P. 360.
11. *Brody S. S., Gregory R. P. F.* Effect of hydrogen Jon concentration on the absorption spectrum and fluorescence life time of chloroplasts//Z. Naturforsch. 1981. B. 36. S. 638.
12. *Пакшина Е. В., Быстрова М. И.* Изучение феофитинизации агрегированных форм бактериохлорофилла//3-я Всесоюз. конф. по химии и биохимии порфиринов. Самарканд, 1982. С. 236.
13. *Лебедев Н. Н., Пакшина Е. В., Шиффел П. и др.* Образование в хлоропластах различных спектральных форм феофитина в кислых средах//Биохимия. 1985. Т. 51. № 1. С. 33.
14. *Лебедев Н. Н., Пакшина Е. В., Шиффел П. и др.* Спектральные эффекты взаимодействия ионов водорода с мембраной хлоропластов//Биофизика. 1985. Т. 30. № 6. С. 1000.
15. *Sieferman-Harms D., Ninneman H.* Differences in acid stability of the chlorophyll-protein complexes in intact thylakoids//Photobiochem. and Photobiophys. 1983. V. 6. P. 85.
16. *Беляева О. Б., Карнеева Н. В., Стадничук Н. Н. и др.* Динамика биосинтеза нативных форм хлорофилла от начальных стадий до завершения процесса зеленения этиолированных листьев//Биохимия. 1975. Т. 40. № 5. С. 951.
17. *Лебедев Н. Н., Шиффел П., Красновский А. А.* Спектральные характеристики флуоресценции протохлорофиллида и хлорофилла в хлоропластах и зеленых листьях// Биофизика. 1985. Т. 30. № 1. С. 44.

18. *Mullet J. E., Burke J. J., Arnizen C. J.* Chlorophyll-proteins of photosystem//Plant Physiol. 1980. V. 65. № 5. P. 814.
19. *Shubin V. V., Karapetyan N. V., Krasnovsky A. A.* Molecular arrangement of pigment-protein complex of photosystem//Photosynth. Res. 1986. V. 9. P. 3.
20. *Кочубей С. М., Шадчина Т. М., Островская Л. К.* О различии строения молекулярных агрегатов с длинноволновой флуоресценцией в фотосистемах I и II//Молекуляр. биология. 1975. Т. 9. № 2. С. 190.
21. *Быстрова М. И., Пакшина Е. В., Красновский А. А.* Изучение феофитинизации агрегированных форм хлорофилла//Биохимия. 1975. Т. 40. № 1. С. 137.
22. *Акулович Н. К.* Формирование и состояние фотоактивного протохлорофиллового пигмента. Минск, 1983. С. 73.

Поступила в редакцию
19.XII.1986
после 2-й доработки
22.VII.1987

PHEOPHYTIN FORMATION IN GREENING WHEAT SEEDLINGS IN ACID MEDIA

E. V. PAKSHINA, N. N. LEBEDEV, A. A. KRASNOVSKY

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Chlorophyll pheophytinization at different steps of greening of etiolated wheat (*Triticum aestivum L.*) in acid media has been studied with the aid of the low-temperature spectra of fluorescence emission and excitation. The identity was shown of spectral forms of pheophytin produced at all steps of greening and irreversible structural rearrangements of pigment-protein complexes preceding pheophytinization.

The nature of the reversible shift of the long-wave band of low-temperature fluorescence upon short-term action of acid media is discussed.

Том 35, вып. 5 1988 г.

УДК 581.132.1

ДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА НА ГИДРОГЕНАЗНУЮ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ANABAENA VARIABILIS*

О. Г. ПОЛЕССКАЯ, А. А. КРАСНОВСКИЙ

Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
Институт биохимии Академии наук СССР им. А. Н. Баха, Москва

Предварительная инкубация клеток цианобактерий *Anabaena variabilis* на свету сопровождалась падением скорости выделения и поглощения ими водорода. Однако внесение водорода в газовую фазу в период инкубации препятствовало инактивации гидрогеназы. При этом наблюдалось уменьшение последующей скорости образования цианобактериями кислорода. Действие молекулярного водорода на фотосинтез предполагает его поглощение клетками при участии гидрогеназы и при использовании молекулярного кислорода в качестве терминального акцептора электронов. По-видимому, в результате этого процесса в клетках возможно возникновение анаэробных условий, которые, как это показано, оказывали ингибирующее действие на фотосинтез у *Anabaena variabilis*. Полученные данные указывают на участие гидрогеназной системы в регуляции фотосинтетической активности у цианобактерий.

Цианобактерии — молекулярный водород — гидрогеназа — анаэробиоз — фотосинтетическое выделение кислорода.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, связанным с изучением водородного обмена азотфиксирующих нитчатых цианобактерий (синезеленых водорослей) [1—3]. Эти микроорганизмы, осуществляя фотосинтез с выделением кислорода, в то же время способны к фиксации молекулярного азота и выделению молекулярного водорода в результате действия нитрогеназы. Так как нитрогеназа инактивируется кислородом, процесс азотфиксации у цианобактерий осуществляется в особых клетках — гетероцистах, в которых отсутствует ФС II. Цианобактерии поглощают молекулярный водород при участии гидрогеназы. Этот процесс имеет значение для поддержания в гетероцистах условий, оптимальных для действия нитрогеназы и успешного протекания азотфиксации [1—3]. В то же время о действии молекулярного водорода на другие стороны метаболизма цианобактерий известно мало. Ранее нами было показано, что в атмосфере инертного газа аргона нитрогеназная активность нитчатой цианобактерии *Anabaena variabilis* падала при внесении молекулярного водорода, возможно, в результате уменьшения скорости фотосинтеза, идущего с выделением кислорода в вегетативных клетках цианобактерии [4].

Настоящая работа посвящена изучению влияния молекулярного водорода на фотосинтетическое выделение кислорода и на активность гидрогеназы у *A. variabilis*.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служила бактериологически чистая культура азотфиксирующей нитчатой цианобактерии *Anabaena variabilis* Kutz, штамм АТСС 29413, полученный из коллекции кафедры генетики МГУ. Культуру цианобактерии выращивали, как описано ранее [4]. Клетки осаждали центрифугированием (1000 g, 5 мин) и ресуспендировали в

Сокращение: Хл — хлорофилл.

свежей среде. В опытах использовали культуру в экспоненциальной фазе роста (5—7 сут после посева).

Опыты включали инкубацию клеток цианобактерии в атмосфере разного состава. Клеточную суспензию (3 мл) помещали в герметично закрывающиеся флаконы объемом 15 мл, которые затем наполняли аргоном. Во флаконы с помощью шприца вносили молекулярный водород (H_2), окись углерода (CO), ацетилен (C_2H_2) в количестве 50, 10 и 20% от объема газовой фазы соответственно. Флаконы инкубировали в течение нескольких часов при 28—30° на свету (освещенность 16 000 лк) или в темноте. Темновые условия создавали с помощью алюминиевой фольги. После инкубации клеточную суспензию снова продували аргоном для удаления растворенных в ней H_2, CO и C_2H_2. Затем в клетках определяли активность гидрогеназы по выделению и поглощению ими H_2, а также способность цианобактерии к образованию O_2 на свету в результате фотосинтеза.

Выделение и поглощение клетками *Anabaena variabilis* H_2 измеряли амперометрическим методом на полярографе LP-7e фирма «Laboratorni pristroje Praha» (ЧССР), используя герметичную ячейку с закрытым платиновым электродом, поляризованным при +600 мВ [5]. Измерения проводили в K-Na-фосфатном буфере (0,07 М, pH 7,5) при 25°, перемешивая клеточную суспензию с помощью магнитной мешалки. Непосредственно перед измерениями в ячейке создавали анаэробные условия, пропуская через клеточную суспензию аргон. Выделение *A. variabilis* H_2 наблюдали в анаэробных условиях в темноте при добавлении к клеткам восстановленного дитионитом натрия ($Na_2S_2O_4$, 20 мМ) метилвиологена (5 мМ). Поглощение клетками водорода регистрировали на свету (10 000 лк) при внесении в ячейку 0,2 мкмоль растворенного в воде H_2. Результаты измерений выражены в нмоль выделенного или поглощенного H_2 на 1 мг Хл в 1 мин. Ошибка измерений ±20%.

Выделение цианобактерий O_2 определяли также амперометрическим методом на полярографе LP-7 фирмы «Laboratorni pristroje Praha» (ЧССР) с использованием открытой ячейки и закрытого платинового электрода, поляризованного при —670 мВ. Измерения проводили в K-Na-фосфатном буфере pH 7,5+5 мМ $NaHCO_3$ при 25° и освещенности 10 000 лк. В процессе измерения клеточная суспензия перемешивалась магнитной мешалкой. Результаты выражены в мкмоль выделенного O_2 на 1 мг Хл в 1 мин. Ошибка измерений ±5%.

Фотосинтетическую фиксацию CO_2 оценивали радиоизотопным методом. Во флаконы с клеточной суспензией (3 мл) вводили 0,1 мл $NaH^{14}CO_3$ с удельной радиоактивностью 1,8 мкКи/мМ. Клетки инкубировали в течение 2 ч в атмосфере разного состава при 16 000 лк и 28—30°, затем их осаждали на мембранных фильтрах. Активность образцов определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике модели Mark-2 фирмы «Nuclear Chicago» (США). Сцинтилляционная жидкость — ЖС-106. Результаты представлены за вычетом темнового уровня радиоактивности клеток. Ошибка измерений ±20%.

Содержание Хл *a* в клеточной суспензии определяли, как описано в [4].

Результаты являются данными типичного опыта и представлены как среднее из трех повторностей каждого варианта опыта. Количество повторностей опытов составляло 3—8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Действие молекулярного водорода на активность гидрогеназы. Образование *A. variabilis* H_2 наблюдалось в анаэробных условиях в темноте при добавлении к клеткам восстановленного метилвиологена. Общеиз-

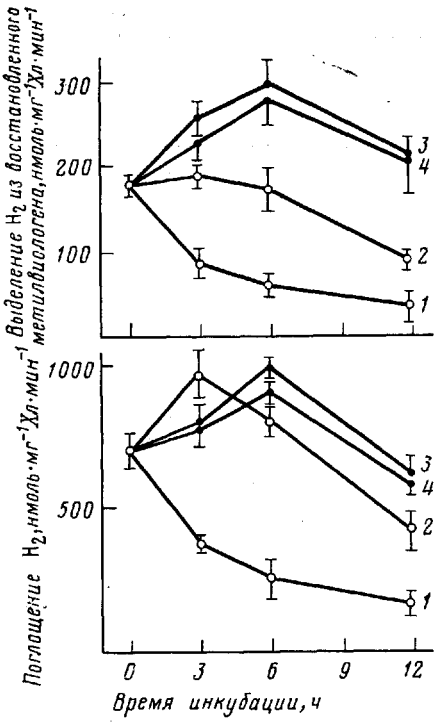


Рис. 1

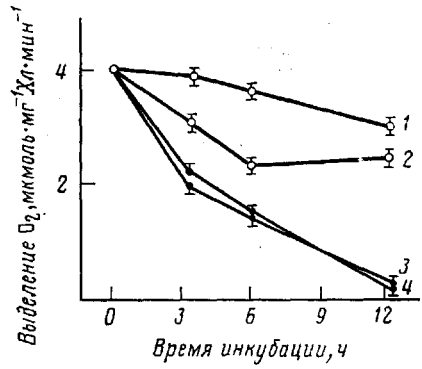


Рис. 2

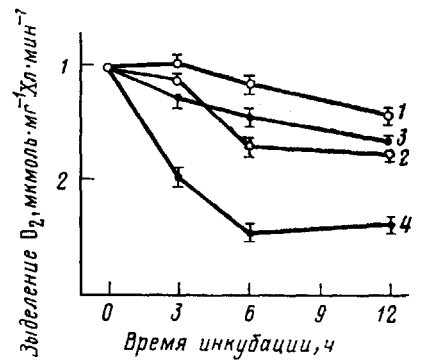


Рис. 3

Рис. 1. Выделение и поглощение цианобактерией H_2 после предварительной инкубации клеток в атмосфере аргона (*1, 3*) и аргона+50% H_2 (*2, 4*)

1, 2 — инкубация клеток на свету; *3, 4* — в темноте

Рис. 2. Выделение цианобактерией O_2 после предварительной инкубации клеток в атмосфере аргона и аргона+50% H_2

Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Выделение цианобактерией O_2 после предварительной инкубации клеток в атмосфере воздуха (*1, 3*) и воздуха+50% H_2 (*2, 4*)

1, 2 — инкубация клеток на свету; *3, 4* — в темноте

вестно, что эта реакция катализируется гидрогеназой [1]. Поглощение цианобактериями H_2 возможно в результате его окисления в дыхательной цепи при использовании кислорода в качестве акцептора электронов [3]. Клетки *A. variabilis* поглощали молекулярный водород в темноте, если в среде содержался растворенный O_2. Однако в продутой аргоном клеточной суспензии эффективное поглощение добавленного H_2 наблюдалось только при освещении клеток. Очевидно, действие света было связано с тем, что поглощение цианобактерией H_2 протекало при использовании в качестве акцептора электронов образующегося при фотосинтезе O_2. Действительно, диурон — ингибитор образования O_2 в результате фотосинтеза — подавлял также поглощение *A. variabilis* водорода более чем на 90%.

Результаты, представленные на рис. 1, демонстрируют изменения в гидрогеназной активности *A. variabilis*, возникающие в результате предварительной инкубации клеток на свету или в темноте в атмосфере аргона без и в присутствии молекулярного водорода. Инкубация клеток на свету в течение 1—12 ч сопровождалась значительным падением их гидрогеназной активности по сравнению с контролем, за который принимали

Таблица 1

Выделение и поглощение цианобактериями H_2 (нмоль·мг$^{-1}$ Хл·мин$^{-1}$) после 3 ч инкубации клеток на свету в атмосфере разного состава

Состав газовой фазы при инкубации	Выделение H_2 из восстановленного метилвиологена в темноте	Поглощение H_2 на свету
Без инкубации	220	910
Аргон	100	350
Аргон + CO	40	100
» + C_2H_2	45	70
» + CO + C_2H_2	0	10
» + H_2	230	1160
» + H_2 + CO	90	300
» + H_2 + C_2H_2	160	980
» + H_2 + CO + C_2H_2	30	300

Таблица 2

Выделение и поглощение цианобактериями H_2 (нмоль·мг$^{-1}$ Хл·мин$^{-1}$) после 3 ч инкубации клеток в темноте в атмосфере разного состава

Состав газовой фазы при инкубации	Выделение H_2 из восстановленного метилвиологена в темноте	Поглощение H_2 на свету
Без инкубации	230	800
Аргон	400	1050
Аргон + CO	100	400
» + C_2H_2	150	370
» + CO + C_2H_2	20	50
» + H_2	350	900
» + H_2 + CO	180	400
» + H_2 + C_2H_2	100	780
» + H_2 + CO + C_2H_2	40	200

таковую в исходной клеточной суспензии. В то же время при добавлении в период инкубации в атмосферу 50% H_2 клетки сохраняли некоторое время способность к выделению H_2 на прежнем уровне, а их способность к поглощению H_2 даже превышала таковую в контроле. Инкубация клеток в анаэробных условиях под аргоном в темноте вызывала некоторое увеличение активности гидрогеназы, причем внесение в атмосферу H_2 в этом случае не оказывало существенного влияния на результаты опыта.

Окись углерода и ацетилен, известные как ингибиторы гидрогеназы у многих микроорганизмов, подавляли активность этого фермента и у *A. variabilis* (табл. 1, 2). Выдерживание клеток в течение 3 ч на свету или в темноте в атмосфере с 10% CO и 20% C_2H_2 сопровождалось последующим снижением скоростей выделения и поглощения ими H_2 в среднем на 50—100%. Однако при добавлении CO или C_2H_2 совместно с молекулярным водородом последний частично препятствовал инактивации гидрогеназы этими соединениями. Так, у клеток, подвергнутых предынкубации на свету в атмосфере, содержащей одновременно CO и H_2, гидрогеназная активность была ниже, чем у клеток, инкубированных с H_2, но выше, чем у клеток, выдержанных в присутствии CO. Инкубация клеток цианобактерии на свету или в темноте в атмосфере, содержащей наряду с C_2H_2 еще и H_2, не сопровождалась подавлением их способности к поглощению H_2 (табл. 1, 2).

Таким образом, молекулярный водород, будучи субстратом гидрогеназы, оказывал стимулирующее действие на функционирование этого фермента у *A. variabilis*.

Таблица 3

Влияние H_2 на фиксацию CO_2 и выделение O_2 цианобактериями

Состав газовой фазы при инкубации	Фиксация CO_2 при инкубации, мкмоль·мг$^{-1}$Хл·ч$^{-1}$	Выделение O_2 после инкубации, мкмоль·мг$^{-1}$Хл·мин$^{-1}$
Воздух	124,0	5,0
Воздух+H_2	48,1	3,5
Аргон	156,0	5,0
Аргон+H_2	89,2	3,2

Таблица 4

Выделение цианобактериями O_2 после 3 ч инкубации клеток на свету и в темноте в атмосфере разного состава

Состав газовой фазы при инкубации	Выделение клетками O_2 после инкубации, мкмоль·мг$^{-1}$Хл·мин$^{-1}$	
	инкубация на свету	инкубация в темноте
Без инкубации	5,0	
Аргон	5,0	1,4
Аргон + CO	5,5	2,1
» + C_2H_2	5,0	2,3
» + CO + C_2H_2	5,3	2,7
» + H_2	3,0	1,2
» + H_2 + CO	5,2	2,7
» + H_2 + C_2H_2	4,2	2,4
» + H_2 + CO + C_2H_2	5,6	2,0

Действие молекулярного водорода на фотосинтетическое выделение кислорода. Выдерживание клеток *A. variabilis* на свету в атмосфере, содержащей молекулярный водород, сопровождалось снижением последующей скорости фотосинтетического образования ими O_2 в среднем на 20—60% по сравнению с клетками, инкубированными в тех же условиях, но в отсутствие H_2 (рис. 2). Уменьшение скорости выделения O_2 становилось заметным через 1—2 ч после начала инкубации клеток в присутствии H_2. Ингибирующее влияние H_2 возрастало со временем до определенного предела, однако никогда не приводило к полному подавлению фотосинтетической активности клеток. Снижение скорости выделения цианобактериями O_2 наблюдалось также в результате их предварительной инкубации на свету в атмосфере воздуха при наличии в ней молекулярного водорода (рис. 3).

Уменьшение видимой скорости фотосинтеза не было связано с увеличением потребления O_2 в процессе дыхания: скорость поглощения O_2 в темноте была одинакова у клеток, инкубированных в присутствии H_2 и без него. Контрольные опыты показали, что при наличии в атмосфере H_2 существенно понижалась эффективность фиксации цианобактериями углекислоты (табл. 3). Это прямо указывало на то, что молекулярный водород подавлял у *A. variabilis* фотосинтез, связанный с выделением кислорода и ассимиляцией углекислоты.

Если во время световой инкубации клеток цианобактерии в атмосферу совместно с H_2 вносили CO, то снижения последующей скорости фотосинтеза не наблюдалось (табл. 4). В то же время ацетилен почти не препятствовал уменьшению фотосинтетической активности клеток под действием молекулярного водорода. Выдерживание *A. variabilis* в атмосфере аргона в темноте, т. е. в анаэробных условиях, вызывало резкое уменьшение скорости фотосинтеза независимо от присутствия или отсутствия H_2 в атмосфере (рис. 2). Как правило, 6—12-часовая инкубация

клеток в этих условиях сопровождалась полным ингибированием их способности к образованию O_2 при переносе на свет, которая не восстанавливалась в течение 20—40 мин освещения.

Именно анаэробиоз оказывал ингибирующее действие на фотосинтез у *A. variabilis*. Выдерживание клеток цианобактерии в темноте, но в атмосфере воздуха приводило лишь к незначительному понижению их фотосинтетической активности, причем добавление в газовую фазу H_2 было связано с уменьшением последней (рис. 3). Существенно отметить, что скорость образования цианобактериями O_2 падала в значительно меньшей степени, если во время пребывания клеток под аргоном в темноте в атмосферу вносили окись углерода и ацетилен (табл. 4).

Таким образом, уменьшение фотосинтетической активности *A. variabilis* наблюдалось после инкубации клеток цианобактерии в атмосфере, содержащей H_2, или в анаэробных условиях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что молекулярный водород вызывал изменения в гидрогеназной и фотосинтетической активности *A. variabilis*. Выдерживание клеток цианобактерии на свету сопровождалось уменьшением активности гидрогеназы, однако этого не происходило при наличии в атмосфере 50% H_2. Можно дать следующее объяснение этим данным. Гидрогеназа проявляет чувствительность к кислороду и, по-видимому, в период инкубации происходит ее инактивация кислородом, образование которого при фотосинтезе усиливалось при высокой интенсивности света, использованной нами в опытах. Но в атмосфере, где присутствует H_2, при освещении клеток происходит его постоянное потребление ими при одновременном поглощении O_2 как акцептора электронов. Возможно, в результате этого процесса внутриклеточная концентрация O_2 уменьшается, его ингибирующее воздействие на гидрогеназу нейтрализуется, и активность фермента остается на прежнем уровне или даже несколько увеличивается. В пользу этого предположения говорит тот факт, что гидрогеназная активность *A. variabilis* увеличивалась в результате анаэробной инкубации клеток в атмосфере аргона в темноте.

Наряду с повышением гидрогеназной активности цианобактерии под влиянием H_2 мы наблюдали понижение скорости фотосинтеза в результате инкубации клеток в присутствии молекулярного водорода. Ранее ингибирующее влияние атмосферы водорода на фотосинтетическое выделение кислорода отмечалось на листьях и хлоропластах традесканции [6]. Сообщалось также, что рост цианобактерии *Anabaena* sp. TA 1 в присутствии H_2 сопровождался подавлением синтеза фикобилиновых пигментов и способности клеток к выделению O_2. По предположению авторов, это могло быть связано с взаимодействием H_2 с одним из компонентов электрон-транспортной цепи, возможно с пластохиноном [7]. Рассматривая действие молекулярного водорода на фотосинтез у *A. variabilis*, существенно подчеркнуть следующее. Эффект водорода проявлялся только в том случае, если в атмосфере исходно присутствовал кислород или его образование было возможно в результате фотосинтеза, протекающего в клеточной суспензии. Оказалось также, что H_2 не подавлял фотосинтез в присутствии окиси углерода, т. е. при ингибировании в клетках активности гидрогеназы. В то же время выдерживание *A. variabilis* в анаэробных условиях сопровождалось падением скорости фотосинтеза, которая, однако, частично восстанавливалась, если инкубация клеток протекала в присутствии CO и C_2H_2. Все это позволяет сделать следующее предположение. В атмосфере, обогащенной H_2, в результате поглощения цианобактерией H_2 и O_2 при участии гидрогеназы внутри клеток возникают анаэробные условия, неблагоприятно влияющие на функционирование фотосинтетического аппарата. В ряде работ, посвященных

изучению эффекта анаэробиоза на фотосинтез водорослей и высших растений, показано, что понижение концентрации O_2 в среде до следовых количеств может вызвать уменьшение фотосинтетической активности у этих организмов [8—11]. Так, например, адаптация клеток *Chlorella* в атмосфере аргона в темноте вызывала уменьшение скорости выделения ими O_2, причем скорость фотосинтеза частично реактивировалась в присутствии окиси углерода [9]. Эти и полученные нами данные указывают на возможную роль гидрогеназной системы в регуляции фотосинтетической активности у зеленых водорослей и цианобактерий. В связи с этим необходимо отметить, что у последних обнаружено две формы гидрогеназы. Кроме гидрогеназы, катализирующей выделение и поглощение H_2, цианобактерии содержат, преимущественно в гетероцистах, гидрогеназу, действие которой направлено исключительно на поглощение H_2 [1—3]. В соответствии с этими представлениями ингибирующее действие H_2 на фотосинтез должно быть связано с поглощением водорода гидрогеназой, обладающей обратимым действием и находящейся в вегетативных, фотосинтезирующих клетках цианобактерии. Вопрос этот требует специального изучения.

Образование цианобактериями водорода, как и другими азотфиксаторами, сопряжено с фиксацией молекулярного азота и постоянно совершается в естественных условиях. В последние годы многие исследования, имеющие практическую направленность, ведутся в целях изучения этих микроорганизмов как возможных продуцентов аммиака и молекулярного водорода [1—3]. Это означает, что выяснение связи водородного обмена с процессами фотосинтеза представляет существенный интерес ввиду перспективы использования цианобактерий в биотехнологических системах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adams M. W., Mortenson L. E., Chen J.-S.* Hydrogenase//Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 594. № 1. P. 105.
2. *Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 342 с.
3. *Houchins J. P.* The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria//Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 768. № 3/4. P. 227.
4. *Полесская О. Г., Красновский А. А.* Влияние экзогенного водорода на нитрогеназную активность синезеленой водоросли *Anabaena variabilis*//Физиология растений. 1985. Т. 32. Вып. 1. С. 79.
5. *Мальцев С. В., Красновский А. А.* Выделение и поглощение молекулярного водорода изолированными хлоропластами высших растений//Физиология растений. 1982. Т. 29. Вып. 5. С. 951.
6. *Закржевский Д. А., Розонова Л. Н., Кутюрин В. М.* О специфическом действии атмосферы водорода на выделение кислорода хлоропластами традесканции//Докл. АН СССР. 1973. Т. 213. Вып. 4. С. 980.
7. *Antarikanonda P., Berndt H., Mayer E., Lorensen H.* Molecular hydrogen: a new inhibitor of photosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena* sp. TAI//Arch. Microbiol. 1980. V. 126. № 1. P. 1.
8. *Воскресенская Н. П., Поляков М. А., Карпушкин Л. Т.* Влияние концентрации кислорода на CO_2-газообмен у бобов и кукурузы//Физиология растений. 1974. Т. 21. Вып. 2. С. 455.
9. *Бойченко В. А.* Действие аноксии на активность фотосистемы II у хлореллы: роль гидрогеназной системы//Физиология растений. 1980. Т. 21. Вып. 1. С. 42.
10. *Suzuki K., Ikawa T.* Effect of oxygen on photosynthetic $^{14}CO_2$ fixation in *Choomonas* sp. (Cryptophyta)//Plant Cell Physiol. 1984. V. 25. № 3. P. 377.
11. *Nash D., Takahashi Masa-aki, Asada K.* Dark anaerobic inactivation of photosynthetic oxygen evolution by *Chlamydomonas reinhardtii*//Plant Cell Physiol. 1984. V. 25. № 4. P. 531.

Поступила в редакцию
12.VIII.1987

EFFECT OF MOLECULAR HYDROGEN ON HYDROGENASE AND PHOTOSYNTHETIC ACTIVITIES IN THE CYANOBACTERIUM *ANABAENA VARIABILIS*

O. G. POLESSKAYA, A. A. KRASNOVSKY

M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The incubation of *Anabaena variabilis* cells in the light was accompanied by the drop in rates of hydrogen evolution and uptake by the cells. However, hydrogen addition to the gaseous phase during the incubation prevented the inactivation of hydrogenase and reduced the subsequent rate of oxygen formation by the cyanobacteria. The effect of molecular hydrogen on photosynthesis is suggested to consist of hydrogen uptake by the cells with the involvement of hydrogenase and utilization of molecular oxygen as the terminal electron acceptor. As a result of the process, anaerobic conditions are likely to appear which produce inhibitory effects on photosynthesis in *Anabaena variabilis*. Thus the results present evidence for the involvement of the hydrogenase system in regulating photosynthetic activity in cyanobacteria.

PHOTOSYNTHETICA 22 (3): 364—370, 1988

Fluorescence Excitation Spectra and Decay Kinetics of Light-Harvesting Complexes in *Chlamydomonas reinhardtii* Mutants*

N. N. LEBEDEV, R. A. KHATYPOV, V. G. LADYGIN** and A. A. KRASNOVSKIĬ

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Leninskiĭ Prospekt 33, 117071 Moscow, U.S.S.R.
*Institute of Soil Sciences and Photosynthesis, Academy of Sciences of the U.S.S.R., Pushchino, Moscow Region, U.S.S.R.***

Abstract

The low-temperature absorption, fluorescence emission and excitation spectra and picosecond decay kinetics of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* mutants devoid of the reaction centre of photosystem (PS) 1 and PS2 and different parts of light-harvesting chlorophyll-protein complex (LHCP) were studied. The spectra agreed with the existence *in situ* of at least two types of LHCP, one with the emission maximum at 681 nm (LHCPII) and the other with the maximum at 706 nm (LHCPO). Both complexes were composed mostly of the same structural units, chlorophyll (Chl) *a*, Chl *b* with carotenoids included, but the second one possessed a specific long-wavelength Chl *a* and a carotenoid absorbing at about 510 nm. The fluorescence decay kinetics of both complexes fitted the double-exponential law suggesting an efficient energy transfer within the complex. The energy transfer between different LHCPs seems to be absent or very low. A new emission maximum at about 700 nm was detected in the chloroplast membrane at a high LHCPII concentration.

Photosynthetic apparatus of green algae consists of several different CPs belonging to PS1 and PS2. In addition to the well-known light-harvesting CP (LHCPII) having polypeptides with the molecular masses of 25, 26.5, 30.5 and emitting fluorescence at 681 nm (Zuber 1985, Brecht 1986, Murphy 1986), a new CP (CPO, LHO) having polypeptides with the molecular masses of 19, 23, 25, 27, and 27.5 kD and emitting low-temperature fluorescence at about 706 nm was isolated from *Chlamydomonas reinhardtii* mutants (Wollman and Bennoun 1982, Ladygin and Lebedev 1986). A new CP (CPOa) with the m.m. slightly smaller than that of CPI and with fluorescence emission at 703 nm *in situ* and at 688 nm after isolation was also found (Garnier *et al.* 1986). These three types of LHCP differ in the Chl composition (Chl *a*/*b* = 1,76, 6.3, and Chl *a* only) and seem to be coded independently. However, there is no information about their molecular arrangements in the photosynthetic membrane up to now. One way to solve the problem is to measure fluorescence excitation spectra and decay kinetics to obtain direct information on the pigment interactions and energy transfers among them (Pashchenko *et al.* 1981, Karukstis and Sauer 1983, Haehnel *et al.* 1983, Moya and Garcia 1983, Holzwarth *et al.* 1985). The mutants

* *Received* 4 November 1987.
Abbreviations: Chl = chlorophyll, CP = chlorophyll-protein complex, DCPIP = 2,6-dichlorophenol-indophenol, LHCP = light-harvesting chlorophyll-protein complex, PS = photosystem.

devoid of some CP of PS1 and PS2 seem convenient for such studies as they emit fluorescence of LHCPs without the interference of the other CPs. Fluorescence decay kinetics of such mutants measured recently showed at room temperature only one decay component with the lifetime of about 2500 ps (Gulotty *et al.* 1985).

In the present paper we analysed the fluorescence decay kinetics of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants at low temperature when the emission of all CPs was more pronounced. CPs spectral differences were also taken into consideration. We also introduce here a new type of mutant devoid not only of CPs of PS1 and PS2 but also of some parts of LHCP.

MATERIAL AND METHODS

The mutants of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* were obtained by γ-irradiation of the wild-type cells (K^+) in a dose of 200 kR (mutant VF5) and by UV-irradiation in a dose of 600 J m^{-2} (mutant VF5-16) (Ladygin 1979). The algae were cultivated on solid agar medium in Petri dishes for 4 d at 20—24 °C, under continuous irradiation with fluorescent lamps (1.7 W m^{-2}).

The low-temperature absorption spectra and their second derivatives were recorded at −170 to −180 °C on a *Perkin-Elmer* spectrophotometer with a specially constructed low-temperature attachment. Before the measurements the cells were placed on a membrane filter (*Synpor 3*, Czechoslovakia). Fluorescence emission and excitation spectra were recorded on a spectrofluorimeter made in our laboratory (Lebedev *et al.* 1985) supplied with a differential corrected spectra unit (*DCSU-2, Perkin-Elmer*) used for spectra correction and calculation of the derivative and difference spectra. The fluorescence decay kinetics wass measured with a laser pulse fluorimeter *LIF-200* (Centre of Optics and Spectroscopy of the Academy of Sciences of the G.D.R.) in a photon-counting regime under excitation at 337 nm and pulse duration of 500 ps. The fluorescence emission was selected with interference filters having a transmission half-width of 14—16 nm. An *Elektronika-60M* computer was used for the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of O'Connor and Phillips (1984). Photochemical activity of PS2 was assayed by photoreduction of DCPIP after ultrasonic treatment and that of PS1 by photooxidation of *P*700 in the presence of 0.2 % *Triton X-100* and sodium ascorbate. Chlorophyll concentration was determined n 80 % acetone (Wellburn and Lichtenthaler 1984).

Acknowledgements: The authors would like to express their thanks to Mr. V. Gorohov, Mr. A. Pikulenko and Dr. V. Z. Pashchenko for help in testing the computer programmes.

RESULTS

The low-temperature fluorescence emission spectrum of *C. reinhardtii* VF5 mutant (Fig. 1*b*) consisted of an intensive emission band at 706 nm and a much less intensive one at 681 nm. The two bands belong to LHCPO and LHCPII, respectively. The low-temperature emission bands at 686 and 696 nm belonging to PS2 (Nakatani *et al.* 1984, Li *et al.* 1986) were absent. The mutant was devoid of photochemical activity of PS2 (with DCPIP) and of the signal of *P*700 (Fig. 2), and there were no CPa and CPI in its electrophoretic pattern (Ladygin and Lebedev 1986). The low-temperature absoption spectrum (Fig. 1*a*) showed the absence of the long-wavelength bands at 688, 696, and 704 nm usually ascribed to PS1 (Satoh and Butler 1978). Thus, the VF5 mutant had only LHCPs.

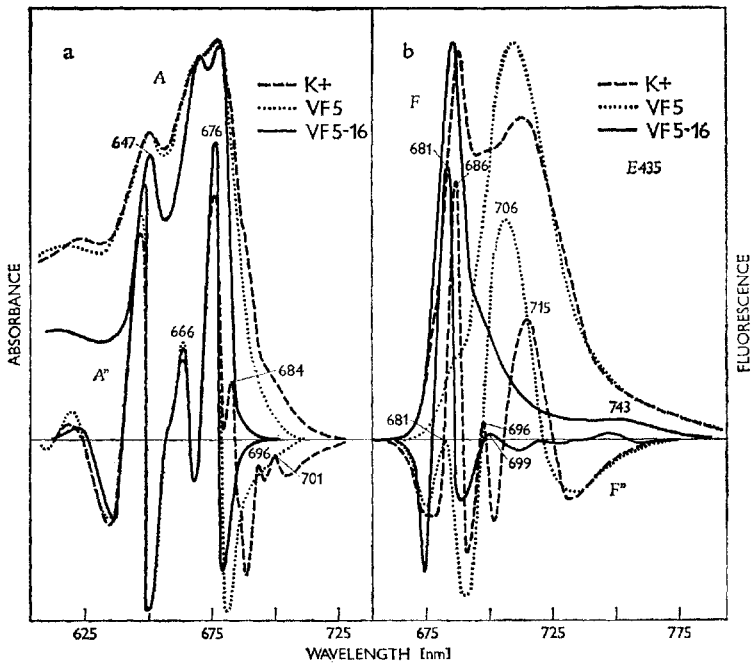


Fig. 1. Low-temperature absorption (*a*) and fluorescence emission (*b*) spectra and their second derivatives of *Chlamydomonas reinhardtii* wild type K^+ (- - - - -) and mutants VF5 (.....) and VF5-16 (———). Excitation wavelength 435 nm.

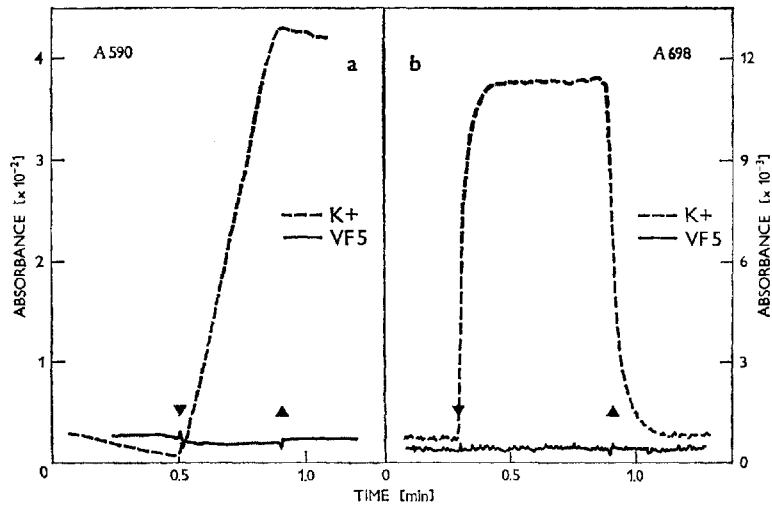


Fig. 2. Photochemical activity in DCPIP reduction (*a*) and *P*700 photooxidation (*b*) of *Chlamydomonas reinhardtii* wild type K^+ (- - - - -) and VF5 mutant (———) at room temperature. Arrows indicate the time of switching on (∨) and off (∧) the exciting radiation.

The low-temperature fluorescence excitation spectra of the two emission bands of the VF5 mutant were close to each other (Fig. 3). Their second derivatives showed bands of Chl *a* (430 and 437 nm), Chl *b* (471 nm) and carotenoids (456, 481, 499 and 506 nm). Thus, both complexes seemed to be composed of the same elementary structural units, or there was efficient energy transfer between them. In a search of fine spectral differences between the complexes we measured the relative amplitude of the excitation spectra for the 684 and 706 nm fluorescence bands (Fig. 3, *top*) that confirmed that LHCPO was more enriched in the long-wavelength Chl *a* and carotenoids absorbing at 510 nm.

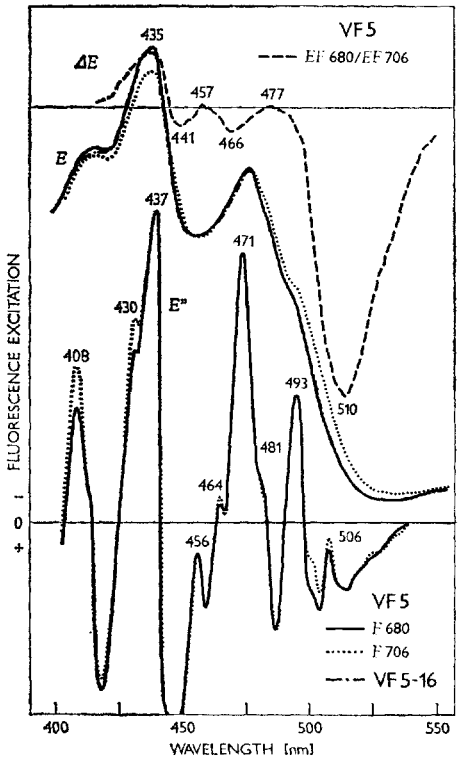


Fig. 3. Low-temperature fluorescence excitation spectra and their second derivative for 680 nm (———) and 706 nm (.....) emission bands of *Chlamydomonas reinhardtii* VF5 mutant and for the emission of VF5-16 mutant (— · —). The ratio of the excitation spectra for the 680 and 706 nm emission bands of VF5 mutant is shown at the top (- - - -).

Fluorescence decay kinetics of the VF5 mutant detected at 680 nm could be fitted by two components with the lifetimes of 83 and 1700 ps and relative amplitudes of 11 and 0.6. The three-exponential fitting did not improve the square difference function significantly (Fig. 4) but by doing the deconvolution of the decay kinetic curve at different separate parts of it we found an additional component with the lifetime of about 1460 ps. This component was very close to the longlived one, and their relative amplitudes were 0.4 and 0.2. Making fluorescence decay analysis at 720 nm (*i.e.* in the emission of the main band) we were able to find only two components with the lifetimes of 85 and 2330 ps.

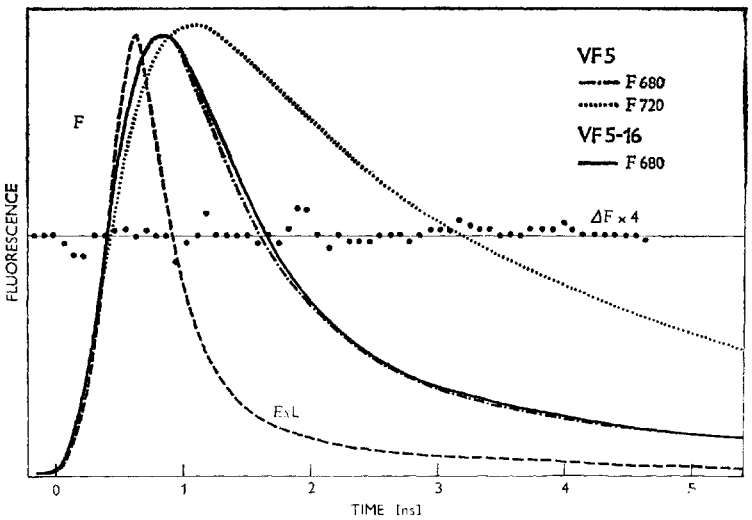


Fig. 4. Fluorescence decay kinetics for the 680 nm (———) and 706 nm (.....) emission bands of the *Chlamydomonas reinhardtii* VF5 mutant and for the emission of the VF5-16 mutant (— · —) and the time course of the exciting light (- - - -). Excitation wavelength 337 nm at 77 K. Differences between the experimental points and a calculation curve at the 680 nm band of the VF5 mutant (*). Scale expansion is 4-fold.

The first one was the same as the fast component of the 681 nm fluorescence band, and the second one was close to that previously found for this mutant at room temperature.

The mutant VF5-16 was derived from the mutant VF5 by using UV-irradiation. It lacked the broad fluorescence band at 706 nm (Fig. 1*b*) and LHCPO in its electrophoretic pattern. The mutant had a main emission band at 681 nm, in the long-wavelength part of which a shoulder at about 700 nm was fairly pronounced. The intensity of the shoulder depended on the age of the algae culture and on the irradiance during cultivation, and it increased with increasing Chl concentration. The formation of this band began when some threshold level of LHCPII was achieved, or, perhaps, the band belonged to the aggregate of this complex. The appearance and an increase of a similar band in the fluorescence spectrum of proteoliposomes containing LHCPII with an increase of the protein/lipid ratio (Ryrie *et al.* 1980) is in line with the second hypothesis. The other long-wavelength emission band of VF5-16, located at about 743 nm seemed by its position and intensity to be a vibrational sublevel of the man emission band.

The fluorescence excitation spectra of all three bands in VF5-16 were close to each other and to the excitation spectrum of F680 in the VF5 mutant (Fig. 3). Emission at 680 nm thus seems to belong to the same complex (LHCPII) in both mutants. The long-wavelength carotenoids and Chl *a* were not necessary for the formation of the 699 nm band.

The fluorescence decay kinetics of the VF5-16 mutant at 680 nm consisted of two components with lifetimes of 100 and 1700 ps and amplitudes of 8.1 and 0.6. Both the components were the same as those found for LHCPII in VF5. The lifetimes of VF5-16 fluorescence did not depend on the wavelength of the exciting radiation (337 or 435 nm) and on the emission wavelength (680, 700 or 720 nm). Some increase in the amplitude of the slower component was seen at 700 nm, but it was too small to be analysed.

DISCUSSION

The low-temperature absorption and fluorescence excitation spectra of the emission bands of the VF5 and VF5-16 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* showed that all LHCPs were composed mostly of the same pigment structural units. These units included three spectral bands of Chl *a* (A659, A666, A676) and one band of Chl *b* (A647).

The emission of the units was located at 681 nm and came from the longest wavelength of the Chl *a* bands. The units existed in LHCPs in two quite different states: low-fluorescent (with a short lifetime), and high-fluorescent (with a long lifetime). The amplitude of the kinetic components showed the concentration of the low-fluorescent unit to be more than 90 % of the total of the structural units, and the efficiency of quenching calculated by the difference in their lifetimes was more than 95 %. Thus, there should be a very efficient energy transfer within LHCPs, and the low-fluorescent units might serve as an intramolecular antenna for the high-fluorescent units. The kinetics of ps absorption changes of isolated LHCPs (Gillbro *et al.* 1985) agrees with this conclusion.

The difference in the excitation spectra of the fluorescence bands at 681 and 706 nm showed that LHCPO and LHCPII differed not only in polypeptide composition, but also in pigment structural units. The unique features of the LHCPO are the long-wavelength absorbing bands of Chl *a* and carotenoids with the absorption maximum at 510 nm. These differences lead to some delay of the singlet excited state de-activation of high-fluorescent units, but the efficiency of the intramolecular energy transfer from the antenna system did not change.

The lack of correlation between the decay kinetics of the 680 nm fluorescence and the presence of LHCPO showed that there was little or no energy transfer between LHCPII and LHCPO. Even if we took into consideration the existence of an intermediate decay component in the VF5 mutant at 680 nm, whose concentration was up to 2/3 of the total of the slow decay components, the efficiency of the energy transfer between the complexes made no more than 14 %.

Our results showed the presence *in situ* of three different types of LHCPs with the emission maxima at 681, 699, and 706 nm, respectively. The complexes were made mostly of the same pigment structural units, and in LHCPO specific states of Chl and carotenoids were formed. The emission at 700 nm probably belonged to the aggregated state of LHCPII. There was a very efficient energy transfer within the complexes, but a small energy transfer between LHCPII and LHCPO.

REFERENCES

Brecht, E.: The light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-protein complex II of higher plants: results from a twenty-year research period. — Photobiochem. Photobiophys. **12**: 37—50, 1986.

Garnier, J., Maroc, J., Guyon, D.: Low-temperature fluorescence emission spectra and chlorophyll-protein complexes in mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for a new chlorophyll-*a*-protein complex related to Photosystem I. — Biochim. biophys. Acta **857**: 395—406, 1986.

Gillbro, T., Sundström, V., Sandström, A., Spangfort, M., Andersson, B.: Energy transfer within the isolated light-harvesting chlorophyll *a*/*b* protein of photosystem II (LHC-II). — FEBS Lett. **193**: 267—270, 1985.

Gulotty, R. J., Mets, L., Alberte, R. S., Fleming, G. R.: Picosecond fluorescence study of photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: Origin of the fluorescence decay kinetics of chloroplasts. — Photochem. Photobiol. **41**: 487—496, 1985.

Haehnel, W., Holzwarth, A. R., Wendler, J.: Picosecond fluorescence kinetics and energy transfer in the antenna chlorophylls of green algae. — Photochem. Photobiol. **37**: 435—443, 1983.

Holzwarth, A. R., Wendler, J., Haehnel, W.: Time-resolved picosecond fluorescence spectra of the antenna chlorophylls in *Chlorella vulgaris*. Resolution of photosystem I fluorescence. — Biochim. biophys. Acta **807**: 155—167, 1985.

Karukstis, K. K., Sauer, K.: Fluorescence decay kinetics of chlorophyll in photosynthetic membranes. — J. cell. Biochem. **23**: 131—158, 1983.

Ladygin, V. G.: Spektral'nye formy khlorofilla mutantov *Chlamydomonas* s neaktivnymi fotosistemami. [Chlorophyll spectral forms of *Chlamydomonas* mutants with inactive photosystems.] — Biofizika **24**: 254—259, 1979.

Ladygin, V. G., Lebedev, N. N.: Spektry fluorestsentsii khlorofilla fotosistemy 1, fotosistemy 2 i svetosobirayushchego kompleksa v kletkakh *Chlamydomonas reinhardii*. [Fluorescence spectra of chlorophyll of photosystem 1, photosystem 2 and light-harvesting complex in *Chlamydomonas reinhardii* cells.] — Mol. Biol. (Moskva) **20**: 407—414, 1986.

Lebedev, N. N., Šiffel, P., Krasnovskiĭ, A. A.: Detection of protochlorophyllide forms in irradiated green leaves and chloroplasts by difference fluorescence spectroscopy at 77 K. — Photosynthetica **19**: 183—187, 1985.

Li, T.-Z., Lou, S.-Q., Lim, S.-Q., Kuang, T.-Y.: Organization of reaction center and internal and peripheral antennae chlorophyll-protein complexes of Photosystem II. — Photobiochem. Photobiophys. **11**: 19—28, 1986.

Moya, I., Garcia, R.: Phase fluorimetric lifetime spectra. I. In algal cells at 77 K. — Biochim. biophys. Acta **722**: 480—491, 1983.

Murphy, D. J.: The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. — Biochim. biophys. Acta **864**: 33—94, 1986.

Nakatani, H. Y., Ke, B., Dolan, E., Arntzen, C. J.: Identity of the photosystem II reaction center polypeptide. — Biochim. biophys. Acta **765**: 347—352, 1984.

O'Connor, D. V., Phillips, D.: Time-Correlated Single Photon Counting. — Academic Press, London — New York 1984.

Paschenko, V. Z., Tusov, V. B., Korvatovskiĭ, B. N., Rubin, L. B.: Pikosekundnaya fluorometriya polos 685, 695, 720, 732 i 750 nm khloroplastov gorokha pri nizkoĭ temperature. [Picosecond fluorometry of 685, 695, 720, 732 and 750 nm emission bands in pea chloroplasts at low temperature.] — Dokl. Akad. Nauk SSSR **260**: 489—493, 1981.

Ryrie, I. J., Anderson, J. M., Goodchild, D. J.: The role of the light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-protein complex in chloroplast membrane stacking. Cation-induced aggregation of reconstituted proteoliposomes. — Eur. J. Biochem. **107**: 345—354, 1980.

Satoh, K., Butler, W. L.: Low-temperature spectral properties of subchloroplast fractions purified from spinach. — Plant Physiol. **61**: 373—379, 1978.

Wellburn, A. R., Lichtenthaler, H.: Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. — In: Sybesma, C. (ed.): Advances in Photosynthesis Research. Vol. II. Pp. 9—12. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague — Boston — Lancaster 1984.

Wollman, F. A., Bennoun, P.: A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Biochim. biophys. Acta **680**: 352—360, 1982.

Zuber, H.: Structure and function of light-harvesting complexes and their polypeptides. — Photochem. Photobiol. **42**: 821—844, 1985.

Volume 234, number 1, 111–114 FEB 05986 July 1988

Efficient photoinduced electron transfer from inorganic semiconductor TiO_2 to bacterial hydrogenase

V.V. Nikandrov, M.A. Shlyk, N.A. Zorin, I.N. Gogotov and A.A. Krasnovsky

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leninsky Prospekt, 33, 117071 Moscow, USSR

Received 15 April 1988

Hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* adsorbed on TiO_2 particles, using electrons photogenerated in the conduction band of the semiconductor, in the presence of an organic electron donor, carries out hydrogen production with the rate comparable to that obtained with reduced methyl viologen as the substrate. Under conditions of the efficient hydrogenase adsorption on TiO_2 (1.6 mM $CaCl_2$, 0.05 M Tris buffer, pH 7.2) the quantum efficiency of hydrogen photoproduction is up to 10%. Coupling of inorganic semiconductors with bacterial hydrogenase may be regarded as a way to the development of artificial photocatalytic systems of light energy conversion.

Hydrogen photoproduction; Titanium dioxide; Hydrogenase; Solar energy conversion

1. INTRODUCTION

The coupling of the inorganic semiconductors capable to generate, under irradiation, electron-donor and electron-acceptor centres at the phase boundary with the enzymes providing reactions which involve photogenerated charges, is a possible approach to the development of photocatalytic systems of solar energy conversion.

Previously, in our laboratory hydrogen photoevolution was revealed in aqueous suspensions of TiO_2, ZnO, CdS containing electron donor, bacterial hydrogenase and methyl viologen [1–4]. Also the possibility of TiO_2 coupling with *Clostridia* cells containing hydrogenase was found [5,6]. Cuendet et al. studied H_2 photoproduction in similar systems with bacterial hydrogenases immobilized on TiO_2 particles [7,8]. Recently, NAD(P) photoreduction and photosynthesis of organic and amino acids in semiconductor suspensions containing enzymes were reported [9]. In the systems investigated the electron transfer from semiconductor to the enzyme was provided by electron mediators: methyl viologen (MV^{2+}), *Rhodium bipyridyl* complexes, etc.

In suspensions of TiO_2 and ZnO a low efficient H_2 photoproduction was observed in the absence of electron mediator [1,3–6], which indicated a direct electron transfer from the semiconductor to the active centre of the enzyme. The possibility of H_2 photoproduction in the absence of electron mediator in TiO_2 suspensions containing electron donors and bacterial hydrogenases was also confirmed by other authors [8]. It remains, however, unclear whether an effective energy conversion can be achieved in the case of the mediator-less coupling of the enzyme with the semiconductor.

In the present paper the conditions of the direct photoinduced electron transfer from TiO_2 particles to hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* which provide hydrogen photoproduction with quantum efficiency up to 10% were established.

2. MATERIALS AND METHODS

In the experiments dispersed TiO_2 powder (anatase) (8.5 m^2/g) from Fluka and P25 TiO_2 (50 m^2/g) from Degussa were employed. The suspensions of semiconductors were prepared in 0.05 M buffer solution of Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), pH 7.2, and in solutions of sucrose, dithiothreitol and 0.05 M phosphate buffer, pH 7.2.

Correspondence address: V.V. Nikandrov, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leninsky Prospekt, 33, 117071 Moscow, USSR

Published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)
00145793/88/$3.50 © 1988 Federation of European Biochemical Societies

Double distilled water was used. Hydrogenase from phototrophic bacteria *T. roseopersicina*, strain BBC, was isolated and purified according to the procedure described [10]. Hydrogenase activity when assayed at 20°C was 2.4 μl $H_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$ in the reaction mixture containing: hydrogenase, 0.6 mg protein per ml; MV^{2+}, 2 mM; potassium dithionite, 30 mM; 0.05 M Tris buffer, pH 7.2.

To measure the amount of the evolving H_2, 1 ml of semiconductor suspension containing 33 mg TiO_2 or 12 mg P25 TiO_2 and 0.6 mg hydrogenase was placed in a glass vial fitted with crimped rubber septa. The suspensions were deoxygenated by flushing with argon, and then irradiated with a Hg lamp in the region 320–800 nm (2.8×10^5 erg $\cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$) or Hg lines 365 nm ($1 \times 10^4$ erg $\cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$) under stirring. Hydrogen evolved was assayed by gas chromatography using molecular sieve 5 Å column. Light intensity was measured with a ferrioxalate actinometer. Calculating the quantum yield of H_2 photoproduction, we assumed the incident light (365 nm) to be completely absorbed by the semiconductor suspension.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Under irradiation of TiO_2 suspension containing hydrogenase and Tris buffer as electron donor, H_2 was produced (table 1). This is in good agreement with the data of our previous studies [1]. However, the reaction rate under these conditions was by two orders lower than that in the presence of MV^{2+} as electron mediator. This, apparently, was accounted for by the low efficiency of the direct transfer of the photogenerated electrons from semiconducting particles to the enzyme molecules.

We studied the influence of the chlorides of mono- and bivalent metals on H_2 photoproduction in the absence of electron mediator. It was observed that $CaCl_2$ addition significantly enhanced the rate of the mediator-less H_2 production (fig.1). The rate dependence on $CaCl_2$ concentration is rather complicated (fig.2). At the optimal $CaCl_2$ concentration (1.6 mM) the rate of H_2 photoproduction is comparable with that observed in the presence of MV^{2+}, and with the rate of dark H_2 production from MV^{2+} reduced by dithionite (table 1). It should be noted that $CaCl_2$ also activated H_2 production in the case when MV^{2+} was present in the suspension. However, in the presence of MV^{2+}, 1.6 mM $CaCl_2$ caused only 3-fold increase in the reaction rate, while without electron mediator the increase was greater than 30-fold.

Table 1

Hydrogen photoproduction in TiO_2 suspensions

No.	System content	H_2 photoproduction rate ($\mu l \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$)
1	TiO_2 + hydrogenase	0.05
2	TiO_2 + hydrogenase + MV^{2+} [a]	3.1
3	TiO_2 + hydrogenase + Ca^{2+} [a]	1.7
4	TiO_2 + hydrogenase + Ca^{2+} + MV^{2+}	5.0
5	TiO_2	<0.01
6	TiO_2 + Ca^{2+}	<0.01
7	Dithionite + MV^{2+} + hydrogenase[b]	2.4

[a] MV^{2+} (0.5 mM) and Ca^{2+} (1.6 mM) were added 20 min after irradiation of the system TiO_2 + hydrogenase

[b] Without irradiation

Experimental conditions are given in the text

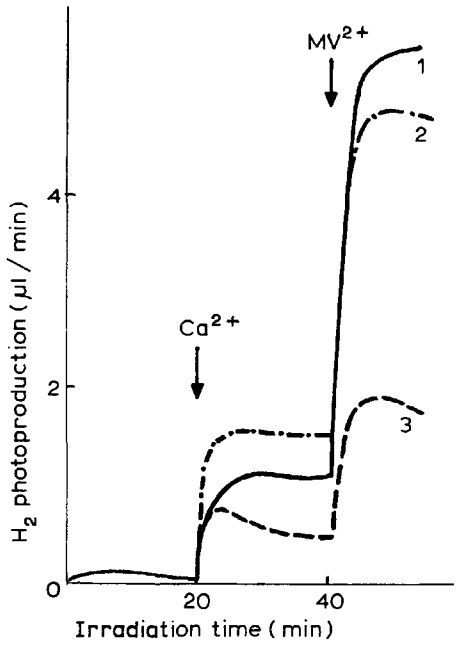


Fig.1. Hydrogen photoproduction in the system Tris-TiO_2 hydrogenase. Arrows indicate additions of $CaCl_2$ (1, 0.4 mM; 2, 1.6 mM; 3, 12.5 mM) and MV^{2+} (0.5 mM).

The dependence of H_2 photoproduction rate on light intensity is non-linear in the system Tris-TiO_2 hydrogenase with 1.6 mM $CaCl_2$ (fig.3). At the light intensity 1×10^3 erg $\cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ (365 nm) the quantum yield of H_2 photoproduction was shown to be $9 \pm 0.9\%$. It is important that the reaction is not saturated within a broad light intensity range. This testifies to a sufficient electron flow out of the conduction band of the semiconductor to hydrogenase in the absence of electron mediator.

Activation of H_2 photoproduction by $CaCl_2$ was

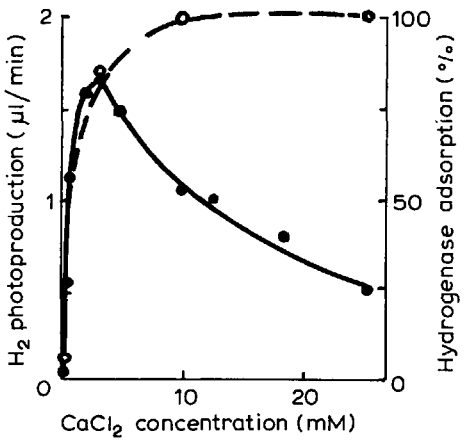


Fig.2. The dependence of hydrogen photoproduction rate (•) and hydrogenase adsorption (○) upon $CaCl_2$ concentration in the system Tris-TiO_2 hydrogenase.

observed not only with Tris buffer as electron donor but with sucrose, or dithiothreitol, or methanol as well, and in the absence of exogenous organic electron donors. In the latter case H_2 photoproduction was significantly lowered and decreased to zero during irradiation. $BaCl_2$, like $CaCl_2$, enhanced the rate of H_2 photoproduction by a factor of about 30. Chlorides of monovalent metals: NaCl, KCl, CsCl at concentrations up to 30 mM increased the reaction rate only 2-fold in the system Tris-TiO_2 hydrogenase.

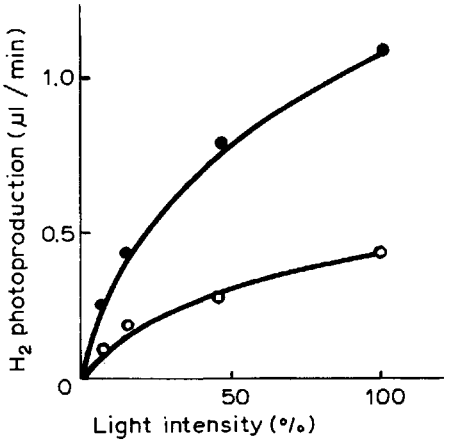


Fig.3. Hydrogen photoproduction in the system Tris-TiO_2 hydrogenase in the presence of 1.6 mM $CaCl_2$ as dependent on light intensity, under irradiation with light of mercury lines 320–800 nm, 100% is 2.8×10^5 erg·cm^{-2}·s^{-1} (•) or 365 nm, 100% is 1×10^4 erg·cm^{-2}·s^{-1} (○).

The data obtained show the activation effect of a salt on H_2 photoproduction to be accounted for by the valency and concentration of the cation and not by changes in the ionic strength.

Experiments using 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) showed the phosphate ions to suppress H_2 photoproduction almost completely in the system consisting of TiO_2, hydrogenase, and 0.5 M sucrose as an electron donor. At the same time, when TiO_2 was coupled with hydrogenase via MV^{2+}, phosphate decreased the rate of H_2 photoproduction only by a factor of 1.5–2.

When a different sample of titanium dioxide P25 TiO_2 (Degussa) was employed in phosphate buffer containing electron donor and hydrogenase, H_2 photoproduction in the absence of MV^{2+} also proceeded at a low rate (<0.01 μl $H_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$). The difference of this sample from Fluka TiO_2 was manifested when the reaction was conducted in Tris buffer. In the system Trs-P25 TiO_2 hydrogenase a high rate of H_2 photoproduction was achieved (1.0–1.5 μl $H_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$). MV^{2+} enhanced the reaction rate only 1.5–2-fold, and the addition of $CaCl_2$ led to a small decrease in H_2 photoproduction rate.

It follows from the analysis of the data on hydrogenase adsorption (fig.2, table 2) and on H_2 photoproduction in suspensions of TiO_2 and P25 TiO_2, that the effective H_2 photoproduction in the absence of electron mediator proceeds under the conditions which provide hydrogenase binding with the semiconductor. Indeed, both hydrogenase adsorption on the semiconducting particles (table 2) and the mediator-less H_2 photoproduction are accelerated by Tris addition to water suspensions of TiO_2 or P25 TiO_2 and suppressed in the presence of phosphate. H_2 photoproduction in the absence of electron mediator and hydrogenase binding with semiconductor (fig.2) were similarly enhanced by $CaCl_2$ at concentrations up to 2 mM in TiO_2 suspensions with Tris buffer. Thus, activation of H_2 photoproduction by $CaCl_2$ is connected with its ability to provide hydrogenase adsorption on TiO_2. With the data obtained it is not yet possible to explain the decrease in H_2 photoproduction rate at $CaCl_2$ concentrations higher than 2 mM, when the total of hydrogenase is bound with the semiconductor. Perhaps this is conditioned by coagulation of the semiconducting particles or by the increase in the ionic strength. The increased ef-

Table 2

Adsorption of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* on TiO_2 and P25 TiO_2

Medium content	Adsorbed hydrogenase (%)	
	TiO_2	P25 TiO_2
H_2O	1	65
Tris buffer, pH 7.2	6	100
Tris buffer, pH 7.2, $CaCl_2$, 10 mM	100	100
Phosphate buffer, pH 7.2	–	4

ficiency of the mediator-less H_2 photoproduction in P25 TiO_2 suspensions is accounted for by the fact that P25 TiO_2 particles in Tris-buffer adsorb the total of hydrogenase, while TiO_2 particles adsorb only 6% of the hydrogenase.

The ability of TiO_2 to adsorb proteins has been already reported [11,12]. It was also shown that bacterial hydrogenases bound firmly to TiO_2 [7]. The authors made an assumption of hydrogen bond formation between the enzyme and the surface groups of the semiconductor [7]. The data on the properties of TiO_2 surface [13] and the data of the present paper allow one to assume that the binding of hydrogenase from *T. roseopersicina* with TiO_2 in our experiments is conditioned mainly by the electrostatic interactions.

Depending on pH of the solution, the hydrated surface of TiO_2 is charged either positively or negatively due to the amphoteric nature of surface OH groups. The charge of TiO_2 surface is dependent on the sample preparation technique and on the specific adsorption of the ions. The isoelectric point for the purified anatase dispersions is in the pH range 5.0–7.5 [13,14]. Commercial TiO_2 samples have the isoelectric point at pH 3 because of the anion impurities (sulphate, phosphate usually) firmly bound to their surfaces [15]. In our experiments, at pH 7.2 the bivalent cations adsorbed on TiO_2 particles may significantly decrease their negative charge, and, thus, create conditions for binding of hydrogenase whose molecules are negatively charged (p*I* 4.2). Hydrogenase adsorption induced by $CaCl_2$ is reversible. Hydrogenase bound with TiO_2 particles in Tris buffer in the presence of $CaCl_2$ is desorbed on resuspending of TiO_2 sediment in Tris buffer containing no $CaCl_2$. This is in line with the assumption of the electrostatic nature of enzyme-semiconductor interactions. In Tris buffer whose molecules at pH 7.2 are neutral or positively charged, the charge of TiO_2 particles is preserved or becomes more positive. The suppression of hydrogenase adsorption in phosphate buffer may be accounted for by the ability of phosphate anions to bind firmly with TiO_2 surface, increasing the negative charge and occupying the surface centres responsible for hydrogenase adsorption.

The difference in the properties of TiO_2 and P25 TiO_2 may, perhaps, be attributed to the difference in their surface charges. Besides, the highly hydroxylated surface of P25 TiO_2 may have a greater number of the centres available for interactions with protein molecules.

Thus, the data obtained show the possibility of H_2 photoproduction with quantum efficiency up to 10% in the course of direct photoinduced electron transfer from TiO_2 conduction band to the reaction centre of hydrogenase under the conditions providing the enzyme binding to the semiconducting particles.

REFERENCES

[1] Krasnovsky, A.A., Brin, G.P. and Nikandrov, V.V. (1976) Dokl. Akad. Nauk SSSR 229, 990–993.
[2] Krasnovsky, A.A., Brin, G.P., Luganskaya, A.N. and Nikandrov, V.V. (1979) Dokl. Akad. Nauk SSSR 249, 896–899.
[3] Nikandrov, V.V., Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1981) Dokl. Akad. Nauk SSSR 256, 1249–1253.
[4] Nikandrov, V.V., Brin, G.P. and Krasnovsky, A.A. (1983) Photobiochem. Photobiophys. 6, 101–107.
[5] Krasnovsky, A.A., Nikandrov, V.V. and Nikiforova, S.A. (1985) Dokl. Akad. Nauk SSSR 285, 1467–1471.
[6] Krasnovsky, A.A. and Nikandrov, V.V. (1987) FEBS Lett. 219, 93–96.
[7] Cuendet, P., Grätzel, M., Rao, K.K. and Hall, D.O. (1984) Photobiochem. Photobiophys. 7, 331–340.
[8] Cuendet, P., Rao, K.K., Grätzel, M. and Hall, D.O. (1986) Biochimie 68, 217–221.
[9] Willner, I., Mandler, D. and Maidan, R. (1987) Nouv. J. Chim. II, 109–121.
[10] Zorin, N.A. and Gogotov, I.N. (1982) Biokhimiya 47, 827–833.
[11] Glueckauf, E. and Patterson, L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 351, 57–76.
[12] Messing, R.A. (1976) in: Methods in Enzymology (Mosbach, K. ed.) vol.44, p.148, Academic Press, New York.
[13] Kalyanasundaram, K. (1986) in: Energy Resources through Photochemistry and Catalysis (Grätzel, M. ed.) pp.241–287, Izd. Mir, Moscow.
[14] Healy, T.W. (1965) J. Coll. Sci. 20, 376.
[15] Bobyrenko, Yu.Ya. (1973) Colloid J. 33, 803–806.

БИОФИЗИКА

Том XXXIV, вып. 1 1989

ХРОНИКА

О РАБОТЕ ЖУРНАЛА «БИОФИЗИКА» ЗА 10 ЛЕТ

В связи с истечением 10-летнего срока работы редколлегии мне хотелось бы поделиться с читателями впечатлениями о нашей работе.

Рабочий орган журнала — редколлегия была сформирована в 1978 г. из биофизиков ведущих учреждений — институтов Академии наук СССР: биофизики, химической физики, молекулярной биологии и цитологии, Института фотобиологии АН БССР, кафедр биофизики биологического и физического факультетов МГУ, кафедры биофизики 2-го Мединститута. Редакционный совет, состоящий из авторитетных ученых, был консультативным органом.

Редколлегия унаследовала чрезвычайно перегруженный портфель и потому в первый год работы пришлось затратить много сил для депонирования накопившихся статей в ВИНИТИ, чтобы обеспечить разумные сроки публикации вновь поступающих статей. До сих пор журнал депонирует в ВИНИТИ более 10% статей.

Наряду с экспериментальными и теоретическими статьями редколлегия считала необходимым публикацию обзоров по наиболее актуальным проблемам биофизики. Существуют раздел писем в редакцию и раздел дискуссий. В журнале сохранились три традиционных раздела по уровню организации: молекулярная, клеточная и биофизика сложных систем.

Объем журнала (6 номеров в год по 12 печатных листов) за истекшее десятилетие остался неизменным, несмотря на то что за это время чрезвычайно возросло число научных и учебных заведений биофизического профиля. Поэтому объем принимаемых статей ограничен семью страницами, т. е. близок к объему статей, принимаемых в Доклады Академии наук СССР. Несмотря на открытие новых журналов близкого профиля («Биологические мембраны», «Журнал химической физики», «Сенсорные системы»), портфель журнала перегружен. Нам не удалось добиться от Президиума Академии наук увеличения объема журнала, и это остается насущной проблемой, которую должна решить новая редколлегия.

За истекшее десятилетие количество поступающих статей колебалось от 300 до 400 в год с явным ростом за последние 3 года. Так, в 1986 и 1987 гг. поступило приблизительно по 450 статей. В год осуществляется 250—280 публикаций во всех формах — статьи, письма в редакцию, дискуссии, обзоры и резюме депонированных статей. Количество отклоненных статей составляет 70—100 в год, т. е. лишь около 25% от числа поступивших статей, а количество депонированных статей — около 50 в год, т. е. 10—15%. Относительно малое количество отклоненных статей свидетельствует о недостаточной требовательности нашей редколлегии. В результате этого происходит накопление статей в портфеле редакции и средний срок публикации, к сожалению, значительно превышает 1 год. Мы пытаемся публиковать приоритетные работы и письма в более короткие сроки.

Рассмотрим поступление статей из разных регионов Советского Союза за последние 5 лет. На долю учреждений Москвы приходится 46% всех опубликованных статей, Московской области — 19%, Ленинграда — 5%, других городов РСФСР — 2,2%, Сибири и Дальнего Востока — 5,2%, УССР — 6,2%, БССР — 3,3%, республик Закавказья — 7,4%, республик Средней Азии и Казахстана — 2,3%, прибалтийских республик — 1,4%, зарубежных стран — 2,0%.

По ведомственному принципу статьи распределяются следующим образом: учреждения Академии наук СССР — 43,4% публикаций, академий наук союзных республик — 12,5%, университеты — 20%, медицинские учреждения и медвузы — 12,5%, отраслевые институты и вузы — 11,6%. Среди учреждений АН СССР доминируют Институт химической физики (25%) и Институт биофизики (22%), на их долю приходится почти половина статей всех институтов Академии наук СССР (т. е. около 20% от всех публикаций).

Среди университетов доминирует Московский университет — 63% (приблизительно половина работ — от биологического факультета), Ленинградский университет далеко отстает от МГУ (6%), на долю остальных университетов страны приходится 31% публикаций.

Предметом оживленной дискуссии на заседаниях редколлегии всегда был вопрос профиля статей и всего журнала в целом. Исторически сложилось так, что границы биофизики как науки чрезвычайно размыты, что особенно отчетливо видно на примере программы международных биофизических съездов. Не всегда легко найти границы между физиологией и биофизикой, разнообразными физико-химическими проблемами биологии и молекулярной биологией. Кроме того, журналу приходилось публиковать статьи по математическому моделированию биологических процессов, которые не могли найти места в журналах другого профиля.

Содержание каждого номера журнала утверждалось на заседании редакционной коллегии.

Я думаю, что новому составу редколлегии следует серьезно обсудить вопрос о «научных границах» журнала и разделения тематики с другими журналами Отделения. Пока, к сожалению, научный профиль журнала слишком широк для реального объема, которым журнал располагает.

Журнал уделял внимание научным дискуссиям и обсуждению ряда спорных научных проблем. К сожалению, мы не смогли обеспечить полное рецензирование всех выходящих в СССР книг и учебных пособий по биофизике.

Журнал достаточно популярен в СССР и за рубежом; он целиком переводится на английский язык издательством Пергамон Пресс. Средний индекс цитирования статей журнала (по Гарфильду) за 1980—1984 гг. достаточно велик — среди советских журналов биологического профиля он занимает второе место (после журнала «Биоорганическая химия»).

Я надеюсь, что новая редколлегия приложит усилия для устранения недостатков — уточнения разумного научного профиля журнала, проявит необходимую жесткость в отборе статей, примет решительные меры для увеличения объема журнала и сокращения сроков публикации.

В условиях перестройки и гласности возрастает роль научных журналов, которые являются действенным средством координации исследований внутри Союза и определяют лицо советской науки за рубежами нашей страны.

В заключение я хочу выразить глубокую благодарность моим заместителям, ответственному секретарю, членам редколлегии, заведующей редакцией и рецензентам журнала.

Желаю дружной работы новому составу редколлегии.

А. А. Красновский

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Информация Всесоюзного агентства по авторским правам (ВААП)

С 1 июля 1988 г. изменен порядок расчетов с авторами по гонорарам за перепечатание за рубежом советских научно-технических журналов, в этой связи изменился и порядок оформления документов на получение авторского гонорара.

Выплата гонорара производится по желанию автора в рублях, либо путем зачисления причитающейся суммы гонорара на текущий инвалютный счет автора в соответствующем банке (с такого счета автор может использовать средства при поездке за рубеж, а также для покупки товаров по безналичному расчету).

Перед направлением в ВААП справки-заявления на выплату гонорара, автору следует обратиться в Валютное управление ВААП по телефонам: 203-59-53; 203-38-49, или почтой по адресу: 103670 г. Москва К-104, ул. Б. Бронная, 6-а. По запросу автора Агентство вышлет в его адрес подробную информацию с формами документов, необходимых для расчета по поступившему из-за рубежа гонорару.

Валютное управление ВААП

Ответственный секретарь журнала Н. Г. ЕСИПОВА

Адрес редакции: 107120, Москва, ул. Обуха, 10, НИФХИ им. Л. Я. Карпова

Телефон 227-38-18

Зав. редакцией *М. А. Левитас*

Технический редактор *Ларкина Е. Н.*

Сдано в набор 10.11.88 Подписано к печати 12.01.89 Т-00216 Формат бумаги 70×108¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 15,4 Усл. кр.-отт. 25,8 тыс. Уч.-изд. л. 17,5 Бум. л. 5,5
Тираж 1648 экз. Зак. 4755 Цена 2 р. 10 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6

Воспоминания
о В.А.ЭНГЕЛЬГАРДТЕ

Ответственный редактор
академик
А. А. БАЕВ



МОСКВА
«НАУКА»
1989

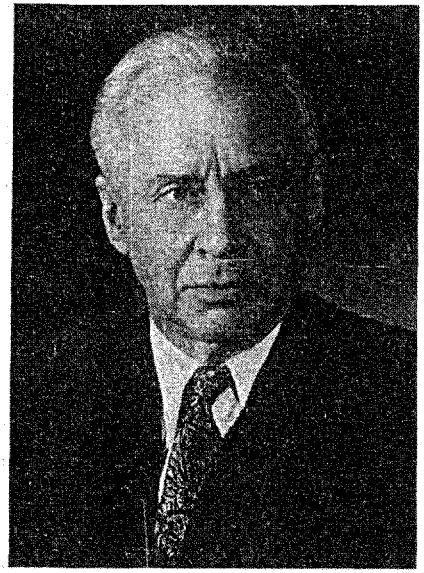
А. А. Красновский

УДИВИТЕЛЬНАЯ ЭРУДИЦИЯ

В марте 1944 г. мой учитель академик А. Н. Теренин ввел меня в дом 33 по Ленинскому проспекту, и мы поднялись на 2-й этаж в кабинет Владимира Александровича Энгельгардта, который тогда исполнял обязанности директора Института биохимии. Александр Николаевич представил меня Владимиру Александровичу как докторанта, прикомандированного к Институту биохимии. Владимир Александрович, узнав, что я инженер-химик, посмотрел на меня с некоторым скепсисом, но тем не менее, уважая Теренина, предложил мне рассказать о своих научных планах в институте. Меня интересовало применение спектральных методов к изучению фотохимических свойств хлорофилла, но моя биохимическая эрудиция была в то время крайне мала. Александр Николаевич сказал, что неясно, в какую лабораторию меня следует определить, и Владимир Александрович ответил, что пока я могу работать в комнате с Милицей Николаевной Любимовой, его женой, которая обладала чрезвычайным по тому времени богатством — прибором Варбурга с полным комплектом сосудиков.

Владимир Александрович и Милица Николаевна отнеслись ко мне с большой добротой и даже позволили мне работать на приборе Варбурга. Я хорошо понимал, что если разобью какой-нибудь сосудик, то недолго продержусь в этой лаборатории. К счастью, все сосуды остались целы, и Владимир Александрович неоднократно в долгих беседах пытался направить меня на биохимический путь. В то время он с Милицей Николаевной открыл АТРазную активность миозина, а незадолго до этого — окислительное фосфорилирование. Понятно, что, по его представлениям, АТР должен был принимать участие и в фотобиологических процессах, таких, как фотосинтез и зрение, и он пытался ориентировать мою работу в этом направлении. «Вы бы посмотрели, образуется ли АТР в хлоропластах»,— часто говорил Владимир Александрович.

К сожалению, в то время я плохо представлял себе, что такое хлоропласты, и пытался уговорить Владимира Александровича, что надо понять, как работает изолированный хлорофилл в искусственных фотохимических системах, а затем уже переходить к хлоропластам. Это было моей большой ошибкой, потому что в



В А Энгельгардт (60-е годы)

1954 г. Д. Арнон открыл фотосинтетическое фосфорилирование. Владимир Александрович все же изложил свои взгляды в докладе на сессии Академии наук в 1947 г., хотя доказать это в прямых экспериментах тогда не удалось Владимир Александрович не упустил случая после работ Арнона (а он прекрасно знал литературу) напомнить мне о наших грехах.

Что касается зрительного процесса, то здесь была Татьяна Владимировна Венкстерн, которой и было поручено заняться этой, как мне кажется, до сих пор не решенной проблемой, хотя генерация АТР бактериородопсином является сейчас предметом интереса десятков лабораторий.

Желая ликвидировать мою биохимическую отсталость, Владимир Александрович Энгельгардт поручил мне перевести статьи Очоа, Гаффрона, Калькара и Михаэлиса в изданном под его редакцией сборнике «Проблемы биохимии», вышедшем в 1948 г., а также снабдить их достаточно обширными комментариями. Я думаю, это был едва ли не первый перевод зарубежного биохимического издания после Великой Отечественной войны. Владимир Александрович был чрезвычайно требовательным и внимательным редактором. Некоторые не удовлетворявшие его предложения он полностью переделывал. Знакомство с этими статьями было для меня очень полезно, так как мне удалось усвоить из статьи Очоа участие NAD в темновых реакциях ассимиляции углекислоты. Отсюда мне стало ясно, что следует ожидать фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления NAD при фотосинтезе. Действительно, уже через год после этого разговора в опытах с Галиной Петровной Брин мы обнаружили фотосенсибилизированное хлорофиллом восстановление NAD в растворе и опубликовали эту работу в 1949 г. в Докладах Академии наук. Через два года в трех американских лабораториях было обнаружено восстановление NAD в хлоропластах, и это доныне является одним из основных положений фотосинтеза.

В те годы штат Института биохимии не превышал 30—40 человек. Владимир Александрович Энгельгардт проводил регулярные научные коллоквиумы, на которых свободно и живо обсуждались насущные проблемы биохимии в очень широком диапазоне. Вспомним, что в те времена в институте работали В. Н. Букин,



Слева направо: Н. М. Сисакян, А. Л. Курсанов, В. Л. Кретович, В. А. Энгельгардт, А. А. Красновский (стоит), В. Н. Букин. Институт биохимии им А. Н. Баха АН СССР (конец 40-х годов)

Н. Н. Дьячков, Д. М. Михлин, В. Л. Кретович, А. Л. Курсанов, Н. М. Сисакян, Д. Л. Талмуд и многие другие; из Ленинграда часто приезжал А. Н. Теренин; несколько позже из эвакуации вернулся А. И. Опарин и взял на себя руководство институтом. При общении с Владимиром Александровичем меня поражала его терпимость к взглядам, которые далеко не всегда соответствовали его точке зрения, его удивительная эрудиция и умение вникать в детали эксперимента.

Владимир Александрович и его семья жили тогда в старом доме за Большим театром. Владимир Александрович иногда приглашал нас, сотрудников своей маленькой лаборатории, к себе домой. Мы наслаждались чаем с сахаром и белыми булками (по тем временам — изысканным лакомством) и чувствовали себя достаточно непринужденно, хотя Владимир Александрович в наших глазах был старым профессором (в то время ему не было еще 50 лет) и его научный авторитет всегда оставался непререкаемым.

Я помню, как в 40-х годах П. Л. Капица пригласил Владимира Александровича для доклада на своем семинаре, на знаменитом «капичнике», на тему о превращении химической энергии в механическую в мышцах. Владимир Александрович сказал, считая меня наиболее близким к физикохимии из числа сотрудников своей лаборатории: «Пойдемте, послушаете, как физики будут меня честить». В. А. Энгельгардт сделал блестящий доклад, сжатый и ясный, и физики долго его «честили», пытаясь понять, как

энергия гидролиза АТР приводит к сокращению мышцы и как происходит обратная релаксация мышечных волокон. Владимир Александрович был особенно ярок в дискуссионных выступлениях, когда мгновенно реализовывались все запасы его громадной эрудиции.

После возвращения А. И. Опарина в Москву Владимир Александрович перешел работать в Институт физиологии им. И. П. Павлова, хотя его лаборатория оставалась в здании Института биохимии. Наша группа (в которую в это время входила уже Г. П. Брин, рекомендованная А. Н. Теренину академиком Казанским; годом позже после демобилизации пришел В. Б. Евстигнеев) с 1948 г. стала именоваться лабораторией фотобиохимии. Нам дали отдельную комнату недалеко от лаборатории Владимира Александровича, и мы получили свой трофейный прибор Варбурга, который существует и доныне. Таким образом, я, к сожалению, вышел из непосредственного контакта с Владимиром Александровичем и его лабораторией, но в течение многих лет мы были тесно связаны на всех «перекрестках» нашей биохимии.

В 1958 г. Владимиру Александровичу было поручено организовать Институт радиационной и физико-химической биологии, который потом превратился в Институт молекулярной биологии, и, естественно, его контакты с Институтом биохимии стали меньше. Когда он был назначен академиком-секретарем Отделения, его влияние на развитие молекулярной биохимии в нашей стране было громадным, и мы все опирались на его помощь и поддержку. Уже гораздо позже мне пришлось участвовать в обследовании его института, и я смог воочию увидеть блестящие результаты его усилий.

Владимир Александрович всегда был добр ко мне. Через 40 лет после нашего знакомства, будучи очень больным, он нашел в себе силы прийти на заседание ученого совета Института биохимии, посвященное, увы, не очень приятной для меня дате. Спросив у присутствующих: «А есть ли у вас своя собственная реакция?», он произнес затем в мой адрес очень лестные слова, которые я никогда не забуду. Мне приходилось бывать с Владимиром Александровичем на международных конгрессах, и я хорошо помню громадное уважение, с которым к нему относились в кругах международной биохимической общественности.

Часто вспоминаю его стройную худощавую фигуру, терпение и непоколебимую выдержку при потере Милицы Николаевны и в борьбе со своими болезнями. Когда я вхожу в его кабинет, то как будто слышу стук клавиш пишущей машинки. Владимир Александрович распухшими от артрита пальцами печатает очередную статью...

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

© Академик А.А. КРАСНОВСКИЙ,
Т.Е. ПАВЛОВСКАЯ, Т.А. ТЕЛЕГИНА

ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА НА ДВУОКИСИ ТИТАНА: ВОЗМОЖНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Среди возможных путей химической эволюции существенное значение могли иметь фотокаталитические процессы с участием неорганических фоторецепторов, присутствующих в земной коре. В серии работ установлено, что окислы титана, цинка и вольфрама обладают фотосенсибилизирующей активностью в окислительно-восстановительных реакциях, сравнимой с активностью порфиринов [1]. Так, указанные окислы способны фотосенсибилизировать реакции в водной среде, при которых происходит выделение кислорода с одновременным восстановлением экзогенных акцепторов электронов [2, 3]; описано фотокаталитическое выделение водорода в водных суспензиях двуокиси титана в присутствии органических доноров электронов [4].

В литературе описаны фотохимические реакции восстановления с участием фотокатализаторов – полупроводников. Так, на влажной поверхности TiO_2 идет восстановление молекулярного азота до гидразина и аммиака [5], ацетилена до этилена

и этана [5], восстановление двуокиси углерода до метана [6] или до формальдегида, муравьиной кислоты и метилового спирта [7]. Имеется сообщение о том, что песчаные дюны Калифорнии и в настоящее время катализируют конверсию атмосферного азота в аммиак под влиянием солнечного света [8].

Показана возможность образования аминокислот при фотохимических реакциях в присутствии окислов металлов (Fe_2O_3 и других окислов) в системах $CH_4-NH_3-H_2O$ [9] и формальдегид – нитраты [10].

Описаны опыты, в которых показано одновременное фотовосстановление карбоната и молекулярного азота на двуокиси титана [11].

Целью настоящей работы являлось изучение фотовосстановления молекулярного азота в нейтральной водной суспензии двуокиси титана, сопряженное с образованием аминокислот при введении в систему ацетальдегида.

В работе применяли двуокись титана (анатаз) фирмы "Fluka". Этот препарат содержал на поверхности в адсорбированном состоянии незначительные количества аммиака, который, вероятно, образовался в процессе хранения при воздействии света на хемосорбированные молекулы воды и азота. Наиболее эффективным методом очистки поверхности оказалась дегазация при нагревании порошка TiO_2 при 250 °С в вакууме в течение 2 ч.

Суспензию TiO_2 (50 мг) в воде (или в 1% водном растворе ацетальдегида) (50 мл) помещали в сосуды из кварца или пирекса (объемом 60 мл) и освещали на расстоянии 20 см от поверхности жидкости ртутно-кварцевой лампой ПРК-2 (мощность лампы 350 Вт), в спектре которой преобладает линия ртути с длиной волны 365 нм, при постоянном перемешивании и пропускании через суспензию азота особой чистоты с объемной скоростью 60 мл/мин. Используемое нами стекло марки "пирекс" толщиной 2 мм поглощает 50% излучения с длиной волны 317 нм, при этом пропуская более длинноволновое излучение, кварц такой же толщины пропускает более коротковолновое излучение. Интенсивность ультрафиолетового излучения в области 365 нм составляла $3 \cdot 10^5$ эрг/см$^2 \cdot$ с. Время облучения варьировали от 1 до 4 ч, температуру поддерживали при 20–22 °С, обдувая установку воздухом.

Ко всем опытам ставили соответствующие контрольные опыты в темноте.

На выходе из реакционных сосудов находились склянки, наполненные 0,001 *N* серной кислотой, для улавливания аммиака, выходящего с током азота.

Определяли аммиак, находящийся в растворе в облученных сосудах, в адсорбированном состоянии на поверхности TiO_2, а также аммиак, выходящий из облученных сосудов с током азота. Количественные определения аммиака проводили колориметрическим методом с реактивом Несслера и титрованием. Перед определением аммиака из реакционных смесей удаляли частицы TiO_2 центрифугированием при 1500 *g* в течение 20 мин. Аммиак, адсорбирующийся в процессе опыта на поверхности TiO_2, определяли микрометодом Къельдаля, применяя обработку частиц TiO_2 10% NaOH.

Аминокислоты и другие нингидринположительные соединения определяли на анализаторе аминокислот.

Проведено несколько серий опытов, отличающихся друг от друга по составу реакционных смесей и времени облучения.

Обнаружено, что при облучении в течение часа водной суспензии TiO_2 (50 мг), через которую пропускался азот, образуется до 0,3 мкмоль/ч аммиака; с увеличением времени облучения количество аммиака пропорционально возрастает. Квантовый выход синтеза аммиака по приближенной оценке достигает 10^{-3}.

При добавлении в систему бикарбоната натрия до pH 9, т.е. при проведении реакции в щелочных условиях подобно [11], количество образовавшегося аммиака увеличивается примерно в 2 раза, что, вероятно, связано с положительным влиянием отвода продукта реакции – аммиака из зоны реакции, поскольку в щелочных условиях большая часть аммиака выдувается с током азота.

В серии опытов с 1% водным раствором ацетальдегида также наблюдалось образование аммиака, при этом, по-видимому, бóльшая часть синтезированного аммиака вступает в реакцию с ацетальдегидом с образованием различных нингидринположительных соединений, в том числе и аминокислот – аланина, глицина, серина в количестве до 1 нмоль/ч. В контрольных опытах (без TiO_2) при освещении системы с ацетальдегидом аминокислоты не обнаружены.

Квантовый выход синтеза аминокислот не превышает 10^{-6}, т.е. на три порядка ниже квантового выхода образования аммиака. Низкий квантовый выход синтеза аминокислот, очевидно, определяется низкой концентрацией в растворе образующегося аммиака (10^{-6} *M*), вступающего затем в реакцию с ацетальдегидом с образованием аминокислот.

Ранее было показано, что в системе ацетальдегид–соли аммония наблюдается фотохимическое образование ряда аминокислот – глицина, аланина, серина, валина, лейцина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, лизина [12, 13] с квантовым выходом 10^{-3}. При этом следует отметить, что в этих опытах применялась высокая исходная концентрация солей аммония (10^{-1} *M*).

Вероятно, механизм фотохимического синтеза аминокислот из аммиака (или ионов аммония) и ацетальдегида в обоих случаях сходен, но для предварительного образования аммиака из молекулярного азота требуется присутствие фотокатализатора – двуокиси титана.

В серии опытов с ацетальдегидом наблюдается также образование темноокрашенных веществ, которые, вероятно, являются пигментами меланоидинового типа и образуются из ацетальдегида и аммиака подобно тому, как они образовывались при УФ-облучении системы ацетальдегид–соль аммония [14]. Меланоидиновые пигменты могут защищать от фотодеструкции образующиеся аминокислоты.

Таким образом, наблюдалось фотовосстановление молекулярного азота до аммиака в нейтральной водной суспензии TiO_2 и сопряженное образование аминокислот при введении в систему ацетальдегида. Эти наблюдения указывают на возможное участие некоторых неорганических компонентов земной коры в абиогенном фотохимическом синтезе аминокислот.

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

Поступило
17 II 1989

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А.* В сб.: Происхождение жизни и эволюционная биохимия. М.: Наука, 1975. с. 133–144. 2. *Красновский А.А., Брин Г.П.* – ДАН, 1961, т. 139, № 1, с. 142–145. 3. *Красновский А.А., Брин Г.П.* – ДАН, 1962, т. 147, № 3, с. 656–659. 4. *Nikandrov V.V., Brin G.P., Krasnovsky A.A.* – Photobiochem. and Photobiophys., 1983, vol. 6, p. 101–107. 5. *Schrauzer G.N., Guth T.D.* – J. Amer. Chem. Soc., 1977, vol. 99, № 22, p. 7189–7193. 6. *Thampi R.K., Kiwi J., Gratzel M.* – Nature, 1987, vol. 327, № 6122, p. 506–508. 7. *Inoue T., Fusishima A., Konishis S., Nonda K.* – Nature, 1979, vol. 277, № 5688, p. 637–638. 8. *Schrauzer G.N.* – Chem. Eng. News, 1978, vol. 56, № 46, p. 7. 9. *Reiche H., Bard A.J.* – J. Amer. Chem. Soc., 1979, vol. 101, № 11, p. 3127–3128. 10. *Николаев Л.А., Агапова О.Н.* – ЖФХ, 1963, т. 37, № 12, с. 2746–2748. 11. *Monheit D., Grayer S., Godinger N. et al.* In: Proc. Int. Conf. on Photochem. Conversion and Storage of Solar Energy. Osaka, 1984, p. 75. 12. *Телегина Т.А., Павловский Т.Е., Ладыженская А.И.* – Журн. эволюц. биохим. и физиол., т. 10, № 2, с. 129–134. 13. *Павловская Т.Е.* В сб.: Происхождение жизни и эволюционная биохимия. М.: Наука, 1975, с. 239–246. 14. *Телегина Т.А., Павловская Т.Е., Тонгур А.М.* – ДАН, 1980, т. 253, № 4, с. 999–1002.

Доклады Академии наук СССР
1989. Том 304, № 6

УДК 577.355 + 581.17

БИОФИЗИКА

Н.Н. ЛЕБЕДЕВ, ЧАН-ВАН НИ, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

КОРОТКОВОЛНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Со времени обнаружения феофитина в составе функционирующего реакционного центра (РЦ) фотосистемы (ФС) 2 до сих пор не известен механизм его образования in vivo [1, 2]. Более того, хотя реакция образования хлорофилла а из протохлорофиллида детально изучена, данные об образовании других пигментов и механизме сборки различных пигмент-белковых комплексов (ПБК) крайне скудны [3, 4].

Совершенствование методов выделения ПБК позволило идентифицировать полосы флуоресценции фотосинтетического аппарата при 686 и 697 нм, принадлежащие белкам 43 и 47 кДа (внутренней и периферической антенне соответственно), а также выделить РЦ ФС2, который оказался локализованным на Д1-белке [5–8]. Оставалось неясным, каково взаимоотношение между Д1-белком и белком 47 кДа, которому до недавнего времени приписывали функцию РЦ. Ответом на этот вопрос могло бы быть определение состояния обоих белков в целых клетках, однако флуоресценцию белка Д1 in vivo пока зарегистрировать не удалось. Разработка нами методики дифференциального флуоресцентного анализа промежуточных продуктов биосинтеза пигментов на фоне интенсивной люминесценции ПБК фотосинтетического аппарата [9–11] открывала экспериментальный подход к такого рода исследованиям. Исходя из этого, в данной работе с целью идентификации промежуточных продуктов и выяснения механизма сборки ПБК фотосистем мы провели исследование коротковолнового участка спектра флуоресценции адаптированных к темноте целых клеток цианобактерий, у которых, как известно, отсутствует светособирающий комплекс и хлорофилл b, люминесценция которых может мешать определению коротковолновой люминесценции содержащих РЦ ПБК.

Цианобактерии Gloeotrichia raciborski выращивали в течение 3–5 дней в безазотной жидкой среде BG-11 [12] при температуре 20–22 °С и непрерывном освещении люминесцентными лампами (освещенность культуры 3000 л). Собранные клетки наносили ровным слоем на мембранный фильтр "Synpor-3" (диаметр пор 1,5 мкм), отдельные части которого использовали для опытов. Инкубацию образцов в темноте проводили в чашках Петри, содержащих культуральную среду и 0,5 г $\cdot$ л$^{-1}$ хлорамфеникола (фирма "Serva") или 5 м*М* δ-аминолевулиновой кислоты (фирма "Serva"), где указано. Освещение клеток после темновой инкубации проводили светом вольфрамовой лампы при освещенности на поверхности образца 500 л. Измерение низкотемпературных спектров (77К) излучения и возбуждения флуоресценции проводили на установке и по методике [9], без применения глицерина с целыми клетками, нанесенными на мембранный фильтр и погруженными в жидкий азот. Оптическая плотность образцов составляла 0,05–0,1 D.

Инкубация клеток цианобактерий в темноте в течение 18–24 ч не вызывает существенных изменений в их низкотемпературном спектре флуоресценции при возбуждении светом, поглощаемым фикобилиновыми пигментами – 560 нм (рис. 1). Как и у клеток, выращенных на свету, у них наблюдаются интенсивные полосы

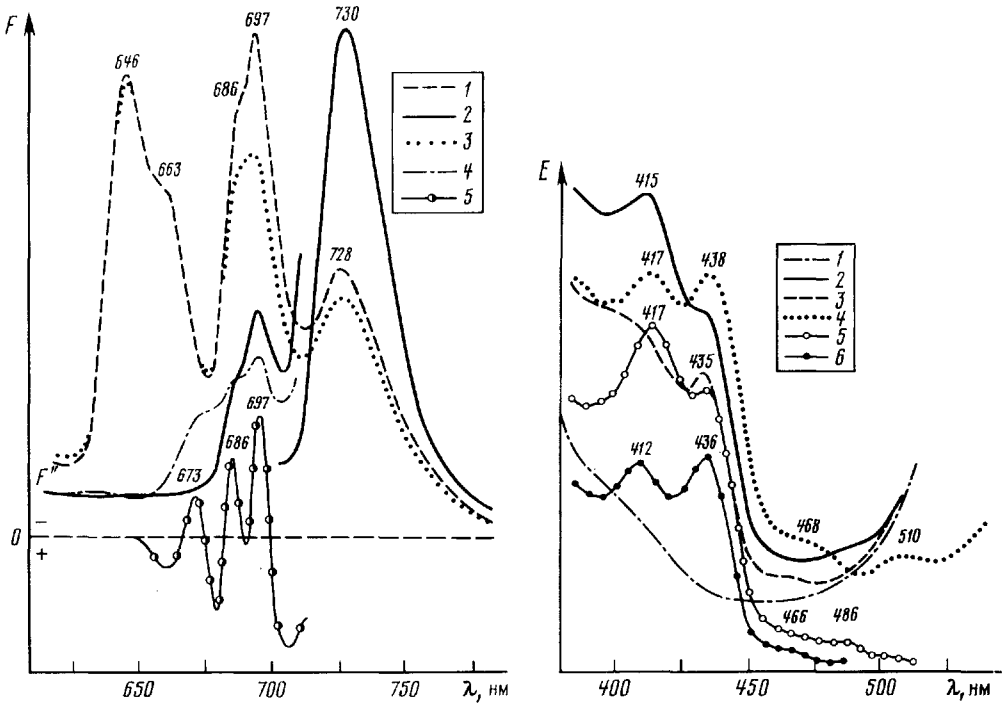


Рис. 1. Низкотемпературные спектры флуоресценции целых клеток Gl. raciborski, выращенных на свету (*1, 2*) и адаптированных к темноте в течение 20 ч (*3, 4*). Возбуждение светом 560 (*1, 3*) и 436 нм (*2, 4*). Интенсивность длинноволновой полосы при возбуждении светом 436 нм уменьшена в 2 раза. *5* – вторая производная спектра *4*

Рис. 2. Спектры возбуждения низкотемпературной флуоресценции клеток Gl. raciborski, адаптированных к темноте. Регистрация излучения при 640 (*1*), 673 (*2*), 697 (*3*) и 730 нм (*4*). Интенсивность спектра возбуждения для полосы 730 нм уменьшена в 5 раз, а для полосы 673 нм увеличена в 2 раза. Дифференциальные спектры возбуждения полос 673 (*5*) и 697 (*6*), полученные после вычитания из суммарного спектра возбуждения фикобилисом (полосы 640 нм)

фикоцианина (646 нм), аллофикоцианина (663 нм) и фикоэритрина (578 нм, не показано), а также полосы флуоресценции хлорофилла ФС2 (686 и 697 нм) и ФС1 (730 нм) [13, 14]. Однако обращает на себя внимание уменьшение в темноте интенсивности полос 728 нм и особенно полосы 697 нм. При возбуждении светом, поглощаемым хлорофиллом – 436 нм, как у световой, так и у темновой культуры видны полосы 686 и 697 нм, а также полоса 730 нм. Кроме того, при этом возбуждении у темновой культуры появляется новая полоса в области 673 нм, аналогичная обнаруженной нами ранее при темновой инкубации клеток Dunaliella [10]. Эта новая полоса обладает заметно большей полушириной, чем другие полосы ФС2, что указывает на ее принадлежность мономерному пигменту. При возбуждении в области 465 нм эта полоса излучения исчезает, хотя другие полосы флуоресценции фотосистемы 2 остаются (не показано). Измерение спектров возбуждения показывает их идентичность для полос флуоресценции 686 и 697 нм, что подтверждает их принадлежность комплексам, между которыми происходит эффективный обмен энергией (рис. 2). В отличие от них, полоса 673 нм имеет в спектре возбуждения, кроме максимума хлорофилла а (435 нм), еще относительно интенсивную полосу при 417 нм, соответствующую феофитину в дифференциальном спектре поглощения РЦ ФС2 [1], так что в целом, после вычитания фона, соответствующего возбуж-

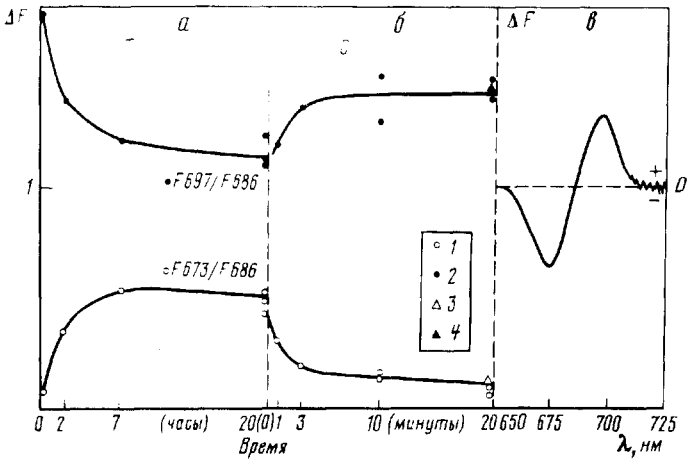


Рис. 3. Кинетика изменения интенсивности полос 673 (*1, 3*) и 697 нм (*2, 4*) в низкотемпературном спектре флуоресценции Gl. raciborski при помещении в темноту (*а*) и на свет (*б*) после нормировки на полосу 687 нм. Измерение в атмосфере воздуха (*1, 2*) и в атмосфере аргона (*3, 4*). *в* – дифференциальный спектр низкотемпературной флуоресценции клеток, адаптированных в течение 30 мин. Возбуждение 436 нм

дению фикобилинов, спектр возбуждения полосы 673 нм практически идентичен спектру поглощения недавно изолированного РЦ ФС2 [5–7]. Более того, измерение относительной интенсивности полос хлорофилла и феофитина в спектре возбуждения флуоресценции 673 нм (с учетом молярных коэффициентов экстинкции и наложения полос) дает величину 2,86:1, что хорошо соответствует содержанию пигментов в изолированном РЦ (димер хлорофилла, мономер хлорофилла и мономер феофитина). Это позволяет предположить, что излучение в области 673 нм у адаптированных к темноте клеток цианобактерий может принадлежать РЦ ФС2.

Измерение кинетики образования в темноте полосы 673 нм показывает, что ее появление происходит довольно медленно (время полупревращения около 2 ч) и завершается к 7 часу инкубации цианобактерий в темноте, что соответствует времени синтеза Д1-белка [15] (рис. 3). Одновременно происходит уменьшение интенсивности полосы 697 нм. Наблюдающееся затем общее медленное уменьшение интенсивности обеих полос, возможно, связано с темновой деструкцией ПБК. В присутствии ингибитора биосинтеза белка – хлорамфеникола – эффективность образования коротковолновой полосы значительно подавляется и она составляет не более 50% от наблюдающейся без добавок. С другой стороны, эта полоса образуется значительно более эффективно в присутствии субстрата биосинтеза порфириновых пигментов – δ-аминолевулиновой кислоты. Следует отметить, что инкубация клеток в темноте (даже в отсутствие аминолевулиновой кислоты) приводит к накоплению в них различных предшественников хлорофилла (в частности, протопорфирина IX и Mg-протопорфирина), проявляющихся как по спектрам излучения, так и по спектрам возбуждения флуоресценции непосредственно в целых клетках. Однако накопление этих пигментов удается регистрировать только через 6–7 ч после начала темновой инкубации, т.е. тогда, когда происходит насыщение образования комплекса, флуоресцирующего при 673 нм.

Освещение адаптированных к темноте клеток цианобактерий приводит к быстрому исчезновению полосы 673 нм, сопровождающемуся одновременным увеличением интенсивности полосы 697 нм (рис. 3). Судя по дифференциальному спектру излучения, полоса 673 нм превращается исключительно в полосу 697 нм. Кинетика

изменения интенсивности этих двух полос одинакова, и превращение завершается в течение 3–5 мин. Исчезновение полосы 673 нм наблюдается как в присутствии атмосферного O_2, так и в атмосфере аргона, что, по-видимому, исключает ее связь с процессом фотодеструкции, а амплитуда увеличения полосы 697 нм не изменяется при последующей темновой инкубации клеток в течение 10–15 мин и не зависит от присутствия диурона (не показано), что указывает на отсутствие ее связи с изменением состояния РЦ. Следует подчеркнуть, что при определении увеличения интенсивности полосы 697 нм мы вели отсчет ее приращения относительно полосы 686 нм, тогда как при фотоиндуцированном закрытии РЦ наблюдается увеличение интенсивности обеих этих полос.

Таким образом, полученные результаты показывают, что наблюдающаяся у целых клеток цианобактерий и зеленых водорослей после темновой адаптации полоса флуоресценции в области 673 нм может принадлежать не взаимодействующему с антенной РЦ ФС2 (Д1-белку). Его взаимодействие с внутренней антенной ФС2 (белком 47 кДа) происходит светозависимо и сопровождается возгоранием флуоресценции в области 697 нм. Описанные результаты открывают возможность исследования биогенеза РЦ ФС2 непосредственно в интактных клетках водорослей.

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

Поступило
6 VI 1988

ЛИТЕРАТУРА

1. *Климов В.В., Красновский А.А.* – Биофизика, 1982, т. 27, № 1, с. 179–189. 2. *Nuijs A.M., Van Gorkom H.J., Plijter J.J., Duyseuns L.N.* – Biochim. et biophys acta, 1986, vol. 848, p. 167–175. 3. Protochlorophyllide reduction and greening / Ed. C. Sironval, M. Brouers. The Hague, 1984. 4. Chloroplast Biogenesis / Ed. N.R. Baker, J. Barber. Amsterdam: Elsevier, 1984. 5. *Nakatani H.Y., Ke B., Dolan E., Arntzen C.J.* – Biochim. et biophys. acta, 1984, vol. 765, p. 347–352. 6. *Nanba O., Satoh K.* – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1987, vol. 84, p. 109–112. 7. *Van Dorssen R.J., Breton J., Plijter J.J. et al.* – Biochim. at biophys. acta, 1987, vol. 893, p. 267–274. 8. *Barber J., Chapman D.J., Telfer A.* – FEBS Lett., 1987, vol. 220, p. 67–73. 9. *Lebedev N.N., Šiffel P., Krasnovskii A.A.* – Photosynthetica, 1985, vol. 19, p. 183–187. 10. *Лебедев Н.Н., Шапошникова М.Г., Красновский А.А.* – Биофизика, 1986, т. 31, № 2, с. 382–383. 11. *Šiffel P., Lebedev N.N., Krasnovskii A.A.* – Photosynthetica, 1987, vol. 21, p. 23–28. 12. *Stanier R.Y., Kunisawa R., Mendel M., Cohem-bazire G.* – Bacteriol. Rev., 1971, vol. 35, p. 175–205. 13. *Kramer H.J.M., Westerhuis W.H.J., Amesz J.* – Physiol. Veg., 1985, vol. 23, p. 535–534. 14. *Бекасова О.Д., Синещеков В.А., Синещеков А.В.* – Биофизика, 1988. т. 33, с. 71–76. 15. *Arntzen C.J., Pakrasi H.D.* In: Encyclopedia of plant physiology. B.: Springer-Verlag, 1986, vol. 19, p. 457–467.

Доклады Академии наук СССР
1989. Том 306, № 5

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

В.А. НАДТОЧЕНКО, И.В. РУБЦОВ,
Я.В. БАРАННИКОВА, В.В. НИКАНДРОВ

ВЛИЯНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОЙ РАЗНОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ НА ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЗАРЯДОВ В МЕМБРАНАХ ЛИПОСОМ

(Представлено академиком А.А. Красновским 20 IX 1988)

Разработка проблемы моделирования фотосинтеза стимулировала интерес к исследованию влияния электростатических полей, возникающих на границе раздела коллоидная частица–раствор электролита, на процессы фоторазделения зарядов. Было установлено влияние поверхностного заряда частиц SiO_2 [1], мицелл детергентов [2], липосом [3, 4] на квантовый выход и скорость рекомбинации ион-радикалов, образующихся в фотохимических реакциях. В суспензиях липосом установлено влияние трансмембранной разности электрических потенциалов на квантовый выход фотоиндуцированного трансмембранного переноса электронов, сенсибилизированного поверхностно-активным аналогом $Ru(opy)_3^{2+}$ [5], порфиринами [6], хлорофиллом или феофитином [7]. Предполагалось, что трансмембранное электростатическое поле влияет на перенос электронов через углеводородную часть липидной мембраны. Однако влияние трансмембранной разности потенциалов на фоторазделение зарядов в паре донор–акцептор электрона в липосомальных системах не исследовалось. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния трансмембранной разности потенциалов на кинетику фотохимической реакции между гидрофобным пигментом, включенным в бислойную мембрану липосомы, и гидрофильным донором электрона.

Исследовали влияние трансмембранной разности электрических потенциалов на фоторазделение зарядов в реакции фотовосстановления феофитина а (Фф), находящегося в мембране липосомы, аскорбатом, заключенным во внутреннем водном объеме липосомы.

Методика приготовления липосом, содержащих во внутреннем водном объеме 0,5 *М* аскорбат натрия, описана в [7, 8]. Разность потенциалов на мембране создавалась при помощи валиномицина (10^{-6} *М*) в условиях трансмембранного градиента концентрации ионов K^+ [7]. Конечные концентрации лецитина и Фф составляли соответственно 10^{-3} *М* и $5 \cdot 10^{-6}$ *М*. Кинетику реакции исследовали методом лазерной кинетической спектроскопии. Возбуждение осуществляли третьей гармоникой Nd^{3+}-АИГ лазера с длительностью импульса 12 нс, энергией в импульсе 4 мДж. Кинетические кривые регистрировали с помощью быстрого аналогоцифрового преобразователя в комплексе с ЭВМ "Электроника 60 М". Измерения проводили в анаэробных условиях в термостатированной 1-сантиметровой кварцевой кювете при $t = 22\,^{\circ}C$. В опытах использовали аскорбат натрия фирмы "Sigma" и валиномицин фирмы "Serva".

Ранее нами было установлено, что аскорбат реагирует с триплетным Фф в среде мицелл и липосом с образованием радикалов $Фф^{\cdot-}$ и $A^{\cdot-}$:

(1) $Фф + h\nu \rightarrow Фф^{S_1} \rightsquigarrow Фф^{T}$,

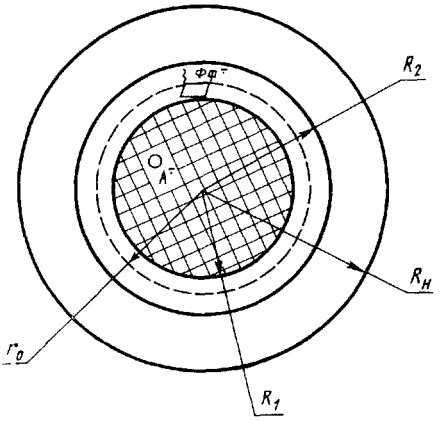
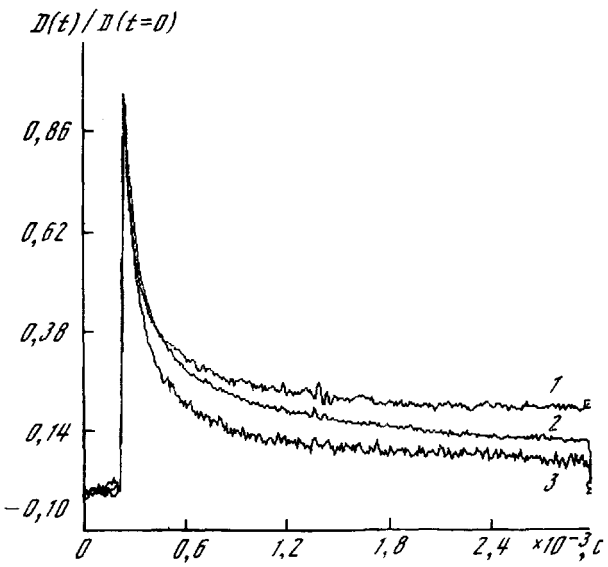


Рис. 1. Положение радикалов $Ф ф^{\cdot-}$ и $A^{\cdot-}$ в липосоме (схема). r_0 – расстояние, на котором происходит образование радикалов $Ф ф^{\cdot-}$ и $A^{\cdot-}$, R_1 – поглощающая граница, R_2 – отражающая граница, $R_н$ – внешний радиус липосомы

Рис. 2. Кинетические кривые рекомбинации ион-радикалов $Ф ф^{\cdot-}$ и $A^{\cdot-}$, генерированных лазерным импульсным освещением в суспензии липосом при различных значениях трансмембранного потенциала: *1* – +178 мВ; *2* – 0; *3* – –178 мВ



$$(2)\quad Ф ф^{т} + AH^{-} \longrightarrow (Ф ф^{\cdot-} \ldots AH^{\cdot}) \begin{cases} \nearrow Ф ф^{\cdot-} + A^{\cdot-} + H^{+} \\ \searrow Ф ф + AH^{-} \end{cases},$$

$$(3)\quad Ф ф^{\cdot-} + A^{\cdot-} \xrightarrow{H^{+}} Ф ф + AH^{-}.$$

Фоторазделение зарядов в липосомах, определяющееся выходом радикалов $Ф ф^{\cdot-}$ и $A^{\cdot-}$ и скоростью их рекомбинации, зависит от локального окружения Фф, AH^{-}, $A^{\cdot-}$ и $Ф ф^{\cdot-}$, от характера движения этих молекул в липосоме. Хотя детальная картина локализации и движения этих реагентов в липосоме не известна, тем не менее представления об их гидрофильных и гидрофобных свойствах и полученные данные позволяют сделать вывод о характере процесса фоторазделения зарядов. Так гидрофильность анионов AH^{-} и $A^{\cdot-}$ определяет их положение в водном объеме внутренней полости липосомы, а гидрофобные молекула Фф и радикал $Ф ф^{\cdot-}$ локализованы в мембране липосомы (рис. 1). Показано, что порфириновое кольцо хлорофилла и его аналогов расположено в мембране вблизи границы раздела липид–вода [9]. Предполагается, что при создании разности потенциалов на мембране действию поля должны подвергаться только ионы, находящиеся в мембране, т.е. преиму-

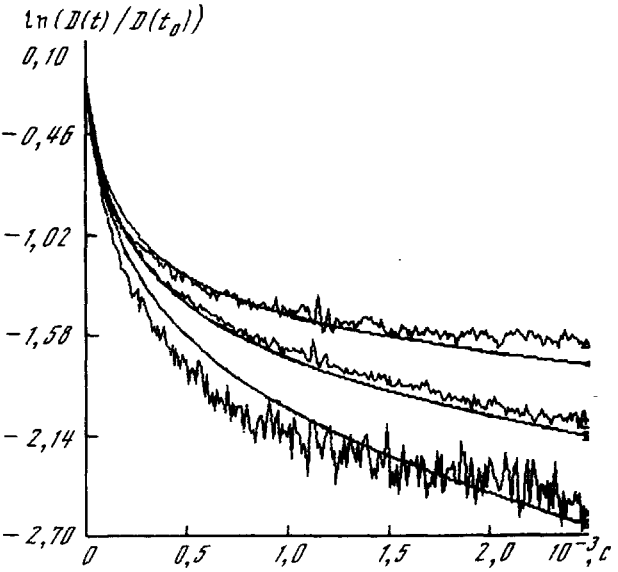


Рис. 3. Полулогарифмические анаморфозы экспериментальных кривых гибели радикала $Фф^{\bar{\cdot}}$. Сплошные линии – расчетные кривые кинетики гибели радикала (в полулогарифмическом представлении) в предположении, что гибель контролируется диффузией этого радикала в мембране:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \operatorname{div} D\left\{\operatorname{grad} P - \frac{eE}{kT} P\right\},$$

$$\left.\frac{\partial P}{\partial r}\right|_{R_2} = 0, \quad P|_{R_1} = 0, \quad P|_{t=0} = 1,$$

По расчету $P(t)$ – вероятность обнаружить к моменту времени t непогибший радикал $Фф^{\bar{\cdot}}$

щественно радикалы $Фф^{\bar{\cdot}}$. Величина трансмембранной разности потенциалов в наших опытах, рассчитанная по формуле Нернста, по абсолютной величине равна 178 мВ, т.е. средняя напряженность поля в мембране составляет $3{,}6 \cdot 10^5$ В/см. Знак разности потенциалов определяется направлением градиента концентрации K_2SO_4. При избытке K_2SO_4 во внешнем водном объеме липосомы внешняя поверхность мембраны приобретает отрицательный заряд по отношению к внутренней ($\Delta\varphi = -178$ мВ), при избытке K_2SO_4 во внутреннем объеме – положительный ($\Delta\varphi = +178$ мВ).

В контрольных экспериментах было показано, что выход триплетного $Фф^{T}$ не зависит от создаваемой разности потенциалов. Относительный выход радикалов в условиях поляризации мембраны был измерен при постоянной концентрации $АН^{-}$ как отношения оптических плотностей образующихся радикалов $Фф^{\bar{\cdot}}$. Квантовые выходы радикалов при разности потенциалов −178мВ (Φ_-), 0 (Φ_0), +178 мВ (Φ_+) относятся как

$$\Phi_- : \Phi_0 : \Phi_+ = (0{,}97 \pm 0{,}21) : (1{,}00 \pm 0{,}25) : (1{,}40 \pm 0{,}5).$$

Исходя из оптической плотности образующихся $Фф^{\bar{\cdot}}$, коэффициента экстинкции $ФФ^{\bar{\cdot}}$ $\Delta\epsilon_{\lambda=460} = 2 \cdot 10^4$ ($M \cdot$ см) и концентрации липосом, равной $3 \cdot 10^{-7}$ M, определили значение среднего числа радикалов $Фф^{\bar{\cdot}}$ и $А^{\bar{\cdot}}$, образующихся в липосоме, равное 0,85. Изменение интенсивности лазерного импульса и соответствующее уменьшение начальной концентрации радикалов в 4 раза не приводит к изменению ни быстрой, ни медленной фазы в кинетике гибели радикалов. Этот факт указывает на отсутствие квадратичных каналов гибели радикалов $Фф^{\bar{\cdot}}$. Поэтому

представленные на рис. 2, 3 кинетики гибели $Ф\phi^{\cdot}$ в основном относятся к процессу геминальной рекомбинации $Ф\phi^{\cdot}$ и $A^{\cdot}$.

Среднее время жизни радикалов $Ф\phi^{\cdot}$, полученное интегрированием кривых на рис. 2 по времени, равно $\langle \tau_+ \rangle = 1{,}42 \pm 0{,}05$ мс; $\langle \tau_0 \rangle = 1{,}06 \pm 0{,}05$ мс; $\langle \tau_- \rangle = 0{,}84 \pm 0{,}04$ мс. Поскольку интегрирование проводилось по ограниченному отрезку времени, полученные значения времени жизни занижены. Наибольшее занижение величины среднего времени жизни относится к кривой с положительным знаком поляризации, так как в этом случае наиболее выражена "затяжка хвоста кинетики".

Полученные данные можно интерпретировать, исходя из следующих представлений: 1) радикалы $Ф\phi^{\cdot}$ и $A^{\cdot}$ образуются в мембране в положении r_0 (рис. 1); 2) гидрофильные радикалы $A^{\cdot}$ быстро выходят в водный объем внутри липосомы; 3) гидрофобные $Ф\phi^{\cdot}$ остаются в мембране; 4) скорость рекомбинации $Ф\phi^{\cdot}$ и $A^{\cdot}$ контролируется диффузией $Ф\phi^{\cdot}$ в радиальном направлении мембраны; 5) реакция двух радикалов происходит на границе липид–вода–R_1. Диффузионное движение $A^{\cdot}$ не лимитирует скорость рекомбинации, так как при коэффициенте диффузии $A^{\cdot}$ в воде порядка 10^{-5} $см^2/с$ среднее время достижения $A^{\cdot}$ границы липосомы не превышает 10^{-7} с, а характерное время реакции $Ф\phi^{\cdot}$ с $A^{\cdot}$ более 10^{-5} с (рис. 2). Так как значение коэффициента диффузии $Ф\phi^{\cdot}$ в радиальном направлении, очевидно, мало, скорость рекомбинации $Ф\phi^{\cdot}$ с $A^{\cdot}$ должна контролироваться диффузией $Ф\phi^{\cdot}$, а гибель $Ф\phi^{\cdot}$ следовать неэкспоненциальной зависимости.

В случае трансмембранной разности потенциалов $Ф\phi^{\cdot}$ должен дрейфовать в постоянном электрическом поле и, соответственно знаку поля, должно происходить либо ускорение, либо замедление процесса. Качественно эти представления полностью соответствуют экспериментальным данным, приведенным на рис. 2 и 3. Правомерность такой интерпретации влияния трансмембранной разности потенциалов на скорость рекомбинации гидрофобного ион-радикала в мембране и гидрофильного радикала в водной полости липосомы подтверждается расчетом времени первого достижения границы точечным зарядом, диффундирующим в поле сферического конденсатора – заряженной мембраны. Подразумевая под точечным зарядом $Ф\phi^{\cdot}$, следует принять во внимание следующие соображения. Для $Ф\phi^{\cdot}$, положение которого в момент $t = 0$ определяется радиусом r_0 относительно центра липосомы, должен существовать гидрофобный барьер прохождения мембраны, следовательно, для точечного заряда необходимо ввести отражающую границу диффузионного движения – R_2 (рис. 1), для которой справедливо неравенство $R_1 < R_2 < R_н$, где R_1 практически совпадает с внутренним радиусом липосомы $R_в$; $R_н$ – наружный радиус липосомы. Учитывая тот факт, что $Ф\phi^{\cdot}$ реагирует с $A^{\cdot}$ в гомогенном растворе с константой скорости, близкой к диффузионно контролируемой $(3 \cdot 10^9$ $(Мс)^{-1}$ в водно-этанольной смеси – по нашим данным), а также малое время достижения $A^{\cdot}$ границы липосомы, разумно принять границу R_1 поглощающей границей движения $Ф\phi^{\cdot}$. Уравнение, определяющее время первого достижения границы R_1 – $T(r_0)$ [10], путем исключения быстрых переменных (координаты Θ, Ψ) сводится к уравнению

$$(4) \quad \left(\beta eE \frac{\partial T(r)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} r^2 \frac{T(r)}{\partial r}\right) \cdot D = -1,$$

$$T(r)|_{r=R_1} = 0; \quad \left.\frac{\partial T(r)}{\partial r}\right|_{r=R_2} = 0,$$

где e – элементарный заряд, $E = \Delta\varphi/l$ – напряженность поля, l – толщина мембраны, $\beta = 1/kT$. При $E = 3{,}6 \cdot 10^5$ В/см величина $\beta eE = 0{,}138$ $Å^{-1}$.

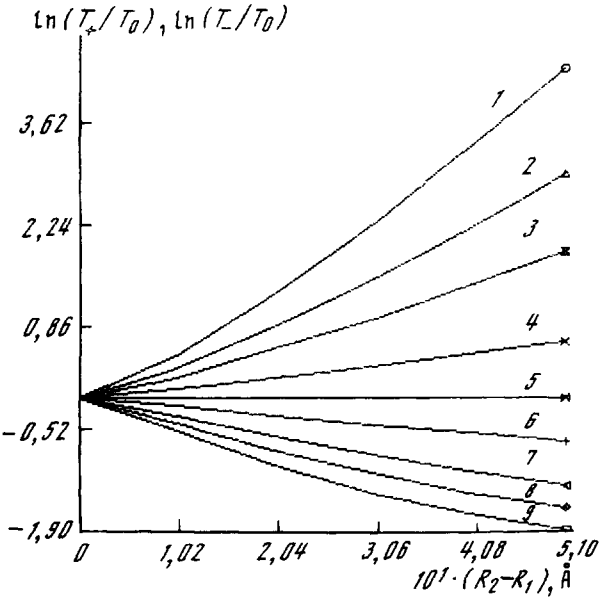


Рис. 4. Зависимость отношения времени первого достижения поглощающей границы R_1 от положения отражающей границы R_2 при различных значениях трансмембранной разности потенциалов. *1–9* – разность потенциалов соответственно равна: +178; +129; +90,3; +38,7; 0; −38,7; −90,3; −129; −178 мВ

Результат интегрирования уравнения (4) для случая $\Delta\varphi = 0$ дает выражение

$$(5)\qquad T(r_0) = \frac{1}{D}\left\{\frac{1}{6}(R_1^2 - r_0^2) + \frac{R_2^3}{3}\left(\frac{r - R_1}{R_1}\right)\right\}.$$

Для случая $\Delta\varphi \neq 0$

$$(6)\qquad T(r_0) = \frac{1}{D}\left\{\frac{2}{(eE\beta)^3}\left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{R_1}\right) + \frac{2}{(eE\beta)^2}\ln\left(\frac{r_0}{R_1}\right) - \frac{r_0 - R_1}{eE\beta} + \right.$$

$$\left. + \left[\frac{R_2^2}{(eE\beta)} - \frac{2R_2}{(eE\beta)^2} + \frac{2}{(eE\beta)^3}\right]\int_{R_1}^{r_0}\frac{\exp(eE\beta(R_2 - r)}{r^2}\,\mathrm{d}r\right\}.$$

Результаты интегрирования показывают, что отношение $T_+ : T_0 : T_-$ не зависит от неизвестного коэффициента трансмембранной диффузии D, а определяется значениями R_2, $\Delta\varphi$ и, в меньшей степени, r_0. На рис. 4 дана зависимость отношения $T_+ : T_0 : T_-$ от $(R_2 - R_1)$ при различных значениях $\Delta\varphi$. Сравнение экспериментально измеренного отношения $\langle\tau\rangle_+ : \langle\tau\rangle_0 : \langle\tau\rangle_-$ при $\Delta\varphi$ = +0,178 мВ и −178 мВ с расчетным позволило определить положение отражающей границы для $Фф^-$ в мембране, которая расположена на глубине приблизительно 7 Å относительно внутренней поверхности мембраны. Так как радиус порфиринового кольца равен 5 Å, то, исходя из полученного значения для положения отражающей границы, можно предположить, что центр порфиринового кольца $Фф^-$ погружается не более чем на полтора радиуса внутрь мембраны. Поскольку порфириновое кольцо Фф располагается в липидной мембране в области полярных голов, ширина которой у лецитиновых липосом составляет 11 Å [11], можно полагать, что радиальное диффузионное движение Фф в основном ограничивается этой областью мембраны.

Таким образом, в настоящей работе показано, что трансмембранная разность электрических потенциалов в зависимости от знака может как повышать, так и снижать эффективность фоторазделения зарядов в липосомальных мембранах. На основании полученных результатов обнаруженное ранее влияние трансмембранного электростатического поля на квантовый выход фотоиндуцированного трансмембранного переноса электронов в пигментированных липосомах [5, 7], плоских липидных мембранах [12] может быть связано не только с изменением высоты энергетического барьера для переноса электронов через углеводородную зону мембраны, но и с изменением эффективности разделения зарядов в результате действия электростатического поля на движение гидрофобных ионрадикалов в мембране.

Авторы статьи выражают глубокую благодарность академику А.А. Красновскому и А.И. Шушину за ценные замечания и обсуждение настоящей работы.

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

Поступило
5 X 1988

ЛИТЕРАТУРА

1. *Calvin M., Willner I., Laane C., Otvos J.W.* – J. Photochem., 1981, vol. 17, p. 195–206. 2. *Gratzel M.* – Biochim. et biophys. acta, 1982, vol. 683, p. 221–224. 3. *Fang Y., Tollin G.* – Photochem. and Photobiol., 1983, vol. 38, № 4, p. 429–439. 4. *Senthilathipan V., Tollin G.* – Ibid., 1985, vol. 42, № 4, p. 437–445. 5. *Laan C., Ford W.E., Otvos J.W., Calvin M.* – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, vol. 78, p. 2017–2020. 6. *Tsvetkov I.M., Maravin G.B., Lymar S.V., Parmon V.N.* – React. Kinet. Catal. Lett., 1984, vol. 25, p. 95–99. 7. *Семенова А.Н., Баранникова Я.В., Никандров В.В., Красновский А.А.* – Биол. мембраны, 1987, т. 4, № 6, с. 648–657. 8. *Batzri S., Korn E.D.* – Biochim. te biophys. acta, 1973, vol. 298, p. 1015–1019. 9. *Oettmeier W., Norris J.R., Katz J.J.* – Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, vol. 17, № 2, p. 445–451. 10. *Гардинер К.В.* Стохастические методы в естественных науках. М.: Мир, 1986, с. 220. 11. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981, с. 125. 12. *Tien H. Ti., Joshi N.B.* – Photochem. and Photobiophys., 1986, vol. 10, p. 241–245.

УДК 547.979

БИОФИЗИКА

А.В. УМРИХИНА, А.Н. ЛУГАНСКАЯ, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫЕ СИГНАЛЫ ЭПР В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ НАД-Н И НАДФ-Н

При функционировании универсальных переносчиков электрона – НАД-Н и НАДФ-Н возможно промежуточное образование продуктов одноэлектронного восстановления или окисления этих соединений [1–3]. Поиски свободнорадикальных продуктов окислительно-восстановительных превращений коэнзимов проводились главным образом в модельных системах.

С помощью импульсного радиолиза наблюдалось одноэлектронное восстановление НАД и одноэлектронное окисление НАД-Н; при этом обнаружен один и тот же продукт – свободный радикал НАД$^{\cdot}$, способный к димеризации [4]. Окислительно-восстановительные превращения коэнзимов наблюдали в этом цикле работ в результате реакции НАД-Н со свободными радикалами, возникающими при действии ионизирующей радиации на присутствующие в среде соединения.

При импульсном фотолизе кванты света действуют непосредственно на молекулу НАД-Н, в результате чего происходит отрыв электрона от НАД-Н с образованием его окисленной формы НАД$^{\cdot}$ и сольватированного электрона ($e^{-}aq$), который обнаруживается по характерному спектру поглощения в области 600–700 нм [5, 6].

Электрохимическое окисление НАД-Н и ряда соединений, моделирующих никотинамидную и адениновую части молекулы НАД, приводило к образованию нескольких продуктов окислительно-восстановительного превращения, один из которых соответствовал радикалу НАД$^{\cdot}$ в его димерной форме [7]. В ряде работ нашей лаборатории изучались фотохимические реакции, идущие с участием НАД и НАДФ и их восстановленных форм [8–10], в которых обнаружено фотосенсибилизированное фотосинтетическими пигментами восстановление НАД и окисление НАД-Н, и фотореакции, идущие за счет световой активации непосредственно НАД-Н и НАДФ-Н; при этом обнаружено образование активных промежуточных продуктов [8].

В настоящей работе нами поставлена задача исследовать методом ЭПР возможность наблюдения свободнорадикальных продуктов фотоокисления НАД-Н и НАДФ-Н в растворах.

Спектры ЭПР измеряли на реконструированном радиоспектрометре РЭ-1301 с приставкой для освещения образцов непосредственно в резонаторе и термостатирующей приставкой, позволяющей проводить измерения в диапазоне температур от 100 до –196 °С. Освещение образцов осуществляли светом ксеноновой лампы ДКСШ-250 через светофильтры УФС-1 и СЗС-23, пропускающие свет в области 340 нм – максимум поглощения НАД-Н. Препараты НАД-Н, НАДФ-Н, НАД и НАДФ ("Reanal", Венгрия и "Serva", ФРГ), содержащие 80–90% основного вещества, использовали без дополнительной очистки. Растворители – дистиллированная вода, этанол. Для приготовления мицеллярных растворов пиридиннуклеотидов использовали неионогенный детергент тритон Х-100. Удаление кислорода осуществляли на форвакуумном насосе при многократном чередовании замораживания образцов в жидком азоте и оттаивания с последующим запаиванием ампул под вакуумом. Реакцию проводили в стеклянных ампулах диаметром 3–4 мм, объем раствора в ампуле приблизительно 0,03 мл.

Освещение в резонаторе радиоспектрометра замороженных ниже –30 °С растворов НАД-Н (10^{-2} *М*) в дистиллированной воде в вакууме приводило к возникновению светоиндуцированного сигнала с характерным структурированным спектром ЭПР (рис. 1). На рис. 1 приведены результаты опыта при –50 °С. В этих условиях сигнал ЭПР появляется в первые секунды освещения, быстро увеличивается по интенсивности и достигает максимальной величины приблизительно за 30 мин освещения. После выключения света сигнал сохраняется в темноте при этой температуре длительное время (часы) и исчезает только при нагревании образцов до комнатной температуры. Появление сигнала ЭПР на свету и исчезновение его в темноте при размораживании можно было наблюдать многократно на одном и том же образце, что свидетельствовало об обратимости светоиндуцированного процесса.

Для установления условий, благоприятствующих наиболее эффективному протеканию реакции, мы исследовали температурную зависимость возникновения сигнала ЭПР в водных растворах НАД-Н. Из рис. 2 видно, что светоиндуцирован-

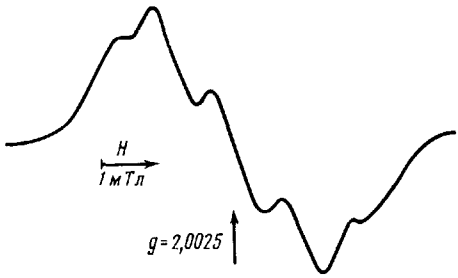


Рис. 1

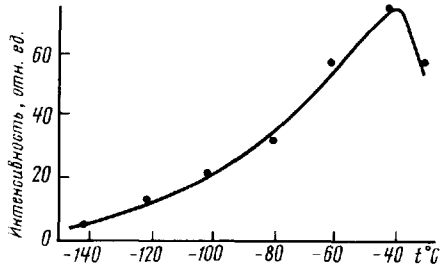


Рис. 2

Рис. 1. Спектр ЭПР, наблюдаемый при действии света на растворы НАД-Н (10^{-2} *М*) в воде. Вакуум, −50 °С, 30 мин освещения через УФС-1 и СЗС-23

Рис. 2. Температурная зависимость светоиндуцированного сигнала ЭПР в водных растворах НАД-Н (10^{-2} *М*). Вакуум, относительные значения интенсивности сигнала ЭПР взяты после 30 мин освещения через УФС-1 и СЗС-23

Рис. 3. Спектр ЭПР, наблюдаемый при действии света на растворы НАДФ-Н (10^{-2} *М*) в воде. Вакуум, −50 °С, 30 мин освещения через УФС-1 и СЗС-23

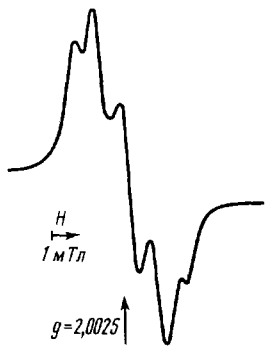


Рис. 3

ный сигнал можно наблюдать только при температурах выше −140 °С. При более низкой температуре реакция практически не идет. Повышение температуры приводит к увеличению скорости световой реакции, причем наиболее эффективное усиление сигнала ЭПР можно видеть в диапазоне температур от −60 до −40 °С. Дальнейшее повышение температуры ведет к замедлению световой реакции и быстрому исчезновению светоиндуцированного сигнала в темноте. Более медленное накопление светового сигнала при температуре выше −40 °С, вероятно, связано с протеканием обратной реакции или вторичных фотопроцессов. На основании проведенных экспериментов очевидно, что оптимальная температура протекания реакции приблизительно −50 °С, так как в этих условиях сигнал наиболее эффективно увеличивается на свету и стабилен в темноте после выключения света.

Светоиндуцированное возникновение сигнала ЭПР в водных вакуумированных растворах НАДФ-Н (10^{-2} *М*) было таким же эффективным, как и в растворах НАД-Н, причем спектр сигнала был идентичен спектру с НАД-Н (рис. 3). В контрольных опытах с окисленными формами пиридиннуклеотидов в вакууме и в присутствии воздуха светоиндуцированный сигнал отсутствовал во всем исследованном диапазоне температур.

Мы изучали влияние добавления HCl и NaOH на световую реакцию в водных растворах НАД-Н. Известно, что молекула НАД-Н неустойчива в кислой среде и стабильна в присутствии щелочи. Действительно, при pH ниже 4 фотоиндуцированный сигнал ЭПР не удалось наблюдать, видимо, вследствие распада молекулы НАД-Н, тогда как в присутствии щелочи (pH 12) светоиндуцированное накопление сигнала ЭПР было таким же эффективным, как и без нее.

Фотоиндуцированное образование свободных радикалов в растворах НАД-Н было исследовано в воде, 50%-ном этаноле и 1%-ном водном мицеллярном растворе тритона X-100. Во всех средах наблюдали появление одного и того же характерного

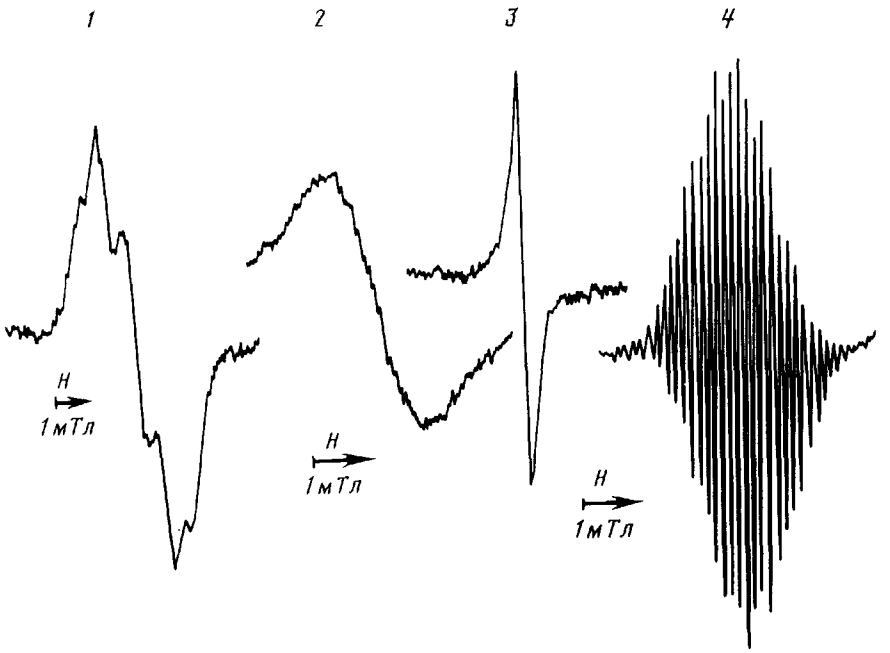


Рис. 4. Спектры ЭПР водных растворов: *1* – НАД-Н (10^{-2} *М*) и $Мв^{2+}$ (10^{-5} *М*); *2* – НАД-Н (10^{-2} *М*) и $Мв^{2+}$ (10^{-3} *М*); *3, 4* – одного $Мв^{2+}$ (10^{-3} *М*): *1, 2, 3* – при –50° С; *4* – при –20° С. Освещение через УФС-1 и СЗС-23 в течение 30 мин, вода, вакуум

спектра ЭПР, причем скорости накопления светового сигнала в водном этаноле и мицеллярной среде были ниже, чем в воде.

Мы исследовали действие окислителей – кислорода и метилвиологена ($Мв^{2+}$) на фотоиндуцированное образование структурированного сигнала ЭПР. Проведение реакции в присутствии кислорода воздуха практически не оказывало влияния на ход фотохимической реакции. Метилвиологен оказывал различное действие на фотоиндуцированное образование свободных радикалов в водных растворах НАД-Н (10^{-2} *М*) в зависимости от его концентрации. При концентрации $Мв^{2+}$ 10^{-5} *М* регистрировался структурированный сигнал ЭПР, характерный для растворов НАД-Н в воде, при этом скорость накопления светового сигнала была ниже, чем без метилвиологена, возможно, в результате взаимодействия свободного радикала, наблюдаемого в растворах одного НАД-Н, с образующимися в реакции катион-радикалами метилвиологена [10]. В присутствии метилвиологена в концентрации 10^{-3} *М* и НАД-Н (10^{-2} *М*) наблюдали возникновение интенсивного синглетного сигнала ЭПР шириной 14–15 Э и g = 2,00 (рис. 4). Вид спектра и скорость накопления сигнала отличались от наблюдаемых в водном растворе одного НАД-Н (характерный спектр с СТС, см. рис. 1) и спектра ЭПР, который мы регистрируем при освещении растворов одного метилвиологена в тех же условиях (рис. 4). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о взаимодействии возбужденной молекулы пиридиннуклеотида с молекулой метилвиологена с образованием свободного радикала, природа которого требует дальнейшего изучения.

На основании проведенных экспериментов можно прийти к заключению, что характерный структурированный сигнал ЭПР принадлежит катион-радикальной окисленной форме пиридиннуклеотидов – НАД$^{\cdot}$ и НАДФ$^{\cdot}$. Можно высказать пред-

положения относительно механизма возникновения сигналов ЭПР в системе НАД-Н + H_2O. Свободные радикалы в исследуемой системе образуются только под действием света, поглощаемого НАД-Н и НАДФ-Н (340 нм). Реакция может протекать с участием синглетного и (или) триплетного состояния пиридиннуклеотидов [10, 11]. Одним из путей образования НАД· является отрыв электрона от возбужденной молекулы с образованием свободного радикала пиридиннуклеотида в ионной или нейтральной форме и сольватированного электрона. Возможно также, что возбужденная молекула НАД-Н взаимодействует с акцепторными примесями, присутствующими в препаратах коэнзимов, в том числе с их окисленными формами – НАД и НАДФ. Не исключена вероятность того, что акцептором электронов от возбужденной молекулы НАД-Н могут быть молекулы кислорода, которые, видимо, присутствуют в системе в связанной с коэнзимами форме (мы показали, что кислород не ингибирует фотореакцию).

Накопление свободнорадикальной окисленной формы пиридиннуклеотидов возможно только в замороженной матрице, где вторичные реакции превращения этих радикалов, требующих энергии активации, заторможены. При нагревании образцов до температуры выше $-40\,^{\circ}C$ происходит быстрое уменьшение светоиндуцированного сигнала до полного его исчезновения. Одной из возможных реакций исчезновения радикалов НАД· может быть образование димера: $2\,НАД^{\cdot} \rightarrow (НАД)_2$. Вероятна также реакция с кислородом, приводящая к образованию полностью окисленной формы $НАД^+$ и O^{-}_{2}. Реакции диспропорционирования не удалось наблюдать для радикалов НАД· [4]. По-видимому, отрыв электрона происходит от пиридиниловой части молекулы коэнзимов; в ряде работ [12–14] методом ЭПР показано образование пиридиниловых свободных радикалов. Имеются данные, что в том случае, когда отрыв электрона происходит от адениновой части молекулы коэнзима, неспаренный электрон быстро переносится на ее пиридиниловую часть [15].

Таким образом, в работе показано, что при действии возбуждающего света (340 нм) на водные и другие растворы НАД-Н и НАДФ-Н происходит реакция, приводящая к образованию свободных радикалов, дающих характерный спектр ЭПР. Сделан вывод, что наблюдаемые сигналы ЭПР принадлежат продуктам одноэлектронного окисления коэнзимов – свободным радикалам НАД· и НАДФ·.

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

Поступило
10 VI 1988

ЛИТЕРАТУРА

1. The pyridine nucleotide coenzymes / Ed. J. Everse, B. Anderson, Kwan-So You. N.Y.: Acad. Press, 1982. 389 p. 2. *Бенсассон Р., Лэнд Э., Траскот Т.* Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз. М.: Мир, 1987, с. 234–242. 3. *Fucuzumi S., Koumitsu S. et al.* – J. Amer. Chem. Soc., 1987, vol. 109, p. 305–316. 4. *Land E.J., Swallow A.J.* – Biochim. et biophys. acta. 1968, vol. 162, p. 327–337; 1971, vol. 234, p. 34–42. 5. *Lindqvist L., Czochralsca B., Grigorov I.* – Chem. Phys. Lett., 1985, vol. 119, p. 494–498. 6. *Boldridge D.W., Morton T.H., Scott G.W.* – Ibid., 1984, vol. 108, p. 461–465. 7. *Thevenot D., Hammouya G.* – Biol. Asp. Electrochem., 1971, vol. 18, p. 647–665. 8. *Красновский А.А., Брин Г.П.* – ДАН, 1964, т. 158, № 1, с. 225–228. 9. *Красновский А.А., Брин Г.П.* Проблемы эволюционной и технической биохимии. М.: Наука, 1964, с. 221–231. 10. *Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А.* – Биохимия, 1978, т. 43, с. 636–645. 11. *Никандров В.В., Красновский А.А.* – Биофизика, 1978, т. 23, с. 721–723. 12. *Kosover M., Teuerstein A., Burrows H.D., Swallow A.J.* – J. Amer. Chem. Soc., 1978, vol. 100, p. 5185–5190. 13. *Rao D.N. R., Eastland G.W., Symons M.C.* – J. Chem. Soc., Farad. Trans., 1984, vol. 80, p. 2803–2815. 14. *Tullio C., Sergio M.J.* – J. Amer. Chem. Soc., 1986, vol. 108, p. 2205–2209. 15. *Weber G.* – Nature, 1957, vol. 180, p. 1409.

УДК 577.23

М. А. ШЛЫК, В. В. НИКАНДРОВ, Н. А. ЗОРИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ *

ОБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА ПРИ ПРЯМОМ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНОВ ОТ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛУПРОВОДНИКА К БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГИДРОГЕНАЗЕ

Ключевые слова: фотообразование водорода, гидрогеназа, диоксид титана, адсорбция гидрогеназы, перенос электрона полупроводник — фермент.

В водных суспензиях TiO_2, содержащих гидрогеназу *Thiocapsa roseopersicina* и органический донор электрона, наблюдалось фотообразование водорода при прямом переносе электронов от неорганического полупроводника к активному центру фермента. В условиях, способствующих сорбции гидрогеназы на TiO_2, квантовая эффективность образования H_2 достигала 10%. Сорбцию гидрогеназы на TiO_2 можно обеспечить двумя способами: снижением pH суспензии или добавлением $CaCl_2$ или хлоридов других щелочноземельных металлов. В основе связывания гидрогеназы с поверхностью полупроводника лежат преимущественно электростатические взаимодействия. Гидрогеназа, сорбированная на частицах TiO_2, способна с высокой эффективностью использовать в качестве субстрата электроны, фотогенерированные в зоне проводимости полупроводника: скорость образования H_2 при прямом фотоиндуцированном переносе электронов от TiO_2 к гидрогеназе близка к скорости образования H_2, наблюдаемой при использовании в качестве донора электрона восстановленного дитионитом метилвиологена.

В последние годы усилия ряда лабораторий направлены на получение фотокаталитических систем, способных к преобразованию солнечной энергии и синтезу разнообразных химических соединений. Одним из подходов к созданию таких систем является сопряжение неорганических полупроводников, способных под действием света генерировать электронодонорные и электроноакцепторные центры на границе раздела полупроводник — раствор, с ферментами, обеспечивающими протекание реакций с участием фотогенерированных зарядов.

Ранее была обнаружена возможность сопряженного действия неорганических полупроводников и бактериальной гидрогеназы, приводящего к фотообразованию водорода [1—4]. Было показано, что при освещении водных суспензий TiO_2, ZnO или CdS, содержащих доноры электрона, метилвиологен (MB^{2+}) и гидрогеназу *Thiocapsa roseopersicina*, происходит образование H_2 в результате сенсибилизированного полупроводником фотовосстановления H_2 и катализируемого гидрогеназой восстановления H^+ до H_2 с окислением восстановленного MB^{2+}. В дальнейшем было изучено фотообразование H_2 в подобных системах, когда бактериальные гидрогеназы иммобилизированы на частицах TiO_2 [5]. В этих исследованиях перенос электронов от полупроводника к ферменту осуществлялся с помощью переносчика электрона — MB^{2+} или бипиридильных комплексов родия.

Вместе с тем в суспензиях TiO_2 и ZnO фотообразование H_2 наблюдалось и в отсутствие переносчика электрона [1, 3, 4], что свидетельствовало о прямом переносе электронов от полупроводника к активному центру фермента [6]. Возможность фотообразования H_2 в отсутствие переносчика электрона в суспензиях TiO_2, содержащих доноры электрона и бактериальные гидрогеназы, подтверждена другими исследовате-

* Ускоренная публикация.

лями [7]. Однако эффективность образования H_2 в таких опытах была значительно ниже, чем в присутствии переносчика электрона. Оставалось неясным: может ли быть осуществлено достаточно эффективное преобразование энергии света при безмедиаторном сопряжении полупроводника и фермента; насколько велика активность гидрогеназы в случае использования ею в качестве субстрата электронов, фотогенерированных в зоне проводимости полупроводника.

С целью выяснения этих вопросов нами исследовано влияние ионов, pH суспензии, природы донора электрона и поверхности полупроводника, соотношения полупроводник/фермент и других факторов на фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2, содержащих гидрогеназу *Thiocapsa roseopersicina*, а также на сорбцию гидрогеназы на TiO_2.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали дисперсные порошки анатаза TiO_2 фирмы «Fluka» (Швейцария) (8,5 $м^2/г$) и P25 TiO_2 фирмы «Degussa» (50 $м^2/г$). Для приготовления буферных растворов использовали бидистиллированную воду, трис-(оксиэтил)аминометан (трис) и морфолинэтансульфокислоту (MES) фирмы «Sigma» (США). Хлориды бария, натрия, калия, цезия были марки ос. ч., метилвиологен дихлорид — фирмы «Sigma», дитионит натрия — фирмы «Merck» (ФРГ).

Определение ξ-потенциала частиц TiO_2 проводили, измеряя электрофоретическую подвижность частиц в 0,01 М растворе KCl с помощью прибора Zetasizer фирмы «Malvern» (Англия).

Гидрогеназу из фототрофных бактерий *T. roseopersicina*, штамм BBS, выделяли и очищали по методу, описанному ранее [8]. Гомогенность полученных препаратов гидрогеназы проверяли аналитическим электрофорезом в 7%-ном полиакриламидном геле. Ферментативную активность гидрогеназы определяли по скорости образования H_2 в присутствии 2 мМ MB^{2+}, 28 мМ дитионита натрия в буферном растворе, содержащем 0,05 М трис, 0,05 М MES, pH 7,2.

Сорбция гидрогеназы на TiO_2. Суспензии TiO_2, содержащие гидрогеназу, периодически встряхивали в течение 15 мин, центрифугировали при 8000 g и определяли активность гидрогеназы в осадке и супернатанте по скорости образования H_2. Степень сорбции гидрогеназы принимали равной доле активности находящегося в осадке фермента за вычетом количества фермента (обычно 5%), содержащегося в объеме раствора, оставшегося связанным с осадком TiO_2.

Фотовосстановление MB^{2+} проводили в стеклянной вакуумной трубке Тунберга. В трубку помещали 20 мг TiO_2 в 4,5 мл буферного раствора, содержащего 0,05 М трис и 0,05 М MES, pH 7,2, и 0,05 мМ MB^{2+}, вакуумировали и освещали линиями ртути 365 нм. В процессе освещения измеряли оптическую плотность суспензии при 605 нм, помещая вакуумную трубку в сферу Ульбрихта спектрофотометра СФ-14.

Фотообразование H_2. Для измерения количества образующегося H_2 в стеклянную ячейку помещали 1 мл суспензии полупроводника, суспензию продували аргоном, после чего при перемешивании освещали лампой ДРШ-250 в области 320—800 нм ($2{,}8 \cdot 10^5$ эрг·$см^{-2}$·$с^{-1}$) или 365 нм ($1 \cdot 10^4$ эрг·$см^{-2}$·$с^{-1}$). Через определенные промежутки времени газовую фазу из ячейки подавали на колонку хроматографа Chrom 4. Интенсивность света измеряли с помощью ферриоксалатного актинометра. Квантовый выход рассчитывали, исходя из предположения о полном поглощении света суспензией полупроводника.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с полученными ранее данными [1, 3], при освещении суспензий TiO_2, содержащих гидрогеназу и донор электрона (трис), происходит образование H_2 (табл. 1, рис. 1). Скорость реакции в этих условиях на два порядка меньше, чем в присутствии переносчика электрона MB^{2+}. Мы предположили, что низкая эффективность фотообразования H_2 при прямом переносе фотогенерированных электронов от полупроводника к гидрогеназе объясняется электростатическим отталкиванием одноименно заряженных частиц полупроводника и молекул фермента.

Поверхность TiO_2 в зависимости от pH раствора может быть заряжена положительно или отрицательно вследствие амфотерности поверхностных OH-групп. Электрофоретические измерения показали, что изоэлектрическая точка использованного образца TiO_2 фирмы «Fluka» (Швейцария) находится около pH 3,5. Молекулы гидрогеназы в нейтральных растворах также несут избыточный отрицательный заряд; для гидрогеназы *T. roseopersicina* $pI \simeq 4{,}2$. Измерение сорбции показало, что гидрогеназа не сорбируется на TiO_2 в воде и растворах сахарозы при

Таблица 1

Фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2, мкл·мин$^{-1}$·мл$^{-1}$

Состав среды	Концентрация гидрогеназы, мг/мл	
	0,0025	0,19
TiO_2	<0,01	<0,01
TiO_2 + Ca^{2+}	<0,01	<0,01
TiO_2 + гидрогеназа	0,02	0,05
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+}*	0,7	1,7
TiO_2 + гидрогеназа + MB^{2+}*	—	3,1
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+} + MB^{2+}	2,0	5,0
Дитионит + MB^{2+} + гидрогеназа **	0,9	2,4

* MB^{2+} (0,5 мМ) и Ca^{2+} (1,2 мМ) добавляли через 20 мин освещения суспензии TiO_2 + + гидрогеназа.

** Опыт проводили без освещения.

pH 7,2. При использовании 0,05 М трис-буфера, pH 7,2, сорбируется не более 8% фермента.

Для того чтобы обеспечить связывание гидрогеназы на TiO_2 и тем самым создать условия для прямого переноса электронов от полупроводника к ферменту, мы предприняли попытки изменить заряд частиц TiO_2, добавляя в суспензию соли одно- и двухвалентных металлов, а также изменяя pH суспензии.

Действие катионов одно- и двухвалентных металлов. Известна способность катионов щелочных и щелочноземельных металлов эффективно сорбироваться на поверхности оксидов и, в частности, на TiO_2 [9, 10]. В наших опытах добавление $CaCl_2$ в миллимолярных концентрациях к суспензии TiO_2 при pH 7,2 приводило к изменению ξ-потенциала частиц с отрицательного на небольшой по величине положительный.

В присутствии $CaCl_2$ обеспечивается сорбция гидрогеназы на частицах полупроводника и наблюдается эффективное фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона (см. рис. 2). 4,7 мМ $CaCl_2$ обеспечивает полную сорбцию гидрогеназы в условиях опытов (см. рис. 2*б*). Сорбция гидрогеназы, стимулированная $CaCl_2$, обратима: фермент, связанный с TiO_2, десорбируется при разбавлении буфером, не содержащим $CaCl_2$.

Скорость фотообразования H_2 достигает максимального значения при 1—2 мМ $CaCl_2$ и становится сравнимой со скоростью реакции в присутствии MB^{2+} (см. табл. 1). Наблюдаемое при концентрациях $CaCl_2 \geqslant \geqslant 4{,}7$ мМ (в условиях полной сорбции фермента) падение скорости фотообразования H_2 можно объяснить коагуляцией частиц полупроводника, сопровождающейся ухудшением фотохимических свойств суспензии, или уменьшением ферментативной активности гидрогеназы в этих условиях.

Концентрация $CaCl_2$ является основным фактором, определяющим скорость безмедиаторного фотообразования H_2 при pH 7,2. При низких концентрациях $CaCl_2$ увеличение концентраций гидрогеназы (рис. 3), трис (рис. 4) или TiO_2 не приводит к достижению высоких скоростей образования H_2, которые можно обеспечить в присутствии оптимальной концентрации $CaCl_2$ (1—2 мМ). При малых концентрациях TiO_2 (<15 мг/мл) или гидрогеназы (<5 мкг/мл) концентрация $CaCl_2$, необходимая для насыщения реакции, снижается.

Активация фотообразования H_2 хлоридом кальция наблюдается при использовании в качестве донора электрона не только трис, но и сахарозы, дитиотреитола, метанола, а также в отсутствие экзогенных органических доноров электрона. В последнем случае скорость образования H_2 значительно ниже, чем в присутствии доноров электрона, и уменьшается в ходе реакции практически до нуля. $BaCl_2$, подобно $CaCl_2$, ускоряет фотообразование H_2 в десятки раз. Хлориды одновалентных метал-

Рис. 1. Фотообразование H_2 в системе TiO_2 — гидрогеназа. Стрелками указаны добавление $CaCl_2$ (*1* — 0,4 мМ, *2* — 1,6 мМ, *3* — 12,5 мМ) и MB^{2+} (0,5 мМ)

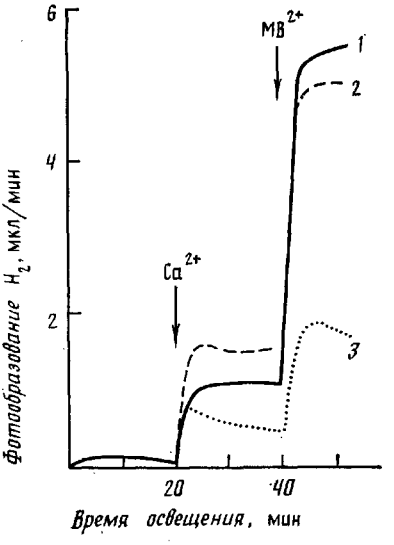


Рис. 1

Рис. 2. Зависимости фотообразования H_2 (*а*) и сорбции гидрогеназы (*б*) от концентрации $CaCl_2$ в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,19 мг/мл, 0,05 М трис, 0,05 М MES, pH 7,2; *1* — в отсутствие MB^{2+}, *2* — в присутствии 0,5 мМ MB^{2+}

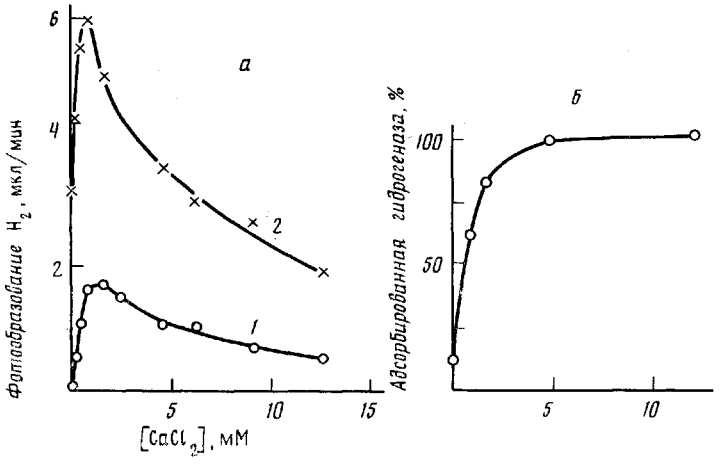


Рис. 2

лов — NaCl, KCl, CsCl — в концентрациях до 30 мМ увеличивают скорость реакции в буфере, содержащем трис, лишь вдвое.

Полученные данные о влиянии солей на фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2 показывают, что активирующее действие соли определяется валентностью и концентрацией катиона и не объясняется влиянием аниона хлора или изменением ионной силы.

Следует отметить, что сорбции гидрогеназы на TiO_2 могло способствовать также уменьшение отрицательного заряда молекул фермента вследствие связывания Ca^{2+} с белком. На наличие такого взаимодействия указывает тот факт, что 5 мМ $CaCl_2$ подавляет способность гидрогеназы (1 мг/мл) сорбироваться на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в 2 раза.

$CaCl_2$ активирует фотообразование H_2 и в том случае, когда в суспензии присутствует MB^{2+}. Однако в присутствии переносчика электрона $CaCl_2$ вызывает увеличение скорости реакции лишь в 2,5 раза, тогда как в отсутствие переносчика — более чем в 30 раз. Очевидно, что активация $CaCl_2$ фотообразования H_2 в присутствии MB^{2+} должна быть связана с активацией одной из следующих стадий: фотовосстановления MB^{2+} на TiO_2 или образования H_2 гидрогеназой при использовании восстановленного MB^{2+}. Мы не обнаружили увеличения скорости фотовосстановления MB^{2+} в суспензиях TiO_2 при добавлении $CaCl_2$ до 5 мМ. Активность гид-

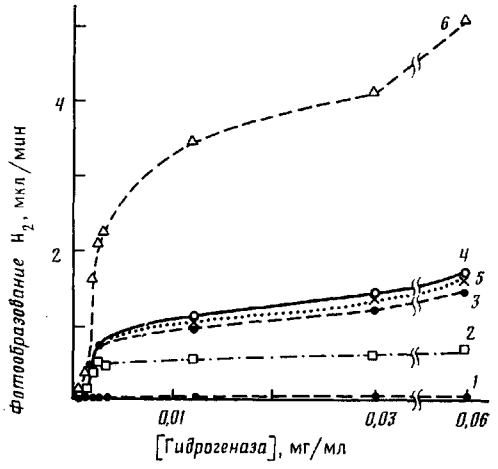


Рис. 3

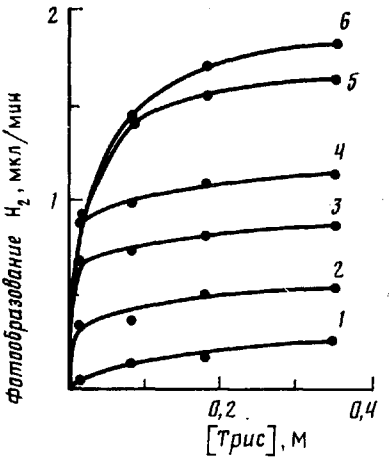


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость фотообразования H_2 от концентрации гидрогеназы в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, 0,05 М трис, 0,05 М MES (pH 7,2) при различных концентрациях $CaCl_2$, мМ: *1* — без $CaCl_2$, *2* — 0,6; *3* — 1,2; *4* — 1,8; *5* — 2,4; *6* — 2,4 мМ $CaCl_2$ и 0,5 мМ MB^{2+}

Рис. 4. Зависимость фотообразования H_2 от концентрации трис в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,10 мг/мл, 0,05 М MES (pH 7,2) при различных концентрациях $CaCl_2$, мМ: *1* — без $CaCl_2$; *2* — 0,68; *3* — 1,35; *4* — 2,0; *5* — 3,3; *6* — 4,6

рогеназы, измеренная по образованию H_2 от восстановленного дитионитом MB^{2+}, в присутствии $CaCl_2$ и TiO_2 также не изменялась. Учитывая эти данные, активирующее действие $CaCl_2$ на фотообразование H_2 в присутствии MB^{2+} можно объяснить увеличением скорости образования H_2 от восстановленного MB^{2+} вследствие повышения локальных концентраций H^+ и MB^+ вблизи поверхности TiO_2. Такое изменение локальных концентраций субстратов гидрогеназы возможно в присутствии $CaCl_2$ из-за изменения поверхностного потенциала TiO_2 на свету.

Влияние pH суспензии. Уменьшение pH суспензии TiO_2 в буфере, содержащем 0,05 М трис и 0,05 М MES, приводит к резкому увеличению сорбции гидрогеназы (рис. 5*б*). При pH 4,5 вся активная гидрогеназа оказывается связанной с поверхностью полупроводника. (MES добавлялся для стабилизации pH в кислой области. Отдельными опытами установлено, что 0,05 М MES практически не влияет на сорбцию гидрогеназы и не увеличивает скорость фотообразования H_2 в присутствии 0,05 М трис.) Сорбция гидрогеназы наблюдалась также при понижении pH менее 4,5 в водных суспензиях TiO_2 в отсутствие трис и MES. Влияние pH на сорбцию гидрогеназы уменьшается в присутствии $CaCl_2$.

Характер зависимости скорости безмедиаторного фотообразования H_2 от pH суспензии аналогичен зависимости для сорбции гидрогеназы (рис. 5*а*). При уменьшении pH от 7,2 до 5,5 скорость фотообразования H_2 в отсутствие $CaCl_2$ повышается более чем в 10 раз. При добавлении $CaCl_2$ влияние pH на фотообразование H_2 уменьшается.

Следует отметить, что с увеличением концентрации трис от 0,05 М до 0,15 М при pH 7,2 сорбция увеличивается от 6 до 20%. Соответственно происходит увеличение скорости безмедиаторного фотообразования H_2 (см. рис. 4). По-видимому, несущие при pH 7,2 положительный заряд молекулы трис (pK 8,1), подобно катионам Ca^{2+}, способны адсорбироваться на частицах TiO_2, снижая их отрицательный заряд и тем самым способствуя сорбции гидрогеназы на поверхности полупроводника. Это предположение подтверждают результаты электрофоретических измерений, показавших, что ξ-потенциал TiO_2 при pH 7,2 в трис-буфере более положителен, чем в воде.

Обращает на себя внимание различный характер зависимостей фотообразования H_2 от концентрации трис в присутствии и в отсутствие $CaCl_2$

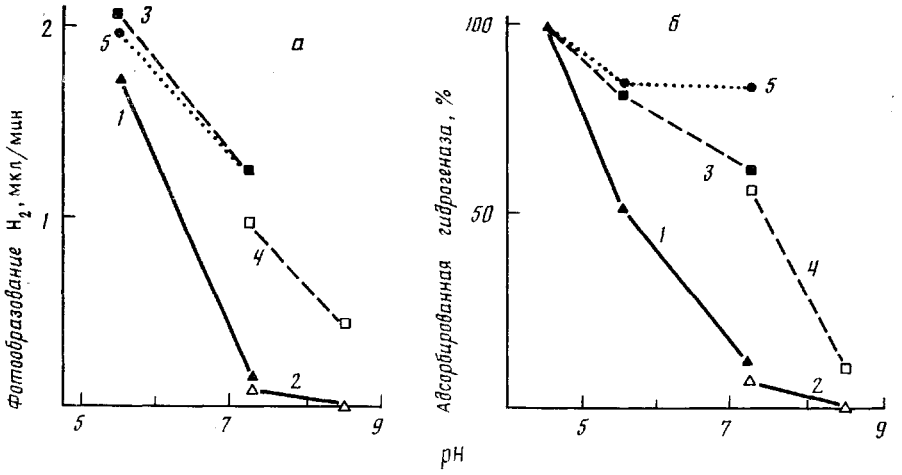


Рис. 5. Влияние pH и концентрации $CaCl_2$ на фотообразование H_2 (*а*) и сорбцию гидрогеназы (*б*) в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,19 мг/мл; буфер трис 0,05 М (*2, 4*) или трис 0,05 М и MES 0,05 М (*1, 3, 5*): *1, 2* — без $CaCl_2$; *3, 4* — 0,8 мМ $CaCl_2$; *5* — 1,6 мМ $CaCl_2$

(см. рис. 4). Вероятным объяснением этого различия является то, что в отсутствие $CaCl_2$ трис выполняет функцию не только донора электрона для TiO_2, но также катиона, обеспечивающего сорбцию гидрогеназы на полупроводнике.

Использование различных образцов TiO_2; модифицирование поверхности TiO_2. Как следует из наших результатов, безмедиаторное фотообразование H_2 при использовании суспензий TiO_2 фирмы «Fluka» возможно лишь в условиях, обеспечивающих снижение отрицательного заряда поверхности полупроводника. Представляло интерес исследовать сорбцию гидрогеназы и фотообразование H_2 в суспензиях образцов TiO_2 с другими поверхностными свойствами и другим значением ИЭТ. Мы использовали препарат P25 TiO_2 фирмы «Degussa», имеющий ИЭТ при pH 6,1 [11], а также модифицировали поверхность TiO_2 и P25 TiO_2 обработкой фосфатом или щелочью. Ионы фосфата прочно связываются на поверхности TiO_2, увеличивая ее отрицательный заряд [12]. Обработка TiO_2 щелочью приводит к удалению имеющихся на поверхности примесных неорганических анионов и, таким образом, сдвигает ИЭТ в область более высоких значений pH [12].

Как следует из результатов, представленных в табл. 2, сорбция гидрогеназы на P25 TiO_2 значительно выше, чем на TiO_2 фирмы «Fluka», как в водных суспензиях, так и в трис-буфере. Соответственно фотообразование H_2 в суспензиях P25 TiO_2 в трис-буфере происходит с высокой скоростью в отсутствие $CaCl_2$ (до 1,5 мкл H_2/мин на 1 мл при концентрации полупроводника 12 мг/мл). Добавление $CaCl_2$ приводит к некоторому уменьшению скорости реакции.

Опыты с применением 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,2, показали, что ионы фосфата практически полностью подавляют безмедиаторное

Таблица 2

Адсорбция гидрогеназы *T. roseopersicina* на TiO_2 фирмы «Fluka» и P25 TiO_2 фирмы «Degussa»

Состав среды	Количество сорбированной гидрогеназы, %	
	TiO_2	P25 TiO_2
H_2O	1	65
Трис-буфер, pH 7,2	6	100
Трис-буфер + $CaCl_2$, 5 мМ	100	100
Фосфатный буфер, pH 7,2	0	4

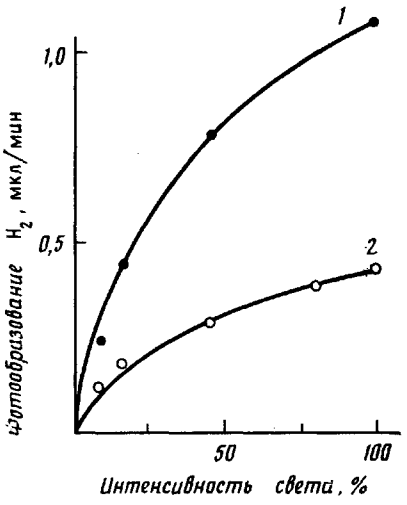


Рис. 6

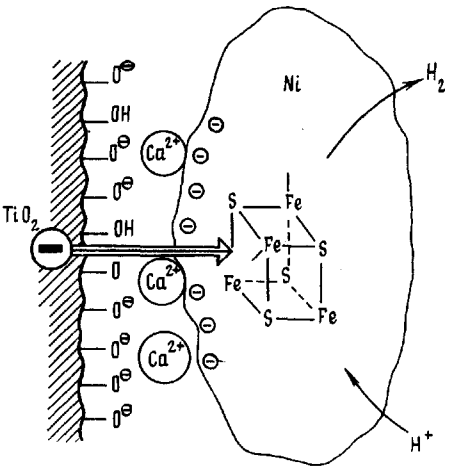


Рис. 7

Рис. 6. Зависимость фотообразования H_2 в суспензии, содержащей TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,19 мг/мл, 1,6 мМ $CaCl_2$ в 0,05 М трис (pH 7,2), от интенсивности света при освещении: *1* — светом ртутной лампы в области 320—800 нм, 100% соответствует $2{,}8 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$; *2* — $\lambda = 365$ нм, 100% соответствует $1 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$

Рис. 7. Гипотетическая схема взаимодействия гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* с TiO_2 в присутствии ионов Ca^{2+}

фотообразование H_2 в суспензии TiO_2 фирмы «Fluka» (донор электрона — 0,05 М сахароза). В то же время, когда TiO_2 сопряжен с ферментом посредством MB^{2+}, ионы фосфата снижают скорость реакции лишь в 1,5—2 раза. При использовании P25 TiO_2 (донор электрона — 10%-ный метанол) скорость фотообразования H_2 в фосфатном буфере также была низкой (<0,01 мкл H_2/мин на 1 мл суспензии).

Обработка TiO_2 фирмы «Fluka» 0,1 М КОН с последующей отмывкой суспензии увеличивает сорбцию гидрогеназы от 6 до ~50% (при концентрациях TiO_2 33 мг/мл и гидрогеназы 0,19 мг/мл в трис-буфере). Это приводит к увеличению скорости фотообразования H_2 в ~10 раз. Добавление $CaCl_2$ обеспечивает дальнейшее повышение скорости реакции, но в меньшей степени, чем в случае необработанного TiO_2.

Таким образом, изменение поверхностного заряда TiO_2 оказывает непосредственное влияние на способность TiO_2 сорбировать гидрогеназу, а также на скорость безмедиаторного фотообразования H_2.

Влияние интенсивности света. Активность гидрогеназы при безмедиаторном фотообразовании H_2. Зависимость скорости фотообразования H_2 в системе трис — TiO_2 — гидрогеназа в присутствии 1,6 мМ $CaCl_2$ от интенсивности света нелинейна (рис. 6). Существенно, что в широком интервале интенсивности света реакция не достигает насыщения. Это свидетельствует об эффективном оттоке электронов из зоны проводимости полупроводника к ферменту в отсутствие переносчика электрона. При интенсивности света $1 \cdot 10^3$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ ($\lambda = 365$ нм) измерен квантовый выход фотообразования H_2 — $\Phi(H) = 9 \pm 0{,}9\%$.

При освещении суспензий TiO_2 светом ртутной лампы в области 320—800 нм интенсивностью ~$3 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ скорость фотообразования H_2 при безмедиаторном переносе электронов от полупроводника к ферменту близка к скорости образования H_2 от восстановленного дитионитом MB^{2+} (табл. 1). При концентрации гидрогеназы 2,5 мкг/мл удельная активность гидрогеназы, катализирующей фотообразование H_2, практически совпадает с удельной активностью фермента, измеренной в стандартных условиях без освещения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2, содержащих донор электрона и гидрогеназу, представляет собой сложный процесс, состоящий из ряда стадий. Среди них можно выделить следующие, оказывающие прямое влияние на эффективность суммарного процесса: поглощение света частицами полупроводника; окисление донора электрона полупроводником, определяющее концентрацию свободных электронов в зоне проводимости; сорбция гидрогеназы на TiO_2, обеспечивающая возможность прямого переноса фотогенерированных электронов; образование H_2 сорбированной гидрогеназой, т. е. ферментативная активность гидрогеназы в условиях опытов.

Результаты настоящей работы показывают, что необходимым условием эффективного фотообразования H_2 при прямом фотоиндуцированном переносе электронов от TiO_2 к бактериальной гидрогеназе является сорбция фермента на поверхности полупроводника. Сорбцию гидрогеназы удается обеспечить двумя способами: добавлением хлоридов щелочноземельных металлов или снижением pH суспензии.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что связывание гидрогеназы на TiO_2 в этих условиях происходит главным образом за счет электростатического взаимодействия фермента с полупроводником. Центрами связывания отрицательно заряженных при $pH > 4{,}2$ молекул гидрогеназы на поверхности TiO_2 могут служить адсорбированные на частицах TiO_2 катионы щелочноземельных металлов или органические катионы (трис) (рис. 7). Сорбции гидрогеназы может способствовать также взаимодействие Ca^{2+} с молекулами белка, приводящее к уменьшению их отрицательного заряда. В кислой области pH возможна сорбция гидрогеназы на положительно заряженных центрах TiO_2, образующихся вследствие протонирования поверхностных гидроксильных групп:

$$\geqslant Ti{-}OH^{+} + H^{+} \rightleftarrows \geqslant Ti^{+} + H_2O,$$

$$\geqslant Ti{-}OH + H^{+} \rightleftarrows \geqslant Ti{-}OH_2^{+}.$$

Наряду с этим при уменьшении pH происходит протонирование ряда аминокислотных групп молекул гидрогеназы, что обеспечивает возможность их взаимодействия с отрицательно заряженными поверхностными центрами TiO_2.

Следует отметить аналогию в активирующем действии двухвалентных катионов на процесс фотопереноса электронов от неорганического полупроводника, наблюдающемся в нашей работе, и известной из литературы [13, 14] активацией поливалентными катионами электрохимического восстановления ряда белков на гидрофильных электродах.

В противоположность нашему выводу об электростатическом характере взаимодействия гидрогеназы и TiO_2, в работе [5] сорбция бактериальных гидрогеназ на TiO_2 объяснялась образованием водородных связей. Основанием для этого было наблюдение, что максимальная сорбция белков на TiO_2 происходила при pH, близких к их pI. В то же время отмечалось, что обработка 6 М мочевиной приводит к десорбции 50% связанного белка, а 1 М NaCl не вызывает десорбции. Следует отметить, что в этой работе использовались суспензии TiO_2 в фосфатном буфере, молекулы которого, как известно, сильно адсорбируются на поверхности TiO_2 [12]. В работе [15], где детально изучена сорбция альбумина на TiO_2 и гидроксилапатите, обнаружено отличие характера сорбции белка в отсутствие фосфата и в его присутствии: в последнем случае белок адсорбировался на поверхности оксида, покрытой слоем связанного фосфата, и образующаяся связь была слабой. Возможно, с особым характером сорбции гидрогеназы на TiO_2 в присутствии фосфата связан тот факт, что в работе [5] не удалось наблюдать прямой перенос электронов от TiO_2 к адсорбированной гидрогеназе, хотя фермент сохранял активность в реакции с восстановленным MB^{2+}.

12 (13)

ДОКЛАДЫ
АКАДЕМИИ НАУК СССР

1991

ТОМ 319 № 1

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК

Доклады Академии наук СССР
1991. Том 319, № 1

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

© В.В. НИКАНДРОВ, А.И. АРИСТАРХОВ,
М.А. ШЛЫК, академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРЯМОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ОТ ЧАСТИЦ ПОЛУПРОВОДНИКА – СЕРНИСТОГО КАДМИЯ – К ГИДРОГЕНАЗЕ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ THIOCAPSA ROSEOPERSICINA

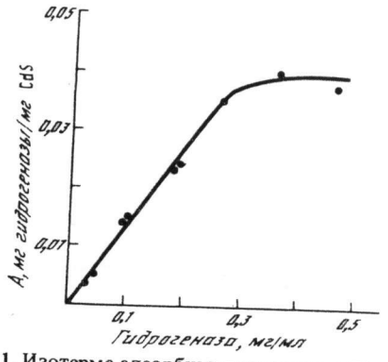
В работах нашей лаборатории [1–7], а также лабораторий Гретцеля [8–10] и Уилнера [11–12] была показана возможность сопряженного действия неорганических полупроводников (TiO_2, ZnO, CdS) и ферментов (гидрогеназ, дегидрогеназ) при фотообразовании водорода, фотовосстановлении $NAD(P)^+$, фотосинтезе органических кислот и аминокислот. Система неорганический полупроводник – фермент способна преобразовывать энергию света в результате фотосенсибилизированного полупроводником окисления донора электрона и катализируемого ферментом восстановления субстратов – акцепторов электрона (H^+, $NAD(P)^+$) с использованием электронов, фотогенерированных в частицах полупроводника. Сопряжение неорганического полупроводника и фермента обычно достигается с помощью переносчика электронов: метилвиологена, бипиридильного комплекса родия и других соединений, способных к обратимому окислению – восстановлению.

Особый интерес представляет осуществление ферментативной реакции при прямом переносе электронов, фотогенерируемых в зоне проводимости полупроводника, к реакционному центру фермента, так как реализация такой возможности является предпосылкой для создания фотобиокатализаторов, биосенсорных и биоэлектронных устройств на основе неорганических полупроводников, связанных с ферментами или редокс-белками.

Впервые безмедиаторное сопряженное действие полупроводника и фермента было показано в нашей лаборатории при исследовании фотообразования водорода в суспензиях TiO_2, содержащих бактериальную гидрогеназу и органические доноры электрона [1, 3, 4], и подтверждено в лаборатории Гретцеля [10]. В дальнейшем было установлено, что необходимым условием эффективного фотообразования H_2 при безмедиаторном сопряжении гидрогеназы и TiO_2 является сорбция фермента на поверхности полупроводника. Показано, что в условиях, обеспечивающих связывание гидрогеназы с поверхностью TiO_2 за счет электростатических взаимодействий, квантовый выход фотообразования H_2 при прямом переносе электронов от TiO_2 к ферменту достигает 10% [5–7].

В настоящем сообщении описано фотообразование водорода при безмедиаторном сопряженном действии гидрогеназы Thiocapsa roseopersicina и CdS – неорганического полупроводника, имеющего отличные от TiO_2 поверхностные и энергетические свойства, способного поглощать свет в видимом диапазоне спектра ($\lambda < 500$ нм). Фотообразование водорода в присутствии медиатора – метилвиологена описано нами ранее [2].

В работе использовали дисперсные порошки CdS фирмы "Aldich", 99,999% (31 $м^2/г$) и CdS марки "XU" (10 $м^2/г$), метилвиологен дихлорид и дитиотреитол "Sigma", дитионит натрия "Merck" (ФРГ). Гидрогеназу из фототрофных бактерий Th. roseopersicina, штамм ВВС, выделяли и очищали по методу [13]. Для определения сорбции гидрогеназы суспензию полупроводника, содержащую гидрогеназу,



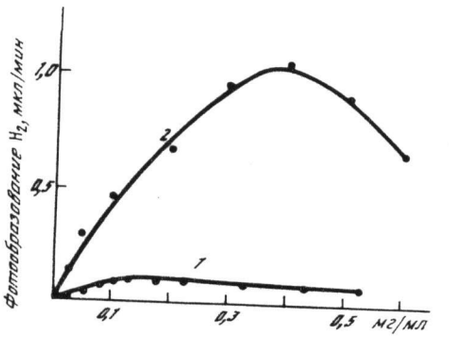


Рис. 1. Изотерма адсорбции гидрогеназы Th. roseopersicina на CdS. 0,06 *M* фосфатный буфер, pH 6,5; 2 мг/мл CdS

Рис. 2. Зависимость скорости фотообразования H_2 в суспензиях CdS от концентрации гидрогеназы: *1* – 3 мг/мл CdS, *2* – 30 мг/мл CdS. 0,06 *M* фосфатный буфер, pH 6,5; 0,1 *M* дитиотреитол

перемешивали в течение 15 мин, центрифугировали при 8000*g* и измеряли количество оставшегося в супернатанте белка по оптической плотности при 280 нм.

Для измерения количества образующегося H_2 1 мл суспензии полупроводника помещали в стеклянную ячейку, продували аргоном, после чего при перемешивании освещали лампой ДРШ-250 в области 400–800 нм или линиями ртути 436 нм. Через определенные промежутки времени газовую фазу подавали на колонку хроматографа "Chrom 4".

Учитывая тот факт, что необходимым условием сопряженного действия TiO_2 и гидрогеназы в отсутствие переносчика электронов является сорбция фермента на полупроводнике [5–7], на первом этапе работы мы исследовали сорбцию гидрогеназы Th. roseopersicina на CdS.

Гидрогеназа сорбируется на CdS в различных буферных растворах – фосфатном, трис, MES, HEPES, а также в воде. С увеличением pH раствора степень сорбции снижается. В 0,06 *M* фосфатном буфере зависимость сорбции гидрогеназы в области pH 5–7 на CdS близка к линейной. Двухвалентные катионы Ca, Cd, Zn, которые активируют сорбцию гидрогеназы на TiO_2 [5–7], практически не влияли на сорбцию гидрогеназы на CdS.

На рис. 1 представлена изотерма адсорбции гидрогеназы на CdS при pH 6,5. Начальный участок изотермы характеризуется линейной зависимостью сорбции от концентрации фермента. Насыщение адсорбции достигается при соотношении 0,04 мг гидрогеназы на 1 мг CdS, при котором по оценочным расчетам происходит покрытие около половины поверхности полупроводника.

Исследование фотообразования H_2 в суспензиях CdS проводили в 0,06 *M* фосфатном буфере при pH 6,5. При освещении суспензий CdS, содержащих гидрогеназу и донор электрона – дитиотреитол, наблюдается образование водорода, зависящее от концентрации CdS, гидрогеназы (рис. 2) и дитиотреитола. Зависимость от интенсивности света (линии ртути 365 нм) линейна в пределах 10^2–10^5 эрг/см^2 · с. С увеличением концентрации гидрогеназы выше определенного значения, различного для разных содержаний CdS, наблюдается падение скорости выделения водорода, что, по-видимому, связано с избыточным заполнением поверхности CdS сорбированной гидрогеназой и влиянием фермента на агрегативную устойчивость суспензии полупроводника.

Безмедиаторное фотообразование водорода в суспензиях CdS происходит также при использовании в качестве доноров электрона цистеина, глицина, метанола, ЭДТА, аскорбата. Однако эффективность фотообразования H_2 при использовании этих соединений была в описанных условиях значительно ниже, чем с дитиотреитолом.

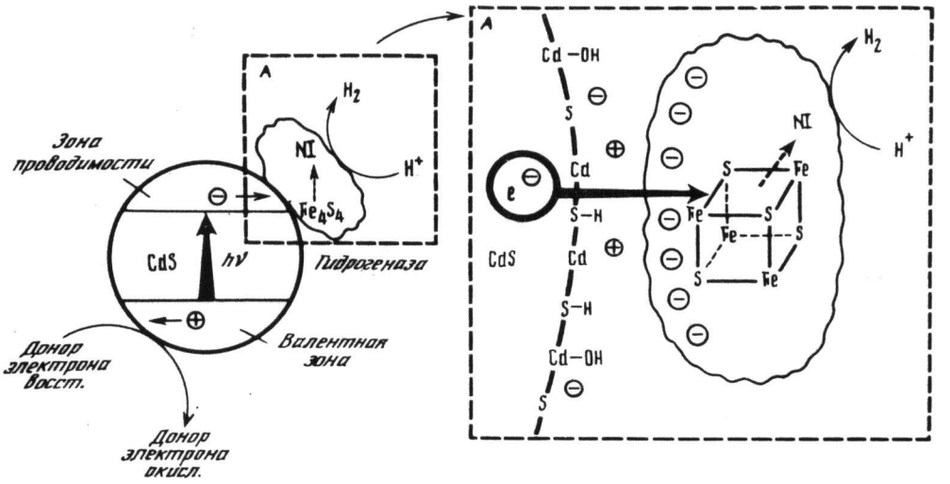


Рис. 3. Гипотетическая схема фотообразования H_2 при сопряженном безмедиаторном действии CdS и гидрогеназы

Введение в суспензию CdS метилвиологена, способного переносить электроны от полупроводника к гидрогеназе, увеличивает скорость образования H_2 в 7–20 раз в зависимости от соотношения фермент/полупроводник. Для иллюстрации приведены результаты следующей серии опытов по фотообразованию водорода (в мкл/мл · мин). Освещение суспензии CdS в 0,06 *M* фосфатном буфере при pH 6,5 в присутствии 0,1 *M* дитиотреитола практически не приводит к выделению водорода ($< 0{,}02$). Введение 0,2 мг гидрогеназы перед освещением приводит к выделению водорода (0,7). Введение 10 м*M* метилвиологена (MB^{2+}) через 20 мин освещения суспензии, содержащей гидрогеназу, приводит к значительному выделению водорода (6,4). В контрольном опыте (в темноте) с CdS, MB^{2+}, дитионитом и гидрогеназой наблюдалось близкое по величине выделение водорода (5,2).

Как видно из этих данных, скорость фотообразования H_2 в присутствии метилвиологена сравнима со скоростью образования H_2 в темновых условиях, когда метилвиологен, концентрация которого составляла 5 к*M*, восстанавливался дитионитом, добавленным в избыточном количестве. Этот факт указывает на то, что при освещении в суспензии CdS генерируется количество восстановительных эквивалентов, достаточное для насыщения гидрогеназы.

Данные, представленные на рисунках, получены в условиях, когда в суспензии гидрогеназа находилась в адсорбированном состоянии и частично в растворе. Нами были также использованы образцы CdS, содержащие адсорбированную гидрогеназу, которые были получены центрифугированием суспензий CdS, выдержанных с гидрогеназой и отмытых от фермента, оставшегося в растворе.

Начальная скорость фотообразования H_2 в суспензиях таких образцов близка к скорости фотообразования H_2 в суспензиях CdS, содержащих то же количество фермента. Однако при длительном освещении скорость фотообразования H_2 в суспензиях CdS, содержащих адсорбированную гидрогеназу, падала, что отражало частичную адсорбцию фермента. Падение скорости фотообразования H_2 со временем зависело от условий сорбции и времени выдерживания CdS с гидрогеназой перед центрифугированием.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что образование H_2 осуществляется гидрогеназой, адсорбированной на поверхности CdS и способной использовать электроны, фотогенерированные в полупроводнике в качестве субстрата.

Гипотетическая схема фотообразования H_2 в суспензиях CdS представлена на рис. 3.

В отличие от ситуации, наблюдаемой в суспензиях TiO_2 [5–7], переносчик электронов метилвиологен значительно активирует фотообразование H_2 в суспензиях CdS. Принимая во внимание этот факт, а также линейную зависимость фотообразования H_2 от интенсивности света в суспензиях CdS, можно предположить, что лимитирующей стадией безмедиаторного фотообразования H_2, осуществляемого CdS и гидрогеназой, является перенос электронов от полупроводника к ферменту. Причиной этого может быть случайная или неблагоприятная ориентация сорбированной на поверхности CdS гидрогеназы, при которой перенос электрона на редокс-центр белка, служащий первичным акцептором электрона, затруднен или протекает с низкой скоростью.

Как было показано ранее, сорбцию гидрогеназы Th. roseopersicina на частицах TiO_2 можно обеспечить введением в суспензию хлоридов щелочноземельных металлов или снижением pH суспензии менее 7 [6]. Полученные данные позволили сделать вывод об электростатическом характере сорбции гидрогеназы на TiO_2. В суспензиях CdS катионы двухвалентных металлов не влияют на сорбцию гидрогеназы, но подкисление суспензии способствует связыванию белка с поверхностью полупроводника. По литературным данным [14] на поверхности CdS в водном растворе имеются два типа функциональных центров: центры Бренстеда и центры Льюиса, для которых потенциалопределяющими являются ионы H^+ и OH^- или Cd^{2+} и S^{2-} соответственно. Количество центров Бренстеда на поверхности CdS невелико, но возможно, что при понижении pH их роль в обеспечении сорбции гидрогеназы становится заметной. Десорбция гидрогеназы при повышении pH показывает, что гидрогеназа обратимо сорбируется на положительно заряженных центрах CdS. Однако данные по сорбции гидрогеназы при pH 6–7 в различных буферных растворах, а также в воде, когда количество положительно заряженных центров на поверхности полупроводника мало (изоэлектрическая точка CdS = 6 [14]), позволяют предположить, что протонированные центры не являются единственными в обеспечении сорбции гидрогеназы на CdS.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности фотообразования H_2 при безмедиаторном сопряженном действии неорганического полупроводника CdS и гидрогеназы Th. roseopersicina. В условиях, способствующих связыванию гидрогеназы на поверхности CdS, возможен прямой фотоиндуцированный перенос электрона из зоны проводимости полупроводника к реакционному центру фермента. Различия в эффективности безмедиаторного сопряжения гидрогеназы с CdS и TiO_2, по-видимому, определяются различным характером сорбции гидрогеназы на этих полупроводниках.

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

Поступило
11 III 1991

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А., Брин Г.П., Никандров В.В.* – ДАН, 1976, т. 229, № 4, с. 990–993. 2. *Красновский А.А., Брин Г.П., Луганская А.Н., Никандров В.В.* – ДАН, 1979, т. 249, № 4, с. 896–899. 3. *Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А.* – ДАН, 1981, т. 256, № 5, с. 1247–1253. 4. *Nikandrov V.V., Brin G.P., Krasnovsky A.A.* – Photobiochem. Photobiophys., 1983, vol. 6, № 2, p. 101–107. 5. *Никандров В.В., Шлык М.А., Зорин Н.А. и др.* – ДАН, 1988, т. 300, № 4, с. 990–994. 6. *Nikandrov V.V., Shlyk M.A., Zorin N.A. et al.* – FEBS Lett., 1988, vol. 234, № 1, p. 111–114. 7. *Шлык М.А., Никандров В.В., Зорин Н.А., Красновский А.А.* – Биохимия, 1989, т. 54, № 10, с. 1598–1606. 8. *Cuendet P., Grätzel M., Rao K.K., Hall D.O.* – Photobiochem. Photobiophys., 1984, vol. 7, № 5/6, p. 331–340. 9. *Cuendet P., Grätzel M., Pelaprat M.L.* – J. Electroanal. Chem., 1984, vol. 181, № 1/2, p. 173–185. 10. *Cuendet P., Rao K.K., Grätzel M., Hall D.O.* – Biochimie, 1986, vol. 68, № 1, p. 217–221. 11. *Willner I., Mandler D., Maidan R.* – Nouv. J. Chim., 1987, vol. 11, № 2, p. 109–121. 12. *Goren Z., Lapidot N., Willner I.* – J. Mol. Catal., 1988, vol. 47, № 1, p. 21–32. 13. *Зорин Н.А., Гоготов И.Н.* – Биохимия, 1982, т. 47, № 5, с. 827–833. 14. *Park S.W., Huang C.P.* – J. Coll. Interface Sci., 1987, vol. 117, № 2, p. 431–441.

БИОФИЗИКА
Том 35, вып. 2 1990

© 1990 г.

НАДТОЧЕНКО В. А., РУБЦОВ И. В., НИКАНДРОВ В. В.,
СЕМЕНОВА А. Н., КРАСНОВСКИЙ А. А.

РЕАКЦИИ ФЕОФИТИНА В ТРИПЛЕТНОМ СОСТОЯНИИ В МИЦЕЛЛАХ ДЕТЕРГЕНТА И ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛАХ

Методом лазерного импульсного фотолиза исследован механизм фотовосстановления метилвиологена (MB^{2+}) аскорбатом (AH^-), сенсибилизированного феофитином *a* (Фф), включенным в мицеллы детергента и в мембрану липосом из фосфатидилхолина. Установлено, что промежуточным продуктом фотосенсибилизированной реакции является анион-радикал феофитина ($Фф^{\cdot-}$), образующийся при взаимодействии аскорбата с феофитином в триплетном возбужденном состоянии ($^3Фф^*$). В отсутствие акцептора электрона анион-радикалы феофитина гибнут в результате обратного переноса электрона на радикал аскорбата ($A^{\cdot-}$) или в реакции диспропорционирования с образованием восстановленной формы феофитина. В присутствии MB^{2+} гибель радикалов феофитина сопровождается образованием катион-радикалов метилвиологена (MB^{+}). Катион-радикалы метилвиологена окисляются радикалами аскорбата или дегидроаскорбатом (A). Выявлен ряд отличий в процессах тушения $^3Фф^*$ и гибели $Фф^{\cdot-}$ в мицеллах детергента и мембранах липосом.

В последние годы установлено участие феофитина *a* (Фф) в процессе первичного разделения зарядов в реакционных центрах фотосистемы II высших растений [1, 2]. Это возродило интерес к исследованиям фотохимических свойств Фф в модельных системах, которые были начаты в работах [3, 4]. Исследованы пути дезактивации энергии возбуждения и перенос электронов в ассоциатах хлорофилла *a* и феофитина *a* [5, 6]. Изучены кинетические закономерности образования и гибели промежуточных продуктов в реакции фотовосстановления Фф в органических растворителях [7]. Исследовано фотовосстановление Фф, адсорбированного на частицах полиэтилена, производными гидразина [8]. Особый интерес представляет исследование фотохимических свойств Фф, включенного в искусственные липидные мембраны. В работах [9, 10] было показано, что Фф, включенный в мембраны липосом, сенсибилизирует фотоиндуцированный трансмембранный перенос электрона от аскорбата, расположенного во внутреннем водном объеме липосом, к метилвиологену (MB^{2+}) и этилвиологенсульфату с высоким квантовым выходом восстановления акцептора электронов (до 20%).

Цель настоящей работы — исследование методом лазерного фотолиза механизма фотосенсибилизированного Фф транспорта электронов от аскорбата к метилвиологену в мицеллярных растворах детергента и в суспензиях липосом.

Материалы и методы. Для приготовления липосом использовали яичный лецитин (фосфатидилхолин) и Фф, выделенные по стандартным методикам с конечной хроматографической очисткой. В работе использованы тритон *X*-100, метилвиологенхлорид, динатриевая соль аскорбата («Serva»). Мицеллярный раствор тритона *X*-100 готовили в 0,1 *M* *трис*-HCl-буфере, pH 7,0, используя концентрацию детергента 2%; липосомы получали по методике, описанной в [11]. Опыты проводили в кварцевой термостатируемой кювете толщиной 1 см при 20° С в анаэробных условиях. В качестве источника возбуждения использовали рубиновый лазер (λ=694,3 нм, полуширина импульса 30 нс) либо N_2-лазер (λ=337 нм, полуширина импульса 4 нс). Изменение во времени оптической плотности раствора после прохождения возбуждающего импульса регистрировали с помощью лазерного фотометра, оптическая схема которого описана ранее [12]. Сигнал с ФЭУ подавали на вход запоминающего осцил-

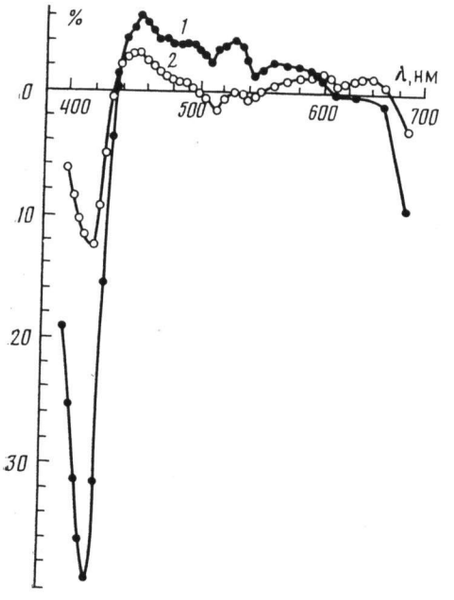


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения ^{3}Фф* и Фф$^-$ в мицеллярном растворе тритона X-100, содержащем 0,3 М аскорбата, измеренные через 2 мкс (*1*) и через 1 мс (*2*) после импульса фотовозбуждения

Рис. 2. Кинетические кривые индуцированного импульсным фотовозбуждением поглощения феофитина *а* в 2%-ных растворах тритона *X*-100 при 460 (*а, б*), 501 (*в*) и 401 нм (*г*) в отсутствие добавок (кривые 2, рис. *а* и *в*) и в присутствии 0,3 М аскорбата кривые *1*, рис. *а, в* и кривая рис. *б* и 3,9 мМ метилвиологена: стрелкой показано включение лазера

Рис. 1

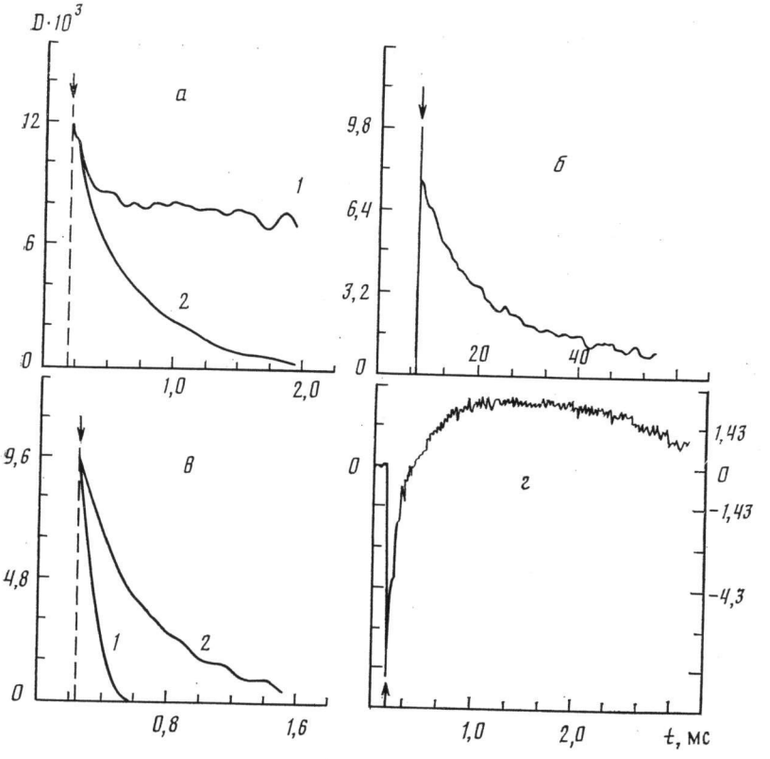


Рис. 2

лографа С8-12 с последующим фотографированием изображения экрана, либо на вход быстродействующего АЦП (время выборки 200 нс на точку) с буферной памятью. Кинетические кривые в виде массива точек обрабатывали на ЭВМ «Электроника 60 М», БЭСМ-6.

Результаты и обсуждение. В мицеллярном растворе детергента и в суспензии липосом, содержащих Фф, при импульсном возбуждении наблюдается дифференциальный спектр поглощения ^{3}Фф* (рис. 1, кривая

1), согласующийся с известным спектром $^3Фф^*$ в пиридине и этаноле [7, 13]. При добавлении донора электронов — аскорбата ($АН^-$) к суспензии липосом или мицеллам детергента наблюдается ускорение тушения $^3Фф^*$ (рис. 2, *а*, *в*), тогда как $МВ^{2+}$, добавляемый в концентрации до 0,1 М не приводит к ускорению тушения $^3Фф^*$. В реакции тушения $^3Фф^*$ аскорбатом образуются радикалы, спектр поглощения которых (рис. 1, кривая *2*) совпадает со спектром $Фф^{\cdot-}$ в пиридине и этаноле [7, 14].

Ни в мицеллярном растворе детергента, ни в суспензии липосом практически не наблюдается тушения флуоресценции Фф аскорбатом ($\leqslant$0,5 М) и метилвиологеном ($\leqslant$0,01 М). Таким образом, фотореакции феофитина с $АН^-$ и $МВ^{2+}$ в исследуемом диапазоне концентраций реагентов не могли протекать через синглетное возбужденное состояние Фф.

В системе Фф—$АН^-$ вслед за образованием радикалов $Фф^{\cdot-}$ происходит их гибель (рис. 2, *б*). В системе Фф—$АН^-$—$МВ^{2+}$ гибель $Фф^{\cdot-}$ сопровождается восстановлением $МВ^{2+}$ до $МВ^{\cdot+}$ (что проявляется в увеличении поглощения в максимуме поглощения $МВ^{\cdot+}$ при 395 нм) и последующей гибелью $МВ^{\cdot+}$ (рис. 2, *г*). Гибель $Фф^{\cdot-}$ в системе двух реагентов и гибель $МВ^{\cdot+}$ в системе трех реагентов обусловлены процессами окисления этих радикалов радикалами аскорбата и дегидроаскорбатом. В условиях эксперимента (pH 7,2) радикалы аскорбата, значение pK которых равно —0,45 [15], будут находиться преимущественно в основной форме и вступать в реакцию диспропорционирования ($k=3{,}5\cdot10^5$ $М^{-1}\cdot с^{-1}$ [16]). Схема процесса восстановления метилвиологена аскорбатом, сенсибилизированного Фф, может быть представлена реакциями

$$Фф + h\nu \rightarrow {}^1Фф^* \rightarrow {}^3Фф^* \quad (0)$$

$$^3Фф^* \rightarrow Фф, \quad (1)$$

$$^3Фф^* + МВ^{2+} \rightarrow \text{тушение}, \quad (2)$$

$$^3Фф^* + АН^- \begin{cases} \rightarrow Фф^{\cdot-} + А^{\cdot-} + H^+, & (3) \\ \rightarrow Фф + АН^-, & (4) \end{cases}$$

$$Фф^{\cdot-} + А^{\cdot-} \xrightarrow{+H^+} Фф + АН^-, \quad (5)$$

$$Фф^{\cdot-} + МВ^{2+} \rightarrow Фф + МВ^{\cdot+}, \quad (6)$$

$$МВ^{\cdot+} + А^{\cdot-} \xrightarrow{+H^+} МВ^{2+} + АН^-, \quad (7)$$

$$А^{\cdot-} + А^{\cdot-} \xrightarrow{+H^+} АН^- + А, \quad (8)$$

$$Фф^{\cdot-} + А \rightarrow Фф + А^{\cdot-}, \quad (9)$$

$$МВ^{\cdot+} + А \rightarrow МВ^{2+} + А^{\cdot-}, \quad (10)$$

Радикалы $Фф^{\cdot-}$, образующиеся в двойной системе Фф—$АН^-$, без добавок $МВ^{2+}$ могут также гибнуть в реакции

$$Фф^{\cdot-} + Фф^{\cdot-} \rightarrow Фф + Фф^{2-}. \quad (11)$$

При стационарном освещении в двойной системе Фф—$АН^-$ наблюдается восстановление феофитина до формы $Фф^{2-}$. Однако обратимое (на 90%) выцветание феофитина в двойной системе Фф—$АН^-$, регистрируемое на длинах волн $\sim$395 и 420 нм, свидетельствует, что основным каналом гибели радикалов $Фф^{\cdot-}$ является реакция рекомбинации $Фф^{\cdot-}$ с $А^{\cdot-}$ (5).

В растворе детергента наблюдается экспоненциальный закон затухания $^3Фф^*$, время жизни $^3Фф^*$ равно 490 мкс. Время жизни $^3Фф^*$ и концентрация тушителя $АН^-$ связаны зависимостью Штерна — Фольмера, из которой получены константа скорости тушения $k_q=(5{,}0\pm1{,}5)\cdot10^4$ $М^{-1}\cdot с^{-1}$ ($k_q=k_3+k_4$, энергия активации равна 26,4$\pm$1,2 кДж/моль).

Кинетика обратной реакции гибели радикалов $Фф^{\cdot-}$ в двойной системе $Фф^{\cdot-}$ — $А^{\cdot-}$ (5) описывается законом второго порядка (время полупревращения $\tau_{1/2}$ радикалов $Фф^{\cdot-}$ увеличивается в 5 раз при уменьшении энергии импульса лазера в 6 раз). Таким образом, тушение $^3Фф^*$ и пре-

вращение радикалов $Фф^{\cdot-}$ в мицеллярной системе подчиняются закономерностям кинетики реакций в гомогенном растворе. Для определения значений констант скорости реакций (3), (4), (5) численно моделировали кинетические кривые оптической плотности на длинах волн 460 и 501 нм (поглощение, обусловленное в основном $^3Фф^*$) при различных концентрациях $АН^-$ ($[МВ^{2+}]=0$). Значения констант варьировали таким образом, чтобы достичь минимального среднеквадратичного отклонения расчетной и экспериментальной кривых. Были использованы известные значения коэффициентов экстинкции $^3Фф^*$ и радикалов $Фф^{\cdot-}$ при $\lambda=460$ нм ($1{,}32\cdot10^4$ и $1{,}7\cdot10^4$ $М^{-1}\cdot см^{-1}$). Для определения значений констант скорости реакций (6), (7) моделировали кривые для системы из трех реагентов $Фф—АН^-—МВ^{2+}$ на длинах волн 395 и 460 нм. Использовали значение коэффициента экстинкции $МВ^{\cdot+}$ при 395 нм ($4{,}5\cdot10^4\ М^{-1}\cdot см^{-1}$). Полученные константы скорости (k_1, $с^{-1}$; k_i, $i=2$—7, $М^{-1}\cdot с^{-1}$) отдельных стадий восстановления $МВ^{2+}$ аскорбатом, сенсибилизированного феофитином, приведены ниже:

Реакция	(1)	(3)	(4)	(5)	(6)
Мицеллы	$2{,}04\cdot10^3$	$(3{,}0\pm0{,}9)\cdot10^4$	$(2{,}0\pm0{,}6)\cdot10^4$	$(2{,}0\pm0{,}4)\cdot10^8$	$(1{,}6\pm0{,}6)\cdot10^6$
Липосомы	$(2{,}2\pm0{,}2)\cdot10^3$	$(2{,}6\pm0{,}6)\cdot10^5$	$(1{,}4\pm0{,}4)\cdot10^5$	$(2{,}3\pm0{,}1)\cdot10^9$	$(1{,}2\pm0{,}2)\cdot10^6$

($k_2=3\cdot10^{-2}$, $k_7=2\cdot10^7$ в обоих случаях, $k_3/(k_3+k_4)=0{,}6\pm0{,}1$ для мицелл).

Кинетика процессов тушения $^3Фф^*$ превращений $Фф^{\cdot-}$ в суспензии липосом имеет ряд особенностей по сравнению с кинетикой соответствующих процессов в мицеллярном растворе: 1) затухание $^3Фф^*$ в среде липосом не подчиняется экспоненциальному закону, время полупревращения $^3Фф^*$ уменьшается при увеличении концентрации пигмента в липосомах; 2) зависимость $\tau_{1/2}$ тушения $^3Фф^*$ от концентрации тушителя $АН^-$ не описывается зависимостью Штерна — Фольмера (рис. 3); 3) кинетика гибели радикалов $Фф^{\cdot-}$, генерируемых в двойной системе $Фф—АН^-$, не подчиняется закону второго порядка, наблюдается выраженная «затяжка» кинетической кривой. В связи с этим в настоящей работе использовали приближенный метод анализа кинетических кривых, основанный на измерении зависимости $\tau_{1/2}$ отдельных стадий процесса от концентрации $АН^-$ и $МВ^{2+}$, относительного выхода радикалов $Фф^{\cdot-}$ от концентрации $АН^-$. Из зависимости времени жизни $^3Фф^*$ от концентрации пигмента в липосоме при малых концентрациях Фф определено значение времени жизни $^3Фф^*$, равное 460 ± 60 мкс. Как видно из рис. 4, зависимость времени накопления $Фф^{\cdot-}$ ($\tau_{1/2}$) от концентрации $АН^-$ близка к зависимости Штерна — Фольмера, тогда как время полупревращения $^3Фф^*$ ($\tau_{1/2}^T$) существенно от нее отклоняется (рис. 3). Этот факт можно объяснить, предполагая, что для тушителя $АН^-$ доступна только часть молекул $^3Фф^*$ в мембране, равная θ. Тогда можно ожидать, что кинетика спада концентрации $^3Фф^*$ будет определяться зависимостью

$$[^3Фф^*](t)=[^3Фф^*]_{in}\exp(-\ln 2\cdot t/\tau^0_{1/2})+$$
$$+[^3Фф^*]_{out}\exp(-\ln 2\cdot t/\tau^0_{1/2}-k_q t[АН^-]),$$
$$[^3Фф]_{out}=\theta([^3Фф^*]_{in}+[^3Фф^*]_{out})=\theta[^3Фф^*], \qquad (12)$$

где $[^3Фф^*]_{in}$ — концентрация $^3Фф^*$ на внутреннем монослое мембраны липосом, $[^3Фф^*]_{out}$ — на внешнем; $\tau^0_{1/2}$ — время полупревращения $^3Фф^*$ при $[АН^-]=0$.

Кинетика накопления $Фф^{\cdot-}$ должна определяться выражением

$$[Фф^{\cdot-}](t)=\varphi_0[^3Фф^*]\theta\{1-\exp(-\ln 2\cdot t/\tau^0_{1/2}-k_q t[АН^-])\}, \qquad (13)$$

где $\varphi_0=k_3/(k_3+k_4)$ — выход радикалов из клетки. Тангенс угла наклона зависимости $1/(\tau_{1/2})$ от $[АН^-]$ при $[АН^-]\to0$, представленной на рис. 3, согласно (12), дает значение $k_q\theta=(2{,}2\pm0{,}5)\cdot10^5\ М^{-1}\cdot с^{-1}$, а тангенс угла

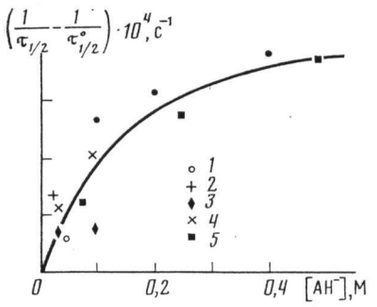


Рис. 3

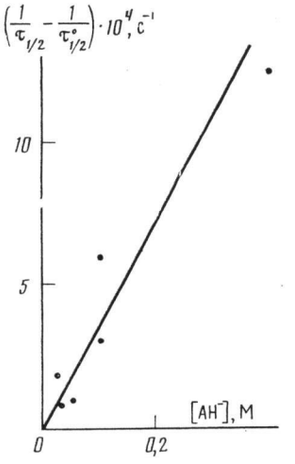


Рис. 4

Рис. 3. Зависимости $\tau_{1/2}$ тушения ^{3}Фф* от концентрации аскорбата с поправкой на значение $\tau_{1/2}$ ($[AH^-]=0$) при различном среднем числе молекул пигмента в липосоме μ: *1* — 9,4; *2* — 12; *3* — 1,7; *4* — 21 (тушитель во внешнем водном пространстве); *5* — 7 (тушитель внутри липосом)

Рис. 4. Зависимость времени накопления $Фф^{\cdot-}$ ($\tau_{1/2}$) от концентрации аскорбата с поправкой на значение $\tau_{1/2}$ ($[AH^-]=0$) в суспензии липосом

Рис. 5. Зависимость выхода радикалов, $Фф^{\cdot-}$ ($\Psi\varepsilon_R/\varepsilon_T$ при $\lambda=460$ нм) от концентрации аскорбата в суспензии липосом

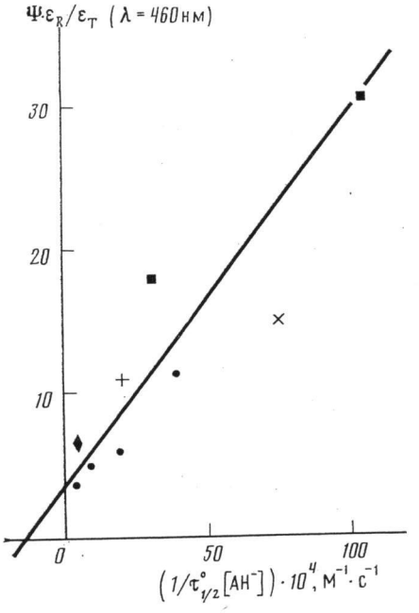


Рис. 5

наклона прямой на рис. 4 — значение $k_q=(4\pm0{,}6)\cdot10^5$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$. Независимым способом оценки величины θ может служить измерение отношения величин выхода радикалов $Фф^{\cdot-}$ в условиях высокой концентрации $[AH^-]=0{,}7$ М, когда аскорбат присутствует только с внешней стороны мембраны. Такое сравнение выхода радикалов при среднем числе молекул Фф на липосому, равном 1,8, дает отношение выходов $0{,}46\pm0{,}1$. Определенные таким образом θ в пределах экспериментальной точности согласуются с полученным из измерений зависимости $\tau_{1/2}$ от $[AH^-]$. Выход радикалов из клетки $\varphi=k_3/(k_3+k_4)$ определен из зависимости выхода радикалов $Фф^{\cdot-}$ от [AH], представленной на рис. 5, согласно формуле

$$\Psi=\frac{1}{\varphi\theta}\left[1+\frac{\ln 2}{k_q\,[AH^-]\,\tau^0_{1/2}}\right], \qquad (14)$$

где $\Psi=[^3Фф^*]_{t=0}/[Фф^{\cdot-}]$. Отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат (рис. 5), дает величину $\varphi\theta=(0{,}36\pm0{,}05)$, откуда $\varphi=0{,}65$. Значение k_5

оценено исходя из времени $\tau_{1/2}$ гибели $Фф^{-\cdot}$ в реакции (5), а k_6 — из зависимости времени жизни радикалов $Фф^{-\cdot}$ от концентрации $МВ^{2+}$. Как видно из приведенных выше данных, значения собственного времени жизни $^3Фф^*$, выход радикалов в реакции тушения $АН^-$ близки для обеих сред — мицелл и липосом. Тушение $^3Фф^*$ анионом $АН^-$ в липосомах происходит несколько быстрее, чем в среде неионных мицелл тритона *X*-100, а реакция $Фф^{-\cdot}$ с $МВ^{2+}$ идет практически с одинаковой константой скорости в мицеллах и в липосомах.

Можно предположить, что наблюдаемые особенности кинетики превращений $^3Фф^*$ и $Фф^{-\cdot}$ в липосомах связаны с особенностями строения липосом и распределением молекул Фф в липосомальной мембране. Тот факт, что Фф располагается как на внутренней, так и на внешней поверхностях мембраны липосомы, приводит к возможности ситуации, когда $^3Фф^*$, находящийся на внутреннем монослое, оказывается недоступным для молекул $АН^-$ из внешнего объема. Объем гидрофобной части липосомы в $\sim$400 раз превосходит объем мицеллы, что может обусловить различие в доступности $^3Фф^*$ и $Фф^{-\cdot}$ для доноров и акцепторов электрона в суспензии липосом и мицеллярном растворе. Выраженную «затяжку» кинетической кривой гибели радикалов $Фф^{-\cdot}$ в суспензии липосом можно объяснить исходя из следующих предположений о взаимодействии ион-радикалов $Фф^{-\cdot}$ и $А^{-\cdot}$ в мембранах липосом. Радикалы $Фф^{-\cdot}$ и $А^{-\cdot}$ могут образовываться на некоторой глубине относительно границы мембрана/водная фаза. Гидрофобный радикал $Фф^{-\cdot}$ связан с мембраной, а гидрофильный радикал $А^{-\cdot}$ распределяется между водной фазой и поверхностью мембраны. Таким образом, на рекомбинацию $Фф^{-\cdot}$ и $А^{-\cdot}$ могут оказывать влияние процессы сорбции и десорбции $А^{-\cdot}$. Наряду с этим обратная рекомбинация $Фф^{-\cdot}$ и $А^{-\cdot}$ может контролироваться диффузией $Фф^{-\cdot}$ в радиальном направлении к поверхности мембраны.

Исследование реакций феофитина в триплетном состоянии с аскорбатом и метилвиологеном в мицеллярном растворе детергента и в суспензии липосом показало, что качественные особенности сенсибилизированного транспорта электронов совпадают для обеих сред, однако кинетика отдельных стадий процесса существенно отличается. Полученные данные позволяют сделать заключение о «восстановительном» механизме сенсибилизированного Фф переноса электрона от $АН^-$ к $МВ^{2+}$: промежуточным продуктом реакции является $Фф^{-\cdot}$. В отличие от Фф хлорофилл сенсибилизирует фотовосстановление метилвиологена в мицеллярных растворах и суспензиях липосом по «окислительному» механизму — на первом этапе происходит перенос электрона от триплетного хлорофилла на $МВ^{2+}$ [17, 18]. Такое различие фотохимических свойств двух пигментов в первую очередь связано с различием в термодинамике реакций взаимодействия триплетных состояний пигментов с $МВ^{2+}$. Действительно, при равенстве энергий триплетных состояний хлорофилла и феофитина ($E_т$ = =1,33 В) [19], Фф в основном и триплетном состояниях имеет более положительный окислительный потенциал, чем хлорофилл (значения $E_м$ для $Фф/Фф^+$, $Хл/Хл^+$, $^3Фф^*/Фф^+$ и $^3Хл^*/Хл^+$ соответственно равны 1,1; 0,78; —0,23 и —0,55 В [20, 21]), что делает маловероятным перенос электронов от $^3Фф^*$ на метилвиологен, имеющий E_0 = —0,45 В. Различие механизмов сенсибилизации фотовосстановления $МВ^{2+}$ может быть причиной различной эффективности феофитина и хлорофилла как фотосенсибилизаторов переноса электрона через мембрану липосом от $АН^-$ к $МВ^{2+}$, показанной в работах [9, 10].

Полученные кинетические данные объясняют тот факт, что при стационарном освещении содержащих Фф, $АН^-$ и $МВ^{2+}$ мицеллярных растворов и суспензий липосом (в случае, когда $АН^-$ и $МВ^{2+}$ находятся по одну сторону мембраны) не наблюдается накопления восстановленного $МВ^+$ [11]. Причиной этого является быстрая обратная реакция (9), в ко-

торой расходуется MB^{+} и регенерируется AH^{-}. Накопление восстановленного MB^{+} при фотосенсибилизированном окислении AH^{-}, наблюдаемое в суспензии липосом, содержащих AH^{-} во внутреннем водном пространстве, а MB^{2+} — во внешней водной фазе, объясняется замедлением обратного переноса электрона между пространственно разделенными донором и акцептором электрона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Клеваник А. В., Климов В. В., Шувалов В. А., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. № 1. С. 241.
2. *Климов В. В., Красновский А. А.*//Биофизика. 1982. Т. 27. С. 179.
3. *Евстигнеев В. Б., Гаврилова В. А.*//Докл. АН СССР. 1954. Т. 96. № 6. С. 1201.
4. *Красновский А. А.*//Успехи химии. 1960. Т. 29. № 6. С. 736.
5. *Зенкевич Э. И., Зенкевич Т. В.*//Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 3. С. 667.
6. *Seely G. R., Senthilathipan V.*//Photochem. Photobiol. 1985. V. 41. № 3. P. 371.
7. *Черников В. С.*//Биофизика. 1985. Т. 30. № 3. С. 389.
8. *Seely G. R., Senthilathipan V.*//Abstr. 5-th Int. Conf. Sol. En. Conv. 1984. P. 261.
9. *Семенова А. Н., Никандров В. В., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 1. С. 189.
10. *Семенова А. Н., Баранникова Я. В., Никандров В. В., Красновский А. А.*//Биол. мембраны. 1987. Т. 4. № 6. С. 648.
11. *Красновский А. А., Семенова А. Н., Никандров В. В.*//Докл. АН СССР. 1982. Т. 262. № 2. С. 469.
12. *Надточенко В. А., Рубцов И. В., Джабиев Т. С.*//Хим. физика. 1983. № 11. С. 1515.
13. *Елфимов Е. И., Возняк В. М., Канцева Т. А., Евстигнеев В. Б.*//Биофизика. 1977. Т. 22. № 6. С. 1004.
14. *Fujita I., Davis M. S., Fayer J.*//J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 19. P. 6280.
15. *Laroff G. P., Fessenden R. W., Schuler R. H.*//Ibid. 1972. V. 94. № 26. P. 9062.
16. *Bielski B. H. J., Coustocj D. A., Bowen R. A.*//Ibid. 1971. V. 93. № 22. P. 5624.
17. *Kalyanasundaram K., Porter G.*//Proc. Roy. Soc. L., 1978. A. 364. P. 29.
18. *Ford W. E., Tollin G.*//Photochem. Photobiol. 1982. V. 35. P. 809.
19. *Красновский А. А. (мл.), Лебедев Н. Н., Литвин Ф. Ф.*//Докл. АН СССР. 1974. Т. 216. № 6. С. 1406.
20. *Seely G. R.*//Photochem. Photobiol. 1978. V. 27. № 6. P. 639.
21. *Stanienda A.*//Z. Phys. Chem. 1965. B. 229. S. 257.

Отделение Института химической физики АН СССР, Черноголовка (Московская область);

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Поступила в редакцию 16.IX.1988

TRIPLET PHEOPHYTIN REACTIONS IN DETERGENT MICELLES AND LIPID VESICLES

NADTOCHENKO B. A., RUBTSOV I. V., NIKANDROV V. V., SEMENOVA A. N., KRASNOVSKY A. A.

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Ac. Sci. USSR, Moscow

The lazer pulse photolysis method was applied to investigate the mechanism of methyl viologen (MV^{2+}) reduction by ascorbate (AH^{-}). The reaction was sensitized by pheophytin «a» (Pp) incorporated in the detergent micelles or in the phosphatidilcholine liposome membrane. The intermediate product of the photosensitized reaction was pheophytin anion-radical ($Pp^{\cdot -}$) formed in the interaction of AH^{-} with pheophytin at triplet excited state ($^{3}Pp^{*}$). In the absence of electron acceptor, anion radicals of pheophytin decayed as a result of the back electron transfer to the ascorbate radical ($A^{\cdot -}$), or in the disproportionation reaction with a formation of the Pp reduced form. In the presence of MV^{2+}, the decay of $Pp^{\cdot -}$ is accompanied by the formation of methyl viologen cation-radicals ($MV^{+\cdot}$). $MV^{+\cdot}$ are oxidized by $A^{\cdot -}$ or dehydroascorbate (A). A number of differentiations were revealed between the processes of $^{3}Pp^{*}$ quenching and $Pp^{\cdot -}$ decay in the detergent micelles and those proceeding in liposome membranes.

БИОХИМИЯ
Т. 54, вып. 10 1989

УДК 577.23

М. А. ШЛЫК, В. В. НИКАНДРОВ, Н. А. ЗОРИН, А. А. КРАСНОВСКИЙ *

ОБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА ПРИ ПРЯМОМ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНОВ ОТ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛУПРОВОДНИКА К БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГИДРОГЕНАЗЕ

Ключевые слова: фотообразование водорода, гидрогеназа, диоксид титана, адсорбция гидрогеназы, перенос электрона полупроводник — фермент.

В водных суспензиях TiO_2, содержащих гидрогеназу *Thiocapsa roseopersicina* и органический донор электрона, наблюдалось фотообразование водорода при прямом переносе электронов от неорганического полупроводника к активному центру фермента. В условиях, способствующих сорбции гидрогеназы на TiO_2, квантовая эффективность образования H_2 достигала 10%. Сорбцию гидрогеназы на TiO_2 можно обеспечить двумя способами: снижением pH суспензии или добавлением $CaCl_2$ или хлоридов других щелочноземельных металлов. В основе связывания гидрогеназы с поверхностью полупроводника лежат преимущественно электростатические взаимодействия. Гидрогеназа, сорбированная на частицах TiO_2, способна с высокой эффективностью использовать в качестве субстрата электроны, фотогенерированные в зоне проводимости полупроводника: скорость образования H_2 при прямом фотоиндуцированном переносе электронов от TiO_2 к гидрогеназе близка к скорости образования H_2, наблюдаемой при использовании в качестве донора электрона восстановленного дитионитом метилвиологена.

В последние годы усилия ряда лабораторий направлены на получение фотокаталитических систем, способных к преобразованию солнечной энергии и синтезу разнообразных химических соединений. Одним из подходов к созданию таких систем является сопряжение неорганических полупроводников, способных под действием света генерировать электронодонорные и электроноакцепторные центры на границе раздела полупроводник — раствор, с ферментами, обеспечивающими протекание реакций с участием фотогенерированных зарядов.

Ранее была обнаружена возможность сопряженного действия неорганических полупроводников и бактериальной гидрогеназы, приводящего к фотообразованию водорода [1—4]. Было показано, что при освещении водных суспензий TiO_2, ZnO или CdS, содержащих доноры электрона, метилвиологен (MB^{2+}) и гидрогеназу *Thiocapsa roseopersicina*, происходит образование H_2 в результате сенсибилизированного полупроводником фотовосстановления H_2 и катализируемого гидрогеназой восстановления H^+ до H_2 с окислением восстановленного MB^{2+}. В дальнейшем было изучено фотообразование H_2 в подобных системах, когда бактериальные гидрогеназы иммобилизированы на частицах TiO_2 [5]. В этих исследованиях перенос электронов от полупроводника к ферменту осуществлялся с помощью переносчика электрона — MB^{2+} или бипиридильных комплексов родия.

Вместе с тем в суспензиях TiO_2 и ZnO фотообразование H_2 наблюдалось и в отсутствие переносчика электрона [1, 3, 4], что свидетельствовало о прямом переносе электронов от полупроводника к активному центру фермента [6]. Возможность фотообразования H_2 в отсутствие переносчика электрона в суспензиях TiO_2, содержащих доноры электрона и бактериальные гидрогеназы, подтверждена другими исследовате-

* Ускоренная публикация.

лями [7]. Однако эффективность образования H_2 в таких опытах была значительно ниже, чем в присутствии переносчика электрона. Оставалось неясным: может ли быть осуществлено достаточно эффективное преобразование энергии света при безмедиаторном сопряжении полупроводника и фермента; насколько велика активность гидрогеназы в случае использования ею в качестве субстрата электронов, фотогенерированных в зоне проводимости полупроводника.

С целью выяснения этих вопросов нами исследовано влияние ионов, pH суспензии, природы донора электрона и поверхности полупроводника, соотношения полупроводник/фермент и других факторов на фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2, содержащих гидрогеназу *Thiocapsa roseopersicina*, а также на сорбцию гидрогеназы на TiO_2.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали дисперсные порошки анатаза TiO_2 фирмы «Fluka» (Швейцария) (8,5 м²/г) и P25 TiO_2 фирмы «Degussa» (50 м²/г). Для приготовления буферных растворов использовали бидистиллированную воду, трис-(оксиэтил)аминометан (трис) и морфолинэтансульфокислоту (MES) фирмы «Sigma» (США). Хлориды бария, натрия, калия, цезия были марки ос. ч., метилвиологен дихлорид — фирмы «Sigma», дитионит натрия — фирмы «Merck» (ФРГ).

Определение ξ-потенциала частиц TiO_2 проводили, измеряя электрофоретическую подвижность частиц в 0,01 М растворе KCl с помощью прибора Zetasizer фирмы «Malvern» (Англия).

Гидрогеназу из фототрофных бактерий *T. roseopersicina*, штамм BBS, выделяли и очищали по методу, описанному ранее [8]. Гомогенность полученных препаратов гидрогеназы проверяли аналитическим электрофорезом в 7%-ном полиакриламидном геле. Ферментативную активность гидрогеназы определяли по скорости образования H_2 в присутствии 2 мМ MB^{2+}, 28 мМ дитионита натрия в буферном растворе, содержащем 0,05 М трис, 0,05 М MES, pH 7,2.

Сорбция гидрогеназы на TiO_2. Суспензии TiO_2, содержащие гидрогеназу, периодически встряхивали в течение 15 мин, центрифугировали при 8000 g и определяли активность гидрогеназы в осадке и супернатанте по скорости образования H_2. Степень сорбции гидрогеназы принимали равной доле активности находящегося в осадке фермента за вычетом количества фермента (обычно 5%), содержащегося в объеме раствора, оставшегося связанным с осадком TiO_2.

Фотовосстановление MB^{2+} проводили в стеклянной вакуумной трубке Тунберга. В трубку помещали 20 мг TiO_2 в 4,5 мл буферного раствора, содержащего 0,05 М трис и 0,05 М MES, pH 7,2, и 0,05 мМ MB^{2+}, вакуумировали и освещали линиями ртути 365 нм. В процессе освещения измеряли оптическую плотность суспензии при 605 нм, помещая вакуумную трубку в сферу Ульбрихта спектрофотометра СФ-14.

Фотообразование H_2. Для измерения количества образующегося H_2 в стеклянную ячейку помещали 1 мл суспензии полупроводника, суспензию продували аргоном, после чего при перемешивании освещали лампой ДРШ-250 в области 320—800 нм ($2{,}8 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$) или 365 нм ($1 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$). Через определенные промежутки времени газовую фазу из ячейки подавали на колонку хроматографа Chrom 4. Интенсивность света измеряли с помощью ферриоксалатного актинометра. Квантовый выход рассчитывали, исходя из предположения о полном поглощении света суспензией полупроводника.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с полученными ранее данными [1, 3], при освещении суспензий TiO_2, содержащих гидрогеназу и донор электрона (трис), происходит образование H_2 (табл. 1, рис. 1). Скорость реакции в этих условиях на два порядка меньше, чем в присутствии переносчика электрона MB^{2+}. Мы предположили, что низкая эффективность фотообразования H_2 при прямом переносе фотогенерированных электронов от полупроводника к гидрогеназе объясняется электростатическим отталкиванием одноименно заряженных частиц полупроводника и молекул фермента.

Поверхность TiO_2 в зависимости от pH раствора может быть заряжена положительно или отрицательно вследствие амфотерности поверхностных OH-групп. Электрофоретические измерения показали, что изоэлектрическая точка использованного образца TiO_2 фирмы «Fluka» (Швейцария) находится около pH 3,5. Молекулы гидрогеназы в нейтральных растворах также несут избыточный отрицательный заряд; для гидрогеназы *T. roseopersicina* pI≃4,2. Измерение сорбции показало, что гидрогеназа не сорбируется на TiO_2 в воде и растворах сахарозы при

Таблица 1

Фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2, мкл·мин$^{-1}$·мл$^{-1}$

Состав среды	Концентрация гидрогеназы, мг/мл	
	0,0025	0,19
TiO_2	$\leqslant$0,01	$\leqslant$0,01
TiO_2 + Ca^{2+}	$\leqslant$0,01	$\leqslant$0,01
TiO_2 + гидрогеназа	0,02	0,05
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+}*	0,7	1,7
TiO_2 + гидрогеназа + MB^{2+}*	—	3,1
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+} + MB^{2+}	2,0	5,0
Дитионит + MB^{2+} + гидрогеназа **	0,9	2,4

* MB^{2+} (0,5 мМ) и Ca^{2+} (1,2 мМ) добавляли через 20 мин освещения суспензии TiO_2 + + гидрогеназа.

** Опыт проводили без освещения.

pH 7,2. При использовании 0,05 М трис-буфера, pH 7,2, сорбируется не более 8% фермента.

Для того чтобы обеспечить связывание гидрогеназы на TiO_2 и тем самым создать условия для прямого переноса электронов от полупроводника к ферменту, мы предприняли попытки изменить заряд частиц TiO_2, добавляя в суспензию соли одно- и двухвалентных металлов, а также изменяя pH суспензии.

Действие катионов одно- и двухвалентных металлов. Известна способность катионов щелочных и щелочноземельных металлов эффективно сорбироваться на поверхности оксидов и, в частности, на TiO_2 [9, 10]. В наших опытах добавление $CaCl_2$ в миллимолярных концентрациях к суспензии TiO_2 при pH 7,2 приводило к изменению ξ-потенциала частиц с отрицательного на небольшой по величине положительный.

В присутствии $CaCl_2$ обеспечивается сорбция гидрогеназы на частицах полупроводника и наблюдается эффективное фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона (см. рис. 2). 4,7 мМ $CaCl_2$ обеспечивает полную сорбцию гидрогеназы в условиях опытов (см. рис. 2*б*). Сорбция гидрогеназы, стимулированная $CaCl_2$, обратима: фермент, связанный с TiO_2, десорбируется при разбавлении буфером, не содержащим $CaCl_2$.

Скорость фотообразования H_2 достигает максимального значения при 1—2 мМ $CaCl_2$ и становится сравнимой со скоростью реакции в присутствии MB^{2+} (см. табл. 1). Наблюдаемое при концентрациях $CaCl_2 \geqslant \geqslant 4{,}7$ мМ (в условиях полной сорбции фермента) падение скорости фотообразования H_2 можно объяснить коагуляцией частиц полупроводника, сопровождающейся ухудшением фотохимических свойств суспензии, или уменьшением ферментативной активности гидрогеназы в этих условиях.

Концентрация $CaCl_2$ является основным фактором, определяющим скорость безмедиаторного фотообразования H_2 при pH 7,2. При низких концентрациях $CaCl_2$ увеличение концентраций гидрогеназы (рис. 3), трис (рис. 4) или TiO_2 не приводит к достижению высоких скоростей образования H_2, которые можно обеспечить в присутствии оптимальной концентрации $CaCl_2$ (1—2 мМ). При малых концентрациях TiO_2 ($<$15 мг/мл) или гидрогеназы ($<$5 мкг/мл) концентрация $CaCl_2$, необходимая для насыщения реакции, снижается.

Активация фотообразования H_2 хлоридом кальция наблюдается при использовании в качестве донора электрона не только трис, но и сахарозы, дитиотреитола, метанола, а также в отсутствие экзогенных органических доноров электрона. В последнем случае скорость образования H_2 значительно ниже, чем в присутствии доноров электрона, и уменьшается в ходе реакции практически до нуля. $BaCl_2$, подобно $CaCl_2$, ускоряет фотообразование H_2 в десятки раз. Хлориды одновалентных метал-

Рис. 1. Фотообразование H_2 в системе TiO_2 — гидрогеназа. Стрелками указаны добавление $CaCl_2$ (*1* — 0,4 мМ, *2* — 1,6 мМ, *3* — 12,5 мМ) и MB^{2+} (0,5 мМ)

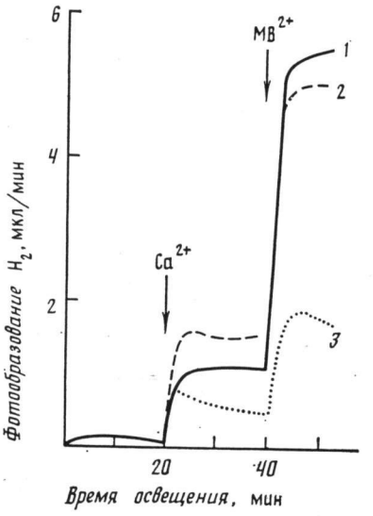


Рис. 1

Рис. 2. Зависимости фотообразования H_2 (*а*) и сорбции гидрогеназы (*б*) от концентрации $CaCl_2$ в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,19 мг/мл, 0,05 М трис, 0,05 М MES, pH 7,2; *1* — в отсутствие MB^{2+}, *2* — в присутствии 0,5 мМ MB^{2+}

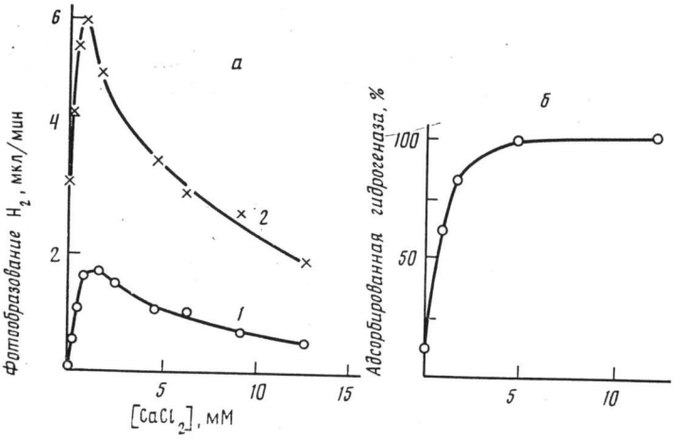


Рис. 2

лов — NaCl, KCl, CsCl — в концентрациях до 30 мМ увеличивают скорость реакции в буфере, содержащем трис, лишь вдвое.

Полученные данные о влиянии солей на фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2 показывают, что активирующее действие соли определяется валентностью и концентрацией катиона и не объясняется влиянием аниона хлора или изменением ионной силы.

Следует отметить, что сорбции гидрогеназы на TiO_2 могло способствовать также уменьшение отрицательного заряда молекул фермента вследствие связывания Ca^{2+} с белком. На наличие такого взаимодействия указывает тот факт, что 5 мМ $CaCl_2$ подавляет способность гидрогеназы (1 мг/мл) сорбироваться на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в 2 раза.

$CaCl_2$ активирует фотообразование H_2 и в том случае, когда в суспензии присутствует MB^{2+}. Однако в присутствии переносчика электрона $CaCl_2$ вызывает увеличение скорости реакции лишь в 2,5 раза, тогда как в отсутствие переносчика — более чем в 30 раз. Очевидно, что активация $CaCl_2$ фотообразования H_2 в присутствии MB^{2+} должна быть связана с активацией одной из следующих стадий: фотовосстановления MB^{2+} на TiO_2 или образования H_2 гидрогеназой при использовании восстановленного MB^{2+}. Мы не обнаружили увеличения скорости фотовосстановления MB^{2+} в суспензиях TiO_2 при добавлении $CaCl_2$ до 5 мМ. Активность гид-

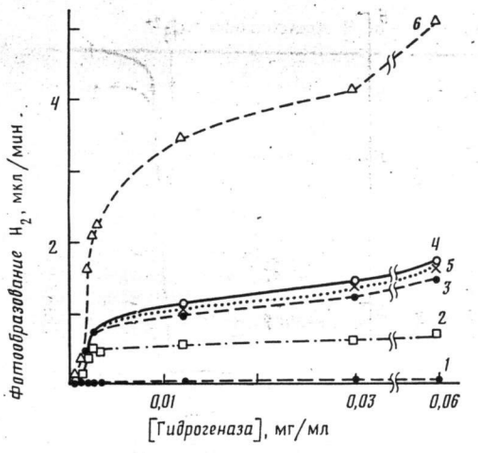


Рис. 3

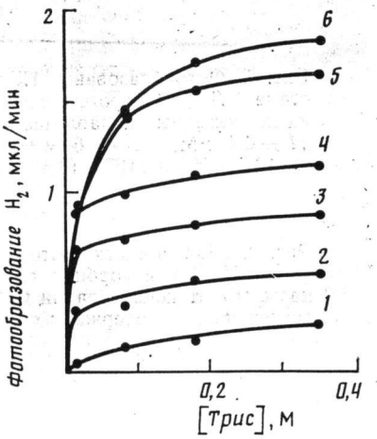


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость фотообразования H_2 от концентрации гидрогеназы в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, 0,05 М трис, 0,05 М MES (pH 7,2) при различных концентрациях $CaCl_2$, мМ: *1* — без $CaCl_2$, *2* — 0,6; *3* — 1,2; *4* — 1,8; *5* — 2,4; *6* — 2,4 мМ $CaCl_2$ и 0,5 мМ MB^{2+}

Рис. 4. Зависимость фотообразования H_2 от концентрации трис в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,10 мг/мл, 0,05 М MES (pH 7,2) при различных концентрациях $CaCl_2$, мМ: *1* — без $CaCl_2$; *2* — 0,68; *3* — 1,35; *4* — 2,0; *5* — 3,3; *6* — 4,6

рогеназы, измеренная по образованию H_2 от восстановленного дитионитом MB^{2+}, в присутствии $CaCl_2$ и TiO_2 также не изменялась. Учитывая эти данные, активирующее действие $CaCl_2$ на фотообразование H_2 в присутствии MB^{2+} можно объяснить увеличением скорости образования H_2 от восстановленного MB^{2+} вследствие повышения локальных концентраций H^+ и MB^+ вблизи поверхности TiO_2. Такое изменение локальных концентраций субстратов гидрогеназы возможно в присутствии $CaCl_2$ из-за изменения поверхностного потенциала TiO_2 на свету.

Влияние pH суспензии. Уменьшение pH суспензии TiO_2 в буфере, содержащем 0,05 М трис и 0,05 М MES, приводит к резкому увеличению сорбции гидрогеназы (рис. 5*б*). При pH 4,5 вся активная гидрогеназа оказывается связанной с поверхностью полупроводника. (MES добавлялся для стабилизации pH в кислой области. Отдельными опытами установлено, что 0,05 М MES практически не влияет на сорбцию гидрогеназы и не увеличивает скорость фотообразования H_2 в присутствии 0,05 М трис.) Сорбция гидрогеназы наблюдалась также при понижении pH менее 4,5 в водных суспензиях TiO_2 в отсутствие трис и MES. Влияние pH на сорбцию гидрогеназы уменьшается в присутствии $CaCl_2$.

Характер зависимости скорости безмедиаторного фотообразования H_2 от pH суспензии аналогичен зависимости для сорбции гидрогеназы (рис. 5*а*). При уменьшении pH от 7,2 до 5,5 скорость фотообразования H_2 в отсутствие $CaCl_2$ повышается более чем в 10 раз. При добавлении $CaCl_2$ влияние pH на фотообразование H_2 уменьшается.

Следует отметить, что с увеличением концентрации трис от 0,05 М до 0,15 М при pH 7,2 сорбция увеличивается от 6 до 20%. Соответственно происходит увеличение скорости безмедиаторного фотообразования H_2 (см. рис. 4). По-видимому, несущие при pH 7,2 положительный заряд молекулы трис (pK 8,1), подобно катионам Ca^{2+}, способны адсорбироваться на частицах TiO_2, снижая их отрицательный заряд и тем самым способствуя сорбции гидрогеназы на поверхности полупроводника. Это предположение подтверждают результаты электрофоретических измерений, показавших, что ξ-потенциал TiO_2 при pH 7,2 в трис-буфере более положителен, чем в воде.

Обращает на себя внимание различный характер зависимостей фотообразования H_2 от концентрации трис в присутствии и в отсутствие $CaCl_2$

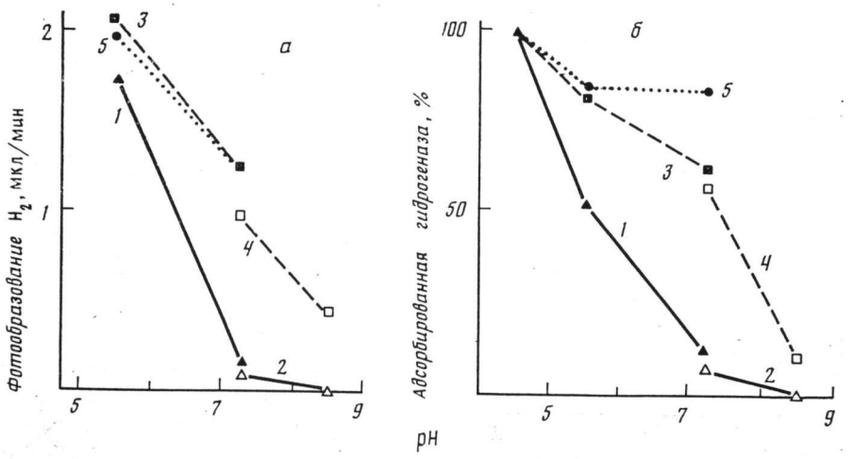


Рис. 5. Влияние pH и концентрации $CaCl_2$ на фотообразование H_2 (*а*) и сорбцию гидрогеназы (*б*) в суспензиях, содержащих TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,19 мг/мл; буфер трис 0,05 М (*2, 4*) или трис 0,05 М и MES 0,05 М (*1, 3, 5*): *1, 2* — без $CaCl_2$; *3, 4* — 0,8 мМ $CaCl_2$; *5* — 1,6 мМ $CaCl_2$

(см. рис. 4). Вероятным объяснением этого различия является то, что в отсутствие $CaCl_2$ трис выполняет функцию не только донора электрона для TiO_2, но также катиона, обеспечивающего сорбцию гидрогеназы на полупроводнике.

Использование различных образцов TiO_2; модифицирование поверхности TiO_2. Как следует из наших результатов, безмедиаторное фотообразование H_2 при использовании суспензий TiO_2 фирмы «Fluka» возможно лишь в условиях, обеспечивающих снижение отрицательного заряда поверхности полупроводника. Представляло интерес исследовать сорбцию гидрогеназы и фотообразование H_2 в суспензиях образцов TiO_2 с другими поверхностными свойствами и другим значением ИЭТ. Мы использовали препарат P25 TiO_2 фирмы «Degussa», имеющий ИЭТ при pH 6,1 [11], а также модифицировали поверхность TiO_2 и P25 TiO_2 обработкой фосфатом или щелочью. Ионы фосфата прочно связываются на поверхности TiO_2, увеличивая ее отрицательный заряд [12]. Обработка TiO_2 щелочью приводит к удалению имеющихся на поверхности примесных неорганических анионов и, таким образом, сдвигает ИЭТ в область более высоких значений pH [12].

Как следует из результатов, представленных в табл. 2, сорбция гидрогеназы на P25 TiO_2 значительно выше, чем на TiO_2 фирмы «Fluka», как в водных суспензиях, так и в трис-буфере. Соответственно фотообразование H_2 в суспензиях P25 TiO_2 в трис-буфере происходит с высокой скоростью в отсутствие $CaCl_2$ (до 1,5 мкл H_2/мин на 1 мл при концентрации полупроводника 12 мг/мл). Добавление $CaCl_2$ приводит к некоторому уменьшению скорости реакции.

Опыты с применением 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,2, показали, что ионы фосфата практически полностью подавляют безмедиаторное

Таблица 2

Адсорбция гидрогеназы *T. roseopersicina* на TiO_2 фирмы «Fluka» и P25 TiO_2 фирмы «Degussa»

Состав среды	Количество сорбированной гидрогеназы, %	
	TiO_2	P25 TiO_2
H_2O	1	65
Трис-буфер, pH 7,2	6	100
Трис-буфер + $CaCl_2$, 5 мМ	100	100
Фосфатный буфер, pH 7,2	0	4

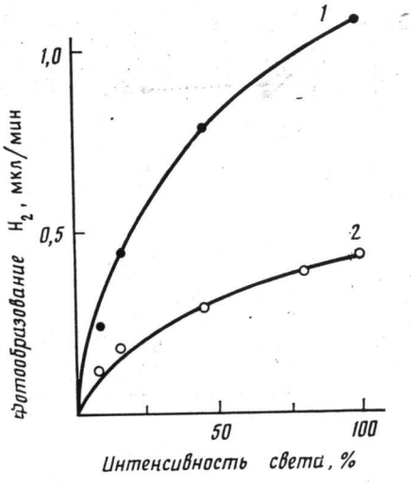


Рис. 6

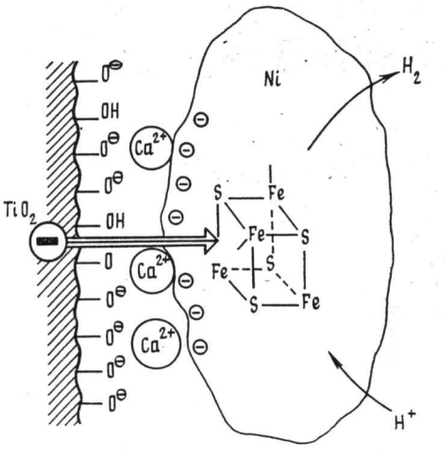


Рис. 7

Рис. 6. Зависимость фотообразования H_2 в суспензии, содержащей TiO_2 33 мг/мл, гидрогеназу 0,19 мг/мл, 1,6 мМ $CaCl_2$ в 0,05 М трис (pH 7,2), от интенсивности света при освещении: *1* — светом ртутной лампы в области 320—800 нм, 100% соответствует $2{,}8 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$; *2* — $\lambda = 365$ нм, 100% соответствует $1 \cdot 10^4$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$

Рис. 7. Гипотетическая схема взаимодействия гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* с TiO_2 в присутствии ионов Ca^{2+}

фотообразование H_2 в суспензии TiO_2 фирмы «Fluka» (донор электрона — 0,05 М сахароза). В то же время, когда TiO_2 сопряжен с ферментом посредством MB^{2+}, ионы фосфата снижают скорость реакции лишь в 1,5—2 раза. При использовании P25 TiO_2 (донор электрона — 10%-ный метанол) скорость фотообразования H_2 в фосфатном буфере также была низкой ($<0{,}01$ мкл H_2/мин на 1 мл суспензии).

Обработка TiO_2 фирмы «Fluka» 0,1 М KOH с последующей отмывкой суспензии увеличивает сорбцию гидрогеназы от 6 до $\sim 50\%$ (при концентрациях TiO_2 33 мг/мл и гидрогеназы 0,19 мг/мл в трис-буфере). Это приводит к увеличению скорости фотообразования H_2 в ~ 10 раз. Добавление $CaCl_2$ обеспечивает дальнейшее повышение скорости реакции, но в меньшей степени, чем в случае необработанного TiO_2.

Таким образом, изменение поверхностного заряда TiO_2 оказывает непосредственное влияние на способность TiO_2 сорбировать гидрогеназу, а также на скорость безмедиаторного фотообразования H_2.

Влияние интенсивности света. Активность гидрогеназы при безмедиаторном фотообразовании H_2. Зависимость скорости фотообразования H_2 в системе трис — TiO_2 — гидрогеназа в присутствии 1,6 мМ $CaCl_2$ от интенсивности света нелинейна (рис. 6). Существенно, что в широком интервале интенсивности света реакция не достигает насыщения. Это свидетельствует об эффективном оттоке электронов из зоны проводимости полупроводника к ферменту в отсутствие переносчика электрона. При интенсивности света $1 \cdot 10^3$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ ($\lambda = 365$ нм) измерен квантовый выход фотообразования H_2 — $\Phi(H) = 9 \pm 0{,}9\%$.

При освещении суспензий TiO_2 светом ртутной лампы в области 320—800 нм интенсивностью $\sim 3 \cdot 10^5$ эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ скорость фотообразования H_2 при безмедиаторном переносе электронов от полупроводника к ферменту близка к скорости образования H_2 от восстановленного дитионитом MB^{2+} (табл. 1). При концентрации гидрогеназы 2,5 мкг/мл удельная активность гидрогеназы, катализирующей фотообразование H_2, практически совпадает с удельной активностью фермента, измеренной в стандартных условиях без освещения.



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2, содержащих донор электрона и гидрогеназу, представляет собой сложный процесс, состоящий из ряда стадий. Среди них можно выделить следующие, оказывающие прямое влияние на эффективность суммарного процесса: поглощение света частицами полупроводника; окисление донора электрона полупроводником, определяющее концентрацию свободных электронов в зоне проводимости; сорбция гидрогеназы на TiO_2, обеспечивающая возможность прямого переноса фотогенерированных электронов; образование H_2 сорбированной гидрогеназой, т. е. ферментативная активность гидрогеназы в условиях опытов.

Результаты настоящей работы показывают, что необходимым условием эффективного фотообразования H_2 при прямом фотоиндуцированном переносе электронов от TiO_2 к бактериальной гидрогеназе является сорбция фермента на поверхности полупроводника. Сорбцию гидрогеназы удается обеспечить двумя способами: добавлением хлоридов щелочноземельных металлов или снижением pH суспензии.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что связывание гидрогеназы на TiO_2 в этих условиях происходит главным образом за счет электростатического взаимодействия фермента с полупроводником. Центрами связывания отрицательно заряженных при $pH > 4{,}2$ молекул гидрогеназы на поверхности TiO_2 могут служить адсорбированные на частицах TiO_2 катионы щелочноземельных металлов или органические катионы (трис) (рис. 7). Сорбции гидрогеназы может способствовать также взаимодействие Ca^{2+} с молекулами белка, приводящее к уменьшению их отрицательного заряда. В кислой области pH возможна сорбция гидрогеназы на положительно заряженных центрах TiO_2, образующихся вследствие протонирования поверхностных гидроксильных групп:

$$\diagup\!\diagdown\text{Ti—OH}^+ + \text{H}^+ \rightleftarrows \diagup\!\diagdown\text{Ti}^+ + \text{H}_2\text{O},$$

$$\diagup\!\diagdown\text{Ti—OH} + \text{H}^+ \rightleftarrows \diagup\!\diagdown\text{Ti—OH}_2^+.$$

Наряду с этим при уменьшении pH происходит протонирование ряда аминокислотных групп молекул гидрогеназы, что обеспечивает возможность их взаимодействия с отрицательно заряженными поверхностными центрами TiO_2.

Следует отметить аналогию в активирующем действии двухвалентных катионов на процесс фотопереноса электронов от неорганического полупроводника, наблюдающемся в нашей работе, и известной из литературы [13, 14] активацией поливалентными катионами электрохимического восстановления ряда белков на гидрофильных электродах.

В противоположность нашему выводу об электростатическом характере взаимодействия гидрогеназы и TiO_2, в работе [5] сорбция бактериальных гидрогеназ на TiO_2 объяснялась образованием водородных связей. Основанием для этого было наблюдение, что максимальная сорбция белков на TiO_2 происходила при pH, близких к их pI. В то же время отмечалось, что обработка 6 М мочевиной приводит к десорбции 50% связанного белка, а 1 М NaCl не вызывает десорбции. Следует отметить, что в этой работе использовались суспензии TiO_2 в фосфатном буфере, молекулы которого, как известно, сильно адсорбируются на поверхности TiO_2 [12]. В работе [15], где детально изучена сорбция альбумина на TiO_2 и гидроксилапатите, обнаружено отличие характера сорбции белка в отсутствие фосфата и в его присутствии: в последнем случае белок адсорбировался на поверхности оксида, покрытой слоем связанного фосфата, и образующаяся связь была слабой. Возможно, с особым характером сорбции гидрогеназы на TiO_2 в присутствии фосфата связан тот факт, что в работе [5] не удалось наблюдать прямой перенос электронов от TiO_2 к адсорбированной гидрогеназе, хотя фермент сохранял активность в реакции с восстановленным MB^{2+}.

В нашей работе сорбированная на TiO_2 гидрогеназа обеспечивает высокую эффективность фотообразования H_2 при прямом переносе электронов, фотогенерированных в зоне проводимости полупроводника, к ферменту; квантовый выход реакции достигает 10%. Максимальная удельная активность сорбированной на TiO_2 гидрогеназы, использующей в качестве субстрата электроны, фотогенерированные в зоне проводимости полупроводника, близка к активности гидрогеназы, использующей в качестве субстрата восстановленный MB^{2+}. Эти данные указывают на высокую эффективность прямого переноса электронов от полупроводника к активному центру сорбированного фермента.

Выражаем глубокую благодарность Ю. А. Ермакову, сотруднику Института электрохимии им. А. Н. Фрумкина АН СССР, за помощь в проведении электрофоретических измерений и обсуждение полученных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Красновский А. А., Брин Г. П., Никандров В. В.*//Докл. АН СССР. 1976. Т. 229. № 4. С. 990—993.
2. *Красновский А. А., Брин Г. П., Луганская А. Н., Никандров В. В.*//Докл. АН СССР. 1979. Т. 249. № 4. С. 896—899.
3. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1981. Т. 256. № 5. С. 1247—1253.
4. *Nikandrov V. V., Brin G. P., Krasnovsky A. A.*//Photobiochem. Photobiophys. 1983. V. 6. № 2. P. 101—107.
5. *Cuendet P., Gratzel M., Rao K. K., Hall D. O.*//Photobiochem. Photobiophys. 1984. V. 7. № 5—6. P. 331—340.
6. *Никандров В. В., Шлык М. А., Зорин Н. А., Гоготов И. Н., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 4. С. 990—994.
7. *Cuendet P., Rao K. K., Gratzel M., Hall D. O.*//Biochimie. 1986. V. 68. № 1. P. 217—221.
8. *Зорин Н. А., Гоготов И. Н.*//Биохимия. 1982. Т. 47. № 5. С. 827—833.
9. *Бобыренко Ю. Я., Пашкова В. И.*//Коллоидн. журн. 1973. Т. 35. № 4. С. 655—659.
10. *Yates D. E., Healy Th. W.*//J. Chem. Soc., Faraday Trans. I. 1980. V. 76. P. 9—18.
11. *Furlong D. N., Wells D., Sasse W. H. F.*//J. Phys. Chem. 1985. V. 89. № 4. P. 625—632.
12. *Miura M., Naono H., Iwaki T.*//J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A-II. 1966. V. 30. № 1—2. P. 57—63.
13. *Armstrong F. A., Hill H. A. O., Oliver B. N., Walton N. J.*//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 104. P. 921—923.
14. *Hill H. A. O.*//Pure and Appl. Chem. 1987. V. 59. № 6. P. 743—748.
15. *Gluekauf E., Patterson L.*//Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 351. № 1. P. 57—76.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
24.XII.1988

M. A. SHLYK, V. V. NIKANDROV, N. A. ZORIN, A. A. KRASNOVSKY

HYDROGEN PRODUCTION DURING THE DIRECT PHOTOINDUCED ELECTRON TRANSFER FROM THE INORGANIC SEMICONDUCTOR TO BACTERIAL HYDROGENASE

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

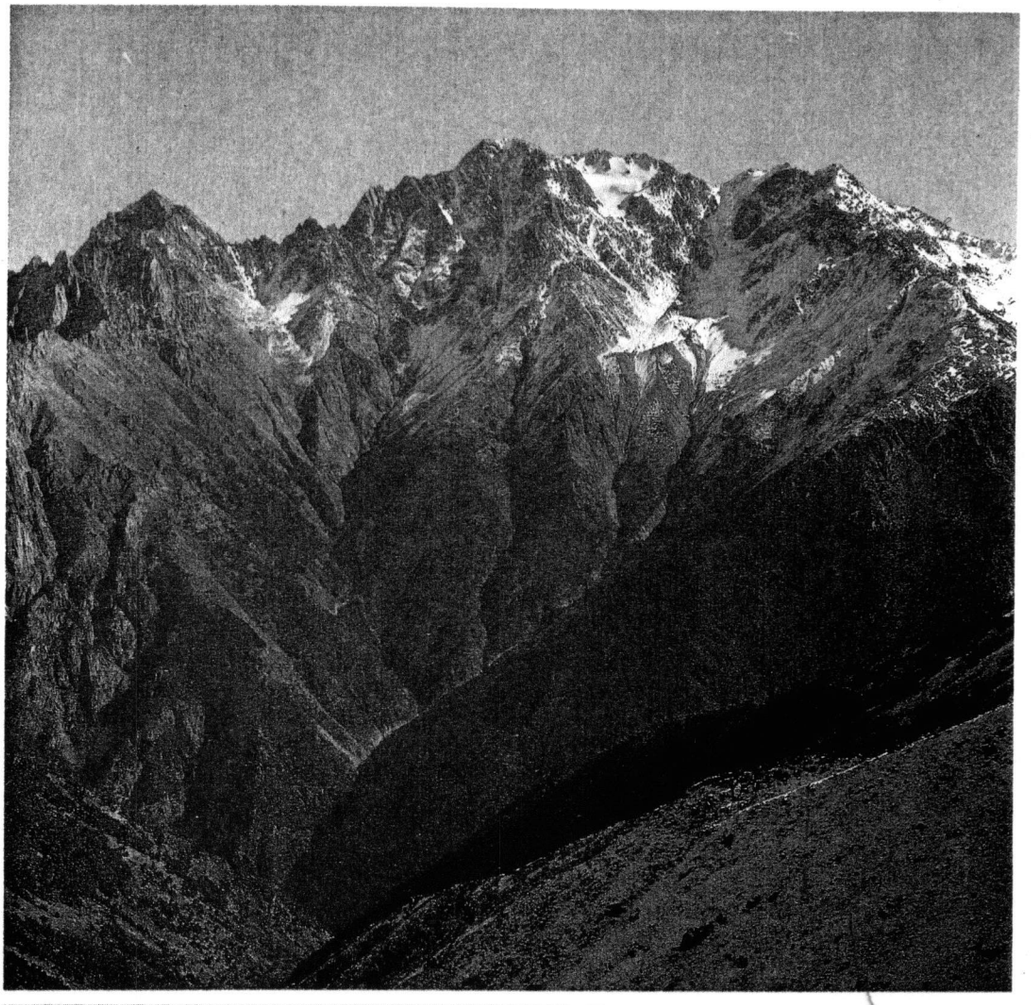
Key words: hydrogen photoproduction, hydrogenase, titanium dioxide, hydrogenase adsorption, electron transfer semiconductor — enzyme active center.

In aqueous suspensions of TiO_2 containing hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* and an organic electron donor, hydrogen photoproduction was observed during the direct electron transfer from the inorganic semiconductor to the enzyme active center. Under the conditions favouring the hydrogenase adsorption on TiO_2, the quantum efficiency of H_2 production reached 10%. The hydrogenase adsorption on TiO_2 can be induced either by decreasing pH of the suspension, or by adding $CaCl_2$ or chlorides of other alkaline-earth metals. Hydrogenase binding to the semiconductor surface is mainly conditioned by electrostatic interactions. The hydrogenase adsorbed on TiO_2 particles is able to effectively use the electrons photogenerated in the conduction band of the semiconductor as a substrate. The rate of H_2 photoproduction during the direct photoinduced electron transfer from TiO_2 to hydrogenase is close to that of H_2 production with dithionite-reduced methyl viologen as an electron donor.

ISSN 0032—874X

ПРИРОДА

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ПОПУЛЯРНЫЙ ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ АКАДЕМИИ НАУК СССР



ДЕКАБРЬ 12 1988

Могли ли ПОЛУПРОВОДНИКИ участвовать в эволюции?

Академик **А. А. Красновский**
В. В. Никандров,
кандидат биологических наук
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР
Москва

МЫ ПОКА не знаем, как возникла жизнь и первичные организмы, способные к самовоспроизведению. Однако, вероятно, что в процессе химической эволюции и последующей биологической имели место различные варианты энергообеспечения и саморепликации. Велика вероятность того, что в этих процессах участвовали компоненты земной коры. Дж. Бернал высказал мысль о возможном участии глинистых минералов в предбиологическом синтезе и репликации макромолекул. Подобные взгляды были затем развиты А. Кейрнс-Смитом[1]. В лаборатории фотобиохимии Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР при исследовании фотохимических свойств неорганических полупроводников получены результаты, позволяющие обосновать участие неорганических компонентов земной коры в преобразовании солнечной энергии в течении химической эволюции и на ранних стадиях биологической эволюции.

Показано, что обладающие свойствами полупроводников окислы титана (TiO_2), цинка (ZnO) и вольфрама (WO_3) под действием ближнего ультрафиолета (300—400 нм) способны к окислению воды, ведущему к образованию молекулярного кислорода и восстановлению акцепторов электрона — соединений окисного железа или бензохинона[2]. Поглощение 100 квантов света частицами полупроводников приводило к образованию одной молекулы кислорода. Стехиометрические соотношения количеств восстановленного акцептора электрона, кислорода и ионов водорода, образующихся в реакции, указывали на то, что кислород выделялся из молекул воды. Впоследствии это положение было доказано в опытах с использованием меченной по кислороду воды (H_2O^{18}).

Было установлено также, что окислы титана и цинка способны при освещении восстанавливать метилвиологен — соединение, имеющее окислительно-восстановительный потенциал, близкий потенциалу водородного электрода, а при наличии в водных суспензиях полупроводников органических доноров электронов (аминов, углеводов, спиртов и др.) — образовывать молекулярный водород[3].

Способность окислов титана и цинка образовывать на свету кислород и водород объясняется тем, что эти полупроводники могут одновременно играть две роли: сенсибилизатора, поглощающего свет и переносящего электрон, и катализатора, на поверхности которого происходит стабилизация первичных активных фотопродуктов с последующим образованием устойчивых соединений. Фотокаталитические свойства неорганических полупроводников могут быть усилены введением катализаторов. Такими катализаторами могут служить как неорганические соединения — платина, окись рутения или марганца, так и биологические макромолекулы — ферменты. Так, введение бактериальной гидрогеназы, способной катализировать реакцию $2H^+ + 2e^- \rightleftarrows H_2$, в суспензию диоксида титана, содержащую органические доноры электронов, приводило к значительной активации выделения водо-

[1] Cairns-Smith A. G. Genetic Takcover and the Mineral Origins of Life. Cambridge. 1982.
[2] Красновский А. А., Брин Г. П. // Докл. АН СССР. 1962. Т. 147. С. 656—659; Krasnovsky A. A. // Origins of Life. 1974. Vol. 5. P. 397—404.
[3] Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 256. С. 1249—1253.

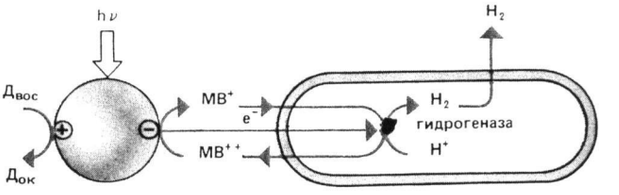


Схема фотообразования водорода при сопряжении неорганического полупроводника с клетками клостридий. Слева — частица полупроводника, справа — клетка клостридий. MB^{++} — метилвиологен, $Д_{вос}$ и $Д_{окис}$ — восстановленный и окисленный доноры электрона соответственно.

рода. В условиях, способствующих адсорбции фермента на поверхности полупроводника, каждый десятый поглощенный квант света вызывал образование одной молекулы водорода[4]. Важно, что сенсибилизированное полупроводниками образование водорода и восстановление акцепторов электрона сопровождалось преобразованием энергии света в потенциальную химическую энергию.

Недавно показана возможность преобразования энергии света при сопряжении полупроводников с бактериальными клетками[5]. При освещении водных суспензий оксидов титана, цинка или сульфида кадмия, содержащих бактерии Clostridium butyricum, доноры электрона и метилвиологен, наблюдалось образование водорода. Реакция протекала в результате совместного действия полупроводников и бактерий: под действием света полупроводники окисляли доноры электронов и восстанавливали метилвиологен, который, благодаря способности проникать сквозь липидные мембраны, переносил электроны от частиц полупроводников к внутриклеточной гидрогеназе, катализирующей образование молекулярного водорода. В ряде случаев в суспензиях диоксида титана наблюдалось эффективное фотообразование водорода в отсутствие переносчика электронов, т. е. при прямом переносе электронов от полупроводника к ферменту, находящемуся внутри бактерий.

Результаты, полученные на модельных системах, позволяют высказать предположение, каким образом неорганические полупроводники могли участвовать в химической и биологической эволюции.

Образование кислорода и окисленных элементов земной коры обычно связывают с возникновением фотосинтеза или фотолизом молекул воды под действием ультрафиолетового излучения Солнца. Учитывая способность неорганических полупроводников к фотоокислению воды, можно предположить, что некоторое количество кислорода могло образоваться при их участии еще до возникновения фотосинтеза.

Согласно гипотезе А. И. Опарина первичные клетки-пробионты и ранние организмы были гетеротрофами, использующими абиогенно образованное органическое вещество. Эта гипотеза допускает наличие в эволюции такого периода, когда истощение «запасов» органических соединений поставило живые существа на грань исчезновения и потребовало использования дополнительных, альтернативных источников энергии: солнечного излучения, восстановленных неорганических соединений и др. На этой «критической стадии развития жизни» (по Э. Брода), когда фотосинтезирующие организмы еще не появились, неорганические полупроводники, способные преобразовывать энергию света в химическую, могли поддержать примитивный метаболизм пробионтов и первичных микроорганизмов. Как показывают опыты по сопряжению двуокиси титана с бактериями, неорганические полупроводники могли обеспечить первичные микроорганизмы активными восстановителями (электронами), генерируемыми при освещении на поверхности полупроводника, и способными непосредственно проникать внутрь бактериальной клетки или с помощью переносчика электронов.

Среди метанобразующих бактерий имеются виды, использующие в качестве единственного источника углерода углекислый газ, а в качестве единственного источника энергии молекулярный водород. Эти бактерии, как известно, относятся к архебактериям, и их «предки», растущие на водороде, существовали, по-видимому, на ранних стадиях биологической эволюции. Поставщиками водорода для таких организмов могли быть неорганические полупроводники, осуществляющие на свету выделение водорода из воды и других соединений.

Эволюционным вариантом перехода от гетеротрофного способа существования к автотрофному могло быть появление организмов, содержащих неорганические фотокатализаторы. И хотя ни у одного из ныне существующих типов организмов неоргани-

[4] Никандров В. В., Шлык М. А., Зорин Н. А., Гоготов И. Н., Красновский А. А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. С. 990—994.

[5] Krasnovsky A. A., Nikandrov V. V. // FEBS Letters. 1987. Vol. 219. P. 93—96.

ческие полупроводники не включены в систему обмена веществ, нельзя исключить возможность такого варианта эволюции (учитывая экспериментальные данные о способности некоторых коллоидных неорганических полупроводников связываться с липидными мембранами). Вероятно, появление организмов, осуществляющих фотосинтез с помощью неорганических фотокатализаторов явилось тупиковой ветвью эволюции. Неорганические полупроводники не выдержали конкуренции с порфиринами, включение которых в метаболизм первичных гетеротрофных организмов привело к современному фотосинтезу.

Таким образом, экспериментальные данные по моделированию первичных процессов эволюции позволяют представить различные варианты включения неорганических полупроводников — компонентов земной коры в энергообеспечение химической и биологической эволюции. Действительно ли неорганические компоненты земной коры энергетически «поддерживали» эволюцию? Ответить на этот вопрос однозначно лишь на основании модельных экспериментов сейчас невозможно. Однако дополнительные доказательства можно, по-видимому, найти в природе. Интересно в этом отношении сообщение о том, что пески пустынь, содержащие диоксид титана, под действием солнечного света катализируют образование аммиака из атмосферного азота[6]. Вероятно, со временем появятся и другие свидетельства участия неорганических компонентов земной коры в преобразовании солнечной энергии на Земле.

[6] Schrauzer G. N. // Chem. Ehg. News. 1978. Vol. 56. P. 7.

НОВОСТИ НАУКИ

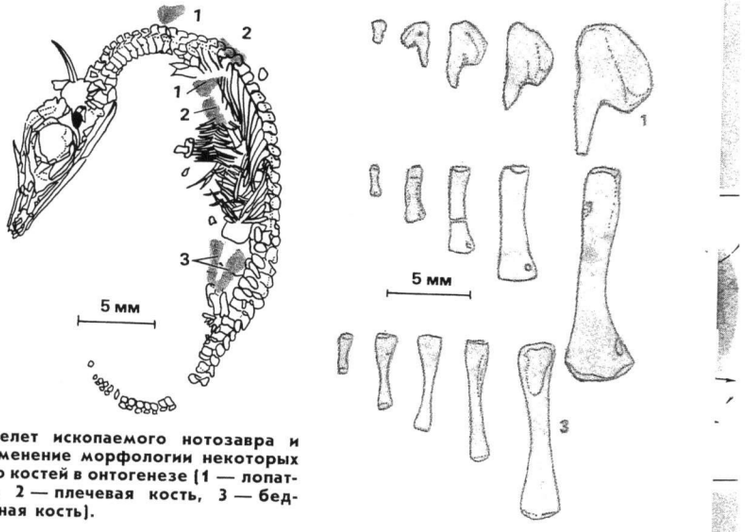
Палеонтология

Эмбрион ископаемого ящера

Целые скелеты ископаемых рептилий встречаются довольно редко, тем более интересна находка в Южных Альпах остатков полностью сформированного эмбриона длиной 51 мм и молодой особи среднетриасового нотозавра (Neusticosaurus sp.). Возраст находки оценивается в 230 млн лет.

П. М. Зандер (P. M. Sander; Музей Палеонтологического института при Цюрихском университете, Швейцария) сравнил найденные скелеты ископаемого эмбриона и молодой особи со скелетами взрослых рептилий, обнаруженных ранее и имевших длину от 23 до 37 см (всего было исследовано 97 ископаемых особей). Впервые удалось проследить морфогенез у ископаемых ящеров и онтогенетические изменения общего строения, отдельных костей и элементов скелета.

Длина ископаемого эмбриона составила всего лишь 22 % от размера взрослой особи, тогда как у современных рептилий эта величина составляет 30 %. В целом же ход онтогенеза ископаемых и современных рептилий (изученный, естественно, на базе скелета) весьма схож.



Скелет ископаемого нотозавра и изменение морфологии некоторых его костей в онтогенезе (1 — лопатка, 2 — плечевая кость, 3 — бедреная кость).

Находка подтверждает гипотезу ряда палеонтологов о том, что уже среди триасовых пресмыкающихся были не только яйцекладущие, но и живородящие формы. Это заметно расширяет наши познания о животном мире далекого прошлого и позволяет восстановить более полную картину его эволюции.

Science. 1988. Vol. 239. Part 1. P. 780—783 (США).

ДОКЛАДЫ
АКАДЕМИИ НАУК СССР

1988

ТОМ 300 № 4

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК

УДК 577.344:541.145:579.852.13

В.В. НИКАНДРОВ, М.А. ШЛЫК, Н.А. ЗОРИН, И.Н. ГОГОТОВ,
академик А.А. КРАСНОВСКИЙ

УСЛОВИЯ ЭФФЕКТИВНОГО ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ОТ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛУПРОВОДНИКА TiO_2 К ГИДРОГЕНАЗЕ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ THIOCAPSA ROSEOPERSICINA

Сопряжение неорганических полупроводников, способных при освещении генерировать электронодонорные и электроноакцепторные центры на границе раздела фаз, с ферментами, обеспечивающими протекание реакций с участием фотогенерированных зарядов, является одним из подходов к созданию фотокаталитических систем, преобразующих солнечную энергию.

В работах нашей лаборатории обнаружено фотообразование водорода в водных суспензиях TiO_2, ZnO, CdS, содержащих доноры электрона, бактериальную гидрогеназу и метилвиологен [1–4]. Была обнаружена также возможность сопряжения TiO_2 с клетками клостридий, содержащими гидрогеназу [5, 6]. В дальнейшем Гретцель с соавторами изучили фотообразование H_2 в подобных системах, когда бактериальные гидрогеназы иммобилизованы на частицах TiO_2 [7, 8]. Недавно описаны фотовосстановление НАД(Ф) и фотосинтез органических кислот и аминокислот в суспензиях полупроводников, содержащих ферменты [9]. В исследованных системах перенос электронов от полупроводника к ферменту осуществлялся с помощью переносчиков электрона – метилвиологена ($МВ^{2+}$), бипиридильных комплексов родия и др.

В суспензиях TiO_2 и ZnO фотообразование H_2 с низкой эффективностью наблюдалось нами и в отсутствие переносчика электрона [1, 3–6], что свидетельствовало о прямом переносе электронов от полупроводника к активному центру фермента. Возможность фотообразования H_2 в отсутствие переносчика электрона в суспензиях TiO_2, содержащих доноры электрона и бактериальные гидрогеназы, подтверждена другими исследователями [8]. Однако остается неясным, может ли быть обеспечено достаточно эффективное преобразование энергии света при безмедиаторном сопряжении полупроводника и фермента.

В данном сообщении описаны условия прямого фотоиндуцированного переноса электронов от частиц TiO_2 к гидрогеназе T. roseopersicina, при которых происходит фотообразование водорода с квантовой эффективностью до 10%.

В опытах использовали дисперсные порошки анатаза TiO_2 фирмы "Fluka" (8,5 $м^2/г$) и P25 TiO_2 фирмы "Degussa" (50 $м^2/г$). Суспензии полупроводников готовили в 0,05 *М* буферном растворе трис-(оксиэтил)-аминометана (трис), pH 7,2, а также в растворах сахарозы, дитиотреитола и 0,05 *М* фосфатного буфера, pH 7,2. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду. Хлориды кальция, бария, натрия, калия, цезия были марки "ос.ч." Гидрогеназу из фототрофных бактерий T. roseopersicina, штамм BBS, выделяли и очищали по методу [10] и добавляли в суспензии в концентрации 0,6 мг белка/мл. Ферментативная активность гидрогеназы при 20 °С составляла 2,4 мкл H_2/мин · мл в реакционной среде следующего состава: гидрогеназа – 0,6 мг белка/мл, $МВ^{2+}$ – $2 \cdot 10^{-3}$ *М*, дитионит натрия – $3 \cdot 10^{-2}$ *М*, 0,05 *М* трис-буфер (pH 7,2).

Для измерения количества образующегося H_2 в стеклянную ячейку помещали 1 мл суспензии полупроводника, содержащей 33 мг TiO_2 или 12 мг P25 TiO_2. Суспензии продували аргоном, после чего при перемешивании освещали лампой ДРШ-250 в области 320–800 нм ($2{,}8 \cdot 10^5$ эрг/$см^2$ · с); через определенные промежутки времени газовую фазу из ячейки подавали на колонку хроматографа.

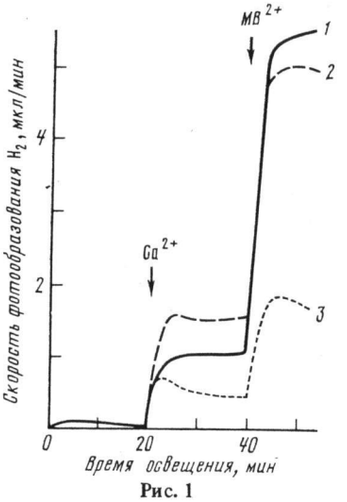


Рис. 1

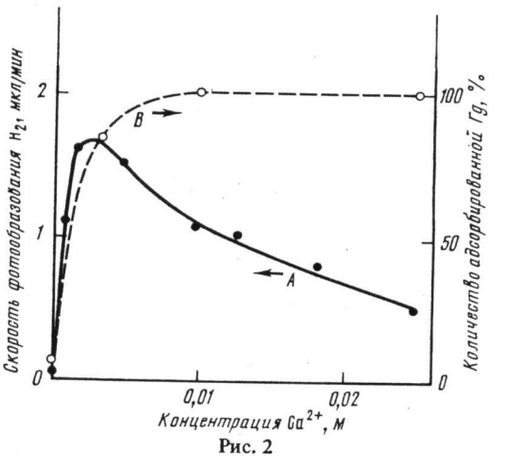


Рис. 2

Рис. 1. Фотообразование H_2 в системе трис–TiO_2–гидрогеназа. Стрелками указаны добавление $CaCl_2$ (*1* – 0,0008 *M*, *2* – 0,0032 *M*, *3* – 0,0248 *M*) и MB^{2+} ($5 \cdot 10^{-4}$ *M*)

Рис. 2. Зависимость скорости фотообразования H_2 (*A*) и количества сорбированной гидрогеназы (Гд) (*B*) от концентрации Ca^{2+} в системе трис–TiO_2–гидрогеназа

Рис. 3. Зависимость фотообразования H_2 в системе трис–TiO_2–гидрогеназа в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ *M* $CaCl_2$ от интенсивности света при освещении: *1* – ртутной лампой в области 320–800 нм, 100% соответствует $2{,}8 \cdot 10^5$ эрг/см^2 · с; *2* – светом с λ = = 365 нм, 100% соответствует $1 \cdot 10^4$ эрг/см^2 · с

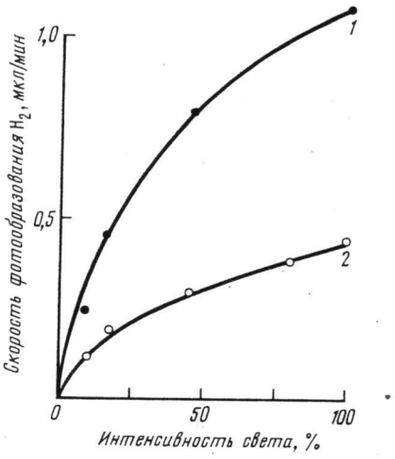


Рис. 3

Интенсивность света измеряли с помощью ферриоксалатного актинометра. Квантовый выход фотообразования H_2 рассчитывали, исходя из предположения о полном поглощении падающего света суспензией полупроводника.

В соответствии с полученными ранее результатами [1], при освещении суспензии TiO_2, содержащей гидрогеназу и трис-буфер как донор электрона, происходит образование H_2 (табл. 1). Однако скорость реакции в этих условиях на два порядка меньше, чем в присутствии переносчика электрона MB^{2+}. Это, по-видимому, объясняется низкой эффективностью прямого переноса фотогенерированных электронов от частиц полупроводника к молекулам фермента.

Мы изучили влияние хлоридов одно- и двухвалентных металлов на фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона. Было обнаружено, что добавление $CaCl_2$ в реакционную среду значительно увеличивает скорость безмедиаторного фотообразования H_2 (рис. 1). Зависимость скорости реакции от концентрации $CaCl_2$ имеет сложный характер (рис. 2). При оптимальной концентрации $CaCl_2$ ($3 \cdot 10^{-3}$ *M*) скорость фотообразования H_2 сравнима с наблюдаемой в присутст-

Таблица 1

Фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2

Состав системы	Скорость фотообразования H_2, мкл/мин · мл
TiO_2 + гидрогеназа	0,05
TiO_2 + гидрогеназа + MB^{2+} *	3,1
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+} *	1,7
TiO_2 + гидрогеназа + Ca^{2+} + MB^{2+}	5,0
TiO_2	0,01
TiO_2 + Ca^{2+}	0,01
дитионит + MB^{2+} + гидрогеназа**	2,4

* MB^{2+} ($5 \cdot 10^{-4}$ *M*) и Ca^{2+} ($3 \cdot 10^{-3}$ *M*) добавляли через 20 мин освещения системы TiO_2 + гидрогеназа.
** Опыт проводили без освещения.

Таблица 2

Адсорбция гидрогеназы T. roseopersicina на TiO_2 и P25 TiO_2

Состав среды	Количество сорбированной гидрогеназы, %	
	TiO_2	P25 TiO_2
H_2O	1	65
Трис-буфер, pH 7,2	6	100
Трис-буфер, pH 7,2 + $CaCl_2$ 0,01 *M*	100	100
Фосфатный буфер, pH 7,2	–	4

вии MB^{2+}, а также со скоростью темнового образования H_2 от восстановленного дитионитом MB^{2+} (табл. 1). Следует отметить, что $CaCl_2$ активирует фотообразование H_2 и в том случае, когда в суспензии присутствует MB^{2+}. Однако в присутствии метилвиологена $CaCl_2$ вызывает увеличение скорости реакции всего в 3 раза, тогда как в отсутствие переносчика электрона – более чем в 30 раз.

Зависимость скорости фотообразования H_2 в системе трис–TiO_2–гидрогеназа в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ *M* $CaCl_2$ от интенсивности света нелинейна (рис. 3). При интенсивности света $1 \cdot 10^4$ эрг/см^2 · с (λ = 365 нм) измерен квантовый выход фотообразования H_2 $\Phi(H) = 9 \pm 0{,}9\%$. Существенно, что в широком интервале интенсивности света реакция не достигает насыщения. Это свидетельствует о достаточно эффективном оттоке электронов из зоны проводимости полупроводника к гидрогеназе в отсутствие переносчика электрона.

Активация фотообразования H_2 хлористым кальцием наблюдается при использовании в качестве донора электрона не только трис-буфера, но и сахарозы, дитиотреитола, метанола, а также в отсутствие экзогенных органических доноров электрона. $BaCl_2$, подобно $CaCl_2$, ускоряет фотообразование H_2 в десятки раз. Хлориды одновалентных металлов – NaCl, KCl, CsCl – в концентрациях до $3 \cdot 10^{-2}$ *M* увеличивают скорость реакции в системе трис–TiO_2–гидрогеназа лишь вдвое.

Полученные данные о влиянии солей на фотообразование H_2 в суспензиях TiO_2 показывают, что активирующее действие соли определяется валентностью и концентрацией катиона и не объясняется изменением ионной силы.

Опыты с применением 0,05 *M* фосфатного буфера (pH 7,2) показали, что ионы фосфата практически полностью подавляют фотообразование H_2 в системе донор электрона (сахароза 0,5 *M*) – TiO_2 – гидрогеназа. В то же время, когда TiO_2 сопряжен с гидрогеназой посредством MB^{2+}, ионы фосфата снижают скорость фотообразования H_2 лишь в 1,5–2 раза.

При использовании другого образца диоксида титана – P25 TiO_2 "Degussa", так же как и TiO_2 "Fluka", в фосфатном буфере, содержащем донор электрона (10% метанол) и гидрогеназу, фотообразование H_2 в отсутствие MB^{2+} происходит с низкой скоростью (< 0,01 мкл H_2/мин · мл). Отличие образца P25 TiO_2 проявляется при проведении реакции в трис-буфере. В системе трис–P25 TiO_2–гидрогеназа обеспечивается высокая скорость фотообразования H_2 (1,0–1,5 мкл H_2/мин · мл). MB^{2+} ускоряет реакцию лишь в 1,5–2 раза, а добавление $CaCl_2$ приводит к некоторому снижению скорости фотообразования H_2.

Из сопоставления результатов, полученных при изучении сорбции гидрогеназы (рис. 2, табл. 2), с данными по фотообразованию H_2 в суспензиях TiO_2 и P25 TiO_2 следует, что эффективное фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона происходит в условиях, которые обеспечивают связывание гидрогеназы с полупроводником. Действительно, как сорбция гидрогеназы на полупроводнике (табл. 2), так и безмедиаторное фотообразование H_2 стимулируются при добавлении трис-буфера к водным суспензиям TiO_2 или P25 TiO_2 и подавляются в присутствии фосфата. В суспензиях TiO_2 в трис-буфере $CaCl_2$ в концентрации до $2 \cdot 10^{-3}$ *M* сходным образом активирует фотообразование H_2 в отсутствие переносчика электрона, и связывание гидрогеназы с полупроводником (рис. 2). Следовательно, активация фотообразования H_2 хлоридом кальция связана с его способностью обеспечивать сорбцию гидрогеназы на TiO_2. Полученные данные пока не позволяют объяснить уменьшение скорости фотообразования H_2 при концентрациях $CaCl_2$ выше $2 \cdot 10^{-3}$ *M*, когда вся гидрогеназа связана с полупроводником. Возможно, что это связано с коагуляцией частиц полупроводника или увеличением ионной силы. Бóльшая эффективность безмедиаторного образования H_2 в суспензиях P25 TiO_2 в трис-буфере, чем в суспензиях TiO_2, объясняется тем, что с частицами P25 TiO_2 в трис-буфере связана вся гидрогеназа, а с частицами TiO_2 – лишь 6%.

Способность TiO_2 сорбировать белки установлена ранее [11, 12]. Показано также, что бактериальные гидрогеназы прочно связываются с TiO_2 [7]. Авторы предположили образование водородных связей между ферментом и поверхностными группами полупроводника [7]. Имеющиеся сведения о свойствах поверхности TiO_2 (см., например, [13]), а также данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что в основе связывания гидрогеназы T. roseopersicina с TiO_2 в условиях наших опытов лежат преимущественно электростатические взаимодействия.

Гидратированная поверхность TiO_2 в зависимости от pH раствора может быть заряжена положительно или отрицательно вследствие амфотерности поверхностных OH-групп. На заряд поверхности TiO_2 влияют такие факторы, как способ получения образца, специфическая адсорбция ионов. Для дисперсий очищенного анатаза изоэлектрическая точка лежит в интервале pH 5,0–7,5 [13, 14]. Промышленные образцы TiO_2 имеют изоэлектрическую точку при pH $\simeq$ 3 вследствие наличия на поверхности прочно связанных анионов фосфата, сульфата и др. [15]. В условиях наших опытов, при pH 7,2, двухвалентные катионы, адсорбируясь на частицах TiO_2, могут значительно уменьшить их отрицательный заряд и, таким образом, обеспечить условия для связывания гидрогеназы, молекулы которой заряжены отрицательно (p*I* $\simeq$ 4,2). Адсорбция гидрогеназы, стимулированная хлоридом кальция, обратима. Гидрогеназа, связанная с частицами TiO_2 в трис-буфере в присутствии $CaCl_2$, десорбируется при ресуспендировании осадка TiO_2

в трис-буфере, не содержащем $CaCl_2$. Это также согласуется с предположением об электростатическом характере взаимодействия фермента и полупроводника. В трис-буфере, молекулы которого при pH 7,2 нейтральны или заряжены положительно, заряд TiO_2 сохраняется или становится более положительным. Подавление адсорбции гидрогеназы на полупроводнике в фосфатном буфере можно объяснить тем, что анионы фосфата способны прочно связываться с поверхностью TiO_2 и увеличивать ее отрицательный заряд.

Различие в свойствах TiO_2 и P25 TiO_2 связано, по-видимому, с различной величиной поверхностного заряда образцов. Кроме того, на высоко гидроксилированной поверхности P25 TiO_2 может содержаться большее количество центров, доступных для взаимодействия с молекулами белка.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности фотообразования H_2 с квантовой эффективностью до 10% при прямом фотоиндуцированном переносе электронов из зоны проводимости TiO_2 к реакционному центру гидрогеназы в условиях, обеспечивающих связывание фермента с частицами полупроводника.

Институт биохимии им. А.Н. Баха
Академии наук СССР, Москва
Институт почвоведения и фотосинтеза
Академии наук СССР, Пущино Московской обл.

Поступило
16 XI 1987

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красновский А.А., Брин Г.П., Никандров В.В.* – ДАН, 1976, т. 229, № 4, с. 990–993. 2. *Красновский А.А., Брин Г.П., Луганская А.Н., Никандров В.В.* – ДАН, 1979, т. 249, № 4, с. 896–899. 3. *Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А.* – ДАН, 1981, т. 256, № 5, с. 1249–1253. 4. *Nikandrov V.V., Brin G.P., Krasnovsky A.A.* – Photobiochem. Photobiophys., 1983, vol. 6, p. 101–107. 5. *Красновский А.А., Никандров В.В., Никифорова С.А.* – ДАН, 1985, т. 285, № 6, с. 1467–1471. 6. *Krasnovsky A.A., Nikandrov V.V.* – FEBS Lett., 1987, vol. 219, № 1, p. 93–96. 7. *Cuendet P., Gratzel M., Rao K.K., Hall D.O.* – Photobiochem. Photobiophys., 1984, vol. 7, p. 331–340. 8. *Cuendet P., Rao K.K., Gratzel M., Hall D.O.* – Biochimie, 1986, vol. 68, № 1, p. 217–221. 9. *Willner I., Mandler D., Maidan R.* – Nouv. J. Chim., 1987, vol. 11, № 2, p. 109–121. 10. *Зорин Н.А., Гоготов И.Н.* – Биохимия, 1982, т. 47, № 5, с. 827–833. 11. *Glueckauf E., Patterson L.* – Biochim. et biophys. acta, 1974, vol. 351, № 1, p. 57–76. 12. *Messing R.A.* – Meth. Enzymol., 1976, vol. 44, p. 148. 13. *Калианасундарам К.* В кн.: Энергетические ресурсы сквозь призму фотохимии и катализа. М.: Мир, 1986, с. 241–287. 14. *Healy T.W., Fuerstenau D.W.* – J. Coll. Sci., 1965, vol. 20, p. 376–386. 15. *Бобыренко Ю.Я.* – Коллоид. журн., 1973, т. 33, № 6, с. 803–806.

В нашей работе сорбированная на TiO_2 гидрогеназа обеспечивает высокую эффективность фотообразования H_2 при прямом переносе электронов, фотогенерированных в зоне проводимости полупроводника, к ферменту; квантовый выход реакции достигает 10%. Максимальная удельная активность сорбированной на TiO_2 гидрогеназы, использующей в качестве субстрата электроны, фотогенерированные в зоне проводимости полупроводника, близка к активности гидрогеназы, использующей в качестве субстрата восстановленный MB^{2+}. Эти данные указывают на высокую эффективность прямого переноса электронов от полупроводника к активному центру сорбированного фермента.

Выражаем глубокую благодарность Ю. А. Ермакову, сотруднику Института электрохимии им. А. Н. Фрумкина АН СССР, за помощь в проведении электрофоретических измерений и обсуждение полученных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Красновский А. А., Брин Г. П., Никандров В. В.*//Докл. АН СССР. 1976. Т. 229. № 4. С. 990—993.
2. *Красновский А. А., Брин Г. П., Луганская А. Н., Никандров В. В.*//Докл. АН СССР. 1979. Т. 249. № 4. С. 896—899.
3. *Никандров В. В., Брин Г. П., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1981. Т. 256. № 5. С. 1247—1253.
4. *Nikandrov V. V., Brin G. P., Krasnovsky A. A.*//Photobiochem. Photobiophys. 1983. V. 6. № 2. P. 101—107.
5. *Cuendet P., Gratzel M., Rao K. K., Hall D. O.*//Photobiochem. Photobiophys. 1984. V. 7. № 5—6. P. 331—340.
6. *Никандров В. В., Шлык М. А., Зорин Н. А., Гоготов И. Н., Красновский А. А.*//Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 4. С. 990—994.
7. *Cuendet P., Rao K. K., Gratzel M., Hall D. O.*//Biochimie. 1986. V. 68. № 1. P. 217—221.
8. *Зорин Н. А., Гоготов И. Н.*//Биохимия. 1982. Т. 47. № 5. С. 827—833.
9. *Бобыренко Ю. Я., Пашкова В. И.*//Коллоидн. журн. 1973. Т. 35. № 4. С. 655—659.
10. *Yates D. E., Healy Th. W.*//J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1980. V. 76. P. 9—18.
11. *Furlong D. N., Wells D., Sasse W. H. F.*//J. Phys. Chem. 1985. V. 89. № 4. P. 625—632.
12. *Miura M., Naono H., Iwaki T.*//J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A-II. 1966. V. 30. № 1—2. P. 57—63.
13. *Armstrong F. A., Hill H. A. O., Oliver B. N., Walton N. J.*//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 104. P. 921—923.
14. *Hill H. A. O.*//Pure and Appl. Chem. 1987. V. 59. № 6. P. 743—748.
15. *Gluekauf E., Patterson L.*//Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 351. № 1. P. 57—76.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
24.XII.1988

M. A. SHLYK, V. V. NIKANDROV, N. A. ZORIN, A. A. KRASNOVSKY

HYDROGEN PRODUCTION DURING THE DIRECT PHOTOINDUCED ELECTRON TRANSFER FROM THE INORGANIC SEMICONDUCTOR TO BACTERIAL HYDROGENASE

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Key words: hydrogen photoproduction, hydrogenase, titanium dioxide, hydrogenase adsorption, electron transfer semiconductor — enzyme active center.

In aqueous suspensions of TiO_2 containing hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* and an organic electron donor, hydrogen photoproduction was observed during the direct electron transfer from the inorganic semiconductor to the enzyme active center. Under the conditions favouring the hydrogenase adsorption on TiO_2, the quantum efficiency of H_2 production reached 10%. The hydrogenase adsorption on TiO_2 can be induced either by decreasing pH of the suspension, or by adding $CaCl_2$ or chlorides of other alkaline-earth metals. Hydrogenase binding to the semiconductor surface is mainly conditioned by electrostatic interactions. The hydrogenase adsorbed on TiO_2 particles is able to effectively use the electrons photogenerated in the conduction band of the semiconductor as a substrate. The rate of H_2 photoproduction during the direct photoinduced electron transfer from TiO_2 to hydrogenase is close to that of H_2 production with dithionite-reduced methyl viologen as an electron donor.

Photosynthesis Research **33**: 177–193, 1992.
© 1992 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

Personal perspective

Excited chlorophyll and related problems*

Alexander A. Krasnovsky
A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, 117071 Moscow, Russia

Received 20 May 1992; accepted 20 May 1992

Key words: chlorophyll photochemistry, hydrogen photoproduction, pheophytin, reaction centres, solar energy conversion, titanium dioxide

Abstract

A historical outline is presented of the primary light energy conversion in photosynthesis studied by our research group. We found that photoexcited chlorophylls, pheophytins and porphyrins are capable of reversible and irreversible oxido-reduction. The mechanism of the photosensitized electron transfer from donor to acceptor molecule is based on the reversible photochemical oxido-reduction of the pigment-sensitizer. This property of the excited pigments is realized in the reaction centres of photosynthetic cells when photooxidation of bacteriochlorophyll(s) or chlorophyll of Photosystem II is coupled to pheophytin reduction leading to the final charge separation.

The studies of the state and function of pigments in the course of chlorophyll biosynthesis in cellular and non-cellular systems revealed different monomeric and aggregated forms of pigments and the phenomenon of self-assembly of various forms of chlorophylls, bacteriochlorophylls and protochlorophylls. The discovery of protochlorophyll photoreduction in non-cellular system allowed the study of the molecular mechanisms of this reaction.

In order to construct models of photosynthetic charge separation, we used inorganic photocatalysts-semiconductors, mainly titanium dioxide, and pigments incorporated into detergent micelles or lipid vesicles. To prevent back reactions we used heterogeneous systems where primary unstable products were spatially separated; coupling of solubilized chlorophylls or semiconductor particles with bacterial hydrogenase led to molecular hydrogen photoproduction. Light excitation of some coenzymes, mainly NADH and NADPH, was considered from the point of view of early events of chemical evolution.

Now we are interested in the creation of photobiochemical systems using principles of photosynthesis for the conversion and storage of solar energy.

I have been invited by Govindjee, the editor of the Historical Corner of Photosynthesis Research, to write the history of my studies in the field of photosynthesis. This proposition agreed with my vague intention to review my past in order to see the future clearer. The elucidation of molecular mechanisms of primary light energy conversion in photosynthesis is the main problem that I have been interested in during my career.

The main line of research was initially to study chlorophyll photochemistry and realize gradual complications of model systems in an effort to mimic the events taking place in biological structures. Another line of research was the reassembly of photosynthetic structures of the cell to understand their functional interaction and coupling. Finally, we came to the study of the primary events of light energy conversion directly in intact photosynthetic structures and cells using sophisticated spectroscopic techniques.

* Written at the invitation of Govindjee.

Like a *Chlorella* cell, our laboratory duplicated several times still preserving the 'mental double helix' necessary for its survival and development (see Bibliography 1983).

The early days

I will now begin with recollections. I was born in Odessa on August 26, 1913. In 1921, may family moved from Odessa to Moscow. There I began to study in the experimental school in the Arbat region of Moscow. In this school, freedom dominated. For instance, being left-handed I was not forced to write with my right hand.

In 1931, after graduating with Chemistry courses, and at the age of 18, I began to work as a chemist at Butyrsky dye factory in Moscow. There I worked till 1936. At the same time I studied at the evening faculty of the Mendeleiev Chemical-Technological Institute from where I graduated in 1937 as a Chemical Engineer. In 1938 I got married to my former classmate Fania Kromysheva who has been my wife and friend ever since.

My diploma work was devoted to the study of the red dye-aluminum-calcium complex of alizarin-(dioxyanthraquinone). At that time I first faced the problem of dye bleaching under the action of light. Then I was invited to be a post-graduate student at the same Institute and the head of the department, Professor Vassily Kiselyov, gave me carte blanche in choosing the theme of my dissertation in the general area of Dye Chemistry and Technology. I had chosen the problem of photosensitizing action of titanium dioxide in connection with the phenomenon of photochemical destruction of dye coatings.

In 1940 I was awarded the candidate degree (Ph.D) in chemistry; my examiner was the outstanding photochemist academician Alexander Nikolaevitch Terenin. Science was his life. He always had his own way in solving complicated scientific problems by simple experimental means. Though Terenin lived and worked in Leningrad and I in Moscow we actively discussed the basic problems of photochemistry. During the war I was involved in chemical defense. In 1942, my son Alexander was born in Siberia.

At the end of the war, Academician A.N. Terenin offered me a doctorate position in the Academy of Sciences of the USSR to study the action of light on biochemical processes. Both of us felt clearly that for the survival of mankind the main problem was not arms race but efficient solar energy conversion in photosynthesis. After a severe heart attack, A.N. Terenin was in a hospital; it was there that he corrected the proofs of his original book 'Photonics of Dyes'. This wonderful book was published immediately after his death, and it was the best memorial of his noble life in science (Terenin 1967).

In 1945, a small research group was organized at the A.N. Bakh Institute of Biochemistry under Terenin's supervision. This group was named later laboratory of photobiochemistry; it still exists. My first associate was Galina Brin and then Vyacheslav Evstigneev. We used laboratory-made equipment for spectroscopy, but in 1946 we were lucky to obtain a Beckman DU spectrophotometer from the USA by way of the Institute of Vitamins. We got it in exchange for an analytical balance; I doubt if it was really a fair exchange.

We used the apparatus as a spectrophotometer and with minor modifications, as a fluorometer. We used Thunberg tubes modified for placement into the cuvette holder of the Beckman DU spectrophotometer. This simple technique allowed us to investigate the action of light under anaerobic conditions. Another instrument used in our research was a Warburg apparatus with the illumination lamp immersed into the bath under the bottom of the vessels.

It seemed to us that the studies of photochemistry of chlorophyll (Chl) and its analogs would allow us to understand the mechanisms of primary energy conversion in photosynthesis and would provide us with an opportunity to construct model systems for the conversion of light energy into chemical energy. In 1948 I was awarded the Doctor of Science Degree presenting a dissertation entitled 'The Study of Photochemical Reactions in Photosynthesis'. In 1962 I was elected the correspondent member of the Academy of Sciences of the USSR, and in 1976 – the full member of the Academy.

Photochemistry of chlorophyll

The photosensitizing action of chlorophyll was observed already in the last century. Edmond Becquerel demonstrated the sensitization of silver bromide by chlorophyll, and the famous Russian botanist Timiriazev in his 1903 Croonian lecture titled 'The cosmic role of plant' demonstrated that the action spectrum of this reaction coincided with the Chl absorbtion spectrum.

It is well known that Edmond Becquerel's son, Henry Becquerel, studied the effect of fluorescent substances, Chl and uranium salts among them, on photographic plate. Having found the effect of uranium on a photographic plate wrapped in a black paper, he discovered radioactivity. Thus, the phenomena of photosensitization by Chl and radioactivity have come from the same cradle. Who would have foreseen a century ago that these phenomena would make the basis for the use of the atomic energy and the biological use of solar energy?

A comprehensive review of the state of the problem and its history was given by Eugene I. Rabinowitch (1945, 1951, 1956) in his classical book 'Photosynthesis' which became the manual in our laboratory. The three volumes of this book were published in English by Interscience Publishers, then translated and published in Russian during 1951–1959 in Moscow by 'Inostrannaya literatura' (Foreign Literature) Publishers.

Photosynthesis begins with absorption of light quantum by chlorophyll molecule. The light-excited molecules initiate a chain of reactions leading in the end to the reduction of carbon dioxide to carbohydrate and the oxidation of water to oxygen.

What happens to Chl under the action of light? This was the problem I was interested in in the first place. Educated as a chemist, I looked for the simplest models to study the process. My education in biochemistry greatly improved when Academician Vladimir Engelhardt invited me to translate into Russian some papers from 'Currents in Biochemical Research' (D. Green Ed, 1946) issued in Russian in 1948. The spatial conjugation of reaction sequence catalysed by enzymes gradually replaced in my mind simple chemistry which I used to treat as a free game of molecules. At that time Chl was too complicated for me. I began with an investigation of spectral and photochemical properties of synthetic pthalocyanins and their magnesium and cuprous complexes.

In the first study (Krasnovsky and Brin 1946), we wanted to elucidate the ability of pthalocyanins to photosensitize the oxidation of ascorbic acid by oxygen in the air. It appeared that water suspensions of all pthalocyanins actively photosensitized ascorbate oxidation, regardless of the nature of the central metal atom. In contrast, the most active was magnesium pthalocyanin when dissolved in organic solvents; this was very similar to Chl in spectral and photochemical characteristics (Krasnovsky and Brin 1947). In these experiments two possibilities were revealed, which we subsequently studied in our group: Photosensitization in the solution with the predominant activity of the monomeric pigment in the triplet excited state, and semiconductor photocatalysis.

The assumptions on the possibility of the oxidative-reductive transformations of Chl in the course of its action were advanced by many researchers in the past. One had to find out in direct experiments whether such transformations really took place. We proposed that Chl photoreduction accompanied by anion radical formation must be more stable in the basic medium, in accordance with Linus Pauling's concept of structure resonance. Indeed, in experiments with ascorbic acid as electron donor in pyridine solution, I could observe reversible chlorophyll photoreduction (Krasnovsky 1948) accompanied with the formation of a red intermediate having absorption maximum at 520 nm reacting reversibly in the dark, with the regeneration of the initial pigment. The same property was intrinsic to all analogs and derivatives of chlorophyll (see review, Krasnovsky 1960). It was the first reversible photochemical reaction of Chl observed in vitro*; thus, it attracted attention (Bannister 1959, Seely and Folkmanis 1964, Scheer and Katz 1974, and many others).

I found that during photooxidation of magnesium pthalocyanin, Chl and bacteriochlorophyll (BChl) by air oxygen or benzoyl peroxide, labile photooxidized compounds were formed,

* Known to us as the Krasnovsky reaction–Govindjee (ed.).

alongside with irreversible oxidation, regenerating Chl after the introduction of the reductant-ascorbic acid (Krasnovsky 1947). Subsequently, we managed to observe a reversible photoxidation of Chl, BChl and their analogs by quinones in viscous alcohol-glycerol media at −70°. The low temperature and viscosity prevented the fast back reaction of the oxidation products. After thawing, the reactions were reversible, with a complete regeneration of the initial pigment (Krasnovsky and Drozdova 1963). In these experiments under stationary illumination, we measured the absorption spectrum of photoxidized and photoreduced intermediates of Chl and its analogs which coincided with flash photolysis measurements. We wanted to see the oxidation-reduction limits within which Chl-photosensitized electron transfer is possible from the donor molecule to that of the acceptor.

In the early nineteen fifties, Melvin Calvin's research group discovered the path of carbon dioxide fixation and all the intermediates involved in the intricate dark enzymatic cyclic processes, now known to many as the Calvin–Benson–Bassham cycle (see Calvin 1989). This cycle that involved the reduction of carbon dioxide required introduction of the reduced pyridine nucleotides and ATP formed in the photochemical processes.

We tried to elucidate the possibility of chlorophyll-photosensitized pyridine nucleotide reduction in the model system: ascorbate-Chl-NAD (nicotinamide adenine dinucleotide). Indeed, under the action of the red light absorbed by Chl we observed NAD photoreduction (Krasnovsky and Brin 1949). Nowadays, we would call this reaction a simple model of photosystem one. Unfortunately, our technique did not allow us to see this reaction in the cells. Two years later (1951), in three laboratories, those of Daniel Arnon, Hans Gaffron and Severo Ochoa the possibility of NADP reduction by chloroplasts was proved, which is the keystone of the photosynthetic electron transfer chain.

We investigated the photochemical electron transfer in different systems by varying the types of electron donors (D) of pigment-sensitizers and of electron acceptors (A). One could expect that the mechanism of these reactions includes the stage of photochemical Chl interaction with electron donors or acceptors and the subsequent dark stage of active intermediates' interaction with molecules of electron donors or acceptors. Various systems of this type were studied in our group (Evstigneev 1968, Krasnovsky 1968, 1972).

Thus, we revealed the possibility of the reversible photoreduction and photoxidation of chlorophyll, bacteriochlorophyll, protochlorophyll, pheophytins and their analogs in the course of the photosensitized reactions (see Fig. 1). In these model reactions in solutions, the primary photoprocesses include formation of triplet (T) states and then that of a pair of cation (+) or anion (−) radicals, whose appearance was measured with the aid of electron spin resonance (ESR).

$$Chl^T + A \rightleftarrows \cdot Chl^+ + \cdot A^-$$

$$Pheo^T + D \rightleftarrows \cdot Pheo^- + \cdot D^+$$

Our measurements were done together with Anna Umrikhina and in collaboration with Lev Kayushin's group in the Institute of Biophysics (1955–1979). In these experiments, the samples were illuminated directly in the cavity of the ESR apparatus (see review, Krasnovsky et al. 1977).

Thus, we proved the validity of our assumption that the excited Chl molecule serves as an uphill electron carrier.

In the homogeneous systems studied, energy storage was insignificant due to the efficient back reactions of the active products formed – the oxidant and the reductant. Therefore, we turned to investigations of these reactions in heterogeneous systems – detergent micelles and liposomes, in order to spatially separate active intermediates.

Such systems were being used and studied by Melvin Calvin, Gordon Tollin, H.T. Tien and others. A peculiarity of our experiments was the introduction of ascorbic acid inside the liposome vesicles, and the use of methyl viologen and its derivatives (having the redox potential close to that of the hydrogen electrode) as terminal electron acceptors in the exterior aqueous phase (Krasnovsky et al. 1982).

In these experiments we introduced into lipsomal membrane bilayer Chl, pheophytin, bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin. Il-

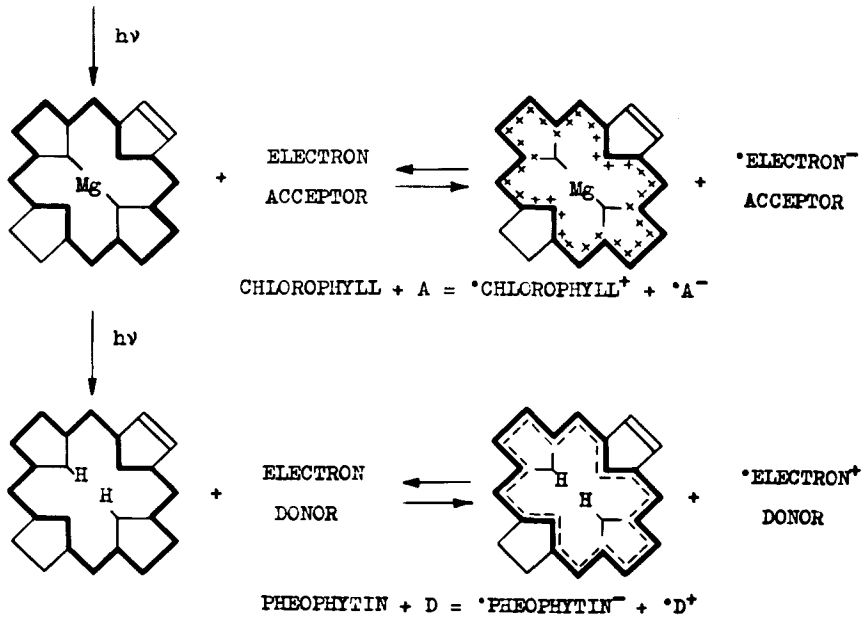


Fig. 1. Reversible photooxidation and photoreduction of chlorophyll and pheophytin.

luminating liposome suspensions with red light, our research group observed in the case of bacteriopheophytin, the reduction of the electron acceptor methyl viologen and its derivatives with an efficiency up to 30% (Semenova et al. 1987a,b). After introduction of the appropriate catalyst into the system (bacterial hydrogenase), we observed molecular hydrogen evolution (Fig. 2). There is no doubt that monomeric pigment molecules in their triplet excited states are active in these cases.

Flash photolysis experiments showed that in the case of bacteriopheophytin the primary event is photoreduction of the pigment in the triplet excited state and the secondary event is electron transfer to methyl viologen. Transmembrane potential greatly affects the charge separation (Nadtochenko et al. 1991). It is not quite clear if the lateral diffusion of pigment molecules in bilayer membrane takes place or if an electron transfer tunneling occurs. In any case, liposomes are a promising model of charge separation in photosynthesis and further studies of the mechanism of this process seem worthwhile. I would like to mention that we studied these reactions mostly in the absence of oxygen; we knew that triplet excited states play other peculiar roles in the photosensitized reactions when molecular oxygen is involved.

In 1976, A.A. Krasnovsky Jr. discovered the

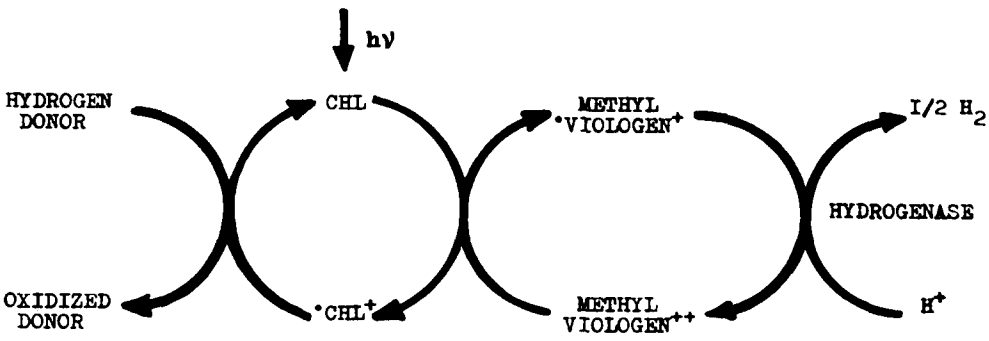


Fig. 2. Scheme of photosensitized methyl viologen reduction.

phenomenon of photosensitized luminescence of singlet oxygen in solutions in the near infrared region (1270 nm) when excited triplet molecules of chlorophyll and its analogs efficiently transfer energy to dioxygen molecules with a quantum yield approaching unity (Krasnovsky Jr. 1976, 1979). This discovery led to the possibility of studying mechanisms of photooxidation by direct spectroscopic techniques being realized in several laboratories.

Already in the beginning of our studies a question had arisen, as to what extent these photochemical Chl reactions in model systems could be realized in chloroplasts and bacterial chromatophores. The next logical step was to study the state of chlorophyll in photosynthetic cells and to integrate information from in vitro studies with in vivo studies.

The state of chlorophyll and its analogs in cells

C. Stacy French at the Carnegie Institute of Washington, applying derivative spectrophotometry, revealed a complicated structure of the chlorophyll absorption bands in the cells (French et al. 1972).

In the measurements performed in the nineteen fifties we observed various absorption maxima in leaves. We used water-infiltrated young leaves to avoid scattering, and a powerful light source in the spectrometer to use as narrow a slit as possible. The best resolution was in the case of transparent thallus of red algae *Phyllophora* (Krasnovsky et al. 1956). We had come to the conclusion that different forms of chlorophyll and its analogs exist in cells (Krasnovsky and Kosobutskaya 1953).

We proposed that the long-wavelength shift of the dominant maximum in Chl absorption of leaves (as compared to that of the dissolved pigment) was due mainly to pigment aggregation, i.e., intermolecular interactions of Chl and its analogs. Similar ideas were developed in Joseph Katz' laboratory (see Katz 1990). We performed a series of experiments on spectral properties of the aggregated Chl forms obtained as solid films by evaporation of pigment solution in vacuo or in the aqueous colloid solutions. It appeared that in solid pigment films all possible variants of intermolecular interactions may be realized at random (Krasnovsky et al. 1953, 1962).

In experiments performed together with Margareta Bystrova (1960–1983), we observed the formation of various long-wavelength pigment forms by treatment of solid films of chlorophylls, bacteriochlorophylls and other pigments with vapours of water, ammonia and some other low molecular weight compounds. These results were good models for the state of pigments in plant cells (Krasnovsky and Bystrova 1980). The most amazing was the behavior of bacteriochlorophylls: Their solid films showed identical absorption spectra to those of bacterial cells having absorption maxima in the red (Krasnovsky et al. 1952) and similar luminescence properties (Krasnovsky et al. 1962). A question arose: How could this phenomenon be consistent with the fact that in vivo pigments exist as pigment–protein complexes. It should be assumed that in protein structures, pigment molecules are located close enough for the interaction with π electron clouds of the system of conjugated double bonds.

In the above cycle of studies we managed to show the spectral identity of the bulk of Chl in chloroplasts and chromatophores of bacteria to the aggregated forms of the pigments. Of course, the role of pigment–protein interactions could, and should, not be denied.

In the nineteen fifties, we had arrived at a hypothesis that in the course of Chl biosynthesis, monomeric Chl must be formed, and during Chl accumulation in thylakoid membrane, aggregation must take place, leading to the appearance of long-wavelength pigment forms.

Based on these assumptions, together with Felix Litvin, we investigated spectral and photochemical properties of Chl during the greening of etiolated leaves (Litvin and Krasnovsky 1957). For luminescence spectrum measurements in the course of the greening process we used the technique of fast freezing of leaves by their immersion in liquid nitrogen. The placement in liquid nitrogen stopped the greening process at any stage, and the measurements of the luminescence spectrum allowed us to observe the properties of pigments in such fixed states. Indeed, at the initial stages of greening, an intermediate with fluorescence maxima at 670–690 nm domi-

nated, and with increased Chl accumulation and the evident greening of the leaf, the fluorescence maxima shifted to 730 nm, which we related to the aggregated pigment forms (Litvin and Krasnovsky 1957).

We revealed in the above studies the transformation of protochlorophyll(-ide) with fluorescence maxima at 655 nm to chlorophyll(-ide) and 'inactive' form with maxima at 630–635 nm. These observations through fluorescence spectroscopy could be correlated with the findings of Kazuo Shibata (1957) made through absorption spectroscopy of greening etiolated leaves. Litvin et al. (1959) discovered chlorophyll precursors in green leaves too. Recently, Nikolai Lebedev, Pavel Shiffel and I (1985) confirmed Litvin et al.'s findings and, using luminescence measurements, observed a similar sequence of protochlorophyllide photoreduction intermediates in green leaves even when an excess of chlorophyll made spectral measurements quite difficult.

Thus, we have managed to observe, in the pigment apparatus of plants, the presence of various Chl forms: aggregated and monomeric, having different spectral and photochemical properties (see review, Krasnovsky 1960, Virgin and French 1973). However, experiments of many research groups showed by far a more complicated picture of biogenesis, where chlorophyll-protein complexes of the light harvesting antenna and reaction centers are formed (Belyaeva and Litvin 1989).

Photobiosynthesis of chlorophyll in non-cellular systems

We tried to achieve photoreduction of protochlorophyll in solutions using ascorbic acid or NADH as electron donor. However, in experiments performed together with Xenia Voynovskaya, Margareta Bystrova, Ferenz Lang and Inna Safronova (see review Krasnovsky et al. 1984) we observed only partial reduction of protochlorophyll to chlorophyll-like compounds. Moreover, the quantum yield of this process was much lower than that in etiolated leaves. In basic media, most of the pigment was reversibly photoreduced to an intermediate having an adsorption maximum at 470 nm (Krasnovsky and Voynovskaya 1949).

With the goal of studying Chl photoformation in the simplest systems, we revealed that cell-free homogenates of the etiolated leaves, prepared in the dark, could under illumination transform protochlorophyll(-ide) to chlorophyll(-ide) (Krasnovsky and Kosobutskaya 1952). However, no further accumulation of the aggregated pigment forms took place here. These experiments allowed us to study protochlorophyllide photoreduction in non-cellular systems.

Different forms of protochlorophyll(ide) with fluorescence maxima at 623, 640 and 655 nm were revealed in our experiments and their photochemical activities were studied; by centrifugation it was possible to achieve partial separation of these forms in different subcellular structures (Krasnovsky et al. 1961). Probably, in Chl photobiosynthesis the triplet-excited state of protochlorophyllide may be active. Actually, protochlorophyllide phosphorescence in leaves, as well as the ability of this pigment to generate singlet oxygen efficiently, has been observed (see Krasnovsky Jr. et al. 1977, and Krasnovsky Jr., 1982).

The question of the nature of the various chlorophyll-protein complexes formed in the course of biosynthesis was developed in many other laboratories while we concentrated, mainly, on the spectral and photochemical properties of pigments formed during greening.

Reaction centers

For a long time we have been interested in the question of pheophytin participation in the primary processes of photosynthesis. Alongside with the magnesium complexes (i.e., chlorophylls) we have always studied the photochemistry of pheophytins. Pheophytins have a more pronounced ability to be photoreduced while chlorophylls can be more easily photooxidized. During pigment extraction from green leaves, small amounts of pheophytin were detected by researchers in our group as well as elsewhere. Pheophytin, thus observed, has usually been considered to be artifact.

Roderick Clayton and coworkers were the first to isolate reactions centers from chromatophores of photosynthetic bacteria. They found, alongside with bacteriochlorophyll, a comparable amount of bacteriopheophytin there (see his excellent personal perspective in the Historical Corner of Photosynthesis Research) (Clayton 1988).

In 1970, at the Institute of Photosynthesis in Pushchino (Moscow Region), I organized a research group for the study of photochemistry of Chl and analogs in photosynthetic reaction centers. The members of the group were my former postgraduate students, Vladimir Shuvalov and Vyacheslav Klimov, among others.

In 1975, Leslie Dutton's and William Parson's research groups in the USA applied picosecond spectroscopy to the investigation of the primary electron transfer in the isolated reaction centers of photosynthetic bacteria (Kaufmann et al. 1975, Rockley et al. 1975). With the aid of picosecond laser technique the participation of bacteriopheophytin in the minichain of electron transfer was determined. (I would like to mention that the ability of bacteriopheophytin to be reversibly photoreduced was discovered long ago by Krasnovsky and Voynovskaya 1951.) At the Institute of Spectroscopy of the USSR Academy of Sciences, this picosecond technique was already developed. Thus, it became necessary to coordinate the efforts of the two groups for further understanding of the reaction centers.

Shuvalov et al. (1978) succeeded in the determination of the sequence of electron transfer in the reaction centers isolated from *Rhodopseudomonas viridis* within the picosecond range. It was shown in these studies that bacteriochlorophyll photooxidation was coupled to the photoreduction of bacteriopheophytin and then ubiquinone. These events occur in the picosecond time scale. In the case of stationary illumination, photoreduction of bacteriopheophytin in chromatophores had been observed by Klimov et al. (1976).

Naturally, we had asked the question: to what extent can one observe pheophytin participation not only in bacterial reaction centers, but in that of Photosystems 1 and 2? In membrane particles enriched with Photosystem 2 reaction centers we could observe photoreduction of pheophytin coupled to photooxidation of chlorophyll (Klimov et al. 1977; see review, Klimov and Krasnovsky 1981). This concept is now generally accepted (Fig. 3). Quite recently, the research groups of Govindjee, Mike Seibert and Mike Wasielewski succeeded in measuring, in the reaction centers of Photosystem 2, the time of 3 picoseconds for the electron transfer from chlorophyll P680 to pheophytin (Wasielewski et al. 1989a, b).

I would like to mention that Navassard Karapetyan et al. (1971) observed Chl a fluorescence induction in chloroplasts when highly reductive media was created. Here quinone was fully reduced and an electron carrier with oxido-reduction potential near hydrogen electrode probably existed; spectral measurements performed some years later have shown that it was really pheophytin.

Thus, pheophytin was found to be an intermediate electron carrier in the reaction centers of photosynthetic bacteria and of Photosystem 2. This led to the hypothesis of evolutionary proximity of both types of reaction centres. The differences between the two are, however, obvious and dramatic. Only the redox potential of the reaction center of Photosystem 2 is oxidizing enough to oxidize water to molecular oxygen.

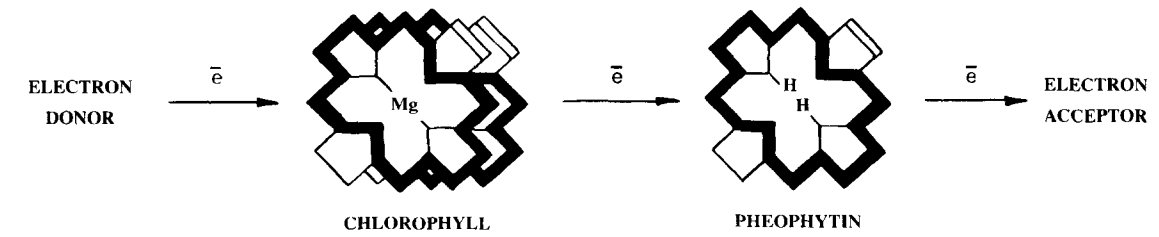


Fig. 3. Primary electron transfer between chlorophyll and pheophytin.

The details of the coupling of the one-electron transfer from Chl to Pheo and four-electron water oxidation so far present one of the mysteries of photosynthesis to be solved.

The situation was different in the case of Photosystem 1, where the reaction center P700 was discovered by Kok (1957). There Pheo reduction was not observed; the role of pheophytin was played, in this case, by a unique form of Chl according to the picosecond absorption measurements of Govindjee and coworkers (Fenton et al. 1979, Wasielewski et al. 1987) and of Shuvalov et al. (1979).

Thus, the ability of Chl and Pheo to engage in reversible oxidative-reductive phototransformation, discovered in the early work of our laboratory, is actually realized in photosynthetic reaction centers. It is peculiar that in the reaction centers singlet exited state of pigment dimer is active, however. The use of singlets allows for a faster and more efficient photochemistry instead of the triplets in solution (see review, Shuvalov and Krasnovsky 1981).

Hydrogen evolution

Gaffron and Rubin (1942) discovered that when an inert gas is passed through suspensions of unicellular algae, hydrogen is evolved instead of oxygen. Most likely, hydrogenase is activated, under anaerobic conditions, by the reduced compounds which probably are the terminal electron acceptors in Photosystem 1. Gest and Kamen (1949) discovered hydrogen evolution by photosynthetic bacteria. We studied hydrogen generation by cells of the green alga *Chlorella* and confirmed that inhibition of Photosystem 2 stimulates hydrogen photogeneration, the quantum yield reaching 20%, according to Oshchepkov and Krasnovsky (1974). Probably, no storage of light energy occurs because here the endogenous organic compounds are used as electron donors.

Arnon et al. (1961) discovered that isolated chloroplasts coupled with hydrogenase, obtained from bacteria, can evolve hydrogen. We found that the combination of dithiothreitol and ascorbate as electron donors greatly increased the efficiency of hydrogen evolution in this system (Krasnovsky et al. 1980). A question arose whether isolated chloroplasts could evolve hydrogen without exogenous hydrogenase addition. Such possibility was mentioned in the early work of Boichenko (1946). Actually, it was possible to observe hydrogen evolution without exogenous hydrogenase, albeit with a very low yield (Maltzev and Krasnovsky 1982). Moreover, recently hydrogen evolution has been detected by illumination of Photosystem 2 particles (in press). The mechanism of this phenomenon and its relevance to reactions in vivo remains to be ascertained.

The question arose, whether it was possible to observe hydrogen evolution in the simplest systems, namely, in solutions of Chl coupled with the hydrogenase isolated from bacteria. We performed such experiments (Krasnovsky et al. 1975, 1976, 1980), using chlorophyll solubilized in water with detergent Triton X-100, and hydrogenase, isolated from photosynthetic bacteria or *Clostridia* cells. Ascorbate or SH-compounds were used as electron donors and methyl viologen as a 'relay'. Illumination with red light, absorbed by Chl, led to photosensitized hydrogen gas evolution. In the case of chlorophyll or pheophytin incorporated into liposomes we observed the same effect. Thus, we succeeded in having a very simple chlorophyll-containing system capable of hydrogen photoevolution (see review, Krasnovsky 1979).

Inorganic photocatalysts – semiconductors; models of charge separation

The experience of my early years in dealing with inorganic semiconductors – photocatalysis helped me to introduce them into photosynthesis research as model of reaction centers. Under the action of light, an electron is transferred from the valence zone to the conductivity one and charge carriers diffuse to the surface of the semiconductor particle thus leading to a local surface separation of an electron and electron vacancy, a hole. In our early studies (1939–1940) TiO_2 appeared to be an efficient photosensitizer of the oxidative processes.

We managed to perform an experiment that we called the 'Inorganic model of Hill reaction' (Krasnovsky and Brin 1962). We used TiO_2,

ZnO, WO_3 illuminated with a 365 nm mercury line. In water suspensions of semiconductor particles and dissolved ferric compounds or *p*-benzoquinone (used as an electron acceptor), we managed to detect oxygen photogeneration with the maximal quantum yield reaching 3%. Formation of ferrous compounds and, respectively, the release of hydrogen ions stoichiometrically corresponded to the oxygen molecule evolved (see review, Krasnovsky and Brin 1978). In the experiments conducted in collaboration with researchers at the Institute of Chemical Physics (using ^{18}O-labelled water), it was shown that in these reactions oxygen was actually evolved from water molecules (Fomin et al. 1973).

In anaerobic suspensions of TiO_2 we observed that hydrogen evolution was enhanced by the presence of various electron donors (Krasnovsky et al. 1976). When methyl viologen was used as an electron acceptor, we observed a photosensitized methyl viologen photoreduction, and in the presence of an appropriate catalyst (bacterial hydrogenase) the evolution of molecular hydrogen (Krasnovsky and Brin 1973, Krasnovsky et al. 1976) (See Fig. 4.). Michael Gratzel has described a number of systems of hydrogen photoproduction; these systems use colloidal TiO_2 and inorganic catalysts (for a review, see Gratzel 1983).

In the above-mentioned experiments, direct electron transfer took place or methyl viologen served as intermediate electron carriers from semiconductor particles to hydrogenase. A question arose on the efficiency of a direct electron transfer at the interface of the semiconductor with the hydrogenase without the intermediate

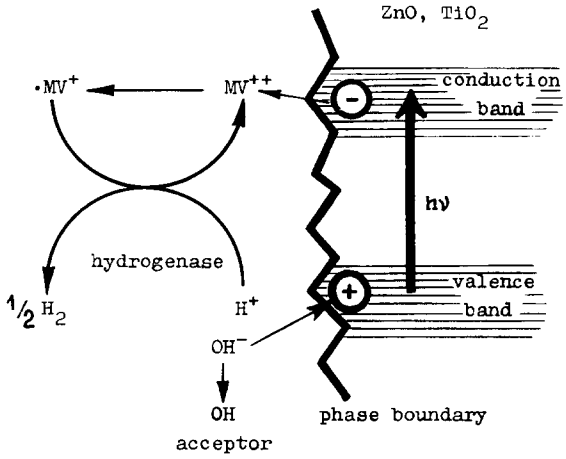


Fig. 4. Hydrogen photoevolution on the TiO_2 surface.

'relay'-electron carrier. In the experiments of Vitaly Nikandrov et al. (1988) and Shlyk et al. (1989), direct electron transfer from titanium dioxide to the absorbed hydrogenase appeared to be realized with a high quantum yield (up to 20%), Tris-buffer being used as electron donor to fill the hole.

Titanium dioxide absorbs light in the near-ultraviolet spectral region (the boundary line is at 400 nm); it seemed important to use in these systems the photocatalysts absorbing in the visible spectral region. We used cadmium sulfide (CdS) which absorbs light up to 600 nm; after coupling of this system with bacterial hydrogenase, hydrogen photogeneration was also achieved (Krasnovsky et al. 1979). Direct electron transfer from CdS to hydrogenase was observed too (Nikandrov et al. 1991).

Recently, we observed the possibility of cou-

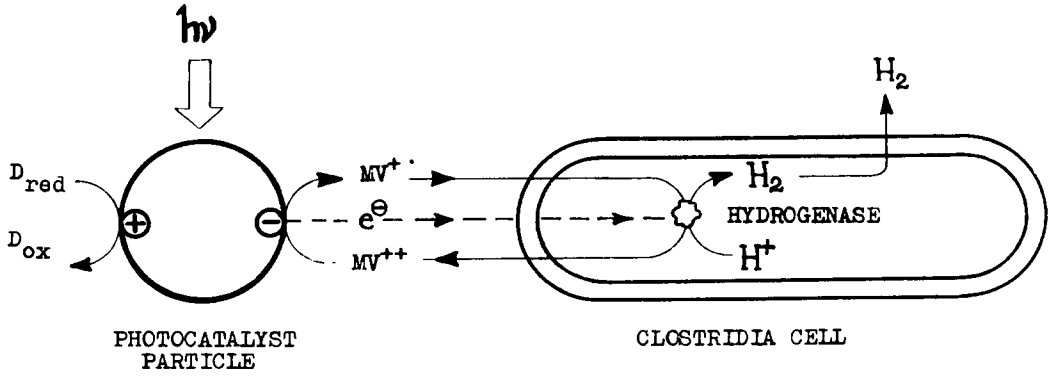


Fig. 5. Hydrogen photoproduction in the system: electron donors – TiO_2 – *Clostridia* cells.

pling of TiO_2 particles with *Clostridia* cells (via reversibly photoreduced methyl viologen) which can diffuse through cell walls to the hydrogenase localized inside *Clostridia* cells leading to hydrogen photoproduction with quantum yield of up to 10% (Krasnovsky and Nikandrov 1987) (see Fig. 5). Here the electron vacancy was filled with an electron of the organic molecule-Tris buffer.

It should be noted that Schrauser and Guth (1977) observed dinitrogen photoreduction with a low quantum yield on the surface of TiO_2. Recently, we modified these experiments in the system: titanium dioxide-nitrogen-acetaldehyde and could observe amino acid photosynthesis with an extremely low quantum yield, about 10^{-6} (Krasnovsky et al. 1989).

Involvement into origin of life problems

The photocatalytic reactions described above may be regarded as models of the primary photobiological processes at the early stages of chemical and biological evolution. It may be assumed that the inorganic components of the Earth's crust in some cases could be no less active photosensitizers than the porphyrins. The diversity of the photocatalytic reactions involving electron transfer, formation of hydrogen, oxygen and various reduced and oxidized compounds suggest a possible use of the inorganic components of the primary cells. However, in the now existing organisms there are no photocatalysts of this kind; maybe, these reactions were the blind alleys of evolution. In the studies of Mars' surface, a possible photocatalytic action of ferrous oxides, predominating on the surface of this planet, should be taken into account.

In 1957, Academician Alexander Ivanovitch Oparin, a pioneer in the field of the Origin of Life (the last Russian edition of his book was in 1967) and then the Director of the A.N. Bakh Institute of Biochemistry, organized in Moscow an International Symposium on the Origin of Life. Participation in the Symposium enhanced my interest in the problem. According to Oparin (1957), the primary cells were the heterotrophic ones, so the role of the photochemically active substances may be played by coenzymes, involved in dark enzymatic reactions. No doubt that porphyrins appeared as the main photoreceptors of photoautotrophic cells.

Analysing photochemical properties of various photoreceptors including porphyrins, we paid attention to cytochromes, flavines and pyridine nucleotides, in particular to their reduced forms having absorption maxima at 340 nm (UVA region). All these coenzymes are activated under the action of light. In a series of studies performed in our group, we revealed that reduced pyridine nucleotides, when excited at their absorption maxima, were capable of undergoing a number of photochemical reactions, including free radical formation and hydrogen photoproduction (Krasnovsky and Brin 1963, Nikandrov et al. 1978, Umrikhina et al. 1990). Under the action of UVA light on hydrogen metabolism of the *Clostridia*, photoactivation of hydrogen production by these organisms was observed probably as a result of NADH photoactivation (Zhukova et al. 1980).

Cytochromes, like other iron-porphyrin complexes, possess very low photochemical activity. However, illumination of the oxidized forms of cytochrome *c* under anaerobic conditions leads to some photoreduction. Also, oxidation of the reduced cytochromes by oxygen was observed (Krasnovsky and Voynovskaya 1956). In water solutions of the detergent-solubilized Chl, an active photosensitized oxidation and reduction of cytochromes was observed, activated by flavins and quinones (Krasnovsky and Mikhailova 1970). Nikandrov et al. (1986) discovered that an extremely active photosensitizer was deazaflavine, isolated from methanogenic bacteria.

Involved in a vast sphere of problems connected with the origin and early evolution of life, I realized how many ideas and solutions depend on the application of various methods and results of photochemical and photophysical studies. These problems were considered in the process of my participation in the International Society on the Origin of Life (ISSOL) and my communications with several outstanding scientists engaged in this interdisciplinary sphere of science. Based on studies of inorganic and organic photosensitizers, I have proposed a hypothesis on the evolution of uphill electron transfer in photosynthesis (Krasnovsky 1974, 1976, 1981). I will not discuss it here.

Epilogue

In 1958 I was for the first time abroad being included in the Soviet delegation to the International Biochemical Congress held in Vienna. In 1959 I was invited as a plenary lecturer at the International Botanical Congress in Montreal being included in the delegation of the Academy of Sciences of the USSR. There, I had the pleasure of meeting my distinguished colleagues: Eugene Rabinowitch, Alexis Moyse, Melvin Calvin, Stacy French, Martin Gibbs, Daniel Arnon, Laurence Bogorad and many others whom I had known earlier only through their publications. In 1961 Prof Hiroshi Tamiya and I organized a symposium on photosynthesis at the International Biochemical Congress held in Moscow. Among the participants were many distinguished colleagues from abroad: Hans Gaffron, Bessel Kok, Govindjee, Martin Kamen, Horst Witt, Andrew Benson and others.

In 1968 I was invited as a plenary lecturer at the first International Congress on Photosynthesis held in Freudenstadt (Germany) where I reviewed the work done in my group in a lecture 'Principles of light energy conversion in photosynthesis' (Krasnovsky 1969). Personal contacts with colleagues greatly enhanced my scientific imagination and I had the feeling that I was not a lonely island in the ocean of science. I mention here only my first participations in International Scientific events as they left lasting impressions on me.

Since 1954 I have been delivering lectures on photobiology at Moscow University. This has allowed me to attract student interests in problems of photosynthesis and photobiology. During these long years about sixty post-graduate students obtained their candidate and doctor of Science degree under my supervision, many of them have become leading scientists in the studies of various problems of photobiology. The sphere of teaching was always attractive to me, giving sometimes deep satisfaction not fully dependent on my age and state.

For ten years – from 1976 up to 1987 – I served as editor-in-chief of the journal 'Biofisica' (Biophysics) which really diminished my research productivity during that period.

No doubt, it was impossible to study in detail all the diversity of problems which appeared during my intensive fifty-years of pilot research in a rather small research group. Inevitably, my post-graduates and co-workers in the course of their scientific development were leaving my group, and starting their own independent research groups and laboratories at various Institutes and Universities. This was source of pride and satisfaction to me.

Being interested in all the problems listed above, I now consider that my main scientific interest is in the creation of an efficient model system that would convert solar energy based on the principles of photosynthesis. The problem is to find photosensitizers capable of efficient charge separation under the action of solar radiation and to avoid back reactions and intercrossing of the pathways of the electrons and holes in the functioning of the artificial electron transfer chains. I think that the search of photobiochemical systems capable not only of solar energy conversion but also of long-term energy storage presents a scientific issue extremely important for the future of mankind in order to solve the problems of energy and food that the world faces.

Govindjee asked me to mention the motivation of the work done and the experience that could be useful for the young people who are beginners in science. The main motive is probably a deep interest in the research which is the best way of the realization of human individuality. Sometimes science is a good shelter to survive in the heavy storms of contemporary life. As the real scientific work takes most of our energies, it is a very difficult compromise between science and private life that one has to face every day during one's life. There is no general approach to solve this problem.

Acknowledgements

I am extremely grateful to my students, coworkers and colleagues for the pleasure of scientific interactions and interrelations during many, many years. I highly appreciate Professor Govindjee who actually stimulated me to write this perspective and thoroughly criticized and edited the first version of this manuscript.

References

Arnon DI, Mitsui A and Paneque A (1961) Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation. Science 134: 1425–1429

Bannister TT (1959) Photoreduction of chlorophyll *a* in the presence of ascorbic acid in pyridine solutions. Plant Physiol 34: 246–254

Belyaeva OB and Litvin FF (1989) Photobiosynthesis of Chlorophyll. Moscow Univ Publ, Moscow

Bibliography of the Scientists of the USSR, Academy of Sciences of the USSR (1983) Alexander Abramovitch Krasnovsky, pp 1–103, Foreward by Academica A-I. Oparin. Nauka Publ. Moscow

Boichenko EA (1946) Hydrogen evolution by isolated chloroplasts. Dokl AN SSSR 52: 525–529

Calvin M (1989) Forty years of photosynthesis and related activities. Photosynth Res 21: 3–16

Clayton RK (1988) Memories of many happy lives. Photosynth Res 19: 207–224

Currents in Biochemical Research (1946) Green D (ed) Interscience Publ, New York

Evstigneev VB (1968) The study of chlorophyll photosensitized oxido-reduction by electrometric methods. In: Neporent BS (ed) Elementary Photoprocesses in Molecules, pp 184–200. Plenum Press, New York

Fenton JM, Pellin MJ, Govindjee and Kaufmann KJ (1979) Primary photochemistry of the reaction center of Photosystem I. FEBS Lett 100–104

Fomin GV, Brin GP, Genkin MV, Ljubimova AK, Blumenfeld LA and Krasnovsky AA (1973) Mass-spectrometric study of water molecule splitting in the system inorganic photosensitizer–electron acceptor. Dokl AN SSSR 212: 424–427

French CS, Brown JS and Lawrence MC (1972) Four universal forms of chlorophyll *a*. Plant Physiol 49: 421–429

Gaffron H and Rubin J (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. J Gen Physiol 26: 219–240

Gest H and Kamen MD (1949) Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. Science 109: 558–559

Gratzel M (1983) Artificial photosynthesis. In: Braun AM (ed) Photochemical Conversions. Press Polytechnique Romandes, Lausanne

Karapetyan NV, Klimov VV, Krakhmaleva IN and Krasnovsky AA (1971) Fluorescence induction of chloroplasts and chromatophores in reductive media. Dokl AN SSSR 201: 1244–1247

Katz JJ (1990) Green thoughts in a green shade. Photosynth Res 26: 143–160

Kaufman KJ, Dutton PL, Netzel TL, Leigh JS and Rentzepis PM (1975) Picosecond kinetics of events leading to reaction center bacteriochlorophyll oxidation. Science 188: 1301–1303

Klimov VV and Krasnovsky AA (1981) Pheophytin as primary electron acceptor in Photosystem II reaction centers. Photosynthetica 15: 592–609

Klimov VV, Shuvalov VA, Krakhmaleva IN, Karapetyan NV and Krasnovsky AA (1976) Change in fluorescence yield of bacteriochlorophyll at photoreduction of bacteriopheophytin in chromatophores of purple sulphur bacteria. Biokhimia (in Russian) 41: 1435–1441

Klimov VV, Klevanik AV, Shuvalov VA and Krasnovsky AA (1977) Reduction of pheophytin in the primary light reaction of Photosystem II. FEBS Lett 82: 183–186

Kok B (1957) Light-induced absorption changes in photosynthetic organisms. Acta Bot Neerl 6: 316–336

Krasnovsky AA (1947) Photochemical oxidation of magnesium pthalocyanine and chlorophyll. Dokl AN SSSR 58: 617–620

Krasnovsky AA (1948) Reversible photochemical reduction of chlorophyll by ascrobic acid. Dokl AN SSR 60: 421–424

Krasnovsky AA (1960) The primary processes of photosynthesis in plants. Ann Rev Plant Physiol 11: 363–410

Krasnovsky AA (1968) Photochemistry of chlorophyll and its analogs. In : Neporent BS (ed) Elementary Photoprocesses in Molecules, pp 163–183. Plenum Press, New York

Krasnovsky AA (1969) The principles of light energy conversion in photosynthesis: photochemistry of chlorophyll and the state of pigments in organisms. In: Metzner H (ed) Progress in Photosynthesis Research, pp 709–727. Tübingen

Krasnovsky AA (1972) The fragments of the photosynthetic electron transfer chain in model system. Biophys J 12: 749–763

Krasnovsky AA (1974) Pathways of chemical evolution in photosynthesis. Origins of Life 5: 397–404

Krasnovsky AA (1976) Chemical evolution of photosynthesis. Origins of Life 7: 133–143

Krasnovsky AA (1979) Photoproduction of hydrogen in photosynthetic and artificial systems. In: Barber J (ed) Topics in Photosynthesis, Vol 3, Photo-Synthesis in Relation to Model Systems, pp 282–295. Elsevier

Krasnovsky AA (1981) Evolution of uphill electron transfer. Biosystems 14: 81–87

Krasnovsky AA and Brin GP (1946) Catalytic and photosensitized oxidation of ascorbic acid by pthalocyanines. Dokl AN SSSR 53: 447–450

Krasnovsky AA and Brin GP (1947) Photosensitizing action of magnesium pthalocyanine and chlorophyll in solution. Dokl AN SSSR 58: 1087–1090

Krasnovsky AA and Brin GP (1949) Hydrogen transfer from ascorbic acid to codehydrase I under action of light absorbed by chlorophyll. Dokl AN SSSR 67: 325–328

Krasnovsky AA and Brin GP (1962) Inorganic models of Hill reaction. Dokl AN SSSR 147: 656–659

Krasnovsky AA and Brin GP (1963) Participation of reduced pyridine nucleotides in photochemical oxido-reductions. Dokl AN SSSR 153: 721–724

Krasnovsky AA and Brin GP (1973) Photoreduction of methylviologen photosensitized by inorganic semiconductors. Dokl AN SSSR 213: 1431–1434

Krasnovsky AA and Brin GP (1978) Photosensitization by titanium dioxide and zinc oxide: oxygen and hydrogen evolution. In: Metzner H (ed) Photosynthetic Oxygen Evolution, pp 405–410. Academic Press, London

Krasnovsky AA and Bystrova MI (1980) Self-assembly of chlorophyll-aggregated structures. Biosystems 12: 181–194

Krasnovsky AA and Drozdova NN (1963) Reversible photochemical interaction of chlorophyll, bacteriochlorophyll and bacterioviridin with quinone and oxygen in ethylalcohol-glycerol media. Dokl AN SSSR 150: 1378–1381

Krasnovsky AA and Kosobutskaya LM (1952) Spectral study of the state of chlorophyll in the course of its formation in plants and colloid solutions of the matter of the etiolated leaves. Dokl AN SSSR 85: 389–392

Krasnovsky AA and Kosobutskaya LM (1953) Various forms of chlorophyll in leaves. Dokl AN SSSR 91: 343–346

Krasnovsky AA and Mikhailova ES (1970) Chlorophyll-photosensitized transformations of cytochrome *c*, activation by flavine coenzymes. Dokl AN SSSR 194: 1441–1444

Krasnovsky AA and Nikandrov VV (1987) The photobiocatalytic system: Inorganic semiconductors coupled to bacterial cells. FEBS Lett 219: 93–96

Krasnovsky AA and Voynovskaya KK (1949) Photochemical properties of protochlorophyll. Dokl AN SSSR 66: 663–666

Krasnovsky AA and Voynovskaya KK (1951) Reversbile photooxidation and photoreduction of bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin. Dokl AN SSSR 81: 879–882

Krasnovsky AA and Voynovskaya KK (1956) Action of light on oxido-reduction of cytochrome and sensitization of these reactions by chlorophyll and bacteriochlorophyll. Biofizica (Russ) I: 120–126

Krasnovsky AA, Voynovskaya KK, Kosobutskaya LM (1952) On the state of bacteriochlorophyll in vivo in connection with spectral properties of its colloids and solid films. Dokl AN SSSR 85: 389–392

Krasnovsky AA, Kosobutskaya LM, Voynovskaya KK (1953) Active and inactive forms of protochlorophyll, chlorophyll and bacteriochlorophyll in photosynthetic organisms. Dokl AN SSSR 92: 1201–1204

Krasnovsky AA, Nesterovskaya EA and Goldenberg AE (1956) Spectral study of the state of chlorophyll in red algae *Phyllophora*. Biofizika (Russ) 1: 328–333

Krasnovsky AA, Bystrova MI and Sorokina AD (1961) Separation of different pigment forms in homogenates of etiolated and greening leaves. Dokl AN SSSR 136: 1227–1230

Krasnovsky AA, Erokhin YuE and Hun Yui Zun (1962) Fluorescence of aggregated forms of bacteriochlorophyll, bacterioviridin and chlorophyll in connection to the state of pigments in photosensitizing organisms. Dokl AN SSSR 143: 456–459

Krasnovsky AA, Brin GP and Nikandrov VV (1975) Hydrogen photoevolution in chlorophyll solutions. Dokl AN SSSR 229: 711–713

Krasnovsky AA, Brin GP and Nikandrov VV (1976) Photoreduction of oxygen and photoproduction of hydrogen on inorganic photocatalysts. Dokl AN SSSR 229: 990–993

Krasnovsky AA, Umrikhina AV and Bublichenko NV (1977) Free radicals in photochemical reactions of chlorophyll and analogs. In: Spectroscopy of the Molecular Photoconversions, pp 106–131. Nauka Publ. (in Russian), Moscow

Krasnovsky AA, Brin GP, Luganskaya AN and Nikandrov VV (1979) Photosensitization of redox reactions by cadmium sulphide. Dokl AN SSSR 249: 898–899

Krasnovsky AA, Chan Van Ni, Nikandrov VV and Brin GP (1980) Efficiency of hydrogen photoproduction by chloroplast-bacterial hydrogenase systems. Plant Physiol 66: 925–930

Krasnovsky AA, Semenova AN and Nikandrov VV (1982) Chlorophyll-containing liposomes, photoreduction of methylviologen and photoproduction of hydrogen. Dokl AN SSSR 262: 469–472

Krasnovsky AA, Bystrova MI and Safronova IA (1984) Photochemical reduction of protochlorophyllide in detergent micelles with the final chlorophyllide formation. In: Sironval C and Brours M (eds) Protochlorophyllide Reduction and Greening, pp 331–340. Nijhoff MWJ Publ, Dordrecht

Krasnovsky AA, Pavlovskaya TE and Telegina AN (1989) Photoreduction of molecular nitrogen on TiO_2: possibility of aminoacids formation. Dokl AN SSSR 308: 1258–1261

Krasnovsky AA Jr (1976) Photosensitized luminescence of singlet oxygen in solution. Biofizica (in Russian) 21: 748–749

Krasnovsky AA Jr (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions. Photochem Photobiol 29: 29–36

Krasnovsky AA Jr. (1982) Delayed fluorescence and phosphorescence of plant pigments. Photochem Photobiol 36: 733–741

Krasnovsky AA Jr, Lebedev NN and Litvin FF (1977) Phosphorescence of chlorophyll and its precursors. Stud Biophysica 65: 81–89

Lebedev NN, Siffel P and Krasnovsky AA (1985) Detection of protochlorophyllide forms in irradiated green leaves and chloroplasts by difference fluorescence spectroscopy at 77 K. Photosynthetica 19: 183–185

Litvin FF and Krasnovsky AA (1957) The study of intermediates of chlorophyll synthesis in etiolated leaves by measurement of their fluorescence spectra. Dokl AN SSSR 117: 106–109

Litvin FF, Rikhireva GT and Krasnovsky AA (1959) Transformation of protochlorophyll in green leaves. Dokl AN SSSR 127: 699–761

Maltsev SV and Krasnovsky AA (1982) Hydrogen evolution and absorption by isolated chlorophyll. Physiol Rast (in Russian) 29: 951–958

Nadtochenko VV, Lavrentyev AI, Rubtosv IR, Denisov NN, Barannikova YaV, Nikandrov VV and Krasnovsky AA (1991) Effect of transmembrane potential on charge photoseparation in liposomes. Photochem Photobiol 53: 261–269

Nikandrov VV, Brin GP and Krasnovksy AA (1978) Light activation of NADH and NADPH. Biokhimiya (Russ) 43: 636–645

Nikandrov VV, Brin GP and Krasnovsky AA (1983) Titanium dioxide as photocatalyst in hydrogen production. Photobiochem Photobiophys 6: 101–107

Nikandrov VV, Pantskhava ES and Krasnovsky AA (1986) Photochemical properties of deazaflavin coenzyme F420: sensitization of NAD photoreduction and hydrogen photoevolution. Photobiochem Photobiophys 13: 105–114

Nikandrov VV, Shlyk MA, Zorin NA, Gogotov IN and Krasnovsky AA (1988) Efficient photoinduced electron transfer from TiO_2 to bacterial hydrogenase. FEBS Lett 234: 111–114

Nikandrov VV, Aristarkhov AI, Shlyk MA and Krasnovsky

AA (1991) Hydrogen photoproduction as a result of direct electron transfer from CdS to hydrogenase. Dokl AN SSSR 319: 242–245

Oparin AI (1957) Origin of Life on the Earth. (in Russian) Academy of Sciences Publ, Moscow

Oshchepkov VP and Krasnovsky AA (1974) Photoproduction of molecular hydrogen by Chlorella: action spectra. Physiol Rast (in Russian) 21: 462–467

Rabinowitch EI (1945) Photosynthesis and Related Processes, Vol 1. Interscience Publ, New York

Rabinowitch EI (1951) Photosynthesis and Related Processes, Vol 2, 1. Interscience Publ, New York

Rabinowitch EI (1956) Photosynthesis and Related Processes. Vol 2, 2. Interscience Publ, New York

Rockley MG, Windsor WW, Cogdell RI and Parson WW (1975) Picosecond detection of an intermediate in the photochemical reaction of bacterial photosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2251–2253

Scheer H and Katz JJ (1974) Structure of the Krasnovsky photoreduction product of chlorophyll *a*. Proc Natl Acad Sci USA 71: 1626–1629

Schrauser GN and Guth TD (1977) Photolysis of water and photoreduction of nitrogen on titanium dioxide. J Amer Chem Soc 99N 2: 7189–7193

Seely GR and Folkmanis A (1964) Photoreduction of ethylchlorophyllide by ascorbic acid in ethanol-pyridine solutions. J Amer Chem Soc 86: 2763–2770

Semenova AN, Barannikova Ya V, Nikandrov VV and Krasnovsky AA (1987a) Conditions for the efficient photoinduced transmembrane electron transfer in chlorophyll- and pheophytin-containing liposomes. Biolog Membr (in Russian) 4: 448–557

Semenova AN, Nikandrov VV and Krasnovsky AA (1987b) Photoinduced electron transfer in pheophytin-containing liposomes. J Photochem Photobiol B I: 85–91

Shibata K (1957) Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. J Biochem (Tokyo) 44, 3: 147–173

Shlyk MA, Nikandrov VV, Zorin NA and Krasnovsky AA (1989) Formation of hydrogen in direct electron transport from an inorganic semiconductor to bacterial hydrogenase. Biokhimiya (in Russian) 54: 1598–1606

Shuvalov VA, Ke B, Dolan (1979) Kinetics and spectral properties of intermediary electron acceptor in Photosystem I. FEBS Lett 100: 5–9

Shuvalov VA and Krasnovsky AA (1981) Photochemical electron transfer in reaction centers of photosynthesis. Biofizika (in Russian) 26: 544–557

Shuvalov VA, Klevanik AV, Sharkov AV, Matveetz YA and Krukov PG (1978) Picosecond detection of bacteriochlorophyll-800 as an intermediate electron carrier between P870 and bacteriopheophytin in *R. rubrum* reaction centers. FEBS Lett 91: 135–139

Terenin AN (1967) Photonics of Dye Molecules. (Russ) Nauka Publ, Leningrad

Umrikhina AV, Luganskaya AN and Krasnovsky AA (1990) ESR signals of NADH and NADPH under illumination. FEBS Lett 260: 294–296

Virgin HI and French CS (1973) The light-induced protochlorophyll-chlorophyll transformations and the succeeding interconversions of the different forms of chlorophyll. Plant Physiol 28: 350–357

Wasielewski MR, Fenton JM and Govindjee (1987) The rate of formation of $P700^{+}$-A_0^{-} in Photosystem I particles from spinach as measured by picosecond transient absorption spectroscopy. Photosynth Res 12: 181–190

Wasielewski MR, Johnson DG, Seibert M and Govindjee (1989a) Determination of the primary charge separation rate in isolated Photosystem II reaction centers with 500-fs time resolution. Proc Natl Acad Sci USA 89: 524–528

Wasielewski MR, Johnson DG, Govindjee, Preston C and Seibert M (1989b) Determination of the primary charge separation rate in Photosystem II reaction centers at 15 K. Photosynth Res 22: 89–99

Zhukova LV, Nikandrov VV and Krasnovsky AA (1980) Action of light on the hydrogen evolution by Clostridium butyricum. Biofizika (in Russian) 25: 1095–1096